



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LAURA MELISSA GALVIS ZAMBRANO

**EFEITO DA APLICAÇÃO LOCAL DE CURCUMIN NANOPARTICULADO EM MODELO
DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDO POR LPS**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LAURA MELISSA GALVIS ZAMBRANO

**EFEITO DA APLICAÇÃO LOCAL DE CURCUMIN NANOPARTICULADO EM MODELO
DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDO POR LPS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de concentração – Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. Carlos Rossa Junior.*

Araraquara

2016

LAURA MELISSA GALVIS ZAMBRANO

EFEITO DA APLICAÇÃO LOCAL DE CURCUMIN
NANOPARTICULADO EM MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR LPS

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau do mestre

Presidente e orientador Carlos Rossa Junior

2º Examinador Prof. Dra. Daniela Leal Zandim- Barcelos

3º Examinador Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum

Araraquara, 07 de dezembro de 2016

Galvis Zambrano, Laura Melissa

Efeito da aplicação local de curcumin nanoparticulado em modelo de doença periodontal experimental induzido por LPS / Laura Melissa Galvis Zambrano.--

Araraquara: [s.n.], 2016

68 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

1. Doenças periodontais 2. Curcumina 3. Inflamação
4. Reabsorção óssea. I. Título

Ficha

DADOS CURRICULARES

Laura Melissa Galvis Zambrano

- Nascimento** 13 de fevereiro de 1987- Bucaramanga,
Santander, Colombia.
- Filiação** Marco Alonso Galvis Camargo
Martha Azucena Zambrano Jimenez
- 2004-2010** Graduação em Odontologia
Universidade Santo Tomás de Aquino
- 2015-2017** Pós-Graduação em Periodontia
Nível mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista- UNESP

Ao todo poderoso por que ele permite que as coisas aconteçam.

A meu filho **Daniel Santiago** que é a maior motivação na minha vida, nunca desistir, não olhar atrás.

Aos meus pais, **Martha e Marco** que de alguma forma me deram apoio e forças para continuar sempre na frente, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À Família Florez Salamanca pelo apoio recebido durante este tempo.

Ao Professor **Carlos Rossa junior** pela aceitação e oportunidade de pesquisa e trabalho.

Aos Companheiros por todos os momentos, paciência, ajuda e conselhos e aos irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Carlos Rossa Junior por permitir minha entrada no programa da Pósgraduação, agradeço a paciência, a partilha de conhecimento e os ensinamentos para a vida.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional. Não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

Ao programa de sustento económico (CAPES), pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

A esta Universidade, direção e administração que oportunizaram a janela de onde hoje vislumbro um horizonte superior, trilhado pela confiança no mérito e ética aqui presentes.

Para llegar al momento de la realización es preciso atravesar el desierto de los años estériles.

Rebindranath Tagore

Galvis Zambrano LM. Aplicação local de curcumin nanoparticulado em modelo de doença periodontal experimental induzido por LPS. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Curcumin é a denominação coletiva do composto extraído das raízes da planta herbácea *Curcuma longa*. A literatura reporta múltiplas atividades biológicas do curcumin, incluindo potente atividade anti-inflamatória. Estudos in vitro e in vivo demonstram que a administração de curcumin reduz a inflamação e destruição tecidual associadas à doença periodontal. No entanto, a maioria dos estudos in vivo administra o curcumin por via oral, o que pode limitar os efeitos deste composto devido à sua hidrofobicidade, baixa absorção no trato gastrointestinal e reduzida meia-vida plasmática. Estas limitações farmacodinâmicas induziram a busca de veículos alternativos para favorecer a biodisponibilidade e atividade biológica do curcumin. O presente estudo foi concebido como um trabalho de prova de princípio visando avaliar o efeito biológico da administração local de curcumin veiculado em nanopartículas, considerando a natureza sítio-específica da doença periodontal e as pobres propriedades farmacodinâmicas do curcumin. Dezesesseis ratos Holtzman foram divididos em dois grupos de 8 animais, segundo a indução de doença periodontal experimental por meio de injeções bilaterais de LPS (3 μ L, 10 mg/mL) ou do mesmo volume do veículo PBS (pH 7,4) como controle. Estas injeções foram realizadas no tecido gengival palatino adjacente aos primeiros molares superiores 3vezes/semana durante 4 semanas. Injeções de nanopartículas contendo curcumin (50 mg/mL, 3 μ L/injeção) ou do mesmo volume do veículo de nanopartículas sem curcumin foram realizadas de forma contra-lateral (lado esquerdo: nanocurcumin, lado direito: veículo) nos mesmos sítios em todos os animais, 2vezes/semana durante as 4 semanas. A administração local do nanocurcumin reduziu a reabsorção óssea inflamatória, avaliada por μ CT e por análise macroscópica. Esta redução foi acompanhada por significativa diminuição do número de osteoclastos e de células inflamatórias nos tecidos em que foi injetado LPS e nanocurcumin em comparação aos tecidos em que foi injetado LPS e veículo de nanopartículas. Também observamos marcante atenuação da ativação das vias de sinalização p38 MAPK e NF- κ B nos tecidos gengivais injetados com o nanocurcumin. Conclui-se que a administração local de nanocurcumin veiculado em nanopartículas inibe a reabsorção óssea e a inflamação associadas ao modelo de doença periodontal induzido por injeções de LPS.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Curcumina. Inflamação. Reabsorção óssea.

Galvis Zambrano LM. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Curcumin is the collective denomination of the compound extracted from the rhizomes of *Curcuma longa* herbal plant. There is evidence indicating that curcumin has multiple biological activities, including potent anti-inflammatory properties. Both in vitro and in vivo studies demonstrate that curcumin may attenuate inflammation and the connective tissue destruction associated with periodontal disease. However, most of the in vivo studies uses an oral systemic administration route, which is limited by curcumin's hydrophobicity, poor absorption rate in the gastrointestinal tract and reduced half-life in the plasma. These pharmacodynamic limitations prompted the search for alternative vehicles to enhance the bioavailability and biological activity of curcumin. This proof of principle study was designed to assess the biological effect of the local administration of curcumin in a nanoparticle vehicle on experimental periodontal disease, considering the site-specific nature of periodontal disease and also the poor pharmacodynamic properties of curcumin. Sixteen 16 Holtzman rats were divided into two groups of 8 animals according to the induction of experimental periodontal disease by bilateral injections of LPS (3 μ L of a 10mg/mL solution) or of the vehicle control (3 μ L of PBS, pH 7.4) directly into the gingival tissues adjacent to the palatal aspect of the upper first molars 3time/week for 4 weeks. The same volume of curcumin-loaded nanoparticles (50 mg/mL) or of nanoparticle vehicle were injected into the same sites 2time/week. μ CT and macroscopic analysis showed that local administration of curcumin inhibited inflammatory bone resorption. Histomorphometric analysis indicated a significant decrease in the number of osteoclasts and inflammatory cells in the diseased gingival tissues injected with nanocurcumin in comparison with the diseased gingival tissues injected with nanoparticle vehicle. Also, western blot analysis showed a marked attenuation in the activation of p38 MAPK and NF- κ B. It is concluded that local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibited inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease.

Keywords: Periodontics diseases. Curcumin. Inflammation. Bone resorption.

LISTA DE ABREVIATURAS

COX- Ciclo-oxigenase

DMSO- dimetilsufóxido.

EC- *Echericha Coli*.

IL- Interleucina

LPS- Lipopolissacarídeos.

MMPS- Metaloproteinases de matriz

NF-K β - Fator de transcrição nuclear Kappa β eta.

NO- Óxido Nítrico

NPs- Nanopartículas

PBS- Tampão Fosfato-salino.

P38- Via de sinalização.

RANK- recetor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B

ROS- Produtos de oxigênio reativo

SOCS- Transdutores de sinais e ativadores de transcrição.

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa.

TRAP- Fosfatase Ácida Tártaro-resistente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Curcumin: propriedades e atividades biológicas	13
2.2 Nano encapsulamento: propriedades farmacocinéticas do curcumin	16
2.3 Curcumin: Agente terapêutico potencial	20
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODO	26
4.1 Preparo do Curcumin Nanoparticulado	26
4.2 Animais e acomodação	28
4.3 Indução da doença periodontal por injeção LPS/PBS e administração do curcumin nanoparticulado	28
4.4 Eutanásia dos animais, obtenção de amostras e delineamento experimental	32
4.5 Histomorfometria	32
4.6 Análise macroscópica	35
4.7 Microtomografia computadorizada	36
4.8 Ativação das vias de sinalização (Western Blot)	37
4.9 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO A	68

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma condição inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte e proteção dos dentes e pode levar à destruição do osso alveolar e do ligamento periodontal. Sua prevalência e severidade são altamente variáveis em diferentes populações, mas estima-se que 15 a 20% dos adultos (35-44 anos) sejam afetados pelas formas mais graves da doença e que as formas menos graves afetem 35 a 60% dos humanos nesta mesma faixa etária¹¹². É importante notar que a doença periodontal destrutiva é uma condição específica do sítio, que frequentemente afeta um número limitado de dentes da dentição. Um biofilme microbiano altamente complexo é o fator etiológico extrínseco necessário e atualmente a patogênese é considerada um processo disbiótico resultante de um desequilíbrio entre microrganismos do biofilme e as respostas do hospedeiro¹⁰.

Desde que a resposta imunitária / inflamatória é o principal responsável pela destruição tecidual associada à doença periodontal. Existe um grande interesse nas estratégias terapêuticas moduladoras do hospedeiro; no entanto, apesar dos esforços de pesquisa e da imensa quantidade de conhecimento acumulado a evidência do tratamento periodontal ainda é principalmente baseado na remoção mecânica dos depósitos bacterianos calcificados e não calcificados. Esta abordagem é um tanto limitada porque os resultados são frequentemente menos do que satisfatórios e altamente variáveis.¹²⁵

A curcumina é a denominação coletiva do composto extraído dos rizomas da planta de *Curcuma longa*, que é amplamente utilizada como especiaria culinária. Quimicamente, a curcumina pura ou diferuloylmetano é denominada (1E, 6E) -1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dieno-3,5-diona⁴⁸. Mas o extrato puro é composto por uma mistura de diversos componentes em proporções variáveis, com a demetoxicurcumina e a bis-demetoxicurcumina considerados dois componentes biologicamente ativos principais, que podem apresentar atividades distintas e opostas^{48, 49}. De facto, a diversidade de efeitos biológicos associados ao curcumin descrita na vasta literatura relaciona-se com a composição variável e a proporção dos componentes biologicamente ativos distintos no extrato rizomático denominados coletivamente "curcumin", que são influenciados pelos métodos de extração / purificação e a origem geográfica da planta⁵³.

Existem evidências consideráveis tanto para estudos *in vitro* como *in vivo* indicando que as propriedades anti-inflamatórias da curcumina atenuam a resposta das células imunitárias aos antígenos bacterianos associados à doença periodontal^{46, 73} e inibem a destruição do tecido periodontal^{28, 44, 45}. No entanto, a maioria destes estudos *in vivo* utiliza uma via sistêmica de administração e os seus resultados podem ser limitados pelas fracas propriedades farmacodinâmicas do curcumin, principalmente a sua hidrofobicidade, baixa taxa de absorção no trato gastrointestinal e semi-vida plasmática extremamente curta^{5, 141}.

Considerando a natureza sito-específica da doença periodontal e as características inflamatória/farmacodinâmicas do curcumin, o presente estudo de prova de princípio foi desenhado para avaliar o efeito biológico da administração local de curcumin em um veículo de nanopartículas, utilizando-se um modelo experimental de doença periodontal em ratos.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 Curcumin: propriedades e atividades biológicas.

O uso de plantas medicinais é baseado na experiência de sistemas tradicionais da medicina, de diferentes sociedades étnicas. A *Curcuma longa* é uma planta herbácea da família do gengibre (Zingiberaceae) cultivada em países do sudeste asiático, onde é comumente utilizada como uma especiaria (Ammon et al.⁴, 1991). Há séculos, essa planta tem sido utilizada na medicina Ayurveda para o tratamento de diversas desordens, tais como reumatismo, doenças de pele, doenças parasitárias e inflamação (Jain et al.⁶¹, 1991). Seu componente principal, responsável pela sua coloração amarela característica, é o curcumin, descrito pela primeira vez em 1910 (Lampe et al.⁸⁰, 1913), Figura 1.

Figura 1 - Curcumin extraído do rizoma



Fonte: naturalpractitionermag.com

Quimicamente, o curcumin puro é denominado diferuloilmetano 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona (Gupta et al.⁴⁸, 2013). Coletivamente denominado curcumin, o extrato do rizoma da *C. longa* é constituído por misturas em proporções variáveis de diversos componentes, sendo demetoxicurcumin e bisdemetoxicurcumin as variantes químicas consideradas como os principais componentes ativos presentes em *C. longa*, os quais podem apresentar propriedades biológicas distintas (Gupta et al.⁵⁰, 2012).

Vasta literatura reporta diversos efeitos biológicos do curcumin, incluindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, anti-neoplásicas, anti-oxidantes e cicatrizadoras (Jurenka⁶⁸, 2009). A diversidade de efeitos biológicos atribuídos ao curcumin está relacionada à variabilidade de sua composição em termos dos compostos ativos principais (demetoxi e bisdemetoxicurcumin), os quais são influenciados pela região geográfica de origem da planta (Hayakawa et al.⁵³, 2011) e

também a grande heterogeneidade de desenhos e modelos experimentais utilizados, incluindo grande variabilidade nos veículos, doses/concentrações e forma de administração empregados.

Esta diversidade de efeitos, associada à variabilidade de desenhos e modelos experimentais, confere à literatura relacionada ao curcumin um caráter anedótico, de consistência e validade interna e externa relativamente baixos. No entanto, estudos realizados com rigor científico demonstram que o curcumin exerce seus efeitos biológicos de formas variadas e complexas, incluindo a modulação da atividade de várias vias de sinalização intracelular e fatores de transcrição, o que influencia diretamente a produção de diversas moléculas biologicamente ativas, como citocinas, quimiocinas e enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo (Gupta et al.⁵⁰, 2012). Os efeitos biológicos do curcumin foram verificados em diferentes células do sistema imune-inflamatório, incluindo linfócitos B e T, macrófagos, neutrófilos, células natural killer e células dendríticas (Jagetia, Aggarwal⁶⁰, 2007).

Devido ao seu potencial terapêutico associado aos seus efeitos biológicos diversos, o curcumin tem sido alvo de inúmeras pesquisas com diferentes modelos animais, estudos clínicos para o tratamento de condições diversas incluindo diabetes, distúrbios neurológicos, câncer, além de doenças inflamatórias crônicas como uveíte crônica, doença de Crohn, psoríase, artrite reumatóide, líquen plano oral e doença periodontal (Gupta et al.⁵⁰, 2012; Chainani-Wu et al.¹⁸, 2012; Guimarães et al.⁴⁴ 2011, Guimarães et al.⁴⁵, 2012). Em outubro de 2016, uma busca na base de dados do National Institutes of Health (NIH) americano (<http://www.clinicaltrials.gov>) utilizando 'curcumin' como palavra-chave retornou 136 estudos clínicos cadastrados, relacionados às mais diversas condições e doenças, incluindo: alzheimer, esquizofrenia, depressão, câncer de cólon, de mama, de pulmão, de cabeça e pescoço, de pâncreas, glioblastoma, mieloma múltiplo, asma, mucosite e dermatite associadas à quimioterapia e radioterapia, doença renal crônica, doença intestinal inflamatória (IRB, Crohn's), diabetes, artrite reumatóide, entre outras. Há uma predominância de estudos clínicos de fases I/II (obtenção de dados preliminares de segurança e eficácia), porém existem diversos estudos de fase III e IV (verificação da eficácia e segurança, uso em associação com outros tratamentos, acompanhamento pós-aprovação para uso clínico por órgão regulador), sendo que mais de 60% destes

estudos clínicos foram conduzidos em Universidades/Institutos/Centros de pesquisa da América do Norte e Europa.

De fato, estudos *in vitro* e pré-clínicos de nosso grupo de pesquisa suportam o potencial anti-inflamatório do curcumin. A administração sistêmica via oral de curcumin inibiu significativamente a expressão de citocinas inflamatórias e a ativação da via NF-kB nos tecidos gengivais em modelo experimental de doença periodontal *in vivo* (Guimarães et al.⁴⁴, 2011). Em macrófagos, ao curcumin inibiu a expressão de genes pró-inflamatórios em resposta à estimulação com LPS bacteriano por meio da modulação de diversas vias e proteínas intermediárias de sinalização intracelular, incluindo NF-kB, p38 MAPK, SOCS1 e SOCS3 (Guimarães et al.⁴⁶, 2013). Evidências também indicam que curcumin pode inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) e de outros mediadores inflamatórios também por neutrófilos polimorfonucleares, como verificado em estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo experimental de artrite reumatóide que, similarmente ao modelo de doença periodontal, também apresenta reabsorção óssea inflamatória como característica principal (Jancinová et al.⁶⁴, 2011; Jancinová et al.⁶², 2012; Srivastava et al.¹³⁴, 2011).

Porém, apesar dos diversos mecanismos envolvidos nos potentes efeitos anti-inflamatórios do curcumin, a inibição significativa da reabsorção óssea inflamatória característica do modelo de doença periodontal é alcançada com doses muito superiores de curcumin administrado via oral, fato provavelmente relacionado às pobres propriedades farmacológicas do curcumin, incluindo sua virtual insolubilidade em meio aquoso, baixa absorção no trato gastrointestinal e meia-vida plasmática na ordem de minutos. Estas propriedades farmacológicas dificultam a aplicação clínica do curcumin como agente terapêutico adjuvante administrado por via sistêmica (oral) em condições inflamatórias associadas à reabsorção óssea inflamatória, como a própria doença periodontal ou a artrite reumatóide. Alternativas para sua veiculação vem sendo estudadas e incluem mais recentemente a utilização de solventes eutéticos naturais profundos (*Natural Deep Eutetic Solvents*, NADES), uma nova classe de eutéticos (matrizes sólidas compostas de misturas de compostos químicos) que apresentam como principal característica a solubilização de compostos não hidrossolúveis (Wikene et al.¹⁴⁵, 2015); bem como sua formulação em nanopartículas, que é mais extensamente estudada.

2.2 Propriedades farmacocinéticas do curcumin: nanoencapsulamento como alternativa

Estudos clínicos em humanos demonstraram a segurança, tolerabilidade e virtual ausência de toxicidade do curcumin em doses diárias de até 12 g (Cheng et al.²², 2001; Lao et al.⁸², 2006). Mas, apesar dos potenciais benefícios do curcumin no tratamento de diversas doenças serem relatados em muitas publicações, existem algumas desvantagens que limitam sua aplicação terapêutica. Sua baixa solubilidade em veículo aquoso e reduzida absorção no trato gastrointestinal requerem a administração de doses 10 vezes maiores do curcumin em veículo lipídico para obtenção de efeito biológico comparável ao observado com a administração do composto em veículo aquoso. As possíveis razões para a reduzida biodisponibilidade de qualquer composto químico incluem a má absorção, elevada taxa de metabolização, a inatividade dos produtos metabólicos e/ou rápida excreção. Embora evidências indiquem uma potente atividade biológica do curcumin incluindo ações anti-inflamatórias, antiangiogênica, antioxidante, imunomodulatória, antimicrobiana e antiapoptótica e, por conseguinte, seu relevante potencial terapêutico vem sendo avaliado em modelos pré-clínicos e estudos clínicos em diversas doenças e condições. (Sharma et al.¹²⁴, 2005) De fato, estudos ao longo as últimas três décadas indicam que a baixa solubilidade em meio aquoso prejudicam a absorção e, juntamente com sua rápida metabolização após administração por via oral, restringe a sua biodisponibilidade, representando a principal dificuldade para a aplicação terapêutica deste composto (Anand et al.⁵, 2007).

Em um dos primeiros estudos publicados sobre a ação do curcumin, 1g/kg de curcumin foi administrado via oral a ratos. Constatou-se que aproximadamente 75% da dose era rapidamente excretada pelas fezes (Wahlstrom et al.¹⁴¹, 1978). A administração oral de curcumin em doses de 0,5 a 12 g/dia a vinte quatro pacientes voluntários saudáveis, resultou em níveis séricos não detectáveis após 1 h em 22 pacientes, com apenas 2 dos pacientes (que ingeriram doses de 10 e 12 g) apresentando vestígios de curcumin (Lao et al.⁸², 2006).

Devido à sua natureza hidrofóbica, após administração oral em modelos animais e em humanos, o curcumin parece ser metabolizado por conjugação e redução, levando à formação de sulfatos e glucuronídeo de curcumin no fígado e no intestino,

o que torna este composto polifenólico biologicamente inativo (Aggarwal, Sung², 2009). A reduzida absorção e biodisponibilidade podem estar associadas a ausência de inibição da reabsorção óssea inflamatória observada em doses menores de curcumin administrado via oral em modelo murino pré-clínico de doença periodontal, apesar do significativo efeito anti-inflamatório (Guimarães et al.⁴⁵, 2012).

Diversas abordagens farmacológicas têm sido avaliadas com objetivo de superar as dificuldades farmacocinéticas e melhorar a absorção e meia-vida do curcumin, incluindo o uso de adjuvantes como o piperine, ou por meio da inclusão do curcumin em diferentes sistemas de veículos, incluindo lipossomas, micelas, complexos fosfolipídicos e nanopartículas (Shoba et al.¹²⁸, 1998; Sasaki et al.¹²⁰; 2011; Gota et al.⁴⁰, 2010; Liu et al.⁹³, 2016).

As nanopartículas (NPs) são tipicamente caracterizadas como materiais com uma de suas dimensões na escala de 0,1-100 nm. Sinteticamente produzidas a partir de inúmeros materiais, como sílica, metais, lipossomos e polímeros, elas podem ser desenhadas tanto pela agregação de constituintes moleculares quanto pela destruição de macromateriais em unidades nanométricas (Yallapu et al.¹⁴⁹, 2012; Naksuriya et al.¹⁰⁴, 2014).

A diversidade nas características físico-químicas das NPs está relacionada ao processo de preparo das NPs, e proporciona a estes materiais variáveis propriedades biológicas. Por exemplo, na terapia do câncer as nanopartículas podem modular os processos de sobrevivência e morte celular por meio da regulação de vias de sinalização relacionadas ao processo de autofagia, como a Akt-mTOR (Cirstea et al.²⁴, 2010; Li et al.⁸⁸, 2016; Liu et al.⁹⁴, 2011) ou por meio da indução da sinalização relacionada ao estresse oxidativo (Harhaji et al.⁵², 2007; Kang et al.⁶⁹, 2016; Wu et al.¹⁴⁶, 2013).

Um importante aspecto relacionado ao uso das NPs é sua habilidade em agir como um carreador efetivo para uma miríade de drogas, protegendo-as de condições fisiológicas indesejáveis e permitindo sua liberação controlada e seletiva nos sítios alvos (Stevenson et al.¹³⁵, 2011; Ulbrich et al.¹⁴⁰, 2010; Lamprecht et al.⁸¹, 2005). As passagens eficientes das NPs através de barreiras, como pequenos capilares no interior de células individuais, permitem um acúmulo terapêutico da droga nos sítios de interesse. Além disso, um aumento na eficácia de drogas conjugadas às NPs tem

sido determinado por um maior e mais rápido reconhecimento celular principalmente por células imunes ativadas, e retenção intracelular sustentada da droga encapsulada em comparação a agentes farmacológicos em solução ou não conjugados à NPs (Kong et al.⁷⁸, 2006; Chakraborty et al.²⁰, 2016; Dobrovolskaia et al.³³, 2008; Anand et al.⁶, 2010; Namiki et al.¹⁰⁵, 2011).

A indústria farmacêutica tem ampliado as aplicações de fármacos carregados em veículos nanoparticulados por apresentarem características farmacocinéticas, solubilidade e biodisponibilidade superiores em relação às drogas não nanoparticuladas. Em 2006, aproximadamente 250 produtos incorporados em veículos nanoparticulados estavam sendo desenvolvidos pela indústria farmacêutica americana (Dobrovolskaia et al.³³, 2008). Este crescente interesse no desenvolvimento e comercialização de fármacos nanoparticulados é em grande parte justificado pela capacidade de liberação sítio-específica das NPs, que permitem que uma menor dose do fármaco seja administrada reduzindo a dose necessária e, em consequência, potencialmente seus efeitos deletérios (Dobrovolskaia et al.³³, 2008).

Especificamente em relação às pobres propriedades farmacológicas do curcumin, sua veiculação em NPs de ácido glicólico polilático (Cur-PGLA-NPs), aumentou 600 vezes a solubilidade do curcumin em água (Xie et al.¹⁴⁸ 2011). A administração oral do (Curc-PLGA-NPs) em ratos aumentou o nível plasmático em 5,6 vezes em relação ao curcumin livre resuspendido em veículo lipídico (Xie et al.¹⁴⁸, 2011), demonstrando o importante potencial das NPs como carreadores do curcumin, maximizando seus efeitos biológicos.

Estudo *in vitro* em linhagens de células leucêmicas humanas demonstrou que o curcumin carregado por NPs biodegradáveis aumentou significativamente a quantidade de curcumin no meio intracelular, bem como a velocidade deste a absorção em comparação ao curcumin livre (em suspensão, não nanoestruturado) (Anand et al.⁶, 2010). *In vivo*, utilizando modelo de camundongos, a concentração sérica (avaliada por HPLC) de ambos os tipos de curcumin (livre e nanoestruturado), demonstrou que curcumin NP apresentou uma maior biodisponibilidade e uma meia vida mais longa. Estes efeitos foram traduzidos em maior potência nos efeitos apoptóticos e de inibição de proliferação em várias linhagens celulares de tumores (Anand et al.⁶, 2010). Clinicamente, a administração oral de curcumin em uma dispersão coloidal de

nanopartículas aumentou em 27 vezes sua concentração plasmática em comparação com a formulação em pó (Sasaki et al.¹²⁰, 2011).

Há uma grande quantidade de informações sobre os benefícios do encapsulamento de compostos ativos em nanopartículas (Chakraborty et al.¹⁹, 2016; Dobrovolskaia et al.³³, 2008, Kong et al.⁷⁸, 2006; Lamprecht et al.⁸¹, 2005; Namiki et al.¹⁰⁵, 2011; Stevenson et al.¹³⁵, 2011; Ulbrich et al.¹⁴⁰, 2010), e a quantidade de estudos publicados avaliando a utilização do curcumin em NPs tem aumentado, especialmente desde 2009. Uma busca na base de dados do NCBI/NIH/PubMed utilizando as palavras-chave "curcumin" e "nanopartículas" em outubro/2016 retornou 662 estudos, com média superior a 100 estudos publicados/ano desde 2014. A maioria das publicações está relacionada à avaliação de nanoformulações contendo curcumin no tratamento de diversos tipos de câncer (incluindo glioblastoma, câncer de mama, colo de útero, câncer de cólon, pulmão, pâncreas, de cabeça e pescoço) (Masloud et al.⁹⁸, 2016; Lee et al.⁸³, 2016; JayapraKasha et al.⁶⁵, 2016; Bisht et al.¹⁴, 2016; Zheng et al.¹⁶⁰ 2015; Li et al.⁸⁸, 2016; Wang et al.¹⁴³, 2016). No entanto, também existem estudos avaliando o potencial imunomodulador anti-inflamatório de formulações de curcumin em nanopartículas, reduzindo a dor e a expressão de mediadores inflamatórios (IL-1, TNF, MMPs) em modelo pré-clínico de osteoartrite (Zhang et al.¹⁵⁸, 2016) e de artrite (Zheng et al.¹⁶⁰, 2015), além de reduzir o edema, migração de leucócitos em modelo de inflamação aguda em ratos (Rachmawati et al.¹¹⁵, 2016), bem como a redução da proliferação e ativação de macrófagos por LPS bacteriano in vitro e in vivo (Amano et al.³, 2015). Em 2015, havia 5 ensaios clínicos registrados, destes 2 em fase I ou fase 0 para avaliar a farmacodinâmica e segurança de nanoformulações contendo curcumin, 1 para avaliar seu potencial em câncer de cólon (fase 1), 1 na síndrome metabólica (fase 2), e na doença renal crônica (fase 3) (Yallapu et al.¹⁵⁰, 2015). De forma intrigante, não encontramos na literatura nenhum estudo pré-clínico ou clínico avaliando formulações de curcumin em nanopartículas para o tratamento de doenças periodontais.

Assim, propomos a incorporação do curcumin em nanopartículas com objetivo de superar suas pobres propriedades farmacológicas quando administrado por via oral em veículo lipídico, potencializando seus efeitos ao aumentar a absorção e promover a liberação controlada da droga. No caso específico das doenças periodontais, devido a sua característica sítio-específica, a administração local diretamente nos sítios de

interesse (afetados pela inflamação), ao invés da administração sistêmica, também pode representar maior eficácia com a utilização de doses terapêuticas reduzidas (Mulik et al.¹⁰¹, 2009).

2.3 Potencial do curcumin como agente terapêutico em doenças periodontais

As doenças periodontais são doenças inflamatórias de origem infecciosa que acometem os tecidos de proteção e suporte dos dentes, e que progridem a partir do tecido gengival, podendo levar à perda de osso alveolar e ligamento periodontal. Ainda que sua prevalência e severidade apresentem uma distribuição bastante variável no mundo, estima-se que 15 a 20% da população adulta (entre 35- 44 anos) apresente as formas mais severas da doença, e que as formas mais leves de sangramento gengival estejam presentes em cerca de 35 a 60% dos indivíduos nessa mesma faixa etária (Petersen, Ogawa¹¹², 2005). A complexa microbiota organizada em biofilme é o fator etiológico extrínseco essencial nas doenças periodontais. A etiopatogênese das doenças periodontais envolve o desenvolvimento e persistência de resposta inflamatória crônica à presença do biofilme microbiano, num processo de disbiose ou desequilíbrio ente microbiota e hospedeiro (Bartold et al.¹¹, 2013). Atualmente são identificados e reconhecidos complexos microbianos formados primariamente por espécies Gram-negativas com forte relação com a ocorrência de formas destrutivas da doença (Socransky et al.¹³², 2005).

A abordagem terapêutica tradicional para seu controle é a remoção mecânica do biofilme microbiano mineralizado e não-mineralizado das superfícies radiculares por meio de raspagem e alisamento radicular (RAR), além da manutenção de bons hábitos de higiene oral pelo paciente e visitas regulares de controle e manutenção periódica preventiva (Page et al.¹⁰⁸, 1997). No entanto, esta abordagem apresenta níveis de sucesso relativamente baixos e com significativa variabilidade entre os indivíduos (Behal et al.¹¹, 2011)

O potencial terapêutico anti-inflamatório e anti-microbiano indica que o curcumin é um composto pleiotrópico, e demonstra seu potencial terapêutico em condições de natureza infecciosa-inflamatória, como as doenças periodontais.

Em termos de seus efeitos antimicrobianos, existem relatos indicando a atividade antimicrobiana do curcumin isoladamente contra diversas espécies microbianas incluindo bactérias (por ex., *S. aureus*, *K. pneumonia*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*,

L. monocytogenes, *H. pylori*), fungos (por ex., *C. neoformans*, *C. albicans*, *P. infestans*, *P. brasiliensis*) e vírus (por ex., HIV-12, influenza H1N1, H1N6, PR8, herpes simplex virus type 1, Coxsackievirus B3), além de atividade de inibição de formação de biofilme por *P. aeruginosa*, curcumin apresenta efeito de sinergismo com antibióticos, reduzindo a concentração inibitória de ampicilina necessária para a eliminação de *S. aureus* ou de norfloxacin e oxacilina para a eliminação de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). No entanto, efeitos adversos/antagônicos em que o curcumin inibe a atividade de antibióticos também são reportados, como é o caso da redução da efetividade da ciprofloxacina na eliminação de *Salmonella* (para revisão, ver Moghadamtousi et al.⁹⁹, 2014).

O potencial terapêutico anti-inflamatório e anti-microbiano indica que o curcumin é um composto pleiotrópico, e demonstra seu potencial terapêutico em condições de natureza infecciosa-inflamatória, como as doenças periodontais.

Curcumin é um composto sensível à luz que pode ser utilizado como fotossensibilizador por gerar espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS), inclusive oxigênio singlete que pode ter efeitos citotóxicos tanto para células eucarióticas (com aplicação, por exemplo anti-tumoral) ou pró-carióticas (efeito antimicrobiano) (Levy⁸⁵, 1994). A utilização de curcumin como fotossensibilizante na terapia fotodinâmica indica que suas propriedades antimicrobianas contra bactérias presentes em condições patológicas orais (cárie, infecção endodôntica), tanto em forma planctônica quanto em biofilme, são favorecidas (Bulit et al.¹⁷, 2014; Pileggi et al.¹¹³, 2013; Tonon et al.¹³⁸, 2015; da Frota et al.³⁰, 2015; Araujo et al.⁸, 2014).

Especificamente em microrganismos associados às doenças periodontais destrutivas, o curcumin foi o polifenol dietético mais potente dentre 48 compostos testados, inibindo tanto o crescimento microbiano planctônico de espécies associadas às doenças periodontais (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*), como também reduziu a formação, maturação e atividade metabólica de biofilmes microbianos multi-espécies (Shahzad et al.¹²², 2015). De forma interessante, o curcumin apresenta efeitos antimicrobianos dose-dependentes quando utilizado isoladamente contra espécies microbianas associadas às doenças periodontais destrutivas, incluindo *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *T. denticola*, além de inibir a formação de biofilmes contendo *P. gingivalis* (Izui et al.⁵⁹, 2016). A atividade

antimicrobiana do curcumin também é demonstrada quando o composto é utilizado como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica, como demonstrado recentemente em culturas planctônicas de *A. actinomycetemcomitans* (Najafi et al.¹⁰³, 2016), assim como em culturas de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* (Madhi et al.⁹⁷, 2015).

Além dos efeitos anti-microbianos, relacionados diretamente ao agente etiológico extrínseco das doenças periodontais, curcumin também apresenta propriedades anti-inflamatórias, atenuando a resposta inflamatória, responsável direta pela degradação dos tecidos conjuntivo mineralizado e não-mineralizado nas doenças periodontais. Curcumin inibe a atividade de ciclooxigenase-2 (COX-2), lipoxigenase, e da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS); reduz a produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL-1, -2, -6, -8 e -12) e proteína quimioatraente de monócitos (MCP). (Jurenka⁶⁸, 2009).

Utilizando modelos in vivo de doença periodontal, nosso grupo de pesquisa observou inibição marcante da produção de citocinas inflamatórias nos tecidos gengivais associada à administração sistêmica, por gavagem oral, do curcumin (Guimarães et al.⁴⁴, 2011). Resultados semelhantes foram relatados por (Zhou et al.¹⁶², 2016), que observaram ainda que a inibição da reabsorção óssea pelo curcumin estava associada à redução da expressão dos reguladores de osteoclastogênese, RANK/RANKL (Zhou et al.¹⁶³, 2013).

Sabe-se que o tratamento periodontal convencional pode se beneficiar da associação com agentes locais, fármacos colocados no interior da bolsa periodontal com o objetivo de potencializar os efeitos da RAR (Hanes, Purvis⁵¹, 2003). Recentemente, tem havido crescente interesse no estudo dos possíveis benefícios da administração tópica do curcumin como adjunto ao tratamento periodontal convencional. No entanto os estudos são publicados em periódicos de reduzido impacto e apresentam diversos aspectos metodológicos que sugerem baixa qualidade científica. Um estudo clínico que avaliou o efeito de um gel à base de 2% de extrato de *C. longa* como adjunto à RAR no tratamento demonstrou melhora significativa dos parâmetros clínicos, particularmente nos índices de sangramento gengival e à sondagem, bem como na redução da prevalência de espécies BANA-positivas (*T. forsythia*, *P. gingivais*, *T. denticola*) após 30 e 45 dias (Behal et al.¹¹, 2011). Mais recentemente, a utilização de gel de curcumin 1% (vol:vol) associado ao tratamento

mecânico em comparação ao tratamento mecânico apenas resultou em redução significativa da proporção de espécies microbianas associadas à doença periodontal no biofilme subgingival (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*), a qual foi sustentada por 6 meses e combinada com melhora significativa, embora de reduzida magnitude, nos parâmetros clínicos (sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e nível clínico de inserção) (Bhatia et al.¹³, 2014). A utilização de preparado em forma de gel contendo curcumin disponível comercialmente (de formulação desconhecida, contendo 50 mg de curcumin, porém sem indicação da concentração) como adjunto à RAR resultou em melhora significativa, embora de reduzida magnitude, nos parâmetros clínicos profundidade de sondagem, nível de inserção e também na prevalência de *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola* no biofilme subgingival. No entanto, neste estudo os pacientes foram acompanhados por apenas 30 dias e não houve comparação direta entre os grupos controle (apenas RAR) e teste (RAR associado ao gel comercial contendo curcumin) (Nagasri et al.¹⁰², 2015). Estudo similar mais recente, utilizando o mesmo preparado comercial de curcumin em gel como adjunto à RAR, porém com acompanhamento dos pacientes por 3 meses e estimulando o gel do curcumin mediante estímulo luminoso reportou, uma redução significativa em parâmetros clínicos e microbiológicos com o uso associado do gel de curcumin e terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal (Sheedhar et al.¹³³, 2015). Surpreendentemente, estudo clínico com acompanhamento de 45 dias relata que a aplicação de gel de curcumin a 2% como adjunto do tratamento periodontal mecânico mostrou-se superior à utilização de gel de clorexindina 0,2% na melhora de parâmetros clínicos (sangramento marginal e à sondagem, nível clínico de inserção e profundidade de sondagem). (Hugar et al.⁵⁷, 2016). Porém neste estudo não há indicação de calibração intra-examinador para as avaliações pós-tratamento, de padronização do tratamento periodontal proporcionado, do cegamento do examinador e paciente, ou randomização na distribuição dos tratamentos (arbitrariamente distribuídos entre os lados esquerdo ou direito dos pacientes).

Em resumo, embora existam evidências científicas de qualidade indicando as propriedades biológicas do curcumin que são de interesse para o tratamento das doenças periodontais, a saber atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, juntamente com evidências do potencial terapêutico do curcumin derivadas de estudos pré-clínicos; os estudos clínicos publicados utilizando curcumin como adjunto

da terapia mecânica apresentam coletivamente baixa qualidade científica e contribuem/justificam o preconceito associado ao uso de qualidade científica e contribuem/justificam o preconceito associado ao uso de produtos naturais em aplicações relacionadas à saúde. Assim, estudos pré-clínicos realizados em condições mais controladas são necessários para a avaliação do potencial terapêutico do curcumin, em particular para o estudo de veículos e formulações alternativas deste composto. Destacamos que não encontramos nenhum estudo, pré-clínico ou clínico, avaliando o potencial de formulações de curcumin em nanopartículas no tratamento de doenças periodontais.

Neste estudo, propomos uma avaliação de *'prova de princípio'* de que a administração de curcumin em veículo de nanopartículas por meio de injeção direta nos sítios afetados é capaz de modular a resposta do hospedeiro iniciada pela interação com MAMPs (LPS, no modelo experimental proposto) reduzindo a severidade da inflamação e a destruição de tecido conjuntivo não mineralizado e a reabsorção óssea associadas. Os dados deste estudo poderão ser utilizados no desenvolvimento de estratégias não invasivas para o emprego de curcumin nanoparticulado como adjunto no tratamento das doenças periodontais. Além disso, as informações derivadas deste estudo podem ser utilizadas como indicativos do potencial desta aplicação do curcumin em outras condições associadas à inflamação crônica, como a artrite reumatoide ou o líquen plano oral.

3 PROPOSIÇÃO

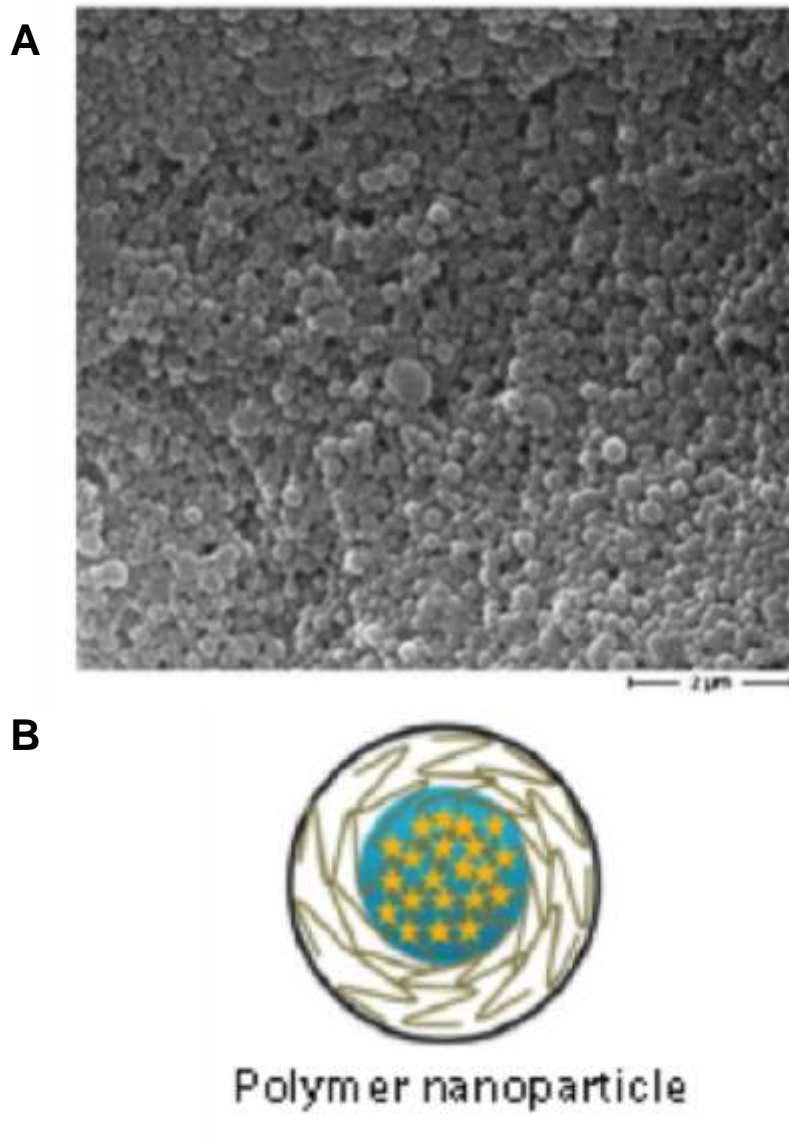
Como hipótese principal, propomos avaliar se a aplicação local do curcumin veiculado em nanopartículas é capaz de inibir a resposta imune-inflamatória e reduzir a reabsorção óssea associadas ao modelo de doença periodontal experimental induzido por LPS.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Preparo do curcumin nanoparticulado

O curcumin nanoparticulado (NP), bem como as nanopartículas 'vazias' (veículo) foram preparados nos laboratórios dos Profs. Drs. Antonio Claudio Tedesco (Departamento de Química da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto) e Dr. Fernando Lucas Primo (Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-Univ. Estadual Paulista). As partículas foram preparadas usando uma combinação de ácido poli-láctico (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) na proporção de 1:1 e carregadas com 50 mg/mL de curcumin (lot # 081M1611V, Sigma-Aldrich Co, São Paulo.Brazil..) (Figura 2). Os polímeros foram inicialmente dissolvidos em di-clorometano e então adicionados a uma solução aquosa contendo 1% de álcool polivinílico e curcumin. A mistura foi submetida a agitação vigorosa (10.000 – 15.000 rpm) para obter a emulsificação água em óleo (w/o). O solvente orgânico foi removido da solução por agitação a temperatura ambiente e evaporação sobre pressão reduzida. As partículas foram centrifugadas (4–10°C; 1100–4600 g) em intervalos de 10 a 20 minutos. A preparação foi lavada três vezes em água destilada, suspensa em 1 mL PBS e estocada a 4°C e usada em até 3 meses. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente estéril com todas as manipulações em capela de fluxo laminar.

Figura 2 - Nanopartículas de PLA:PGA (PLGA)



(A) Morfologia de nanopartículas de PLGA obtidas por microscopia eletrônica de varredura.
(B) Esquema ilustrativo de nanopartícula de PLGA ilustrando a incorporação de composto ativo hidrofóbico (estrelas amarelas).

Fonte: Muralli et al.⁴¹, 2012.

4.2 Animais e acomodação

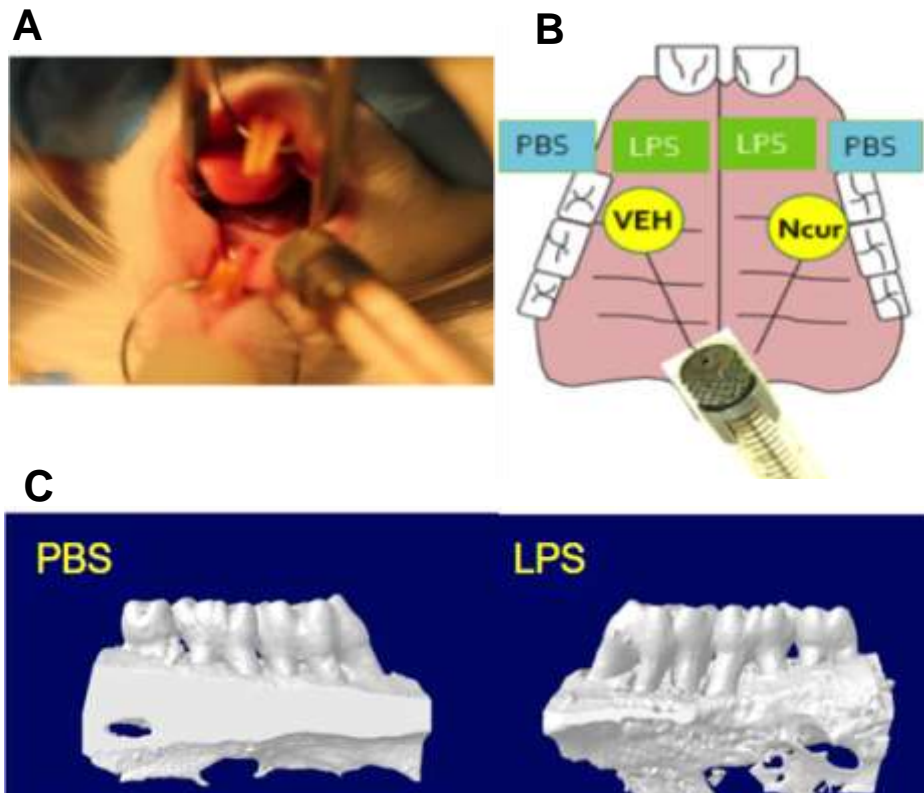
Foram usados 16 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus Holtzman*) para os experimentos. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de temperatura, umidade e ciclo luz/escuro no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOAr/UNESP (Anexo A). Os animais foram acomodados em grupos de 4 em gaiolas feitas de prolipropileno em estante isoladora com temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (65 a 70%) controladas, e ciclo de iluminação de 12 horas luz/escuro. Os animais foram mantidos com dieta com ração para roedores padronizada (Labina/purina) e água filtrada *ad libitum*. As caixas foram limpas/lavadas e a maravalha substituída 3 vezes por semana.

4.3 Indução da doença periodontal por injeção LPS/PBS e administração do curcumin nanoparticulado

A doença periodontal foi induzida segundo o modelo de injeção de LPS na região palatina⁴¹, utilizando como controle negativo a injeção do mesmo volume de tampão fosfato (PBS, sem Cálcio e Magnésio, pH 7.4), que foi o veículo utilizado na diluição do LPS. As injeções foram realizadas sob anestesia geral inalatória utilizando isoflurano em vaporizador adaptado (Sistema Fluovac de anestesia para 02 ratos com caixa de indução (Harvard Apparatus Holliston, Massachusetts EUA.), três vezes por semana. As injeções de LPS ou PBS foram feitas por operador treinado nos tecidos gengivais palatinos adjacentes à porção média do primeiro molar superior (Figura 2), bilateralmente. Cada injeção foi realizada num volume total de 3 μL de uma solução de 10 mg/mL de LPS (purificado de *Eschericia coli*, strain 055:B5 - Sigma Chem Co., St. Louis, MO, EUA). Os animais-controle receberam injeção de 3 μL do veículo (PBS), nas mesmas regiões, também bilateralmente. Foram utilizadas microseringas Hamilton com agulha customizada de gauge 30 e comprimento de 0.6 cm (Hamilton Robotics - Agilent Technologies, Reno, NV, EUA). As injeções de LPS ou PBS foram realizadas por 4 semanas (28 dias), num total de 12 injeções em cada sítio.

O curcumin nanoparticulado e as nanopartículas de PLGA 'vazias' (controle-veículo) foram administrados duas vezes por semana, no dia seguinte à primeira e à segunda injeção de LPS ou PBS. As injeções de nanocurcumin ou do veículo de nanopartículas foram feitas nos mesmos sítios, também sob anestesia inalatória e utilizando o mesmo tipo de microseringa e agulha. Para cada injeção, foi utilizado um volume de 3 μ L da suspensão de nanopartículas 'vazias' (controle-veículo) ou carregadas com 50 mg/mL de curcumin (Sigma-Aldrich Co.). Todos os animais receberam o nanocurcumin no lado esquerdo e o veículo no lado direito, de forma que cada animal servisse como seu próprio controle em relação ao tratamento com nanocurcumin. Assim, os animais foram anestesiados 5x/semana, durante o período experimental de 4 semanas (Figuras 3 e 4). Não foram realizadas injeções em dois dias da semana, para possibilitar a recuperação dos animais do anestésico geral.

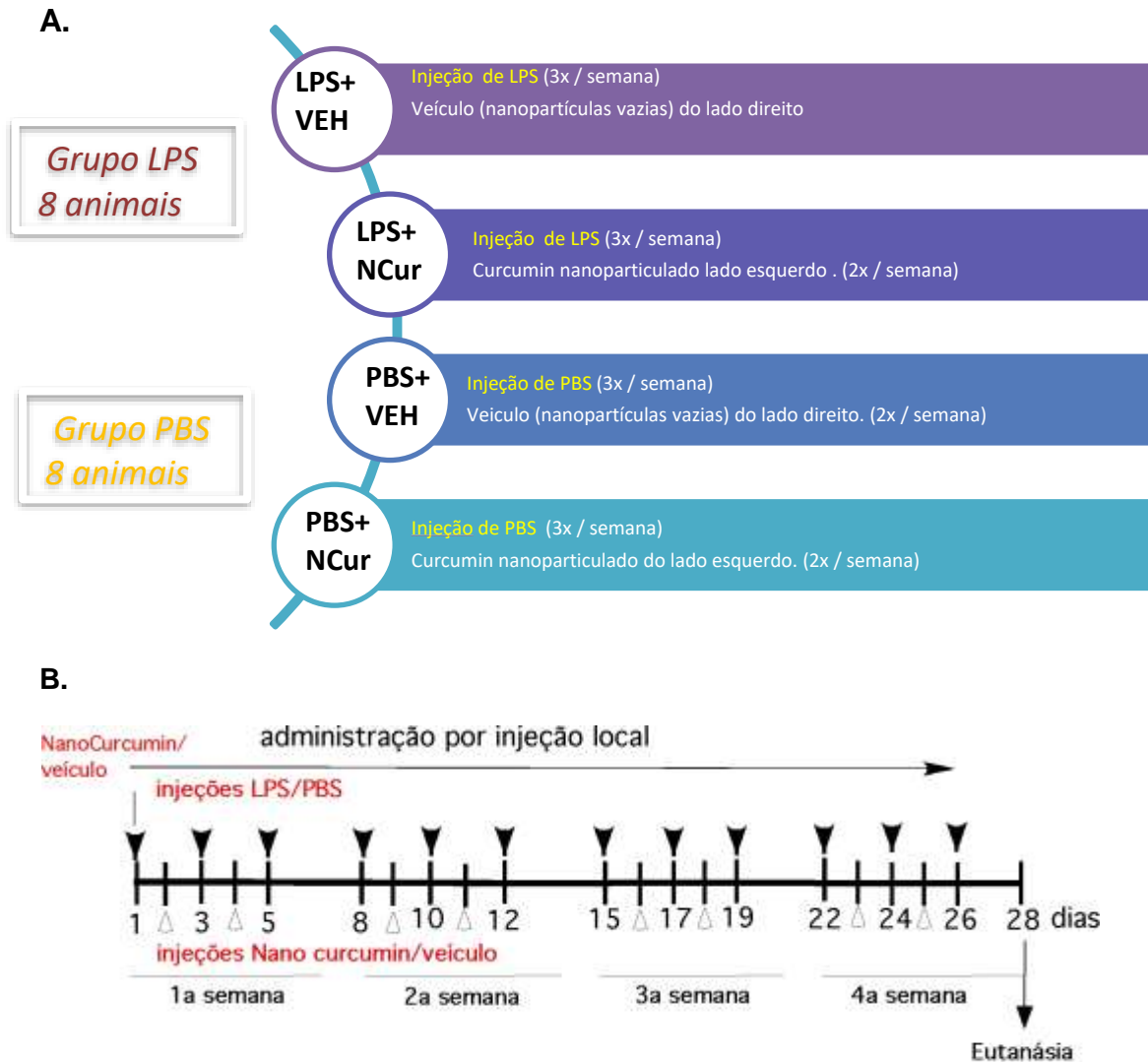
Figura 3 - Metodologia utilizada para o experimento in vivo



(A) Foto ilustrativa do procedimento de injeção no tecido gengival palatino adjacente aos primeiros molares utilizando microseringa Hamilton. (B) Ilustração esquemática da metodologia experimental utilizada: injeções bilaterais de LPS ou de PBS foram realizadas 3x/semana. Em dias alternados (2x/semana), foram feitas nas mesmas áreas, injeções contra-laterais de nanocurcumin (lado esquerdo do animal) e do mesmo volume de nanopartículas PLGA 'vazias' (lado direito do animal). (C) Imagens representativas de hemi-maxilas de ratos escaneadas no microtomógrafo (vista palatina) ilustrando a reabsorção óssea associada ao modelo experimental de doença periodontal induzida por injeções de LPS 3x/semana por 4 semanas.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Distribuição dos animais experimentais segundo as condições experimentais



(A) inicialmente foram formados dois grupos de 8 animais cada, segundo a indução ou não de doença periodontal experimental por meio de injeções bilaterais de LPS ou de PBS. Dentro de cada um destes grupos, foram distribuídos o tratamento com nanocurcumin ou com as nanopartículas 'vazias' de forma contralateral, de forma que cada animal recebesse tanto o tratamento (nanocurcumin) quanto o controle (nanopartículas PLGA 'vazias'). (B) Ilustração esquemática do modelo experimental utilizado. As setas 'cheias' indicam os dias em que foram realizadas as injeções bilaterais de LPS ou do veículo PBS (3x/semana), e as setas 'vazias' indicam os dias em que foram realizadas as injeções contra-laterais de veículo (nanopartículas 'vazias') ou de nanocurcumin (2x/semana).

Fonte: Elaboração própria.

4.4 Eutanásia dos animais, obtenção e preparo das peças – histomorfometria

Ao final do período experimental de 28 dias, os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia geral dissociativa com quetamina e xilazina. Imediatamente após o sacrifício, as hemi-maxilas de cada animal foram cuidadosamente ressecadas .

O tecido mole gengival de um tamanho aproximado de 2 (mésio-distal, comprimento) x 3 (cérvico-apical, altura) mm na área em que foram realizadas as injeções foi cuidadosamente dissecado de 3 amostras de cada condição experimental e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado a -80°C até o momento da utilização. Após a remoção do tecido gengival, a hemimaxila foi armazenada em álcool para posterior análise da extensão da reabsorção óssea inflamatória por meio da coloração da superfície radicular com azul de metileno e também microtomografia computadorizada (μ CT). Após o escaneamento no microtomógrafo, as 5 peças de cada condição experimental das quais não foram coletados os tecidos moles foram submetidas a processamento histológico de rotina (incluindo a descalcificação em EDTA 0,5 M, pH 8,0, durante 2 meses, sendo a solução do EDTA removida a cada 3 dias). Após confirmada a descalcificação avaliando a textura de cada peça mediante uma agulha hipodérmica na área de interesse da amostra, as peças foram levadas para fazer inclusão em parafina e preparo de cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura, obtidos no sentido vestibulo-lingual para utilização na análise histomorfométrica.

4.5 Histomorfometria

A análise histomorfométrica foi realizada para avaliar a intensidade e perfil do infiltrado inflamatório. De cada peça foram obtidos 9 cortes (5 μ m de espessura) semi-seriados, de três regiões ('anterior', 'central' e 'posterior') espaçadas em 250 μ m no sentido M-D (plano frontal). Assim, a área analisada no sentido M-D se estendeu por 795 μ m. Foram analisados 3 cortes seriados obtidos de cada uma das três regiões de cada peça: anterior (região média do primeiro molar), central (região proximal entre primeiro e segundo molar) e posterior (região central do segundo molar). Foram avaliados cortes obtidos de 5 peças de cada uma das condições experimentais:

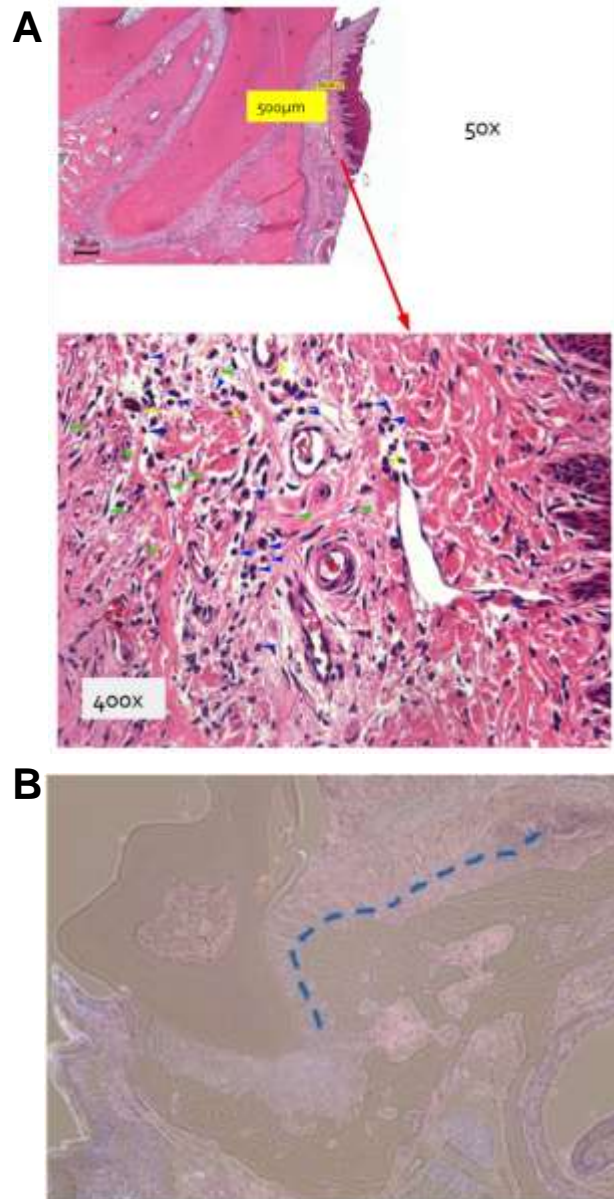
PBS+veículo de nanopartículas, PBS+nanocurcumin, LPS+veículo de nanopartículas, LPS+nanocurcumin.

Inicialmente foram obtidas imagens de cada corte em menor magnificação (50X). Nesta imagem foi traçada uma linha reta de 500 μm em direção ao centro do palato a partir da base do epitélio juncional do primeiro molar, utilizado como ponto de referência anatômica padronizado. Esta distância de 500 μm foi definida correspondendo a área em que foram realizadas as injeções e também à área em que a inflamação era visualmente mais severa. Foi definido um ponto de reparo anatômico para cada peça ao final da reta de 500 μm , o qual foi utilizado para a obtenção da imagem digitalizada em maior magnificação (400X). Nas imagens de 400X, foram contadas todas as células presentes segundo a morfologia nuclear (alongada/fibroblastóide, circular/mononuclear, lobular/neutrófilos) (Figura 7A). As imagens digitalizadas de maior aumento (400X) foram avaliadas duas vezes de forma independente (intervalo de 6 semanas entre as avaliações) para verificação da consistência dos critérios de identificação morfológica dos tipos celulares. As duas contagens morfológicas foram realizadas por um mesmo examinador treinado e cego para condição experimental.

A partir destas mesmas lâminas coradas com H/E também foram obtidas imagens digitalizadas em microscópio óptico comum (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha) para a contagem de osteoclastos, os quais foram identificados segundo as características morfológicas. Estas imagens foram obtidas em aumento de 200X, mantendo-se os parâmetros de captura de imagem (contraste, brilho e tempo de exposição) constantes para a obtenção de todas as imagens utilizadas nesta avaliação.

Para a quantificação de osteoclastos, foram avaliados 3 cortes seriados de cada uma das 3 diferentes regiões no sentido mesio-distal (espaçamento de 250 μm entre cada região) de 3 hemi-maxilas de cada grupo experimental. As células foram consideradas como osteoclastos quando se apresentam 3 ou mais núcleos (multinucleadas), dimensões maiores que as células normais presentes na mesma área e estavam localizadas próximas à superfície do osso alveolar. Foram contadas as células com estas características presentes a partir 500 μm de distância do epitélio juncional em direção ao centro do palato até a região apical da raiz palatina (Figura 7).

Figura 7 - Metodologia utilizada na análise histomorfométrica e contagem de osteoclastos



(A) Imagens representativas do procedimento utilizado para obtenção de imagens em aumento de 400X para análise histomorfométrica. Imagem de menor aumento (50X) com traçado da linha de 500 Mm a partir da base do epitélio juncional em direção palatina. Nesta imagem de 50X foi determinado um ponto de referência ao final da reta de 500 Mm para a obtenção da imagem em maior aumento (400x). Na imagem em maior aumento foi realizada a contagem diferencial morfológica das células (setas em verde indicam fibroblastos; em azul células mononucleares; e em amarelo os neutrófilos polimorfonucleares). (B) Imagem representativa de corte de maxila contra-corado com hematoxilina ilustrando a região de interesse em que foram contados os osteoclastos (aumento de 25X). A linha tracejada em azul se inicia na região palatina a uma distância de 500 µm a partir do epitélio juncional e se estende sobre a superfície óssea até a região apical da raiz palatina.

Fonte: Elaboração própria.

4.6 Análise Macroscópica

Como metodologia alternativa para confirmação dos resultados de avaliação da reabsorção óssea, as peças das quais foram dissecados os tecidos moles (3 hemimaxilas de cada condição experimental) foram mantidas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 24 horas para remover o tecido mole residual. Em seguida as peças foram imersas por 5 minutos em solução de azul de metileno (0,7 mg/mL em etanol 50%) a temperatura ambiente. As peças foram posicionadas de forma padronizada sobre base de cera para a obtenção de imagens digitais em estereomicroscópio (Leica HZ6- magnificação de 4.). Nestas imagens, um examinador treinado e cego para os grupos experimentais delimitou a superfície radicular exposta (corada pelo azul de metileno) no primeiro e segundo molares, desde a junção cimento-esmalte até a crista óssea. do dente utilizando o programa ImageJ (National Institutes of Health, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.) (Figura 6).

Figura 6 - Imagem digital representativa das imagens utilizadas na análise da área de superfície radicular exposta em hemi-maxila corada com azul de metileno.



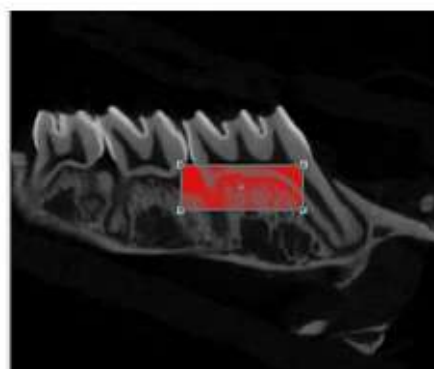
A área de raiz exposta foi delimitada com o programa ImageJ. Para conversão da área determinada em pixels para mm^2 , foi utilizada a escala com quadrados de 1 mm^2 posicionada abaixo da peça analisada.

Fonte: Elaboração própria.

4.7 Microtomografia computadorizada

Após a fixação em paraformaldeído a 4% por 12 h a 4°C, as peças destinadas a análise por microtomografia computadorizada foram transferidas para etanol a 70% até o momento da análise, que foi realizada pela varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia computadorizada (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) com cortes de 18 µm de espessura e utilizando condições (50 kV, 300 mA, filtro de atenuação de alumínio de 0,5 mm de espessura) previamente otimizadas para este tipo de amostra. Após a reconstrução, as imagens tridimensionais geradas pelo software do tomógrafo foram rotacionadas em uma orientação tridimensional padrão utilizando referências anatômicas definidas e padronizadas, e foi estabelecido um limite de contraste padronizado para distinguir tecidos mineralizados de não-mineralizados utilizando o software CT Analyser (version 1.12.4.0 Bruker microCT, Skyscan, Bélgica). Para a determinação da região de interesse (ROI), foi construída uma caixa volumétrica de dimensões padronizadas (1400 x 500 x 540 Mm, comprimento x altura x espessura), que foi posicionada segundo pontos de reparo anatômicos pré-definidos (Figura 5). Nesta ROI foi determinada a fração de volume ocupado por tecido mineralizado. Os valores foram tabulados e apresentados como a proporção ou percentual (%) de tecido mineralizado na ROI. As análises foram realizadas por um operador técnico treinado e cego para os grupos experimentais.

Figura 5 - Definição da área de interesse (ROI) para a análise por microtomografia computadorizada



Na imagem bidimensional (plano sagital ou mesio-distal) correspondente ao centro do 1o. molar superior, foi definida uma área retangular com comprimento de 1.400 µm (M-D) a partir da junção cimento-esmalte da superfície D do 2o. molar, e com altura (ocluso-apical) de 500 µm. Na reconstrução tridimensional, este retângulo foi estendido a partir desta imagem (no centro do 1o. molar) em direção palatina por 30 cortes (540 µm). A área total da ROI assim definida era de 378 µm³.

Fonte: Elaboração própria.

4.8 Ativação das vias de sinalização (Western Blot)

A partir das amostras de tecido gengival congeladas, foram extraídas proteínas totais por meio da lise mecânica dos tecidos utilizando pistilo plástico adaptado em microtubos de 1,5 mL em 150 µL de tampão de lise (M-Per, Pierce - ThermoFisher Scientific) suplementado com coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Complete e PhosStop, Roche). Após a maceração mecânica, as amostras foram deixadas em gelo por 30 minutos, centrifugadas (12,000 RPM, 4°C, 10 min) e transferidas para novos microtubos de 1.5 mL. As amostras foram quantificadas em leitor de placas (Spectramax L, Molecular Devices) verificando a absorbância em 595 nm, segundo o método de Bradford (Bio-Rad Laboratories), utilizando curva-padrão preparada com diluição seriada de BSA (8 - 80 g/mL).

Para a realização do Western-blot, um total de 40 µg de cada amostra foi acrescentado a tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% de glicerol, 100 mM ditiotreitol, 2% de dodecil sulfato de sódio, 0,01% de azul de bromofenol) na proporção vol:vol de 1 tampão : 6 amostra. Antes de serem carregadas no gel de poliacrilamida, as amostras foram aquecidas à 95°C por 5 min para completa desnaturação. Foram preparados géis descontínuos de poliacrilamida (4% no gel de empilhamento e 12% no gel de separação), e as amostras foram separadas eletroforéticamente em tampão de Tris-Glicina-SDS utilizando corrente constante de 100 V (32 mA) durante 60 min. Subsequentemente, as proteínas separadas nos géis foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose de 0,2 µm durante mais 60 minutos em tampão de metanol à corrente constante de 110 mA/gel.

As membranas foram bloqueadas (tampão Tris contendo 5% BSA e 0,1% de Tween-20) durante 1 h à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários específicos para as formas ativas (fosforiladas) e totais (incluindo formas fosforiladas e não fosforiladas) das proteínas de interesse na diluição de 1:1000 indicada pelo fornecedor dos anticorpos (Cell Signaling Inc.) durante 18 h à 4°C. Após três lavagens (15 min/lavagem) em tampão Tris/Tween-20, a presença dos anticorpos primários foi detectada pela incubação com anticorpos secundários espécie-específicos conjugados à peroxidase (Cell Signaling Inc.) por 1 h à temperatura ambiente. Após novas lavagens, o complexo anticorpo primário/anticorpo secundário conjugado à HRP foi detectado com a utilização de um substrato quimioluminescente de HRP (SuperSignal West Pico, Pierce - ThermoFisher

Scientific). Por meio de um sistema de documentação digital (GelDoc XT, Bio-Rad Laboratories), foram obtidas imagens das membranas. Nestas imagens utilizando o software ImageQuant (Bio-Rad Laboratories) foi feita a quantificação densitométrica das bandas correspondentes às proteínas de interesse, normalizadas para as bandas correspondentes à expressão das formas totais (incluindo formas fosforiladas e não-fosforiladas) das proteínas de interesse.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos a partir de cada experimento foram analisados em separado, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Foram calculadas medidas de tendência central segundo as condições experimentais, considerando cada dado como um evento independente. O objetivo da análise dos dados foi comparar os resultados segundo as diferentes condições experimentais. Para estas comparações, considerando cada ponto de dado como um evento independente, foram utilizados o teste t de Student não pareado com correção de Welch para variâncias desiguais entre os grupos e a análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* de Tukey para comparações pareadas. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$) para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Curcumin nanoparticulado reduz a severidade da resposta inflamatória associada ao modelo de doença periodontal induzida por injeções de LPS

A análise histomorfométrica dos cortes histológicos corados com H/E indicou que a injeção de LPS efetivamente induziu uma marcante resposta inflamatória nos tecidos gengivais, com significativo aumento do número de neutrófilos polimorfonucleares e de células mononucleares. A administração local de nanocurcumin reduziu de forma significativa a presença destes dois tipos celulares, resultando em níveis compatíveis aos observados no tecido gengival em que não foi induzida a doença periodontal (em que foram realizadas injeções dos veículos PBS/nanopartículas 'vazias') (Figura 8).

Foi constatado um aumento no número de células fibroblastóides nos tecidos gengivais em que foi realizada a indução de doença periodontal experimental e a administração de nanocurcumin reduziu a quantidade destas células significativamente, atingindo níveis inferiores aos observados nos tecidos gengivais normais, injetados apenas com os veículos (PBS/nanopartículas 'vazias'). Interessante observar que mesmo na ausência de estímulo inflamatório, nas hemimaxilas injetadas com PBS a administração de nanocurcumin reduziu significativamente a quantidade de células fibroblastóides (Figura 8).

Figura 8 - Efeito de nanocurcumin na modulação da resposta no infiltrado inflamatório-
Análise histomorfométrica. (continua)

A

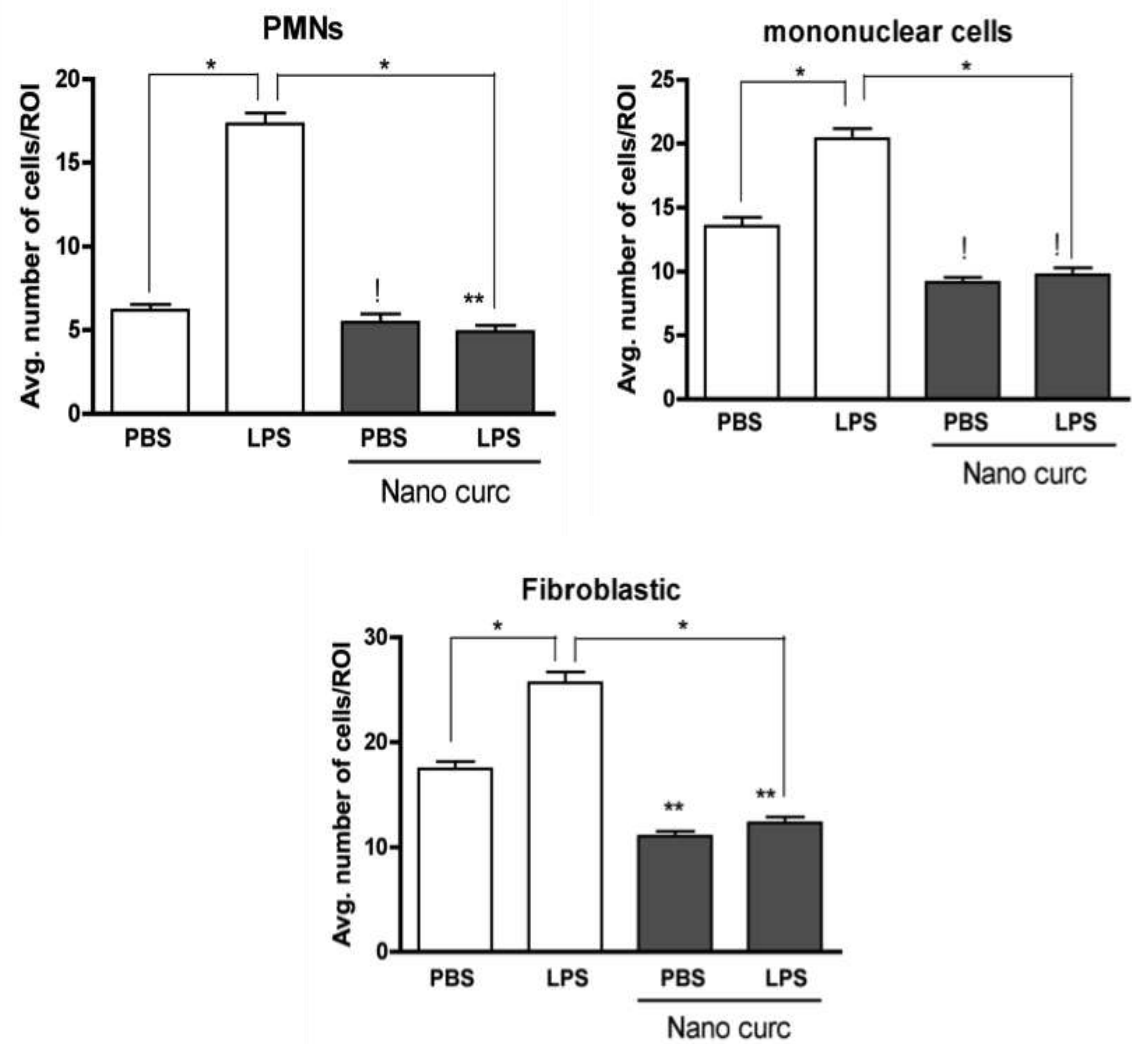
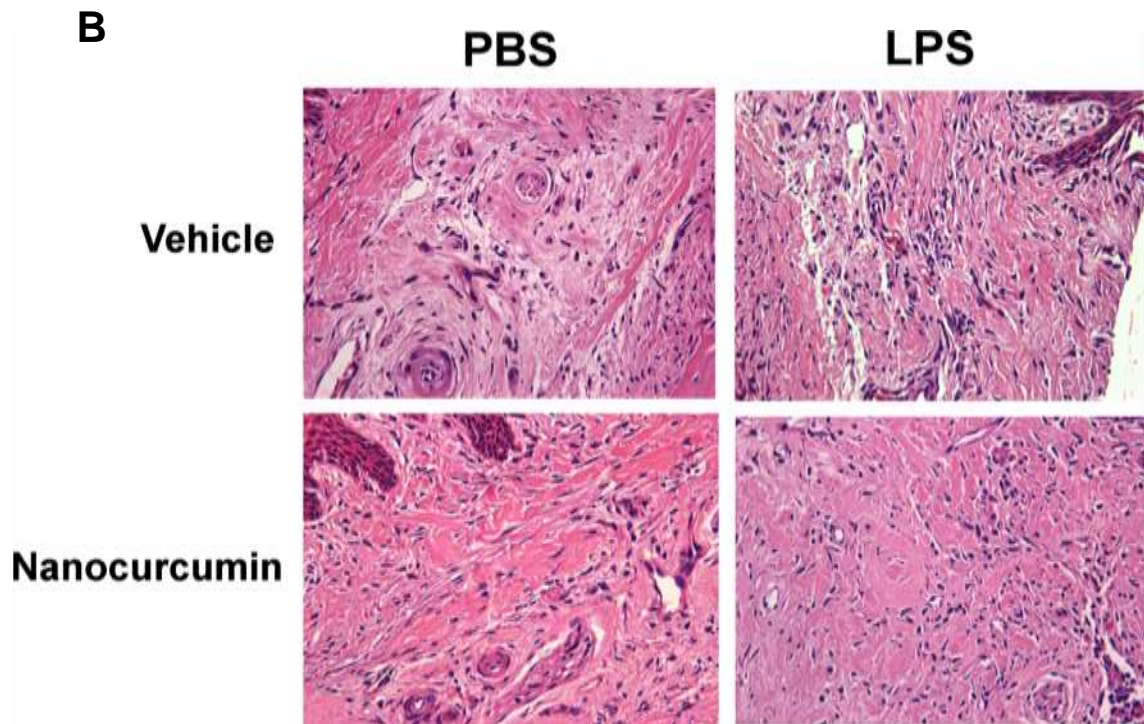


Figura 8 - Efeito de nanocurcumin na modulação da resposta no infiltrado inflamatório-
Análise histomorfométrica. (Conclusão)



(A) Gráficos indicam a quantidade média de células inflamatórias (mononucleares, polimorfonucleares) e de células fibroblastóides contadas nos tecidos gengivais avaliados em aumento de 400X segundo a condição experimental. Dados derivados de duas contagens independentes de um total de 180 cortes histológicos analisados (9 cortes de provenientes de cada hemi-maxila/ 5 peças de condição experimental). Resultados da ANOVA seguido de Tukey para comparações pareadas (* $p < 0.05$). (B) Imagens representativas de cortes corados com H/E na área de interesse (em que foram realizadas as injeções bilaterais de PBS/LPS e contra-laterais de veículo/nanocurcumin) em aumento de 200X.

Fonte: Elaboração própria.

Administração local de Curcumin nanoparticulado inibe significativamente a reabsorção óssea inflamatória em modelo de doença periodontal experimental

O ensaio de avaliação da área de superfície radicular exposta após coloração com azul de metileno indica que as hemi-maxilas em que foi injetado LPS apresentaram reabsorção óssea claramente visível. A administração local do nanocurcumin resultou em redução marcante (embora não significativa estatisticamente nesta análise) da reabsorção óssea em comparação às áreas que receberam injeções do veículo de nanopartículas sem curcumin (Figura 9).

Figura 9 - Administração local de nanocurcumin atenua a reabsorção óssea inflamatória associada ao modelo de doença periodontal induzido por LPS. (Continua)

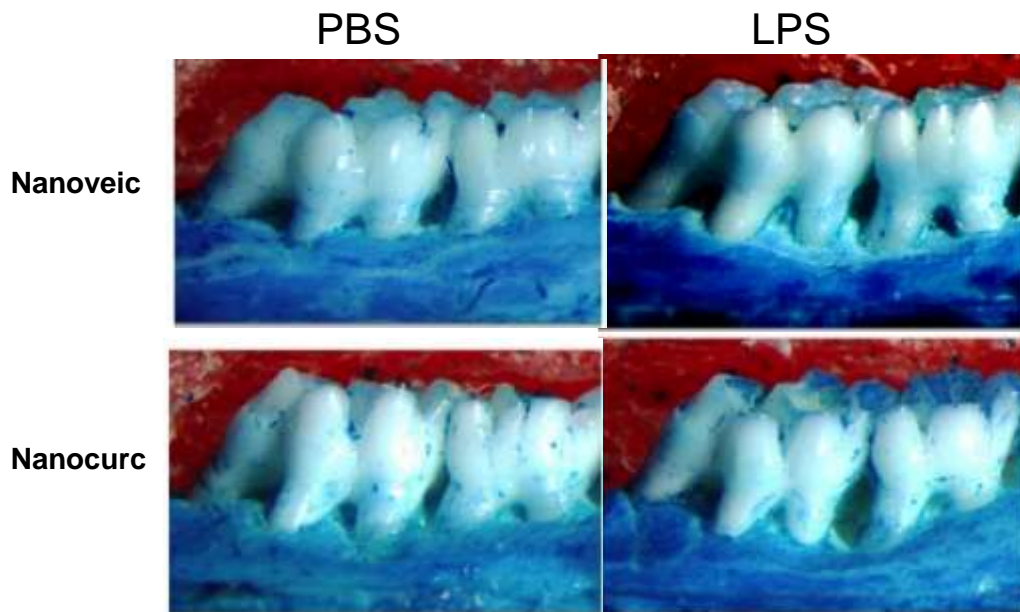
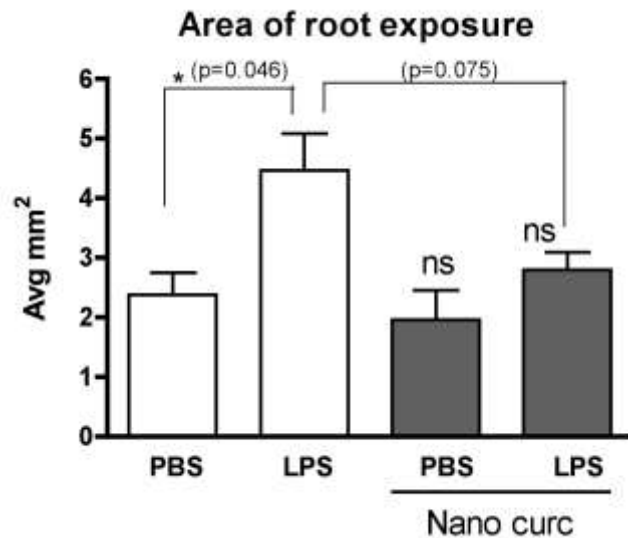


Figura 9 - Administração local de nanocurcumin atenua a reabsorção óssea inflamatória associada ao modelo de doença periodontal induzido por LPS. (Conclusão)

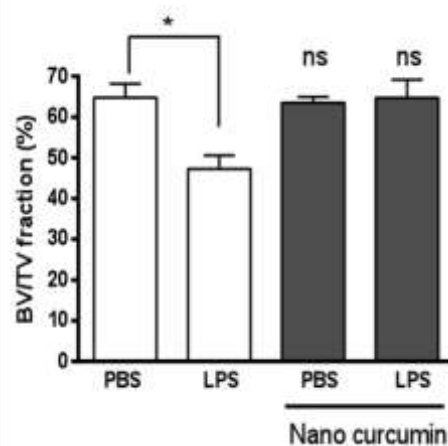
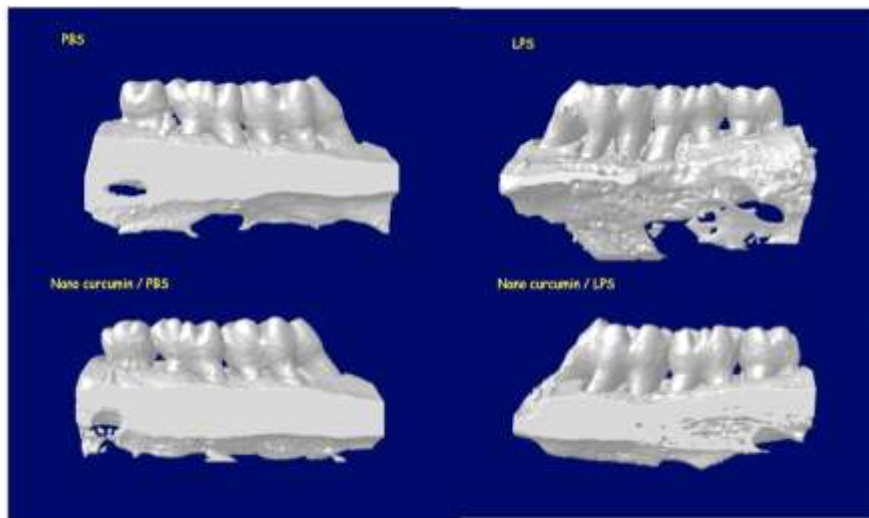


Imagens representativas de hemi-maxilas segundo a condição experimental (vista palatina). O gráfico apresenta a área média (\pm desvio-padrão) de superfície radicular exposta mensurada utilizando o software ImageJ em imagens digitalizadas obtidas de forma padronizada de três hemi-maxilas para cada condição experimental. Dados analisados utilizando o test t de Student não pareado com correção de Welch para desigualdade de variâncias (valores de 'p' indicados para as comparações entre as condições experimentais unidas pelos bráquetes. 'ns' indica ausência de diferença significativa em comparação às hemi-maxilas em que foram injetados apenas os veículos (PBS / nanopartículas 'vazias').

Fonte: Elaboração própria.

Por outro lado, a avaliação quantitativa tridimensional a partir dos dados da análise por microtomografia computadorizada indicou que a administração local de nanocurcumin efetivamente inibiu de forma completa a reabsorção óssea inflamatória neste modelo experimental (Figura 10).

Figura 10 - Nanocurcumin aplicado localmente inibe completamente a reabsorção óssea inflamatória no modelo de doença periodontal induzido por LPS.



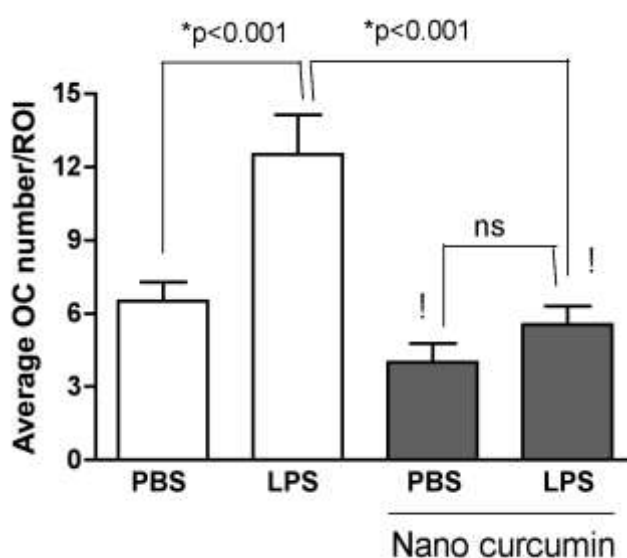
Imagens representativas de reconstruções tridimensionais de hemi-maxilas dos animais em cada grupo (vista palatina). O gráfico apresenta os resultados da quantificação da proporção de tecido mineralizado em relação ao volume total padronizado da área de interesse de 378 μm^3 . Redução da fração 'volume de tecido mineralizado/volume total' ('bone volume/total volume' ou 'BV/TV') indica reabsorção óssea. Os dados demonstram que a injeção local de nanocurcumin inibiu completamente a reabsorção óssea associada às injeções de LPS ('ns' indica ausência de diferença em comparação ao grupo controle, sem indução de doença periodontal e injetado apenas com os veículos PBS/nanopartículas 'vazias'). Além disso, a realização de 5 injeções semanais não resultou em reabsorção óssea por trauma (grupos PBS/nanoveículo e PBS/nanocurcumin). Dados de 8 peças por grupo experimental analisados por meio de ANOVA seguido de Tukey para comparações pareadas (* $p < 0.05$).

Fonte: Elaboração própria.

Administração local de curcumin nanoparticulado reduziu significativamente a quantidade de osteoclastos presentes in vivo.

A contagem dos osteoclastos presentes na área de interesse, identificados morfológicamente em cortes corados com H/E demonstra que a injeção de LPS/veículo de nanopartículas resultou em aumento significativo no número de osteoclastos em comparação às hemi-maxilas em que foi injetado PBS/veículo de nanopartículas. A aplicação de nanocurcumin reduziu significativamente o número de osteoclastos presentes nas hemi-maxilas em que foi induzida a doença periodontal experimental com injeções de LPS. Esta redução associada à injeção do nanocurcumin foi tão marcante que não houve diferença significativa na quantidade de osteoclastos presentes nas hemi-maxilas em que foi injetado PBS (sem indução de doença periodontal) (Figura 11).

Figura 11 - Diminuição significativa no número de osteoclastos nas hemi-maxilas injetadas com nanocurcumin



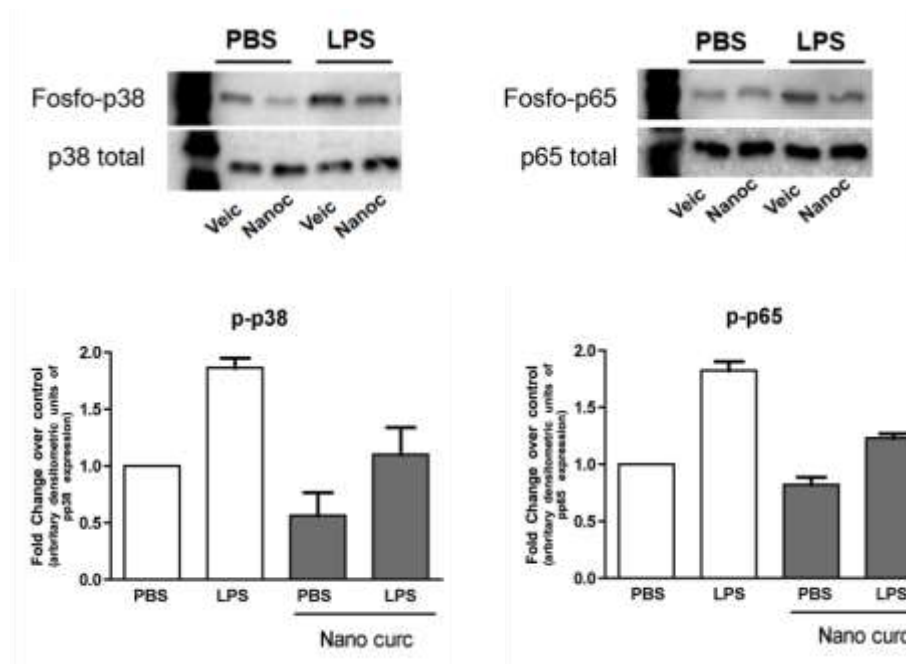
Nas hemi-maxilas em que foi injetado o nanoveículo, as injeções de LPS aumentaram significativamente o número de osteoclastos em comparação ao grupo controle (PBS) (*p<0,001). O número de osteoclastos presentes em amostras submetidas à injeção de LPS e também de nanocurcumin foi significativamente reduzido (*p<0,001), de forma que não houve diferença no número de osteoclastos presentes em comparação ao grupo injetado com PBS ('ns': diferença não significativa entre as condições experimentais indicadas, '!': diferença não significativa em comparação às amostras injetadas com PBS/veículo). Dados obtidos de 108 cortes (9 cortes de provenientes de cada hemi-maxila/ 3 peças de condição experimental) analisados por meio de ANOVA seguido de Tukey para comparações pareadas (*p<0.05).

Fonte: Elaboração própria.

A redução do número de células inflamatórias indica a eficácia do nanocurcumin aplicado localmente em inibir a severidade da resposta imune nos tecidos gengivais. Considerando que a expressão de diversos mediadores inflamatórios está diretamente relacionada à atividade das vias NF- κ B e p38.

MAPK, as quais também representam as principais vias de sinalização ativadas *downstream* dos TLRs, também foi avaliada o efeito da administração local de nanocurcumin na atividade de MAPK. Esta avaliação indicou que o nanocurcumin reduziu de forma marcante a atividade de NF- κ B e p38 MAPK nos tecidos gengivais in vivo (Figura 12).

Figura 12 -: Administração local de nanocurcumin inibe a atividade das vias p38 MAPK e NF- κ B nos tecidos gengivais no modelo de doença periodontal induzida por LPS



Imagens representativas dos Western-blots realizados para avaliação do estado de ativação das vias p38 MAPK e NF- κ B (p65). As formas fosforiladas representam a condição ativa destas vias. As formas totais (incluindo formas fosforiladas e não-fosforiladas) foram avaliadas como forma de normalização do carregamento das amostras. Cada um dos westerns/imunoblots foi realizado utilizando 40 μ g de proteína total derivadas dos tecidos gengivais, segundo as diferentes condições experimentais. Gráficos apresentam os dados da análise densitométrica das imagens digitalizadas de três westerns blots realizados utilizando amostras de proteína de três hemi-maxilas distintas e realizados de forma independente. É apresentada a regulação relativa (fold change) em relação ao estado de ativação de p38 MAPK e NF- κ B (p65) nas amostras provenientes de hemi-maxilas em que foram injetados apenas os veículos (PBS/ nanopartículas 'vazias').

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi desenhado e executado como um estudo inicial, de "prova de princípio", para verificar a viabilidade e efeito biológico associado à administração local de curcumin veiculado em nanopartículas. Os resultados indicam a efetiva inibição da reabsorção óssea inflamatória, associada à diminuição significativa no número de osteoclastos e do infiltrado de células inflamatórias, bem como atenuação da atividade de p38 MAPK e NF-kB. Não observamos nenhum tipo de resultado adverso, local ou sistêmico, com a administração local do nanocurcumin ou do veículo de nanopartículas vazias.

O efeito anti-inflamatório do curcumin é amplamente documentado por estudos *in vitro* em diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células T, células B^{54,77, 23,159, 37,7,32,130,63,136,159,36,1,71,56,31,118,27,67,66,127,72} e também em diversos modelos *in vivo*, incluindo desfechos adversos da gravidez por inflamação da placenta, isquemia renal de reperfusão, inflamação pulmonar, sepsis, inflamação intestinal, osteoartrite, artrite e psoríase^{162,139,93,151,154,111,69,55}.

Especificamente no contexto da doença periodontal, nosso grupo de pesquisa já relatou a atenuação da inflamação, com redução da atividade de NF-kB (mas não de p38 MAPK) e da reabsorção óssea inflamatória em modelo murino de doença periodontal idêntico ao utilizado neste trabalho^{45,44}. Resultados similares foram encontrados em modelo murino de doença periodontal induzido por ligadura^{163,28} e, mais recentemente, constatou-se que a inibição da reabsorção óssea alveolar neste modelo experimental está associada a inibição da expressão de IL-17 e de ROR γ T (fator de transcrição associado à polarização de células Th17^{92, 131}). Nosso grupo de pesquisa observou a inibição da ativação de NF-kB e p38 MAPK em macrófagos estimulados com LPS e pré-tratados com curcumin⁴⁶. Evidências indicam que o curcumin também inibe a ativação de NF-kB em macrófagos estimulados com LPS de *Porphyromonas gingivalis*²¹ ou com LPS de *Prevotella intermedia*⁷³.

A grande maioria dos trabalhos utiliza o curcumin *in vitro* diluído em veículo não-aquoso (etanol ou DMSO), enquanto seu uso *in vivo* é associado à utilização de diferentes veículos de natureza lipídica ou outros compostos polares (carboximetilcelulose). A virtual insolubilidade do curcumin em meio aquoso é uma das propriedades químicas que limitam seu uso *in vivo*, juntamente à outras limitações farmacodinâmicas, como baixa absorção no trato gastrointestinal e meia-vida

plasmática na ordem de minutos^{5,35}. Além destas dificuldades, o curcumin utilizado nos diversos estudos é obtido comercialmente de diferentes fontes e, por vezes, não há indicação da fonte de obtenção do composto. As variações de veículo, concentrações utilizadas e origem do curcumin; juntamente com as pobres propriedades farmacodinâmicas deste composto podem representar vieses que explicam a variabilidade de resultados relatados na literatura.

O potencial terapêutico do curcumin, especificamente suas propriedades anti-inflamatórias, juntamente com as pobres propriedades farmacodinâmicas justificam a busca por compostos com modificações químicas do curcumin que resultem em maior consistência e potência do efeito biológico com a utilização de doses reduzidas em comparação ao extrato natural^{58,126,110,90,156,155}. De fato, alguns destes compostos sintéticos baseados na modificação química do curcumin demonstram atividade anti-inflamatória e inibição da reabsorção óssea em diferentes modelos murinos de doença periodontal experimental^{43,34}, inclusive com redução de 80X na dose administrada do composto modificado em comparação ao composto natural (3 mg/Kg x 400 mg/Kg), para a obtenção do mesmo efeito biológico em modelo murino de doença periodontal experimental¹⁶

Outra forma de superar as dificuldades farmacodinâmicas do curcumin que também tem sido intensamente pesquisada na literatura recente é a busca por veículos alternativos para o curcumin, em especial as nanoformulações lipídicas, associadas à quitosana, proteína hidrolisada de milho ou caseinato de sódio^{143,144,129}. Uma formulação proprietária de curcumin carregado por nanopartículas denominada 'Theracurmin' foi avaliada em humanos que receberam dose única de 150 e 210 mg do composto por via oral, atingindo concentração plasmática máxima 189 e 275 ng/mL, respectivamente, e meia-vida 9,7 h para a dose de 150 mg e 13 h para a dose de 210 mg, sendo que o único efeito colateral registrado foi diarreia leve em um dos 6 indivíduos participantes do estudo¹²⁹.

Neste trabalho, utilizamos nanopartículas de PLGA, sintetizadas à partir de ácido poliáctico co-glicólico. A utilização do ácido poli-láctico co-glicólico em preparos de nanopartículas para aplicações terapêuticas é aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos por suas características biodegradáveis e biocompatíveis e tem demonstrado ser um veículo potencialmente eficiente no carregamento de drogas com reduzida capacidade de permeabilidade por modular o efeito da glicoproteína-P, proteína expressa na superfície celular que promove

ativamente a saída de substâncias do interior celular¹⁰¹. A veiculação do curcumin em nanopartículas de PLGA aumenta a meia-vida plasmática do curcumin de cerca de 20 minutos (solução aquosa de curcumin) para 4 horas após uma única administração por gavagem oral em ratos, resultando em aumento de 15 vezes na biodisponibilidade do curcumin⁷⁰. Além disso, as nanopartículas de PLGA permitem modificações químicas suplementares para sua funcionalização, visando aumentar a absorção das nanopartículas em tecidos/tipos celulares específicos, direcionar a absorção por vias específicas (evitando, por exemplo, a macropinocitose e a possível degradação lisossômica) ou viabilizar a detecção de sua absorção e localização sub-celular por meio de ligação covalente das nanopartículas com compostos fluorescentes, por exemplo¹⁰⁹.

É preciso considerar, no entanto, a possibilidade de influência de aspectos como o tempo e temperatura de armazenamento, bem como a exposição à luz nas propriedades biológicas do curcumin veiculado em nanopartículas de PLGA. As atividades anti-oxidantes e anti-nitrosantes do curcumin nanoencapsulado são afetadas de forma oposta pela exposição à luz¹². Neste trabalho, o curcumin nanoencapsulado foi utilizado dentro de 30 dias de seu preparo e as condições de armazenamento foram padronizadas (4 C, ao abrigo da luz).

Considerando este estudo como um trabalho inicial para 'prova de princípio', os dados demonstram a viabilidade e efetividade biológica anti-inflamatória da aplicação local do curcumin veiculado por nanopartículas de PLGA. No entanto, estes resultados devem ser interpretados em termos das limitações do modelo experimental e das análises realizadas. O modelo experimental de indução de doença periodontal experimental por injeções de LPS permite maior controle sobre a intensidade do estímulo inflamatório (concentração de LPS), que foi mantido ao longo de todo o período experimental. No entanto, de forma distinta da doença periodontal natural e de outros modelos experimentais (por ex., ligaduras ou infecção microbiana), não há colonização microbiana na parte cervical do dente, e tanto o estímulo (LPS) quanto o tratamento (nanocurcumin ou veículo) foram introduzidos diretamente nos tecidos gengivais, sem a presença de toxinas microbianas ou outros antígenos (PAMPs) e sem o envolvimento do epitélio juncional e do sulco. A perspectiva de aplicação clínica é a utilização do nanocurcumin de forma não invasiva, introduzido (não injetado) no sulco gengival de sítios inflamados, evitando a administração sistêmica e procurando maximizar o efeito biológico, direcionando-o às áreas efetivamente inflamadas. Outra

importante diferença em relação à perspectiva de aplicação terapêutica clínica é o fato que na abordagem experimental utilizada neste estudo a administração do nanocurcumin foi concomitante ao estímulo inflamatório, enquanto clinicamente o estímulo inflamatório representado pelo biofilme dental seria removido (ao menos parcialmente) previamente à aplicação local do nanocurcumin, uma vez que a proposta é sua utilização como adjunto ao tratamento mecânico.

As duas metodologias de análise quantitativa da reabsorção óssea inflamatória apresentam resultados consistentes (inibição da reabsorção óssea no grupo tratado com nanocurcumin), porém com diferença na magnitude do efeito (não significativo estatisticamente na análise macroscópica). Atribuímos esta diferença de magnitude de efeito entre as análises ao menor 'n' utilizado na avaliação macroscópica e também ao fato desta análise ser bidimensional (incluindo os planos sagital/mesio-distal e coronal/cérvico-apical), enquanto na avaliação por microtomografia computadorizada, por sua característica tridimensional, foi possível incluir o plano frontal (plano vestíbulo-palatino) e considerar o tecido ósseo presente na região palatina dos dentes superiores, exatamente a região em que foi induzida a inflamação com as injeções de LPS.

A avaliação histomorfométrica do infiltrado inflamatório também é sujeita a vieses introduzidos pelo ângulo de obtenção dos cortes histológicos, que pode alterar a morfologia nuclear considerada na identificação dos tipos celulares avaliados (osteoclastos, neutrófilos, células mononucleares ou fibroblastóides); no entanto esta forma de análise é reportada na literatura, sendo considerada adequada por muitos autores^{25,26,107,9,86,42,87,95,106}. Mesmo sem considerar a efetiva caracterização dos tipos celulares inflamatórios (neutrófilos e células mononucleares), os resultados indicam, coletivamente, redução do infiltrado celular nos tecidos em que foi injetado o nanocurcumin, suportando a interpretação de inibição do infiltrado inflamatório.

Esta interpretação é suportada também pelo achado de atenuação do estado de ativação das vias p38 MAPK e NF- κ B, as quais são ativadas no modelo experimental utilizado³⁸, além de serem duas das principais vias de sinalização ativadas por TLRs incluindo o TLR4, receptor de LPS que foi o agente indutor da doença periodontal no modelo utilizado. No ensaio de avaliação da atividade de p38 MAPK e NF- κ B também atribuímos a ausência de significância estatística ao reduzido 'n' (proteínas obtidas de 3 amostras para cada condição experimental), além das dificuldades na padronização do tamanho e localização de obtenção das amostras pela ressecção cirúrgica do

tecido gengival. O fato de p38 e NF- κ B serem proteínas intracelulares dificulta sua detecção *in vivo*, uma vez que, mesmo em tecidos inflamados, a quantidade relativa de proteínas da matriz extracelular (tanto de proteínas constituintes, como o colágeno, quando de proteínas secretadas pelas células presentes) é superior à de proteínas intracelulares. Considerando a reduzida área inflamada no modelo de injeção de LPS, pequenas diferenças no tamanho da amostra ou na localização de onde foram retiradas as amostras de tecido gengival podem afetar a relativa abundância de células inflamatórias presentes e, assim, a detecção de p38 MAPK e NF- κ B. De qualquer forma, os resultados obtidos indicam claramente a atenuação da atividade de p38 MAPK e NF- κ B e suportam a redução da atividade inflamatória; porém não é possível determinar se esta atenuação na ativação de p38 MAPK e NF- κ B é resultante da redução do número de células inflamatórias presentes ou da inibição da ativação destas células (ou da combinação destas duas possibilidades).

Neste estudo, selecionamos p38 MAPK e NF- κ B como representativas da atividade inflamatória de forma arbitrária, com base em seus papéis primordiais na sinalização via TLRs e na regulação da expressão de diversos genes pró-inflamatórios^{152,79,76}. Além disso, evidências indicam que o curcumin inibe a sinalização via TLR4^{153,161,96} e até mesmo a ativação de TLR4 por meio da inibição da dimerização do receptor¹⁵². No entanto, não podemos afastar a possibilidade do efeito biológico do nanocurcumin estar relacionado à modulação de outras vias de sinalização e mecanismos biológicos. Evidências indicam que curcumin afeta a atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e diversas vias de sinalização intracelular, incluindo SOCS1, SOCS3, p38, ERK e JNK MAPKinases, JAK/STAT, PI3K/Akt^{46,154,23,123}, bem como influenciando a atividade de inflamassomos³⁹ e microRNAs¹⁰⁰.

A redução do número de células fibroblastóides é uma observação inesperada e pode sugerir um potencial prejuízo ao processo de reparo dos tecidos periodontais. No entanto, diversos estudos indicam o favorecimento do reparo com a administração de curcumin, tanto com a aplicação tópica em diversos modelos *in vivo*^{119,116,89,47,157}. É possível que a redução do número de células fibroblastóides observada possa estar relacionada à atenuação da resposta inflamatória crônica no microambiente do tecido gengival, uma vez que a inflamação pode afetar tanto a proliferação⁸⁴, quanto o fenótipo dos fibroblastos, com maior expressão de citocinas inflamatórias e metaloproteínases de matriz¹⁵. De fato, a proliferação de fibroblastos gengivais

humanos é aumentada pelo estímulo com IL-1¹²¹, citocina presente no microambiente do tecido gengival inflamado, assim especulamos que a redução do número de células fibroblastóides observada seja relacionada à atenuação da inflamação neste microambiente.

Também é possível que a redução do número de células fibroblastóides observada seja resultante diretamente do efeito biológico do nanocurcumin aplicado localmente, que deve ter resultado em concentração significativamente maior do composto nos tecidos gengivais em comparação à administração oral. Neste sentido, o curcumin 'livre' (diluído em veículo polar, DMSO) foi mais tóxico a em fibroblastos sinoviais do que uma formulação de nanopartículas lipossomais carreando curcumin (denominada 'Lipocurc') em fibroblastos sinoviais lipossomos, a qual reduziu a proliferação e a expressão de citocinas inflamatórias nestes fibroblastos⁷⁵.

A aplicação terapêutica de nanoformulações de partículas de PLGA contendo curcumin natural demonstrou atividade biológica *in vitro* em células de carcinoma espinocelular da cavidade bucal⁹⁸, e também apresentaram resultados positivos em modelos *in vivo* de glioma²⁹, colite¹⁴⁷ e câncer de cólon⁷⁴. Outros tipos de nanopartículas carreando curcumin demonstram efeitos positivos em modelos experimentais *in vivo* de artrite¹⁶⁰, reparo de feridas cutâneas⁹¹ e sepsis¹⁴².

Coletivamente, estas informações da literatura e os dados obtidos neste estudo indicam o potencial do curcumin veiculado em nanopartículas como adjuvante na terapia periodontal. Este potencial pode ser ampliado com modificações no veículo (por ex., a funcionalização das nanopartículas de PLGA por modificações químicas) e pode incluir também outras possibilidade de interesse particular na doença periodontal, como a fotoativação do curcumin para favorecer seu efeito antimicrobiano contra bactérias do biofilme dental^{103,117,114} ou sua utilização após a remoção do agente agressor externo (biofilme microbiano) para favorecer o processo de reparo¹³⁷.

Em conclusão, os dados do estudo indicam a efetividade da aplicação local de curcumin veiculado em nanopartículas na atenuação da resposta inflamatória e da reabsorção óssea associadas ao modelo experimental de doença periodontal induzida por injeções de LPS em ratos. Estudos subsequentes deverão avaliar os mecanismos de ação do nanocurcumin em aspectos da biologia de células de interesse, incluindo a proliferação, viabilidade e expressão gênica (fibroblastos), atividade/metabolismo oxidativo, fagocitose e polarização fenotípica (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos).

7 CONCLUSÃO

Segundo a hipótese proposta para este estudo, os dados obtidos demonstram que a aplicação local do curcumin nanoparticulado efetivamente reduz a intensidade da resposta inflamatória e a severidade da reabsorção óssea associadas ao modelo de doença periodontal experimental induzido por LPS.

REFERÊNCIAS*

1. Abu-Rizq HA, Mansour MH, Afzal M. Curcuma longa attenuates carbon tetrachloride-induced oxidative stress in T-lymphocyte subpopulations. *Methods Mol Biol.* 2015; 1208: 159-70.
2. Aggarwal BB, Yuan W, Li S, Gupta SC. Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57(9): 1529-42.
3. Amano C, Minematsu H, Fujita K, Iwashita S, Adachi M, Igarashi K, et al. Nanoparticles containing Curcumin useful for suppressing macrophages in vivo in mice. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137207.
4. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med.* 1991; 57(1):1-7.
5. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 807-18.
6. Anand P, Nair HB, Sung B, Kunnumakkara AB, Yadav VR, Tekmal RR, et al. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochem Pharmacol.* 79(3): 330-8.
7. Antoine F, Simard JC, Girard D. Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2013; 17(4): 1101-7.
8. Araujo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(2): 629-35.
9. Barakat MT, Mofteh NH, El Khayyat MA, Abdelhakim ZA. Significant reduction of inflammation and sebaceous glands size in acne vulgaris lesions after intense pulsed light treatment. *Dermatol Ther.* 2016 Sep 9. [Epub ahead of print].
10. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000.* 2013; 62(1): 203-17.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

11. Behal R, Mali AM, Gilda SS, Paradkar AR. Evaluation of local drug-delivery system containing 2% whole turmeric gel used as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; 15(1): 35-8.
12. Betbeder D, Lipka E, Howsam M, Carpentier R. Evolution of availability of curcumin inside poly-lactic-co-glycolic acid nanoparticles: impact on antioxidant and antinitrosant properties. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 5355-66.
13. Bhatia M, Urolagin SS, Pentyala KB, Urolagin SB, K BM, Bhoi S. Novel therapeutic approach for the treatment of periodontitis by curcumin. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(12): ZC65-9.
14. Bisht S, Schlesinger M, Rupp A, Schubert R, Nolting J, Wenzel J, et al. A liposomal formulation of the synthetic curcumin analog EF24 (Lipo-EF24) inhibits pancreatic cancer progression: towards future combination therapies. *J Nanobiotechnology.* 2016;14(1):57.
15. Bozkurt SB, Hakki SS, Hakki EE, Durak Y, Kantarci A. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide induces a pro-inflammatory human gingival fibroblast Phenotype. *Inflammation.* 2016. Nov 3. [Epub ahead of print].
16. Brandão DA. Modulation of periodontal disease curcumin chemically modified . Dose-response studies in rodent model. [Disertação do Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP. 2016.
17. Bulut F, Grad I, Manoil D, Simon S, Wataha JC, Filieri A, et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of 3 photosensitizers activated with blue light. *J Endod.* 2014; 40(3): 427-31.
18. Chainani-Wu N, Collins K, Silverman S, Jr. Use of curcuminoids in a cohort of patients with oral lichen planus, an autoimmune disease. *Phytomedicine.* 2012; 19(5): 418-23.
19. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Lee SS. Zebrafish: a complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *J Nanobiotechnology.* 2016; 14(1): 65.
20. Chakraborty M, Jain S, Rani V. Nanotechnology: emerging tool for diagnostics and therapeutics. *Appl Biochem Biotechnol.* 165(5-6):1178-87.
21. Chen D, Nie M, Fan MW, Bian Z. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from Porphyromonas gingivalis. *Pharmacology.* 2008; 82(4): 264-9.
22. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 2001; 21(4B): 2895-900.

23. Cianciulli A, Calvello R, Porro C, Trotta T, Salvatore R, Panaro MA. PI3k/Akt signalling pathway plays a crucial role in the anti-inflammatory effects of curcumin in LPS-activated microglia. *Int Immunopharmacol*. 2016; 36: 282-90.
24. Cirstea D, Hideshima T, Rodig S, Santo L, Pozzi S, Vallet S, et al. Dual inhibition of akt/mammalian target of rapamycin pathway by nanoparticle albumin-bound-rapamycin and perifosine induces antitumor activity in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2010; 9(4): 963-75.
25. Coimbra LS, Steffens JP, Alsadun S, Albiero ML, Rossa C, Jr., Pignolo RJ, et al. clopidogrel enhances Mesenchymal Stem cell proliferation following periodontitis. *J Dent Res*. 2015; 94(12): 1691-7.
26. Coimbra LS, Steffens JP, Rossa C, Jr., Graves DT, Spolidorio LC. Clopidogrel enhances periodontal repair in rats through decreased inflammation. *J Clin Periodontol*. 2014; 41(3): 295-302.
27. Cong Y, Wang L, Konrad A, Schoeb T, Elson CO. Curcumin induces the tolerogenic dendritic cell that promotes differentiation of intestine-protective regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2009; 39(11): 3134-46.
28. Correa MG, Pires PR, Ribeiro FV, Pimentel SZ, Casarin RC, Cirano FR, et al. Systemic treatment with resveratrol and/or curcumin reduces the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2016.May 2. [Epub ahead of print].
29. Cui Y, Zhang M, Zeng F, Jin H, Xu Q, Huang Y. Dual-targeting magnetic PLGA nanoparticles for codelivery of paclitaxel and curcumin for brain tumor therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Nov 3.[Epub ahead of print].
30. da Frota MF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Bagnato VS, Espir CG, Berbert FL. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(7): 1867-72.
31. Decote-Ricardo D, Chagas KK, Rocha JD, Redner P, Lopes UG, Cambier JC, et al. Modulation of in vitro murine B-lymphocyte response by curcumin. *Phytomedicine*. 2009; 16(10): 982-8.
32. Derochette S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Ceusters J, Deby-Dupont G, Lejeune JP, et al. Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils. *Chem Biol Interact*. 2013; 206(2): 186-93.
33. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*. 2008; 5(4): 487-95.

34. Elburki MS, Rossa C, Guimaraes MR, Goodenough M, Lee HM, Curylofo FA, et al. A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 959471.
35. Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr.* 2010; 103(11): 1545-57.
36. Ford CT, Richardson S, McArdle F, Lotito SB, Crozier A, McArdle A, et al. Identification of (poly)phenol treatments that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. *Br J Nutr.* 2016; 115(10): 1699-710.
37. Gao S, Zhou J, Liu N, Wang L, Gao Q, Wu Y, et al. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 85:131-9.
38. Garcia de Aquino S, Manzolli Leite FR, Stach-Machado DR, Francisco da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C, Jr. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sci.* 2009; 84(21-22): 745-54.
39. Gong Z, Zhou J, Li H, Gao Y, Xu C, Zhao S, et al. Curcumin suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59(11): 2132-42.
40. Gota VS, Maru GB, Soni TG, Gandhi TR, Kochar N, Agarwal MG. Safety and pharmacokinetics of a solid lipid curcumin particle formulation in osteosarcoma patients and healthy volunteers. *J Agric Food Chem.* 2010; 58(4): 2095-9.
41. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol.* 2012; 15: 117-32.
42. Graves DT, Nooh N, Gillen T, Davey M, Patel S, Cottrell D, et al. IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing. *J Immunol.* 2001; 167(9): 5316-20.
43. Gu Y, Lee HM, Napolitano N, Clemens M, Zhang Y, Sorsa T, et al. 4-methoxycarbonyl curcumin: a unique inhibitor of both inflammatory mediators and periodontal inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 329740.
44. Guimaraes MR, Coimbra LS, de Aquino SG, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C, Jr. Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res.* 2011; 46(2): 269-79.
45. Guimaraes MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C, Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun.* 2012; 18(1): 155-63.

46. Guimaraes MR, Leite FR, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C, Jr. Curcumin abrogates LPS-induced pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(10): 1309-17.
47. Guo C, Li M, Qi X, Lin G, Cui F, Li F, et al. Intranasal delivery of nanomicelle curcumin promotes corneal epithelial wound healing in streptozotocin-induced diabetic mice. *Sci Rep.* 2016; 6:29753.
48. Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors.* 2013; 39(1): 2-13.
49. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* 2013;15(1):195-218.
50. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012; 39(3): 283-99.
51. Hanes PJ, Purvis JP. Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003; 8(1): 79-98.
52. Harhaji L, Isakovic A, Raicevic N, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, et al. Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol.* 2007; 568(1-3): 89-98.
53. Hayakawa H MYIK, Yamamoto Y, Fukuda T. Difference of curcumin content in *Curcuma Longa L*, (Zingiberaceae) caused by hibridization with other *Curcum* species. *Am J Plant Sci.* 2011; 2(2): 111-9.
54. Hoppstadter J, Hachenthal N, Valbuena-Perez JV, Lampe S, Astanina K, Kunze MM, et al. Induction of Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) contributes to anti-inflammatory effects of the natural product Curcumin in macrophages. *J Biol Chem.* 2016; 291(44): 22949-60.
55. Huang G, Xu Z, Huang Y, Duan X, Gong W, Zhang Y, et al. Curcumin protects against collagen-induced arthritis via suppression of BAFF production. *J Clin Immunol.* 2013; 33(3): 550-7.
56. Huang G, Yang Y, Xu Z, Zhou P, Gong W, Li Y, et al. Downregulation of B lymphocyte stimulator expression by curcumin in B lymphocyte via suppressing nuclear translocation of NF-kappaB. *Eur J Pharmacol.* 2011; 650(1): 451-7.
57. Hugar SS, Patil S, Metgud R, Nanjwade B, Hugar SM. Influence of application of chlorhexidine gel and curcumin gel as an adjunct to scaling and root planing: a interventional study. *J Nat Sci Biol Med.* 2016; 7(2): 149-54.

58. Iranshahi M, Chini MG, Masullo M, Sahebkar A, Javidnia A, Chitsazian Yazdi M, et al. Can small chemical modifications of natural pan-inhibitors modulate the biological selectivity? The Case of Curcumin Prenylated derivatives acting as HDAC or mPGES-1 Inhibitors. *J Nat Prod*. 2015; 78(12): 2867-79.
59. Izui S, Sekine S, Maeda K, Kuboniwa M, Takada A, Amano A, et al. Antibacterial activity of Curcumin against periodontopathic bacteria. *J Periodontol*. 2016; 87(1): 83-90.
60. Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol*. 2007; 27(1): 19-35.
61. Jain SK, De Filippis RA. *Medicinal plants of India*. Michigan: Reference Publ; 1991. 849p.
62. Jancinova V, Perecko T, Harmatha J, Nosal R, Drabikova K. Decreased activity and accelerated apoptosis of neutrophils in the presence of natural polyphenols. *Interdiscip Toxicol*. 2012; 5(2): 59-64.
63. Jancinova V, Perecko T, Nosal R, Kostalova D, Bauerova K, Drabikova K. Decreased activity of neutrophils in the presence of diferuloylmethane (curcumin) involves protein kinase C inhibition. *Eur J Pharmacol*. 2009; 612(1-3): 161-6.
64. Jancinova V, Perecko T, Nosal R, Mihalova D, Bauerova K, Drabikova K. Pharmacological regulation of neutrophil activity and apoptosis: Contribution to new strategy for modulation of inflammatory processes. *Interdiscip Toxicol*. 2011; 4(1): 11-4.
65. Jayaprakasha GK, Chidambara Murthy KN, Patil BS. Enhanced colon cancer chemoprevention of curcumin by nanoencapsulation with whey protein. *Eur J Pharmacol*. 2016; 789: 291-300.
66. Jeong YI, Kim SW, Jung ID, Lee JS, Chang JH, Lee CM, et al. Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the Janus-activated kinase-protein kinase C-delta-STAT1 signaling pathway in interferon-gamma-stimulated murine dendritic cells. *J Biol Chem*. 2009; 284(6): 3700-8.
67. Jung ID, Jeong YI, Lee CM, Noh KT, Jeong SK, Chun SH, et al. COX-2 and PGE2 signaling is essential for the regulation of IDO expression by curcumin in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 2010; 10(7): 760-8.
68. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009; 14(2): 141-53.
69. Kang D, Li B, Luo L, Jiang W, Lu Q, Rong M, et al. Curcumin shows excellent therapeutic effect on psoriasis in mouse model. *Biochimie*. 2016; 123: 73-80.

70. Khalil NM, do Nascimento TC, Casa DM, Dalmolin LF, de Mattos AC, Hoss I, et al. Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013; 101:353-60.
71. Kim G, Jang MS, Son YM, Seo MJ, Ji SY, Han SH, et al. Curcumin inhibits CD4(+) T cell activation, but augments CD69 expression and TGF-beta1-mediated generation of regulatory T cells at late phase. *PLoS One*. 2013; 8(4): e62300.
72. Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, et al. Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-kappa B as potential targets. *J Immunol*. 2005; 174(12): 8116-24.
73. Kim SJ. Curcumin suppresses the production of interleukin-6 in Prevotella intermedia lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *J Periodontal Implant Sci*. 2011; 41(3): 157-63.
74. Klippstein R, Wang JT, El-Gogary RI, Bai J, Mustafa F, Rubio N, et al. Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA nanocapsules for colon cancer therapy in vivo. *Small*. 2015; 11(36): 4704-22.
75. Kloesch B, Gober L, Loebisch S, Vcelar B, Helson L, Steiner G. In Vitro Study of a Liposomal Curcumin Formulation (Lipocurc): Toxicity and biological activity in synovial fibroblasts and macrophages. *In vivo*. 2016; 30(4): 413-9.
76. Ko W, Sohn JH, Jang JH, Ahn JS, Kang DG, Lee HS, et al. Inhibitory effects of alternaramide on inflammatory mediator expression through TLR4-MyD88-mediated inhibition of NF-small ka, CyrillicB and MAPK pathway signaling in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 and BV2 cells. *Chem Biol Interact*. 2016; 244: 16-26.
77. Kong F, Ye B, Cao J, Cai X, Lin L, Huang S, et al. Curcumin represses NLRP3 inflammasome activation via TLR4/MyD88/NF-kappaB and P2X7R signaling in PMA-induced macrophages. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 369.
78. Kong KY, Marcus AI, Hong JY, Giannakakou P, Wang MD. Automatic microtubule tracking for QD-based in vivo cell imaging and drug efficacy study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006; 1: 3321-4.
79. Lai JL, Liu YH, Liu C, Qi MP, Liu RN, Zhu XF, et al. Indirubin inhibits LPS-Induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF-kB and MAPK signaling pathways. *Inflammation*. 2016 Oct 7. [Epub ahead of print].
80. Lampe V, Milobedzka J. Studien uber Curcumin. *Ber Dtsch Chem Ges*. 1913;46(2): 2235-40.
81. Lamprecht A, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y. Nanoparticles enhance therapeutic efficiency by selectively increased local drug dose in experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 315(1): 196-202.

82. Lao CD, Ruffin MTt, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med.* 2006; 6:10.
83. Lee WH, Loo CY, Ong HX, Traini D, Young PM, Rohanizadeh R. Synthesis and characterization of inhalable flavonoid Nanoparticle for lung cancer cell targeting. *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(2):371-86.
84. Lei L, Zhao C, Qin F, He ZY, Wang X, Zhong XN. Th17 cells and IL-17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin-induced murine model of systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016; 34 Suppl 100(5): 14-22.
85. Levy JG. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin Oncol.* 1994; 21(6 Suppl 15): 4-10.
86. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol.* 2007; 78(6): 1120-8.
87. Li CH, Amar S. Role of secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) in wound healing. *J Dent Res.* 2006; 85(4): 374-8.
88. Li H, Tian J, Wu A, Wang J, Ge C, Sun Z. Self-assembled silk fibroin nanoparticles loaded with binary drugs in the treatment of breast carcinoma. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 4373-80.
89. Li X, Ye X, Qi J, Fan R, Gao X, Wu Y, et al. EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 3993-4009.
90. Liang G, Shao L, Wang Y, Zhao C, Chu Y, Xiao J, et al. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17(6): 2623-31.
91. Lin YH, Lin JH, Hong YS. Development of chitosan/poly-gamma-glutamic acid/pluronic/curcumin nanoparticles in chitosan dressings for wound regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015 Oct 1. [Epub ahead of print].
92. Linyuan W, Ning G, Xiaoping L. [Study on the immune status of T helper 17 cells in mice with periodontitis]. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi.* 2015; 33(2): 125-9.
93. Liu FH, Ni WJ, Wang GK, Zhang JJ. Protective role of curcumin on renal ischemia reperfusion injury via attenuating the inflammatory mediators and Caspase-3. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2016; 62(11): 95-9.

94. Liu J, Gao Y, Cao D, Zhang L, Guo Z. Nanoparticle dispersion and aggregation in polymer nanocomposites: insights from molecular dynamics simulation. *Langmuir*. 2011; 27(12): 7926-33.
95. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res*. 2006; 85(6): 510-4.
96. Lubbad A, Oriowo MA, Khan I. Curcumin attenuates inflammation through inhibition of TLR-4 receptor in experimental colitis. *Mol Cell Biochem*. 2009; 322(1-2): 127-35.
97. Mahdi Z, Habiboalh G, Mahbobeh NN, Mina ZJ, Majid Z, Nooshin A. Lethal effect of blue light-activated hydrogen peroxide, curcumin and erythrosine as potential oral photosensitizers on the viability of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Laser Ther*. 2015; 24(2): 103-11.
98. Masloub SM, Elmalahy MH, Sabry D, Mohamed WS, Ahmed SH. Comparative evaluation of PLGA nanoparticle delivery system for 5-fluorouracil and curcumin on squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2016; 64: 1-10.
99. Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed res int*. 2014;2014:186864.
100. Momtazi AA, Derosa G, Maffioli P, Banach M, Sahebkar A. Role of microRNAs in the therapeutic effects of Curcumin in non-cancer diseases. *Mol Diagn Ther*. 2016; 20(4): 335-45.
101. Mulik R, Mahadik K, Paradkar A. Development of curcuminoids loaded poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles: Physicochemical characterization and stability study. *Eur J Pharm Sci*. 2009; 37(3-4): 395-404.
102. Nagasri M, Madhulatha M, Musalaiah SV, Kumar PA, Krishna CH, Kumar PM. Efficacy of curcumin as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis patients: a clinical and microbiological study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015; 7(Suppl 2): S554-8.
103. Najafi S, Khayamzadeh M, Paknejad M, Poursepanj G, Kharazi Fard MJ, Bahador A. An in vitro comparison of antimicrobial effects of curcumin-based photodynamic therapy and chlorhexidine, on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Lasers Med Sci*. 2016; 7(1): 21-5.
104. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014; 35(10): 3365-83.

105. Namiki Y, Fuchigami T, Tada N, Kawamura R, Matsunuma S, Kitamoto Y, et al. Nanomedicine for cancer: lipid-based nanostructures for drug delivery and monitoring. *Acc Chem Res.* 2011; 44(10): 1080-93.
106. Nenda MM, Lewicki M, Mandalunis PM. Histomorphometry of the tibia and mandible of healthy female Wistar rats at different stages of growth. *Exp Anim.* 2016; 65(2): 109-16.
107. Pacios S, Kang J, Galicia J, Gluck K, Patel H, Ovaydi-Mandel A, et al. Diabetes aggravates periodontitis by limiting repair through enhanced inflammation. *FASEB J.* 2012; 26(4): 1423-30.
108. Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J.* 1997; 47(2): 61-87.
109. Paka GD, Ramassamy C. Optimization of curcumin loaded-PEG-PLGA nanoparticles by GSH functionalization. Investigation of the internalization pathway in neuronal cells. *Mol Pharm.* 2016.Oct 15. [Epub ahead of print].
110. Park CB, Ahn CM, Oh S, Kwon D, Cho WC, Shin WS, et al. Synthesis of alkylsulfonyl and substituted benzenesulfonyl curcumin mimics as dual antagonist of L-type Ca(2+) channel and endothelin A/B2 receptor. *Bioorg Med Chem.* 2015; 23(20): 6673-82.
111. Park S, Lee LR, Seo JH, Kang S. Curcumin and tetrahydrocurcumin both prevent osteoarthritis symptoms and decrease the expressions of pro-inflammatory cytokines in estrogen-deficient rats. *Genes Nutr.* 2016; 11:2.
112. Petersen PE, Ogawa H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol.* 2005; 76(12): 2187-93.
113. Pileggi G, Wataha JC, Girard M, Grad I, Schrenzel J, Lange N, et al. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(2):134-40.
114. Quishida CC, De Oliveira Mima EG, Jorge JH, Vergani CE, Bagnato VS, Pavarina AC. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5): 997-1009.
115. Rachmawati H, Safitri D, Pradana AT, Adnyana IK. TPGS-Stabilized Curcumin nanoparticles exhibit superior effect on carrageenan-Induced inflammation in Wistar rat. *Pharmaceutics.* 2016; 8(3): 1-13
116. Ranjbar-Mohammadi M, Rabbani S, Bahrami SH, Joghataei MT, Moayer F. Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly(epsilon-caprolactone) electrospun nanofibers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 69: 1183-91.

117. Ricci Donato HA, Pratavieira S, Grecco C, Brugnera-Junior A, Bagnato VS, Kurachi C. Clinical comparison of two photosensitizers for oral cavity decontamination. *Photomed Laser Surg*. 2016 Nov7. [Epub ahead of print].
118. Rogers NM, Kireta S, Coates PT. Curcumin induces maturation-arrested dendritic cells that expand regulatory T cells in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162(3): 460-73.
119. Rowart P, Ercicum P, Detry O, Weekers L, Gregoire C, Lechanteur C, et al. Mesenchymal stromal cell therapy in Ischemia/Reperfusion injury. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 602597.
120. Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34(5):660-5.
121. Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1beta and IL-6. *Biomed Res*. 2013; 34(1): 31-40.
122. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards CA, Ramage G, Combet E. Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food Funct*. 2015 ;6(3): 719-29.
123. Shang W, Zhao LJ, Dong XL, Zhao ZM, Li J, Zhang BB, et al. Curcumin inhibits osteoclastogenic potential in PBMCs from rheumatoid arthritis patients via the suppression of MAPK/RANK/c-Fos/NFATc1 signaling pathways. *Mol Med Reports*. 2016;14(4): 3620-6.
124. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*. 2005;41(13):1955-68.
125. Sheridan RA, Wang HL, Eber R, Oh TJ. Systemic chemotherapeutic agents as adjunctive periodontal therapy: a narrative review and suggested clinical recommendations. *J Int Acad Periodontol*. 2015; 17(4): 123-34.
126. Sherin DR, Rajasekharan KN. Mechanochemical synthesis and antioxidant activity of Curcumin-templated azoles. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2015;348(12):908-14.
127. Shirley SA, Montpetit AJ, Lockey RF, Mohapatra SS. Curcumin prevents human dendritic cell response to immune stimulants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 374(3): 431-6.
128. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. 1998; 64(4): 353-6.

129. Shome S, Talukdar AD, Choudhury MD, Bhattacharya MK, Upadhyaya H. Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective. *J Pharm Pharmacol*. 2016 Oct 17. [Epub ahead of print].
130. Shuto T, Ono T, Ohira Y, Shimasaki S, Mizunoe S, Watanabe K, et al. Curcumin decreases toll-like receptor-2 gene expression and function in human monocytes and neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 398(4): 647-52.
131. Silva JA, Ferrucci DL, Peroni LA, Abrahao PG, Salamene AF, Rossa-Junior C, et al. Sequential IL-23 and IL-17 and increased Mmp8 and Mmp14 expression characterize the progression of an experimental model of periodontal disease in type 1 diabetes. *J Cell Physiol*. 2012; 227(6): 2441-50.
132. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 135-87.
133. Sreedhar A, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Kamath V, et al. Comparative evaluation of the efficacy of curcumin gel with and without photo activation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A split mouth clinical and microbiological study. *J Nat Sci Biol Med*. 2015; 6(Suppl 1): S102-9.
134. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(3): 331-41.
135. Stevenson R, Hueber AJ, Hutton A, McInnes IB, Graham D. Nanoparticles and inflammation. *ScientificWorldJournal*. 2011; 11: 1300-12.
136. Takahashi M, Ishiko T, Kamohara H, Hidaka H, Ikeda O, Ogawa M, et al. Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) blocks the chemotaxis of neutrophils by inhibiting signal transduction through IL-8 receptors. *Mediators Inflamm*. 2007; 2007: 10767.
137. Tejada S, Manayi A, Daglia M, Nabavi SF, Sureda A, Hajheydari Z, et al. Wound healing effects of Curcumin: a short review. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016; 17(11): 1002-7.
138. Tonon CC, Paschoal MA, Correia M, Spolidorio DM, Bagnato VS, Giusti JS, et al. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(1): 1-6.
139. Tyagi N, Dash D, Singh R. Curcumin inhibits paraquat induced lung inflammation and fibrosis by extracellular matrix modifications in mouse model. *Inflammopharmacology*. 2016 Oct 20. [Epub ahead of print].

140. Ulbrich W, Lamprecht A. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *J R Soc Interface*. 2010; 7 Suppl 1:S55-66.
141. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1978; 43(2): 86-92.
142. Wang J, Wang H, Zhu R, Liu Q, Fei J, Wang S. Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles in IL-1beta transgenic mice subjected to the lipopolysaccharide-induced sepsis. *Biomaterials*. 2015; 53: 475-83.
143. Wang T, Ma X, Lei Y, Luo Y. Solid lipid nanoparticles coated with cross-linked polymeric double layer for oral delivery of curcumin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016; 148: 1-11.
144. Wang YH, Yuan Y, Yang XQ, Wang JM, Guo J, Lin Y. Comparison of the colloidal stability, bioaccessibility and antioxidant activity of corn protein hydrolysate and sodium caseinate stabilized curcumin nanoparticles. *J Food Sci Technol*. 2016; 53(7): 2923-32.
145. Wikene KO, Bruzell E, Tonnesen HH. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. *Eur J Pharm Sci*. 2015; 80: 26-32.
146. Wu Y, Li YH, Gao XH, Chen HD. The application of nanoemulsion in dermatology: an overview. *J Drug Target*. 2013; 21(4): 321-7.
147. Xiao B, Si X, Zhang M, Merlin D. Oral administration of pH-sensitive curcumin-loaded microparticles for ulcerative colitis therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 135: 379-85.
148. Xie X, Tao Q, Zou Y, Zhang F, Guo M, Wang Y, et al. PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms. *J Agric Food Chem*. 2011; 59(17): 9280-9.
149. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today*. 2012;17(1-2):71-80.
150. Yallapu MM, Nagesh PK, Jaggi M, Chauhan SC. Therapeutic applications of Curcumin nanoformulations. *AAPS J*. 2015; 17(6): 1341-56.
151. Yang X, Lv JN, Li H, Jiao B, Zhang QH, Zhang Y, et al. Curcumin reduces lung inflammation via Wnt/beta-catenin signaling in mouse model of asthma. *J Asthma*. 2016: 1-6.
152. Youn HS, Saitoh SI, Miyake K, Hwang DH. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(1): 62-9.

153. Yu S, Wang X, He X, Wang Y, Gao S, Ren L, et al. Curcumin exerts anti-inflammatory and antioxidative properties in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+))-stimulated mesencephalic astrocytes by interference with TLR4 and downstream signaling pathway. *Cell Stress Chaperones*. 2016; 21(4): 697-705.
154. Zhang X, Wu J, Ye B, Wang Q, Xie X, Shen H. Protective effect of curcumin on TNBS-induced intestinal inflammation is mediated through the JAK/STAT pathway. *BMC Complement Altern Med*. 2016; 16(1): 299.
155. Zhang Y, Golub LM, Johnson F, Wishnia A. pKa, zinc- and serum albumin-binding of curcumin and two novel biologically-active chemically-modified curcumins. *Curr Med Chem*. 2012; 19(25): 4367-75.
156. Zhang Y, Gu Y, Lee HM, Hambardjieva E, Vrankova K, Golub LM, et al. Design, synthesis and biological activity of new polyenolic inhibitors of matrix metalloproteinases: a focus on chemically-modified curcumins. *Curr Med Chem*. 2012; 19(25): 4348-58.
157. Zhang Y, McClain SA, Lee HM, Elburki MS, Yu H, Gu Y, et al. A Novel Chemically Modified Curcumin "Normalizes" Wound-Healing in Rats with Experimentally Induced Type I Diabetes: Initial Studies. *J Diabetes Res*. 2016; 2016: 5782904.
158. Zhang Z, Leong DJ, Xu L, He Z, Wang A, Navati M, et al. Curcumin slows osteoarthritis progression and relieves osteoarthritis-associated pain symptoms in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18(1): 128.
159. Zhao HM, Xu R, Huang XY, Cheng SM, Huang MF, Yue HY, et al. Curcumin improves regulatory T cells in gut-associated lymphoid tissue of colitis mice. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(23): 5374-83.
160. Zheng Z, Sun Y, Liu Z, Zhang M, Li C, Cai H. The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 4931-42.
161. Zhong K. Curcumin Mediates a Protective Effect Via TLR-4/NF-kappaB Signaling Pathway in Rat Model of Severe Acute Pancreatitis. *Cell Biochem Biophys*. 2015; 73(1): 175-80.
162. Zhou J, Miao H, Li X, Hu Y, Sun H, Hou Y. Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt. *Inflamm Res*. 2016 Nov 5. [Epub ahead of print].
163. Zhou T, Chen D, Li Q, Sun X, Song Y, Wang C. Curcumin inhibits inflammatory response and bone loss during experimental periodontitis in rats. *Acta Odontol Scand*. 2013; 71(2): 349-56.

ANEXO A- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 15/2014

Araraquara, 17 de junho de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado **"AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DOSE-RESPOSTA DE CMC 2.24 NO MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR LPS EM ROEDOR"** (Proc. CEUA nº 15/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para **AGOSTO/2016**.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. CARLOS ROSSA JUNIOR
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 24 de novembro de 2016

LAURA MELISSA GALVIS ZAMBRANO

