

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/03/2022.



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



Amanda Favoreto Silva

Efeito da aplicação local do curcumin nanoparticulado sobre o reparo ósseo in vivo e potencial osteogênico in vitro.

Araraquara

2020



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



Amanda Favoreto Silva

Efeito da aplicação local do curcumin nanoparticulado sobre o reparo ósseo in vivo e potencial osteogênico in vitro.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Mestre em nome do Programa de Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientador(a): Profª. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara

2020

Silva, Amanda Favoreto

Efeito da aplicação local do curcumin nanoparticulado sobre o reparo ósseo in vivo e potencial osteogênico in vitro / Amanda Favoreto Silva.-- Araraquara: [s.n.], 2020
59 f.; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

1. Curcumina 2. Células-tronco mesenquimais
3. Nanopartículas 4. Ratos 5. Regeneração óssea
I. Título

Amanda Favoreto Silva

Efeito da aplicação local do curcumin nanoparticulado sobre o reparo ósseo in vivo e potencial osteogênico in vitro.

Comissão Julgadora

Exame de defesa para obtenção do Grau de Mestre em Odontologia (Periodontia)

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

2º Examinador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

3º Examinador: Profa. Dra. Flávia Aparecida Chaves Furlaneto

4º Examinador (suplente): Profa. Dra. Sabrina Garcia de Aquino

5º Examinador (suplente): Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara, 20 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Amanda Favoreto Silva

NASCIMENTO: 04/01/1993 – Maringá – Paraná – Brasil

FILIAÇÃO: Domingos Isidoro da Silva Filho

Neide Favoreto da Silva

2010/2014: Graduação em Odontologia – Universidade Federal do Paraná (UFPR)

2015: Aperfeiçoamento em Endodontia – Associação Brasileira de Odontologia, Seção Paraná (ABO-PR)

2016/2018: Especialização em Implantodontia – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FOAr – UNESP / FAEPO)

2018/2020: Mestranda em Odontologia (Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FOAr – UNESP)

Aos meus pais,

Domingos e Neide,

Por tudo que me proporcionaram até hoje, por todo amor e educação que me deram. Este trabalho nos tirou o convívio diário, mas com a saudade aprendi que meu amor por vocês conseguia ser maior do que imaginei que fosse. Espero sempre ser o motivo de orgulho de vocês, esta conquista é nossa.

Dedico-lhes este trabalho, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me guiar pelos caminhos e me abençoar em cada passo que dei. À Ele, sempre presente nos momentos de dificuldades e alegrias.

À **minha família**, por todo incentivo que me deram para iniciar essa grande jornada quando até eu tinha dúvidas dos caminhos a seguir. Sem vocês eu jamais conquistaria tudo isso.

Ao meu amor, **Raphael**, que com certeza foi o melhor que já me aconteceu. Obrigada por estar comigo em todos os momentos e pelo amor que construímos. Eu jamais conseguiria sem você. Meu melhor amigo, e meu amor... sou melhor com você. Te amo para sempre.

Aos **meus amigos**, por serem a parte mais gostosa e leve de toda a minha jornada. Que possamos continuar colecionando momentos.

À minha orientadora, **Morgana**, por todos os ensinamentos ao longo desses dois anos. Acredito que evolui muito profissionalmente, mas o meu crescimento pessoal é o maior deles, e eu devo isso à você. Tenho um enorme carinho pela pessoa especial que você é e embora não continuarmos um caminho juntas, espero que saiba que lhe desejo o melhor, que consiga alcançar seus objetivos profissionais e pessoais, estarei sempre torcendo por você. Seu amor e dedicação pelo que faz é o segredo do sucesso.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, à todos os professores e funcionários, que sem vocês nada seria possível. Agradecimento especial à Claudinha, que foi uma mãezona para mim por todo esse tempo, você é sensacional.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

AO CNPq: O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – sob o auxílio 440588/2014-9.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.” John Ruskin

Silva AF. Efeito da aplicação local do curcumin nanoparticulado sobre o reparo ósseo in vivo e potencial osteogênico in vitro. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Curcumin é um composto ativo derivado da planta *Curcuma longa* que exibe uma variedade de atividades biológicas, potencial anti-inflamatório e imunomodulatório, que pode ser associado ao tratamento de uma série de condições, como doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide, câncer, diabetes e periodontite. Recentemente, a literatura também tem demonstrado o potencial do composto sobre o reparo ósseo, entretanto, os dados ainda são contraditórios. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da administração tópica do curcumin veiculado em nanopartículas de PLGA sobre a formação/reparo ósseo de defeitos críticos in vivo, e investigar seu potencial biológico in vivo e in vitro. Defeitos ósseos confeccionados na calvária de ratos machos foram preenchidos com solução salina (controle), curcumin nanoparticulado 0,05mg/ml ou veículo utilizado na diluição do composto (nanopartícula vazia) por 7, 14 e 28 dias. A fração de volume ósseo no interior do defeito nos diferentes grupos foram avaliados por microtomografia óssea (μ CT); expressão e imunolocalização dos marcadores do *turnover* tecidual (RANKL, OPG, PCNA e RUNX2) foram investigados por imunohistoquímica, enquanto as características teciduais do tecido neoformado foram observadas através da análise histológica descritiva e estereometria. In vitro, o potencial do curcumin nanoparticulado em estimular a diferenciação osteogênica de células estromais derivadas da medula óssea (BMSCs) de ratos foi avaliado determinando-se a atividade da fosfatase alcalina (ALP Assay) e produção de matriz mineralizada. μ CT e análise histológica mostraram maior formação óssea nos defeitos de animais tratados curcumin no período de 14 dias. Curcumin reduziu o infiltrado celular e aumentou o conteúdo colágeno no período mais tardio (28 dias), e aumentou a expressão de PCNA e RUNX2 aos 14 dias. In vitro, a menor concentração de composto (0,025 μ g/ml) aumentou significativamente a atividade de ALP em meio osteogênico, entretanto, não estimulou a produção de matriz mineralizada. Os resultados obtidos permitem concluir que o curcumin pode favorecer o reparo ósseo em defeitos críticos e estimular a osteoblastogênese de maneira dose-dependente in vitro.

Palavras-chave: Curcumin. Células-Tronco Mesenquimais. Nanopartículas. Ratos. Regeneração óssea.

Silva AF. Effect of local administration of curcumin-loaded nanoparticle on the bone repair in vivo and osteogenic potential in vitro. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Curcumin is an active compound derived from the *Curcuma longa* plant that exhibits a variety of biological activities, anti-inflammatory and immunomodulatory potential, which can be associated with the treatment of a number of conditions, such as inflammatory bowel diseases, rheumatoid arthritis, cancer, diabetes and periodontitis. Recently, the literature has also demonstrated the potential of the compound on bone repair, however, the data are still contradictory. The aim of this study is to evaluate the effect of topical administration of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on bone formation / repair of critical defects in vivo, and to investigate its biological potential in vivo and in vitro. Bone defects made in the calvaria of rats were filled with saline solution (control), nanoparticulate curcumin 0,05mg/ml, or vehicle used in the dilution of the compound (empty nanoparticle) for 7, 14 and 28 days. The fraction of bone volume within the defect in the different groups was assessed by microcomputed tomography (μ CT); expression and immunolocalization of tissue turnover markers (RANKL, OPG, PCNA and RUNX2) were investigated by immunohistochemistry, while the tissue characteristics of the newly formed tissue were observed through descriptive histological analysis and stereometry. In vitro, the potential of nanoparticulate curcumin in stimulating osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) was assessed by determining the activity of alkaline phosphatase (ALP Assay) and mineralized matrix production. μ CT and histological analysis showed greater bone formation in the defects of animals treated curcumin in the period of 14 days. Curcumin reduced cell infiltrate and increased collagen content in the later period (28 days), and increased expression of PCNA and RUNX2 at 14 days. In vitro, the lower concentration of compound (0,025 μ g /ml) significantly increased the activity of ALP in osteogenic medium, however, it did not stimulate the production of mineralized matrix. The results obtained allow us to conclude that curcumin can favor bone repair in critical defects and stimulate osteoblastogenesis in a dose-dependent manner in vitro.

Keywords: Curcumin. Bone marrow stromal cells. Nanoparticles. Rats. Bone Regeneration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP – Atividade de fosfatase alcalina

BMSC – Células estromais da medula óssea

CMC – Carboximetilcelulose

DMSO – Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

Dkk1 – Dickkopf-1

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

LPS – Lipopolissacarídeo

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NPs – Nanopartículas

OPG – Osteoprotegerina

PBS – Tampão fosfato-salino

PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular

PEG – Polietilenoglicol

PLA – Ácido polilático

PLGA – Ácido polilático glicólico

PGA – Ácido poliglicólico

RANK – Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL – Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa

RUNX2 – fator de transcrição 2 relacionado à Runt.

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

μ CT – Microtomografia computadorizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO.....	15
3 PUBLICAÇÃO	16
4 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICE A - METODOLOGIA.....	47
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA) ...	59

1 INTRODUÇÃO

Curcuma longa é uma planta herbácea da família do gengibre (Zingiberaceae) cultivada em países do sudeste asiático, onde é comumente utilizada como aditivo alimentar.¹ Além do uso culinário, há décadas a *Curcuma longa* também tem sido utilizada na medicina oriental no tratamento de diversas desordens, tais como reumatismo, doenças de pele, doenças parasitárias e inflamação². Seu componente principal, responsável pela sua coloração amarela característica, é o curcumin, descrito pela primeira vez em 1910³.

Curcumin é um composto polifenólico com um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas. Inúmeros estudos têm demonstrado seu potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-carcinogênico, além de efeitos hepato e nefro-protetores, hipoglicemiante e antirreumático⁴⁻⁸.

Muitos desses efeitos parecem ser provenientes do efeito modulatório do composto sobre fatores de transcrição, receptores, quinases, citocinas, enzimas e fatores de crescimento, podendo influenciar nas cascatas moleculares e bioquímicas⁷, além de atuar sobre diversas vias de sinalização intracelular⁹⁻¹².

Devido a sua capacidade de modular múltiplos alvos moleculares, especialmente relacionados à patogênese das doenças inflamatórias, curcumin tem sido investigado em estudos clínicos e pré-clínicos para o tratamento de condições diversas, incluindo diabetes, câncer, além de doenças inflamatórias crônicas como uveíte, doença de Crohn, psoríase, artrite reumatóide e doença periodontal¹³⁻¹⁸. Dados do nosso grupo de pesquisa avaliando o efeito da administração sistêmica do curcumin (30 e 100mg/kg) em um modelo experimental de periodontite em ratos, demonstraram redução dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, bem como redução do infiltrado celular e aumento na proporção de fibras colágenas no tecido gengival dos animais periodontalmente doentes^{15,16}. Inibição significativa da perda óssea alveolar induzida por LPS¹⁹⁻²¹ e ligaduras²², também tem sido demonstrada nos animais tratados com curcumin, e parece estar relacionado à redução de marcadores de reabsorção óssea (RANKL/OPG, TNF e IL-6)²³.

Outros estudos avaliando o efeito do curcumin sobre o *turnover* tecidual em doenças relacionadas à reabsorção óssea inflamatória, como a artrite reumatóide²⁴⁻²⁶, também têm demonstrado resultados favoráveis do composto. A administração via oral de 200mg/kg de curcumin em ratos com artrite induzida por colágeno (CIA), reduziu os níveis aumentados de TNF- α , IL-17, IL-1 β e TGF- β presentes no líquido sinovial das articulações, e preveniu as

alterações histopatológicas (edema, degradação de osso e colágeno e hiperplasia sinovial) nos animais doentes²⁷.

Corroborando estes resultados, um estudo avaliando o efeito da suplementação dietética com curcumin 0,5% sobre o metabolismo ósseo de ratos com diabetes induzida por estreptozotocin, observou redução na expressão do mRNA de catepsina K e TRAP, e redução no número de osteoclastos presentes no osso femoral dos animais tratados com o composto²⁸.

Entretanto, apesar dos efeitos anti-inflamatórios e anti-osteolíticos, além da eficácia e segurança farmacológica, curcumin apresenta reduzida biodisponibilidade, baixa absorção e meia vida plasmática curta, o que tem sido um entrave para sua utilização clínicas.

Diversas estratégias vêm sendo avaliadas com objetivo de superar suas limitações físico-químicas e potencializar seus efeitos biológicos⁷, entre elas, a adição de adjuvantes como o piperine, que agem bloqueando a metabolização hepática do curcumin, aumentando sua biodisponibilidade; modificações químicas estruturais que reduzem sua hidrofobicidade e aumentam sua absorção; uso de veículos lipídicos, lipossomas, micelas e complexos fosfolipídios que podem melhorar a absorção gastrointestinal de drogas, aumentando seus níveis plasmáticos; bem como sua formulação em nanopartículas^{5,7}.

As nanopartículas são tipicamente caracterizadas como materiais com 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^{29,30}. A diversidade nas características físico-químicas das nanopartículas está relacionada ao seu processo de preparo, e proporciona a estes materiais variáveis propriedades biológicas³¹⁻³³.

Um importante aspecto relacionado ao uso das nanopartículas 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 alvos³⁴⁻³⁶. O nanoencapsulamento protege as moléculas da degradação prematura, melhora a solubilidade, além de promover uma ação sítio-específica da droga.

A passagem eficiente das nanopartículas através da membrana celular, permite um acúmulo terapêutico da droga nos sítios de interesse. Além disso, um aumento na eficácia de drogas conjugadas às nanopartículas 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 nanopartículas³⁷⁻⁴¹.

Especificamente em relação ao perfil farmacológico do curcumin, sua veiculação em nanopartículas de ácido glicólico polilático (Cur-PGLA-NPs), aumentou 600 vezes a solubilidade do composto em água⁴². De acordo com a literatura, o carreamento do curcumin em nanopartículas de PLGA (ácido poliláticoglicólico) prolonga e reforça a atividade antioxidante e anti-inflamatória do composto^{6,43,44}.

Estudos do nosso grupo de pesquisa avaliando os efeitos da aplicação local do curcumin veiculado em nanopartículas nos tecidos periodontais de ratos, demonstraram que o composto inibiu completamente a reabsorção óssea induzida por lipopolissacarídeos (LPS) de *E. coli*, reduziu significativamente o número de osteoclastos e o infiltrado inflamatório, além de reduzir a ativação de NF- κ B (fator nuclear kappa B) e P-38 MAPK.

Enquanto a literatura tem mostrado consistentemente os efeitos inibitórios do curcumin sobre a osteoclastogênese em diferentes modelos experimentais, poucos estudos têm avaliado seu potencial em induzir a osteogênese, e os resultados encontrados são ainda contraditórios.

Embora dados de estudo in vitro tenham demonstrado um efeito inibitório do curcumin sobre a proliferação e a mineralização de células pré-osteoblásticas da calvária de ratos (ROB)⁴⁵, resultados de estudo in vivo do nosso laboratório demonstraram um efeito positivo do curcumin sobre o reparo ósseo⁴⁶. Neste estudo, a administração sistêmica de curcumin (400mg/kg) foi capaz de acelerar o reparo ósseo inicial, após perda óssea induzida pela colocação de ligaduras em ratos, além de aumentar os níveis de TGF- β ⁴⁶.

De forma semelhante, curcumin também foi capaz de acelerar o reparo ósseo em modelos de osteoporose induzida por dexametasona in vivo¹⁹. Os autores observaram que a administração sistêmica de curcumin (100mg/kg) via oral, por 60 dias, aumentou os níveis de osteocalcina e diminuiu os níveis de collagen-type I fragments (CTX), além de aumentar a densidade óssea mineral e atenuar a injúria óssea induzida.¹⁹

Com objetivo de avaliar os efeitos preventivos do curcumin in vitro, osteoblastos primários foram tratados com curcumin e em seguida expostos a dexametasona. Curcumin inibiu os efeitos induzidos pela dexametasona, prevenindo a redução da capacidade proliferativa dos osteoblastos e aumentando os níveis de mRNA de OPG e de fatores de transcrição que favorecem a diferenciação osteoblástica¹⁹.

Um estudo avaliando os efeitos protetores do curcumin sobre a função osteogênica de células tronco mesenquimais de humanos após estímulo com peróxido de hidrogênio (H₂O₂)²², observou que a adição do composto recuperou o potencial osteogênico das células favorecendo sua diferenciação em osteoblastos e elevando os níveis de mRNA de marcadores do turnover tecidual (osteopontina e colágeno 1). Células tronco mesenquimais da medula óssea (BMSC)

possuem um grande potencial de auto-renovação e diferenciação em diversos tipos celulares, como osteoblastos⁴⁷, condrócitos⁴⁸ e adipócitos⁴⁹. Como um precursor de osteoblastos, BMSCs não apenas regulam a homeostase óssea, como também atuam de maneira crítica no reparo de fraturas⁵⁰.

Aumento na proliferação, diferenciação e mineralização de células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) tratadas com nanopartículas carregadas com alendronato e curcumin, e revestidas com ácido hialurônico também foram observados, corroborando o potencial osteogênico do curcumin⁵¹.

Considerando o potencial do composto no estímulo ao reparo ósseo, a ausência de dados na literatura sobre a aplicação tópica do curcumin sobre esse tecido e a capacidade regenerativa das BMSCs, este estudo tem como objetivo investigar, pela primeira vez, o efeito reparador do curcumin veiculado em nanopartículas de PLGA aplicado localmente sobre defeito ósseo in vivo, bem como determinar sua influência sobre as propriedades osteogênicas de BMSC derivadas de ratos.

4 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nos permitem concluir que a aplicação local de curcumin nanoparticulado favoreceu discretamente a neoformação óssea e acelerou o processo de cicatrização do defeito. O aumento dos níveis de RUNX2 e PCNA pelo composto *in vivo*, bem como o estímulo dose-dependente à atividade da fosfatase alcalina *in vitro*, podem estar envolvidos nestes efeitos positivos do curcumin sobre o reparo ósseo

REFERÊNCIAS*

1. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 1991; 57(1): 1-7.
2. Jain. SK, RA. RADF. Medicinal plants of India. Michigan: Reference Publ. 1991.
3. Lampe V, Milobedzka J. Studien uber Curcumin. *Ber Dtsch Chem Ges.* 1913; 46(2): 2235-40.
4. Shome S, Talukdar AD, Choudhury MD, Bhattacharya MK, Upadhyaya H. Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective. *J Pharm Pharmacol.* 2016; 68(12): 1481-500.
5. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm.* 2007; 4(6): 807-18.
6. 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; 14(1): 93-106.
7. 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.
8. Kim S-J. Curcumin suppresses the production of interleukin-6 in *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *J Periodontal Implant Sci.* 2011; 41(3): 157.
9. 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- κ B. *Eur J Pharmacol.* 2011; 650(1): 451-7.
10. 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.
11. Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol.* 2007; 27(1): 19-35.
12. Tomita M, Kawakami H, Uchihara JN, Okudaira T, Masuda M, Takasu N, et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive active NF- κ B, leading to suppression of cell growth of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer.* 2006; 118(3): 765-72.
13. 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.
14. 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.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Guimarães. MR, Coimbra. LS, Aquino. SGd, Spolidorio. LC, Kirkwood. KL, Junior. CR. Potent anti-inflammatory effects of systemically-administered curcumin modulates periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res.* 2011; 46(2): 269-79.
16. 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.
17. Elburki MS, Rossa Jr C, Guimaraes-Stabili MR, Lee HM, Curylofo-Zotti FA, Johnson F, et al. A chemically modified curcumin (CMC 2.24) inhibits nuclear factor kappaB activation and inflammatory bone loss in murine models of LPS-induced experimental periodontitis and diabetes-associated natural periodontitis. *Inflammation.* 2017; 40(4): 1436-49.
18. 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.
19. Chen Z, Xue J, Shen T, Mu S, Fu Q. Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2016; 37(2): 329-38.
20. Curylofo-Zotti FA, Elburki MS, Oliveira PA, Cerri PS, Santos LA, Lee HM, et al. Differential effects of natural curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2018; 91: 42-50.
21. de Almeida Brandao D, Spolidorio LC, Johnson F, Golub LM, Guimaraes-Stabili MR, Rossa C, Jr. Dose-response assessment of chemically modified curcumin in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2019; 90(5): 535-45.
22. Wang N, Wang F, Gao Y, Yin P, Pan C, Liu W, et al. Curcumin protects human adipose-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. *J Pharmacol Sci.* 2016; 132(3): 192-200.
23. 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.* 2012; 71(2): 349-56.
24. Dai Q, Zhou D, Xu L, Song X. Curcumin alleviates rheumatoid arthritis-induced inflammation and synovial hyperplasia by targeting mTOR pathway in rats. *Drug Des Devel Ther.* 2018; 12: 4095-105.
25. Haroyan A, Mukuchyan V, Mkrtchyan N, Minasyan N, Gasparyan S, Sargsyan A, et al. Efficacy and safety of curcumin and its combination with boswellic acid in osteoarthritis: a comparative, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *BMC Complement Altern Med.* 2018; 18(1): 7.
26. Chandran B, Goel A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phytother Res.* 2012; 26(11): 1719-25.
27. Wang Q, Ye C, Sun S, Li R, Shi X, Wang S, et al. Curcumin attenuates collagen-induced rat arthritis via anti-inflammatory and apoptotic effects. *Int Immunopharmacol.* 2019; 72: 292-300.
28. Hie M, Yamazaki M, Tsukamoto I. Curcumin suppresses increased bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2009; 621(1-3): 1-9.

29. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today*. 2012; 17(1-2): 71-80.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Stevenson R, Hueber AJ, Hutton A, McInnes IB, Graham D. Nanoparticles and inflammation. *ScientificWorldJournal*. 2011; 11: 1300-12.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Chakraborty M, Jain S, Rani V. Nanotechnology: emerging tool for diagnostics and therapeutics. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011; 165(5-6): 1178-87.
39. 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.
40. 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*. 2010; 79(3): 330-8.
41. 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.
42. 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.
43. Tiwari SK, Agarwal S, Seth B, Yadav A, Nair S, Bhatnagar P, et al. Correction to curcumin-loaded nanoparticles potentially induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/beta-catenin pathway. *ACS Nano*. 2019; 13(6): 7355.

44. Chopra D, Ray L, Dwivedi A, Tiwari SK, Singh J, Singh KP, et al. Photoprotective efficiency of PLGA-curcumin nanoparticles versus curcumin through the involvement of ERK/AKT pathway under ambient UV-R exposure in HaCaT cell line. *Biomaterials*. 2016; 84: 25-41.
45. Notoya M, Nishimura H, Woo JT, Nagai K, Ishihara Y, Hagiwara H. Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts. *Eur J Pharmacol*. 2006; 534(1-3): 55-62.
46. Guimaraes-Stabili MR, de Aquino SG, de Almeida Curylofo F, Tasso CO, Rocha FRG, de Medeiros MC, et al. Systemic administration of curcumin or piperine enhances the periodontal repair: a preliminary study in rats. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(8): 3297-306.
47. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; (355 Suppl): S247-56.
48. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998; 238(1): 265-72.
49. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(5): 700-9.
50. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*. 2007; 38 Suppl 1: S26-32.
51. Dong J, Tao L, Abourehab MAS, Hussain Z. Design and development of novel hyaluronate-modified nanoparticles for combo-delivery of curcumin and alendronate: fabrication, characterization, and cellular and molecular evidences of enhanced bone regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2018; 116: 1268-81.
52. Zambrano LMG, Brandao DA, Rocha FRG, Marsiglio RP, Longo IB, Primo FL, et al. Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 6652.
53. Nguyen DH ZT, Shu J, and Mao JH. Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer InCytes*. 2013; 2(1).