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

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB/5646
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

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

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

5 º 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 (μCT); expressão e imunolocalização dos marcadores do *turnover* tecidual (RANKL, OPG, PCNA e RUNX2) foram investigados por imuno-histoquímica, 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. uCT 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 μg /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 (μCT); expression and immunolocation 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. uCT 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 μg /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-kB – 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

µCT – 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 inflamação[2]. Seu componente principal, responsável pela sua coloração amarela característica, é o curcumin, descrito pela primeira vez em 1910[3].

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 antirreumático[4-8].

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 bioquímicas[7], além de atuar sobre diversas vias de sinalização intracelular [9-12].

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 periodontal[13-18]. 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 LPS[19-21] e ligaduras[22], 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 reumatoíde[24-26], 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-1β e TGF-β presentes no líquido sinovial das articulações, e preveniu as

alterações histopatólogicas (edema, degradação de osso e colágeno e hiperplasia sinovial) nos animais doentes[27].

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 composto[28].

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 clínica[5].

Diversas estratégias vêm sendo avaliadas com objetivo de superar suas limitações físico-químicas e potencializar seus efeitos biológicos[7], 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 biológicas[31-33].

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 alvos[34-36]. O nanoencapsulamento protege as moléculas da degradação prematura, melhora a solubilidade, além de promover uma ação sítio-especifica 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 nanopartículas[37-41].

Especificamente em relação ao perfil farmacológico do curcumin, sua veiculação em nanopartículas de ácido glicólico poliláctico (Cur-PGLA-NPs), aumentou 600 vezes a solubilidade do composto em água[42]. De acordo com a literatura, o carreamento do curcumin em nanopartículas de PLGA (ácido poliláticoglicóico) 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-κB (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 ósseo[46]. 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 vivo[19]. 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 osteoblástica[19].

Um estudo avaliando os efeitos protetores do curcumin sobre a função osteogênica de células tronco mesenquimais de humanos após estímulo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2)[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 osteoblastos[47], condrócitos[48] e adipócitos[49]. Como um precursor de osteoblastos, BMSCs não apenas regulam a homeostase óssea, como também atuam de maneira crítica no reparo de fraturas[50].

Aumento na proliferação, diferenciação e mineralização de células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) tratadas com nanopartículas carreadas com alendronato e curcumin, e revestidas com ácido hialurônico também foram observados, corroborando o potencial osteogênico do curcumin[51].

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.

2 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo é avaliar o efeito da aplicação local do curcumin veiculado em nanopartículas sobre o reparo de defeito ósseo de tamanho crítico em ratos, e investigar seu potencial biológico in vivo e in vitro. A hipótese principal desse estudo é que a aplicação tópica do curcumin nanoparticulado favorece o reparo tecidual. A hipótese secundária é que pelo menos parte dos efeitos reparadores do composto está relacionado com a modulação de marcadores do *turnover* tecidual e ao potencial osteogênico do curcumin.

3 PUBLICAÇÃO

O desenvolvimento desta dissertação originou no artigo: "Effect of local administration of curcumin-loaded nanoparticle on the bone repair in vivo and osteogenic potential in vitro."

3.1 Publicação 1*

Effect of local administration of curcumin-loaded nanoparticle on the bone repair in vivo and osteogenic potential in vitro.

Amanda Favoreto Silva[1], Cindy G. P. Pacheco[1], Angelo C. Camilli[1], Danilo .P Ferrarezi[1], Laura A. G. Maldonado[1], Flávia Gullo[1], Rafael S. de Molon[1], Fernando L. Primo[2], Luís C. Spolidorio[3], Carlos Rossa Jr[1], Morgana R. Guimaraes-Stabili[1].

1- Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil
2- Department of Bioprocess and Biotechnology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil
3- Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil

Corresponding Author:
Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, DDS, PhD
Department of Diagnosis and Surgery
School of Dentistry at Araraquara – Univ. Estadual Paulista (UNESP)
Rua Humaitá, 1680 – Centro
14801-903 Araraquara – SP BRAZIL
e-mail: morgana.guimaraes@unesp.br
phone: +55 (16) 3301-6374 Fax: +55 (16) 3301-6433

* O artigo segue as normas do periódico Archives of Oral Biology ao qual será submetido, disponível no site: https://www.elsevier.com/journals/archives-of-oral-biology/0003-9969/guide-for-authors

Abstract

Objective: The objective of this study is to evaluate the effect of curcumin-loaded nanoparticles on bone repair and osteogenesis, and to investigate the biological mechanisms of the compound. **Material and Method**: Critical bone defects were made in the calvaria of rats (n = 63) and filled according to the treatment groups: control (saline), nanoparticulate curcumin (0.05mg / ml) and vehicle (empty nanoparticle)) for 7, 14 and 28 days. At the end of the experimental periods, the calvaria containing the bone defects were removed and used for analysis of the bone volume fraction, using microcomputer tomography (μCT); expression and immunolocation of tissue turnover markers (RANKL, OPG, PCNA and RUNX2) were analyzed by immunohistochemistry. The tissue characteristics of the newly formed tissue were observed through descriptive histological analysis and stereometry. Histological sections stained with Masson's Trichome were used to quantify collagen content. In vitro, the potential of nanoparticulate curcumin in stimulating osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) was evaluated by the activity of alkaline phosphatase (ALP Assay) and mineralized matrix production.
Results: Curcumin slightly favored bone repair and increased the expression of PCNA and RUNX2 in the initial periods. An increase in the amount of collagen fibers and a reduction in cellularity were observed in the defects treated by the compound in the later period. Nanoparticles, on the other hand, caused an inflammatory reaction, impairing the repair process in the initial healing period. In vitro, curcumin increased ALP activity in a time and dose-dependent manner but did not favor the formation of a mineralized matrix. **Conclusions:** The results suggest that local application of curcumin favors bone repair and stimulates osteoblastic differentiation. Additional studies evaluating different types of carrier nanoparticles must be carried out in order to benefit the biological activities of the compound.
Keywords: Curcumin. Bone marrow stromal cells. Nanoparticles. Rats. Bone Regeneration. Calvaria.

INTRODUCTION

Bone regeneration is crucial for the rehabilitation of defects resulting from trauma or bone pathologies such as osteoporosis and bone tumors, and in craniofacial defects resulting from periodontal disease, peri-implantitis or bone remodeling after tooth loss.

Conventional therapies for bone and periodontal regeneration, including bone graft, guided tissue regeneration and root surface modification, have shown variable and limited clinical results (Bae, Auh, Kim, Moon, & Kim, 2016). Thus, the use of bioactive molecules that stimulate the differentiation and function of osteoblasts and favor the balance between bone resorption and formation processes, has emerged as an alternative for the treatment of osteolytic diseases.

Curcumin, a natural compound with multiple biological actions, including anti-inflammatory, anti-angiogenic, immunomodulatory, antimicrobial and anti-osteoclastogenic activity, has been the subject of numerous clinical and preclinical researches for the treatment of various inflammatory conditions such as diabetes (Jin, Song, Weng, & Fantus, 2018; Nabavi et al., 2015; Pivari, Mingione, Brasacchio, & Soldati, 2019), rheumatoid arthritis (Asteriou et al., 2018; Dai, Zhou, Xu, & Song, 2018; Daily, Yang, & Park, 2016) Crohn's disease (Lewis & Abreu, 2017; Limketkai, Wolf, & Parian, 2018; Schneider, Hossain, VanderMolen, & Nicol, 2017), and osteolytic pathologies such as osteoporosis (Chen, Xue, Shen, Mu, & Fu, 2016; Khanizadeh, Rahmani, Asadollahi, & Ahmadi, 2018), bone tumors (Feng, Wei, Lee, & Zhao, 2017; K. Wang et al., 2018) and periodontal disease periodontal (Chainani-Wu, Collins, & Silverman, 2012; Elburki et al., 2014; Elburki et al., 2017; Guimaraes et al., 2012; Guimarães. et al., 2011; Gupta, Patchva, Koh, & Aggarwal, 2012).

Data from our research group (Curylofo-Zotti et al., 2018; de Almeida Brandao et al., 2019; Elburki et al., 2014; Guimaraes et al., 2011; Guimaraes et al., 2012) have shown that the systemic administration of the compound is able to prevent bone resorption in models of periodontal disease progression model, through the inhibition of key biological mediators in the inflammatory bone resorption process, such as IL-1β, IL-6 and TNF-α, and the negative modulation of intracellular signaling pathways such as NF-ĸB and MAP kinases; however, the effects and mechanisms of action of curcumin on bone repair and osteogenesis are still scarce and controversial.

In vivo studies evaluating the effect of systemic administration of curcumin (400mg / kg, orally, daily for 15 days) on bone repair after bone loss induced by the experimental periodontal disease model in rats (Guimaraes-Stabili et al., 2019), observed that the compound

was able to markedly accelerate the repair in the initial healing period (5 days). Increased collagen content and TGF-β expression in the gingival tissues of animals treated with the compound were also observed (Guimaraes-Stabili et al., 2019). Corroborating these results, Cirano et al. observed greater repair of the bone defect in the calvaria of diabetic rats treated with systemic administration of curcumin (100mg / kg, orally), when compared to the placebo group (Cirano. et al., 2018). Curcumin modulated the expression of RANKL / OPG, but did not alter the expression bone formation genes (RUNX2, osteocalcin, osteopontin, BMP-2 and osterix) (Cirano. et al., 2018).

Although in vivo studies have found positive results of curcumin on bone repair, its effects may be limited due to its pharmacological characteristics, such as low water solubility, low absorption in the gastrointestinal tract and short plasma half-life, especially when administered systemically.

Alternatives to increase the bioavailability of curcumin have been studied and include more recently its incorporation in lipid vehicles; association with hepatic metabolism inhibitors, such as piperine, or even its formulation in nanoparticles.

Nanoparticles are typically characterized as materials with dimensions on the scale of 0.1-100 nm (Naksuriya, Okonogi, Schiffelers, & Hennink, 2014; Yallapu, Jaggi, & Chauhan, 2012). The diversity in the physical-chemical characteristics of nanoparticles is related to its preparation process, and provides these materials with variable biological properties (Cirstea et al., 2010; Li et al., 2016; Liu, Gao, Cao, Zhang, & Guo, 2011), such as ability to act as an effective carrier for drugs, protecting them from undesirable physiological conditions and allowing their controlled and selective release at target sites (Lamprecht, Yamamoto, Takeuchi, & Kawashima, 2005; Stevenson, Hueber, Hutton, McInnes, & Graham, 2011; Ulbrich & Lamprecht, 2010), in addition to increasing the drug's effectiveness (Anand et al., 2010; Chakraborty, Jain, & Rani, 2011; Dobrovolskaia, Aggarwal, Hall, & McNeil, 2008; Kong, Marcus, Hong, Giannakakou, & Wang, 2006; Namiki et al., 2011). Specifically in relation to the pharmacological profile of curcumin, its delivery in nanoparticles of polylactic glycolic acid (Cur-PGLA-NPs), increased the compound's solubility in water 600 times, demonstrating the potential of nanoparticles as carriers of the curcumin, maximizing its biological effects.

In fact, a study evaluating the effectiveness of curcumin-loaded nanoparticles on bone resorption induced by LPS in rats, showed that the local application of the compound in gingival tissues completely inhibited bone loss, and reduced the number of osteoclasts and the amount of inflammatory infiltrate present (Zambrano et al., 2018).

Although many studies have evaluated the effects of curcumin on osteoclastogenesis, there is a lack of data on its effects on osteogenesis. In vitro studies have observed an inhibitory effect of the compound on the proliferation and mineralization of pre-osteoblastic cells from rat calvaria (ROB) (Notoya et al., 2006). On the other hand, a study evaluating the effects of curcumin on the osteogenic function of human mesenchymal stem cells, observed that the compound recovered the osteogenic potential of the cells, favoring their differentiation into osteoblasts and increasing the levels of mRNA of bone markers (osteopontin and collagen 1) after stimulation with hydrogen peroxide (H2O2) (Wang et al., 2016).. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) have a great potential for self-renewal and differentiation in several cell types, such as osteoblasts (Bruder et al., 1998), chondrocytes (Johnstone, Hering, Caplan, Goldberg, & Yoo, 1998) and adipocytes (Dennis et al., 1999). As a precursor to osteoblasts, BMSCs not only regulate bone homeostasis, but also act critically in fracture repair (Bielby, Jones, & McGonagle, 2007)

Numerous studies have investigated the effects of various compounds, mechanical stress, physical stimuli and scaffolds on BMSCs (Fairey & Cowan, 1967; Yan, Guo, Wang, Li, & Wang, 2018), in order to translate their regenerative capacity into clinical practice. In view of its multi-potent characteristics, the use of natural bioactive compounds that can stimulate its osteogenic potential may represent an advance towards bone regeneration, especially considering its absence of toxicity and low cost.

Thus, considering the data on the healing potential of curcumin, this study aims to investigate the effect of local application of curcumin carried on nanoparticles on bone repair in vivo, as well as to determine its influence on the osteogenic properties of BMSC in vitro.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1Nanoparticles

Nanoparticulate curcumin, and empty nanoparticles (vehicle) were prepared at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara (UNESP) using a combination of poly-lactic acid (PLA) and polyglycolic acid (PGA) in the proportion of 1: 1 and carried with 0,05 mg / mL of curcumin (lot # 081M1611V, Sigma-Aldrich Co, São Paulo, Brazil), as previously described(Zambrano et al., 2018). The vehicle control (‘empty’ nanoparticles) were prepared using the same method but using loaded only with the same volume of ethanol vehicle.

2.2 In vivo study

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of School of Dentistry at Araraquara-UNESP (license number 40/2017) and carried out in accordance with the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Sixty-three male Wistar rats (Rattus norvegicus), aged 11 weeks, weighing between 300-350g were used in this study. The animals were accommodated in polypropylene cages and received granulated food (Labina / Purina) and water ad libitum, being weighed weekly.

Experimental Design:

The animals were randomly divided into three groups (Control, Curcumin and Vehicle), each containing 21 animals, and subdivided into groups of eight animals, according to the experimental period (7, 14 and 28 weeks).

Intervention

After anesthesia, incision and tissue divulsion, a single spherical defect of 5mm in diameter, centered on the sagittal suture in the central region of the frontal bone was created using a trephine drill (Neodent®, Brazil),) under constant irrigation. The defects were filled according to the experimental groups: Control group (topical application of saline); Curcumin group (application of 0.05mg / ml nanoparticulate curcumin); vehicle group (empty nanoparticle). The periosteum and soft tissue were repositioned and sutured with 4-0 vicryl® (polyglactin 910) and 4–0 mononylon (Ethicon, Johnson & Johnson, Brazil). All animals received intramuscular administration (single dose) of 0.1 ml / kg of sodium dipyrone (Ibasa, Porto Alegre, RS-Brazil). The animals were euthanized after 7, 14 and 28 days. After euthanasia, the entire upper portion of the animals' cap was removed and fixed in 4% paraformoldehyde for 24 hours, transferred to 70% ethanol and stored at 4ºC for evaluation by microcomputer tomography (μCT). After scanning in μCT, the tissues were decalcified in a 10% EDTA solution, pH 7.2 for 6 to 8 weeks for later preparation and inclusion in paraffin, staining with Hematoxylin and Eosin (H / E) for descriptive histological analysis and stereometry; Masson’s Trichome staining for collagen quantification, or for immunohistochemistry.

Microcomputer tomography

All calvaria containing the surgically made bone defect were scanned on a microcomputer tomography (Skyscan 117, SkyScan, Aartselaar, Belgium) with standardized parameters. The sample was reconstructed in a three-dimensional model, reoriented in the sagittal, coronal and transversal planes, and a circular region of interest (ROI) was constructed and positioned on the defect margins to determine the percentage of newly formed bone volume. The standardized gray scale value was defined to distinguish bone tissue (255-55). The reconstruction, reorientation of all images and analysis of bone volume / total volume (BV / TV fraction) in the region of interest was performed was performed using the software package of the scanning equipment (NRecon/Dataviewer/CTan/CTvo, Skyscan, Aartselaar, Belgium) by a trained examiner who was not aware of the experimental conditions of each sample.

Descriptive histological analysis and stereometry

Routine histological processing was carried out, and 4μm thick sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) for descriptive histological analysis and stereometry, and with Masson's Trichome for quantification of collagen content. The images were captured by optical microscopy (DIASTAR; Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Germany), with an original magnification of 20X for the stereometric analysis and 50X and 100X for the histological description.

A histological description of the sections in each group was made according to the characteristics of the newly formed tissues: organization of granulation tissue, neovascularization, presence of inflammatory infiltrate and repair / formation of bone tissue. These analyzes were performed for five animals per group in two sections by a blind, trained examiner.

Stereometric analysis

The stereological technique points count was employed in sections stained with H&E to evaluate the proportion (or relative density) of cells (without distinction of cell type), and blood vessels. After capturing images, quantification was performed with the support of grids positioned (superimposed) on the digitized images of the histological sections filling the defect ends. For each grid, 80 coinciding points on histological structures were counted. Then, a percentage analysis of each tissue component was performed in relation to the total number of points counted per experimental period for the graphical representation of stereometry. All analyzes were performed by an examiner blinded to the experimental groups

Quantification of collagen content

Collagen content present between the defect margins was analyzed semi-quantitatively. We analyzed two semi-serial sections from each of four different animals in each experimental condition and period. All image-acquisition parameters were standardized. Digital images were obtained at × 25 magnification (digital camera DP-71, Olympus, Tokyo, Japan). Using the Photofiltre software, the region of interest for the defect was defined. ImageJ® analysis software was used to convert the images into a grayscale 8-bit image creating a colorless image. Then, the images were subjected to a threshold (0-200) so that each grayscale pixel was turned white and each black pixel remained black. The number of white pixels in each image was used to calculate the percentage of the image area that corresponded to collagen. The number of white pixels was determined, and collagen content is expressed as the percentage of white pixels from the total number of pixels in the image.

Immunohistochemistry

The detection of the expression and location of tissue turnover markers (PCNA, RANKL, OPG and RUNX2) was performed by immunohistochemistry using the Dako EnvisionTM FLEX visualization kit, High pH (Link) - (# K800021-2) , in the same regions of interest of stereometric analysis (defect margins). The sections were rehydrated, incubated for 15 minutes with 3% hydrogen peroxide solution to block endogenous peroxidase and submitted to the antigenic recovery step with sodium citrate for 10 minutes (anti-RANKL, anti-OPG and anti-Runx2), or incubated with the solution of the "Target retrieval solution high pH" kit in a pressure cooker (anti-PCNA). Then the sections were incubated with the primary antibodies (anti-RANK-L (sc-52950, Santa Cruz Biotechnology, 1: 100), anti-OPG (ab73400, Abcam, 1: 200,), anti-Runx2 (sc- 8566, Santa Cruz Biotechnology, 1: 200) and anti-PCNA (ab29-Abcam, 1: 6000) and left for 18 h (overnight) at 4º C in a humidified compartment. Then the sections were incubated with secondary antibody conjugated to peroxidase (Dako EnVision ™ FLEX / HRP detection reagent), supplied by the kit, and the reaction was developed using the DAB chromogen, all sections were contrasted with Carrazi's hematoxylin and mounted with Permount. Photomicrographs at 40x magnification were obtained using a microscope (LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) coupled to a digital camera. The image capture parameters were kept constant. Three sections were analyzed per animal a total of 4 animals per group. The results were analyzed by a blind examiner for the experimental groups, using the Image J software and the IHC Profile plugin (Nguyen & Nguyen, 2013).

2.3 In vitro study

BMSCs were obtained from the bone marrow of 3-4-week-old Wistar rats, weighing between 100g and 110g. After euthanizing the animals, the femur was dissected and kept in PBS (1X), subsequently taken to 70% alcohol for 1 minute and finally left in pure α-MEM medium. For the collection of cells, the epiphyses were removed, the medullary portion rinsed with pure α-MEM medium and its contents collected and subjected to cell separation. The collected cells were washed (centrifugation at 350g / 5 min / 4ºC) in PBS (1X) and resuspended in complete α-MEM (supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin / streptomycin (P / S)) to perform the initial experiments. These cells were maintained for 12 to 16 days, with expansion to other plates, until the non-adherent hematopoietic cells were eliminated. In all experiments, cells were used between the 3rd and 5th pass. In all the experiments described below, the cells were treated with nanoparticulate curcumin or vehicle (empty nanoparticle). Three different concentrations of curcumin were evaluated: (0.1 µg / ml; 0.05 µg / ml; 0.025 µg / ml). Untreated cells, maintained only in culture medium, were used as controls.

To assess the influence of osteogenic inducers (ascorbic acid and ß-glycerolphosphate) on the effects of curcumin on the production of alkaline phosphatase and mineralized matrix, cells were maintained in standard medium (α-MEM supplemented with 10% FBS + 1% penicillin / streptomycin), and in osteogenic medium (α-MEM + 10% FBS + 1% P / S + 20 µM ascorbic acid + 10 µM ß-glycerolphosphate + 10 µM dexamethasone).

Cell Viability Test (MTT)

To assess the viability of cells exposed to different concentrations of nanoparticulate curcumin, BMSC were seeded in complete DMEM at a concentration of $1x10_4$ cells in a 96-well plate. After a period of 24 hours, to allow cell adhesion to the plate, the cell medium was removed and the cells were treated with different concentrations of nanoparticulate curcumin (0.1ug / mL, 0.05ug / mL and 0.025ug / mL) to evaluate the dose-response effect in periods of 1, 3, 7 and 10 days. Controls were represented by the same volume of the vehicle used in the dilution of the nanoparticulate curcumin ("empty" nanoparticle). At the end of the experimental period, the cells were treated with MTT (cat. M6494, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) and incubated for 2 hours. After removing the MTT, 50ul of acidified isopropanol was added to each well for later reading on the spectrophotometer (Spectramax L, Molecular

Devices), using a wavelength of 570nm. The number of viable cells in the wells treated with nanoparticulate curcumin or vehicle was estimated in relation to the control without treatment.

Alkaline Phosphatase activity

Considering that ALP levels are considered markers of the initial phase of osteoblastic differentiation, we evaluated the dose-response effect of curcumin on the production of this protein by BMSCs. For this analysis $1x10^4$ cells / well were cultured in a 96-well plate in osteogenic medium and standard medium (non-osteogenic medium). After 24h the cells were treated with nanoparticulate curcumin (0.1µg / ml, 0.05µg / ml, 0.025µg / ml) or vehicle (in a volume corresponding to the higher volume used in curcumin treatment). Culture medium and stimuli were added again every 48 hours. Untreated cells were used as controls. At the end of the experimental periods (7 and 10 days), the cells were collected and prepared with lysis buffer (Cell Lysis Buffer, cat. 9803, Cell Signaling Tech., Inc.) supplemented with protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA free, sc- 29131, Santa Cruz Biotech Inc., USA) for extraction of total protein. After quantification using the Bradford method (QuickStart Bradfordprotein1xdyereagent, Bio-Rad Lab. Inc., USA), the proteins were used to determine ALP levels using the Labtest commercial kit (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil), according to the manufacturer's instructions, and the quantification obtained by reading the absorbance in a spectrophotometer at a wavelength of 590nm.

Alizarin Red

For these experiments, bone marrow stromal cells were seeded with $5x10^3$ cells / well in a 96-well plate. The cells were grown in medium standard (non-osteogenic medium) and osteogenic medium and maintained for 14 days. After this period, the cells were washed with PBS (1X) and then fixed in 4% paraformol for 1 hour at 4ºC. After 2 washes with PBS (1X) the cells were stained with 2% alizarin red (pH 4.2) at room temperature for 10 minutes to identify calcium deposits in areas of mineralized matrix. For the quantification of the mineral matrix production, the cells were washed abundantly with distilled water and then diluted in acetylpyridine chloride (10% in PBS) for 5 minutes and transferred to a new 96-well plate for reading on a spectrophotometer, using 550nm wavelength.

Analysis of results

The data obtained from each experiment were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The samples of each experimental group were considered as independent, thus, comparisons were made 2 to 2, using parametric (t test for independent samples) or non-parametric (ANOVA) methods according to the data distribution. The level of significance adopted was 95% ($p < 0.05$).

3. RESULTS

Curcumin slightly favors bone repair in the initial periods

The results of µCT show that although the local application of the empty nanoparticle (vehicle) promoted a delay in the bone repair process (difference in total bone volume of 53% in relation to the control group in the period of 7 days), the administration of the nanoparticulate curcumin stimulated the formation of bone tissue in the initial periods, particularly in the 14-day experimental period. (7 days: control vs curcumin = 6.052 ± 0.6600 vs 6.751 ± 1.304; 14 days: control vs curcumin = 5.207 ± 1.042 vs 6.889 ± 1.297) (Figure 1).

Curcumin reduces cellularity in the later period and increases collagen content.

Data from the stereometric analysis show an increase in the proportion of cellular infiltrate in the defects treated with the vehicle, in relation to the control group. Curcumin, however, modulated this effect in the 28-day period (relative cell density in the control, vehicle and curcumin groups, respectively, in the 28-day period: 15.00 ± 2.814 vs 19.38 ± 2.522 vs 11.72 ± 1.566). Reduction in the proportion of blood vessels was also observed in defects treated with curcumin in the final evaluation period. Interestingly, the defects that received application of the vehicle and curcumin, showed a greater amount of collagen fibers in the same period (figure 2).

Corroborating the data from the stereometric analysis, we observed that at 7 days the defects filled by the vehicle showed more swollen granulation tissue, and with more calibrated vessels, in a clear process of stasis, when compared to the control group in the same experimental period. In the subsequent periods, no morphological and structural changes were observed in relation to the control group, and the tissue evolved with normal morphological characteristics.

In defects treated with curcumin, we observed an abbreviation of the proliferative phase and anticipation of the remodeling phase in the granulation tissue when compared to the other groups after the 14th day. These characteristics are reflected in the increase in the quantity and thickness of the collagen fiber, reduction of the inflammatory process and the presence of smaller capillaries, results also observed in stereometry. In this group, there was a greater replacement of immature bone tissue by lamellar bone tissue and we found greater bone formation at the ends of the defects. Representative histological images of each experimental group can be seen in figure 3.

Expression of PCNA and RUNX2 are modulated by the compound

When we investigated the effect of curcumin on the expression of tissue turnover markers, we observed a significant increase in the expression of PCNA (figure 4a) and RUNX2 in the period of 14 days (figure 4d). The levels of RANKL and OPG were not altered by the compound (figures 4b and 4c). On the other hand, vehicle-treated defects showed lesser RUNX2 expression (figure 4c) at 7 and 28 days in relation to control, and an increase in RANKL expression at 28 days (figure 4c) ($p < 0.05$).

Curcumin increases ALP activity in a time-dependent manner, but does not stimulate the formation of mineralized matrix

Cell viability test demonstrated that none of the curcumin concentrations evaluated was cytotoxic (figure 5a). When we evaluated the effect of curcumin on the production of ALP, we observed that in the absence of osteogenic inducers, curcumin did not stimulate the production of the protein in the analyzed periods (figure 5c-1), however, in the presence of osteogenic medium, treatment with the compound caused a time and dose-dependent effect (figure 5c-2). While the lowest dose (0.025µg /ml) significantly stimulated the increase in ALP levels in the period of 10 days, the dose of 0.05µg / ml markedly reduced the amount of protein when compared to the control. At 7 days, curcumin did not change the levels of ALP in relation to the control (figure 5c-2). Similarly, curcumin was not able to stimulate the production of mineralized matrix in the absence of osteogenic medium, in any of the experimental periods (figure 5a-1). In the presence of the osteogenic medium, interestingly the vehicle markedly inhibited the production of calcification nodules. (figure 5a-2).

4 DISCUSSION

The present study evaluated the potential of nanoparticulate curcumin on repair, using a critical bone defect model in rat calvaria, and investigated its osteogenic potential in vitro. The local administration of the compound favored bone formation and increased the expression of RUNX2 and PCNA in the initial healing periods. Increased collagen production and reduced cellularity were observed in the later period. In vitro, curcumin increased the production of ALP in a dose-dependent manner but did not stimulate the formation of a mineralized matrix.

Few studies have evaluated the effect of local administration of curcumin on bone repair. Data from in vivo study by our research group (*in preparation*), evaluating the effect of local application of curcumin on the repair of periodontal tissues after removal of ligatures (stimulus inducing periodontal disease), showed that after 14 days of , application curcumin induced the formation of a bone volume statistically superior to the control group. Increased expression of RUNX2 and the amount of collagen fibers in the same period, and reduced cell infiltrate after 7 days were also observed in animals treated with curcumin. In the present study, increased collagen content and reduced cellularity were found only in the later period (28 days), and although curcumin stimulated bone formation in the initial periods, we found no statistically significant difference in relation to the control. Increased RUNX2 expression after 14 days of healing, however, was a consistent finding in both studies.

Although the compound and dose used in both studies were the same (0.05mg / mL nanoparticulate curcumin), it is likely that differences related to the experimental models (as well as the cellular microenvironment found in each of the models), and particularities involving the synthesis of the nanoparticle are responsible for the difference in the magnitude of the effects. When applied directly to the bone defect, the nanoparticles elicited an initial inflammatory response evidenced by the increase in the defect's cellularity and blood vessels, which was not observed in the periodontal model. In addition, when compared to the control, the nanoparticles promoted a substantial delay in bone repair. This effect may have suppressed the biological activities of curcumin.

We use nanoparticles synthesized from PLGA, a biodegradable and biocompatible polymer, widely studied and approved by the FDA, used for sustained and controlled administration of active molecules (Bose, Sarkar, & Banerjee, 2018). Studies have shown that this polymer has low toxicity in vitro and in vivo, but factors such as preparation method, characteristics inherent to the polymer such as (molecular weight, chemical structure, hydrophobicity) and physicochemical parameters (pH, temperature and ionic charge), in

addition to the characteristics of the implantation site, they can influence the behavior of the material (Sadat Tabatabaei Mirakabad et al., 2014) and cause different reactions.

Although the nanoparticles caused a delay in the repair process in the initial period, curcumin stimulated bone formation and increased the expression of RUNX2 and PCNA. The increase in RUNX2 by the compound has been demonstrated in previous studies (Chen et al., 2016; Gu, Cai, Huang, Shi, & Yang, 2012; Pimentel et al., 2020) and correlated with the osteogenic effect of curcumin. RUNX2 is an important transcription factor that controls the osteoblast phenotype (An et al., 2016). In vivo study data demonstrated an absence of osteoblast development in RUNX2 knockout animals (Ducy, Zhang, Geoffroy, Ridall, & Karsenty, 1997). The increase in the expression of this transcription factor in defects treated with curcumin, observed in our study, may explain, at least in part, the beneficial effect of the compound on bone formation. On the other hand, the increase in the expression of PCNA, a marker of cell proliferation, seems to indicate a greater stimulus to the proliferative phase of repair, and may be one of the factors associated with the repairing effect of curcumin. Studies have shown that the modulation of PCNA by the compound depends on the cell type. Curcumin reduces the expression of PCNA in cancer cells (Calaf, Ponce-Cusi, & Carrion, 2018; J. Y. Wang et al., 2018), where blocking cell proliferation is required, but increases in inflammatory processes characterized by tissue degradation (Zhao et al., 2017; Zhou, Zhang, Xu, & Wang, 2014).

Considering the role of RANKL and OPG in tissue turnover, the expression of these markers was also evaluated in vivo samples. Results showed that curcumin did not change the expression of the markers in any of the experimental periods. A study evaluating the effect of systemic administration of curcumin on bone repair in diabetic rats, observed a reduction in the RANKL / OPG ratio in animals treated with the compound (Cirano. et al., 2018). It is possible that differences related to the curcumin (nanoparticulate curcumin vs free curcumin), and the route of administration (topical vs systemic) explain these divergences between the results.

The data obtained in vitro experiments also corroborate the osteogenic potential of curcumin in vivo. Curcumin increased the production of alkaline phosphatase in BMSCs maintained in osteogenic medium in a dose-dependent manner. Alkaline phosphatase (ALP) activity is a widely recognized biochemical marker for osteoblastic activity. In general, the ALP activity is represented as an early phenotypic marker of osteoblastogenesis (Stein, Lian, & Owen, 1990), indicating a role of the compound in this process. Contrarily, experiments evaluating the effect of curcumin on the production of mineralized matrix, showed an inhibitory effect of the nanoparticle (vehicle) when the cells were kept in an osteogenic medium.

In the in vitro experiments, the cells were maintained in an osteogenic medium (containing synthetic stimulants of osteogenic differentiation - ascorbic acid and β-glycerophosphate) and non-osteogenic, so that we could evaluate the role of the compound in osteoblastogenesis without interference from external stimulants. The results showed that curcumin is not able to induce the production of ALP and the formation of mineralized matrix in the absence of osteogenic medium.

Data on the pharmacodynamics of the compound in vivo and the effects of different doses of the compound over longer experimental periods have not been addressed and represent limitations of this study. Despite the limitations, this study demonstrated that the local application of curcumin may favor bone repair in vivo and stimulate osteoblastogenesis in vitro. Additional studies should investigate the effect of different nanoparticles on the bioavailability and biological activity of curcumin for its use in local applications.

5 CONCLUSIONS

Curcumin favored bone repair in the early periods and anticipated tissue remodeling by reducing cellularity in the later period and increasing collagen content. Increased RUNX2 expression was also observed in the initial periods and may be correlated with the stimulus on bone formation. In addition, curcumin significantly stimulated osteoblastic differentiation of BMSCs, increasing ALP activity in a dose-dependent manner. Although the use of nanoparticles may benefit the achievement of significant biological effects using low concentrations of the compound, further studies are needed to optimize its synthesis in order to minimize tissue toxicity reactions.

Conflict of interests

All authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

Financial support provided by CNPq 440588/2014-9.

Ethical approval

All the experimental protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Use (CEUA) of the School of Dentistry at Araraquara – UNESP (40/2017) and in accordance with the guidelines from the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA)

Acknowledgments

Financial support provided by CNPq 440588/2014-9. The authors are very grateful to Mrs. Ana Claudia Gregolin Costa Miranda (senior laboratory assistant, Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara-UNESP) for her support in the histological processing and staining and to Ms. Luana Carla Pires (laboratory technician, Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara-UNESP), operator of the μCT instrument.

6 REFERENCES

An, J., Yang, H., Zhang, Q., Liu, C., Zhao, J., Zhang, L., & Chen, B. (2016). Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation. *Life Sci, 147*, 46-58. doi:10.1016/j.lfs.2016.01.024

Anand, P., Nair, H. B., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Yadav, V. R., Tekmal, R. R., & Aggarwal, B. B. (2010). 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), 330-338. doi:10.1016/j.bcp.2009.09.003

Asteriou, E., Gkoutzourelas, A., Mavropoulos, A., Katsiari, C., Sakkas, L. I., & Bogdanos, D. P. (2018). Curcumin for the Management of Periodontitis and Early ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis: Killing Two Birds with One Stone. *Nutrients, 10*(7). doi:10.3390/nu10070908

Bae, W. J., Auh, Q. S., Kim, G. T., Moon, J. H., & Kim, E. C. (2016). Effects of sodium tri- and hexameta-phosphate in vitro osteoblastic differentiation in Periodontal Ligament and Osteoblasts, and in vivo bone regeneration. *Differentiation, 92*(5), 257-269. doi:10.1016/j.diff.2016.04.004

Bielby, R., Jones, E., & McGonagle, D. (2007). The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury, 38 Suppl 1*, S26-32. doi:10.1016/j.injury.2007.02.007

Bose, S., Sarkar, N., & Banerjee, D. (2018). Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration. *Mater Today Chem, 8*, 110-120. doi:10.1016/j.mtchem.2018.03.005

Bruder, S. P., Jaiswal, N., Ricalton, N. S., Mosca, J. D., Kraus, K. H., & Kadiyala, S. (1998). Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl), S247-256. doi:10.1097/00003086-199810001-00025

Calaf, G. M., Ponce-Cusi, R., & Carrion, F. (2018). Curcumin and paclitaxel induce cell death in breast cancer cell lines. *Oncol Rep, 40*(4), 2381-2388. doi:10.3892/or.2018.6603

Chainani-Wu, N., Collins, K., & Silverman, S., Jr. (2012). Use of curcuminoids in a cohort of patients with oral lichen planus, an autoimmune disease. *Phytomedicine, 19*(5), 418-423. doi:10.1016/j.phymed.2011.11.005

Chakraborty, M., Jain, S., & Rani, V. (2011). Nanotechnology: emerging tool for diagnostics and therapeutics. *Appl Biochem Biotechnol, 165*(5-6), 1178-1187. doi:10.1007/s12010-011-9336-6

Chen, Z., Xue, J., Shen, T., Mu, S., & Fu, Q. (2016). Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway. *Int J Mol Med, 37*(2), 329-338. doi:10.3892/ijmm.2015.2432

Cirano., F. R., Pimentel., S. P., Casati., M. Z., Corrêa., M. G., Pino., D. S., Messora., M. R., . . . Ribeiro., F. V. (2018). Effect of curcumin on bone tissue in the diabetic rat: repair of peri-implant and critical-sized defects. *Int J Oral Maxillofac Surg., 47(11)*, 1495-1503. doi:10.1016/j.ijom.2018.04.018

Cirstea, D., Hideshima, T., Rodig, S., Santo, L., Pozzi, S., Vallet, S., . . . Raje, N. (2010). 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, 9*(4), 963-975. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0763

Curylofo-Zotti, F. A., Elburki, M. S., Oliveira, P. A., Cerri, P. S., Santos, L. A., Lee, H. M., . . . Guimaraes-Stabili, M. R. (2018). Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. *Arch Oral Biol, 91*, 42-50. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.04.007

Dai, Q., Zhou, D., Xu, L., & Song, X. (2018). Curcumin alleviates rheumatoid arthritis-induced inflammation and synovial hyperplasia by targeting mTOR pathway in rats. *Drug Des Devel Ther, 12*, 4095-4105. doi:10.2147/DDDT.S175763

Daily, J. W., Yang, M., & Park, S. (2016). Efficacy of Turmeric Extracts and Curcumin for Alleviating the Symptoms of Joint Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Med Food, 19*(8), 717-729. doi:10.1089/jmf.2016.3705

de Almeida Brandao, D., Spolidorio, L. C., Johnson, F., Golub, L. M., Guimaraes-Stabili, M. R., & Rossa, C., Jr. (2019). Dose-response assessment of chemically modified curcumin in experimental periodontitis. *J Periodontol, 90*(5), 535-545. doi:10.1002/JPER.18-0392

Dennis, J. E., Merriam, A., Awadallah, A., Yoo, J. U., Johnstone, B., & Caplan, A. I. (1999). A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res, 14*(5), 700-709. doi:10.1359/jbmr.1999.14.5.700

Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B., & McNeil, S. E. (2008). Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm, 5*(4), 487-495. doi:10.1021/mp800032f

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell, 89*(5), 747-754. doi:10.1016/s0092-8674(00)80257-3

Elburki, M. S., Rossa, C., Guimaraes, M. R., Goodenough, M., Lee, H. M., Curylofo, F. A., . . . Golub, L. M. (2014). A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations. *Mediators Inflamm, 2014*, 959471. doi:10.1155/2014/959471

Elburki, M. S., Rossa, C., Jr., Guimaraes-Stabili, M. R., Lee, H. M., Curylofo-Zotti, F. A., Johnson, F., & Golub, L. M. (2017). 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, 40*(4), 1436-1449. doi:10.1007/s10753-017-0587-4

Fairey, R. N., & Cowan, R. J. (1967). A new method for measuring skin surface areas. *Can J Surg, 10*(3), 371-378.

Feng, T., Wei, Y., Lee, R. J., & Zhao, L. (2017). Liposomal curcumin and its application in cancer. *Int J Nanomedicine, 12*, 6027-6044. doi:10.2147/IJN.S132434

Gu, Q., Cai, Y., Huang, C., Shi, Q., & Yang, H. (2012). Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. *Pharmacogn Mag, 8*(31), 202-208. doi:10.4103/0973-1296.99285

Guimaraes, M. R., Coimbra, L. S., de Aquino, S. G., Spolidorio, L. C., Kirkwood, K. L., & Rossa, C., Jr. (2011). Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res, 46*(2), 269-279. doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01342.x

Guimaraes, M. R., de Aquino, S. G., Coimbra, L. S., Spolidorio, L. C., Kirkwood, K. L., & Rossa, C., Jr. (2012). Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun, 18*(1), 155-163. doi:10.1177/1753425910392935

Guimaraes-Stabili, M. R., de Aquino, S. G., de Almeida Curylofo, F., Tasso, C. O., Rocha, F. R. G., de Medeiros, M. C., . . . Rossa, C., Jr. (2019). Systemic administration of curcumin or piperine enhances the periodontal repair: a preliminary study in rats. *Clin Oral Investig, 23*(8), 3297-3306. doi:10.1007/s00784-018-2755-9

Guimarães., M. R., Coimbra., L. S., Aquino., S. G. d., Spolidorio., L. C., Kirkwood., K. L., & Junior., C. R. (2011). Potent anti-inflammatory effects of systemically-administered curcumin modulates periodontal disease in vivo. *J Periodontal Res, 46(2),* 269-279. doi:0.1111/j.1600-0765.2010.01342.x

Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol, 39*(3), 283-299. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x

Jin, T., Song, Z., Weng, J., & Fantus, I. G. (2018). Curcumin and other dietary polyphenols: potential mechanisms of metabolic actions and therapy for diabetes and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab, 314*(3), E201-E205. doi:10.1152/ajpendo.00285.2017

Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M., & Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res, 238*(1), 265-272. doi:10.1006/excr.1997.3858

Khanizadeh, F., Rahmani, A., Asadollahi, K., & Ahmadi, M. R. H. (2018). Combination therapy of curcumin and alendronate modulates bone turnover markers and enhances bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Arch Endocrinol Metab, 62*(4), 438-445. doi:10.20945/2359-3997000000060

Kong, K. Y., Marcus, A. I., Hong, J. Y., Giannakakou, P., & Wang, M. D. (2006). Automatic microtubule tracking for QD-based in vivo cell imaging and drug efficacy study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 1*, 3321-3324. doi:10.1109/IEMBS.2006.259750

Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., & Kawashima, Y. (2005). Nanoparticles enhance therapeutic efficiency by selectively increased local drug dose in experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther, 315*(1), 196-202. doi:10.1124/jpet.105.088146

Lewis, J. D., & Abreu, M. T. (2017). Diet as a Trigger or Therapy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology, 152*(2), 398-414 e396. doi:10.1053/j.gastro.2016.10.019

Li, H., Tian, J., Wu, A., Wang, J., Ge, C., & Sun, Z. (2016). Self-assembled silk fibroin nanoparticles loaded with binary drugs in the treatment of breast carcinoma. *Int J Nanomedicine, 11*, 4373-4380. doi:10.2147/IJN.S108633

Limketkai, B. N., Wolf, A., & Parian, A. M. (2018). Nutritional Interventions in the Patient with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am, 47*(1), 155-177. doi:10.1016/j.gtc.2017.09.007

Liu, J., Gao, Y., Cao, D., Zhang, L., & Guo, Z. (2011). Nanoparticle dispersion and aggregation in polymer nanocomposites: insights from molecular dynamics simulation. *Langmuir, 27*(12), 7926-7933. doi:10.1021/la201073m

Nabavi, S. F., Thiagarajan, R., Rastrelli, L., Daglia, M., Sobarzo-Sanchez, E., Alinezhad, H., & Nabavi, S. M. (2015). Curcumin: a natural product for diabetes and its complications. *Curr Top Med Chem, 15*(23), 2445-2455. doi:10.2174/1568026615666150619142519

Naksuriya, O., Okonogi, S., Schiffelers, R. M., & Hennink, W. E. (2014). Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and

clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials, 35*(10), 3365-3383. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.090

Namiki, Y., Fuchigami, T., Tada, N., Kawamura, R., Matsunuma, S., Kitamoto, Y., & Nakagawa, M. (2011). Nanomedicine for cancer: lipid-based nanostructures for drug delivery and monitoring. *Acc Chem Res, 44*(10), 1080-1093. doi:10.1021/ar200011r

Notoya, M., Nishimura, H., Woo, J. T., Nagai, K., Ishihara, Y., & Hagiwara, H. (2006). Curcumin inhibits the proliferation and mineralization of cultured osteoblasts. *Eur J Pharmacol, 534*(1-3), 55-62. doi:10.1016/j.ejphar.2006.01.028

Pimentel, S. P., Casati, M. Z., Ribeiro, F. V., Correa, M. G., Franck, F. C., Benatti, B. B., & Cirano, F. R. (2020). Impact of natural curcumin on the progression of experimental periodontitis in diabetic rats. *J Periodontal Res, 55*(1), 41-50. doi:10.1111/jre.12683

Pivari, F., Mingione, A., Brasacchio, C., & Soldati, L. (2019). Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Nutrients, 11*(8). doi:10.3390/nu11081837

Sadat Tabatabaei Mirakabad, F., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Milani, M., Zarghami, N., . . . Joo, S. W. (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev, 15*(2), 517-535. doi:10.7314/apjcp.2014.15.2.517

Schneider, A., Hossain, I., VanderMolen, J., & Nicol, K. (2017). Comparison of remicade to curcumin for the treatment of Crohn's disease: A systematic review. *Complement Ther Med, 33*, 32-38. doi:10.1016/j.ctim.2017.06.002

Stein, G. S., Lian, J. B., & Owen, T. A. (1990). Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J, 4*(13), 3111-3123. doi:10.1096/fasebj.4.13.2210157

Stevenson, R., Hueber, A. J., Hutton, A., McInnes, I. B., & Graham, D. (2011). Nanoparticles and inflammation. *ScientificWorldJournal, 11*, 1300-1312. doi:10.1100/tsw.2011.106

Ulbrich, W., & Lamprecht, A. (2010). Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *J R Soc Interface, 7 Suppl 1*, S55-66. doi:10.1098/rsif.2009.0285.focus

Wang, J. Y., Wang, X., Wang, X. J., Zheng, B. Z., Wang, Y., Wang, X., & Liang, B. (2018). Curcumin inhibits the growth via Wnt/beta-catenin pathway in non-small-cell lung cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci, 22*(21), 7492-7499. doi:10.26355/eurrev_201811_16290

Wang, K., Guo, C., Dong, X., Yu, Y., Wang, B., Liu, W., & Chen, D. (2018). In Vivo Evaluation of Reduction-Responsive Alendronate-Hyaluronan-Curcumin Polymer-Drug Conjugates for Targeted Therapy of Bone Metastatic Breast Cancer. *Mol Pharm, 15*(7), 2764-2769. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00266

Wang, N., Wang, F., Gao, Y., Yin, P., Pan, C., Liu, W., . . . Wang, J. (2016). Curcumin protects human adipose-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. *J Pharmacol Sci, 132*(3), 192-200. doi:10.1016/j.jphs.2016.10.005

Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2012). Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discov Today, 17*(1-2), 71-80. doi:10.1016/j.drudis.2011.09.009

Yan, Z., Guo, Y., Wang, Y., Li, Y., & Wang, J. (2018). MicroRNA profiles of BMSCs induced into osteoblasts with osteoinductive medium. *Exp Ther Med, 15*(3), 2589-2596. doi:10.3892/etm.2018.5723

Zambrano, L. M. G., Brandao, D. A., Rocha, F. R. G., Marsiglio, R. P., Longo, I. B., Primo, F. L., . . . Rossa Junior, C. (2018). Local administration of curcumin-loaded nanoparticles effectively inhibits inflammation and bone resorption associated with experimental periodontal disease. *Sci Rep, 8*(1), 6652. doi:10.1038/s41598-018-24866-2

Zhao, L., Gu, Q., Xiang, L., Dong, X., Li, H., Ni, J., . . . Chen, G. (2017). Curcumin inhibits apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 expression and alleviates oxidative stress in testes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ther Clin Risk Manag, 13*, 1099-1105. doi:10.2147/TCRM.S141738

Zhou, X., Zhang, J., Xu, C., & Wang, W. (2014). Curcumin ameliorates renal fibrosis by inhibiting local fibroblast proliferation and extracellular matrix deposition. *J Pharmacol Sci, 126*(4), 344-350. doi:10.1254/jphs.14173FP

FIGURES

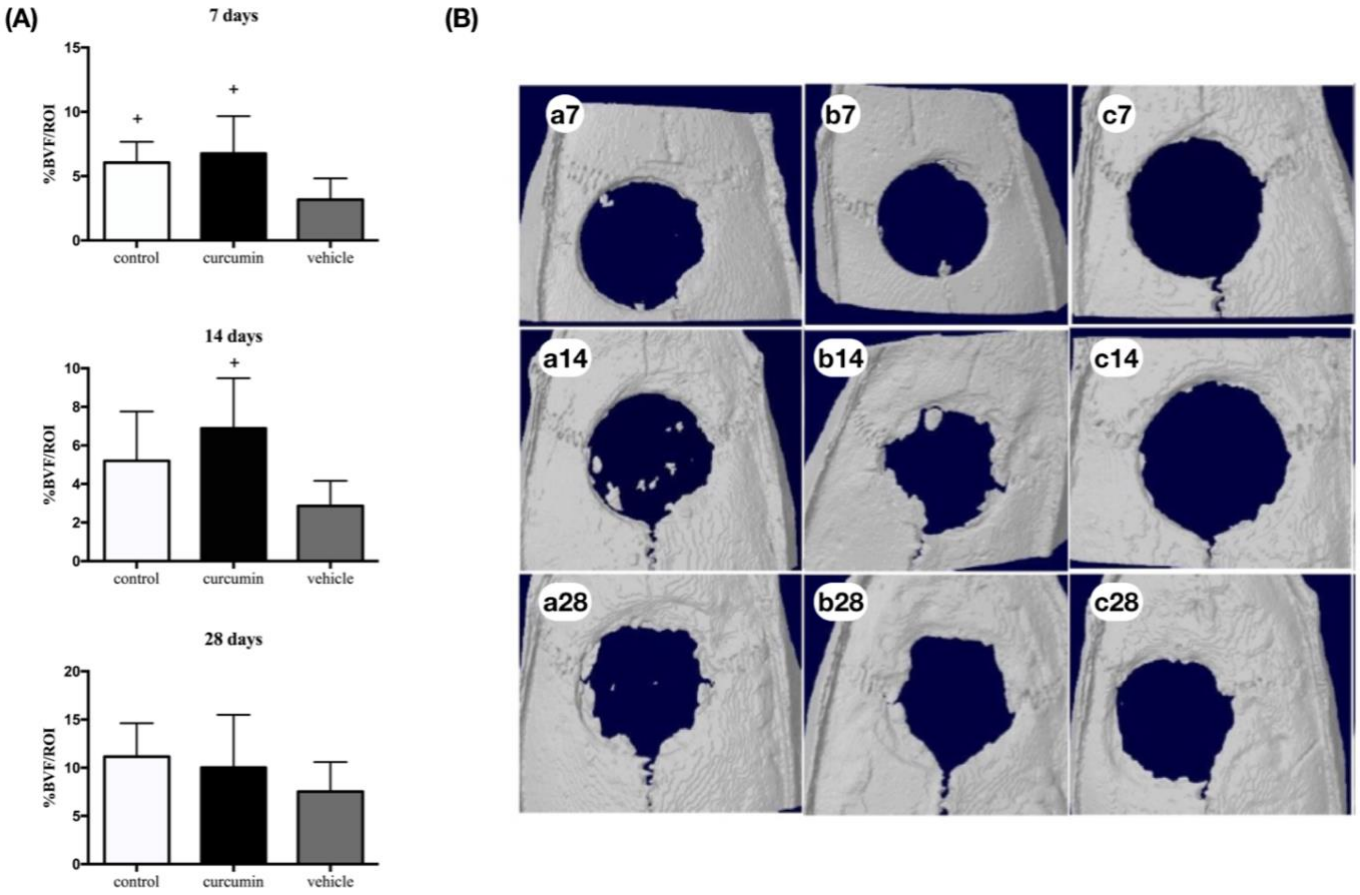


Figure 1 – Curcumin stimulate bone repair in the early healing periods. **A:** The bar graph presents the quantitative results of the ratio of mineralized tissue (BV/TV) in the defined standardized ROI, according to the experimental condition. **B**: Representative images of three-dimensional reconstructions of the bone defect in each experimental condition (**(a)** control group; **(b)** curcumin group; **(c)** vehicle group) and period (7, 14 and 28 days). Specimens from all animals were analyzed. (+) indicates significant a difference ($p < 0.05$) in comparison with the vehicle group.

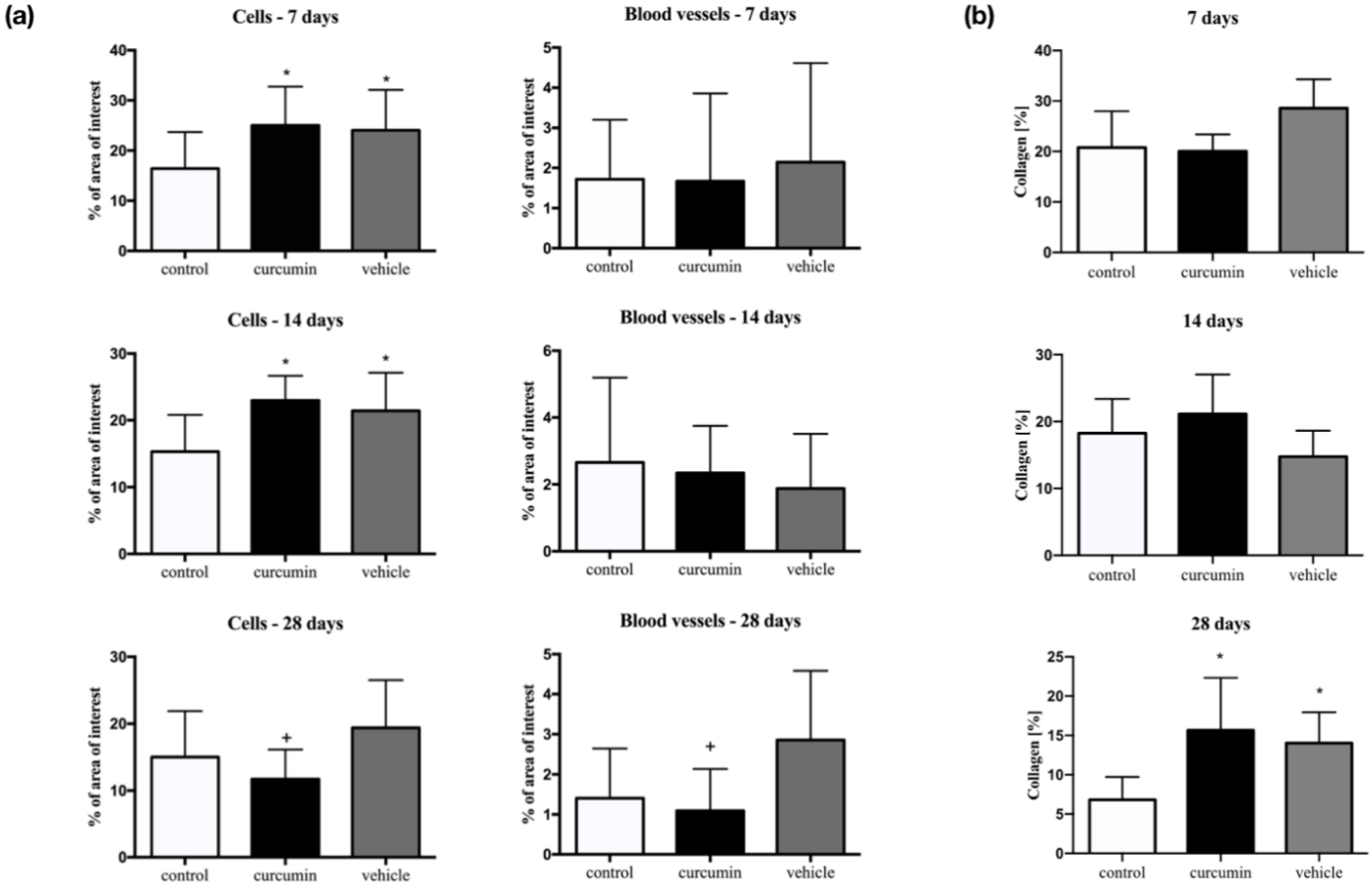


Figure 2 – Curcumin reduces cellularity and increases collagen content in the late healing period. **A**: Stereometric analysis of the defect ends, according to the experimental condition and period. Vehicle increased cellularity in the initial periods and curcumin modulated this effect in the 28-day period. In this same period curcumin reduced the blood vessel proportion in relation to the vehicle group. **B**: Percentage of collagen fibers in the bone defect according to the experimental condition and period. (+) indicates a significant difference ($p < 0.05$) in comparison with the vehicle group. (*) indicates a significant difference ($p < 0.05$) in comparison with the control group. Bars indicate means and vertical lines standard error of mean of at least three animals in each experimental group.

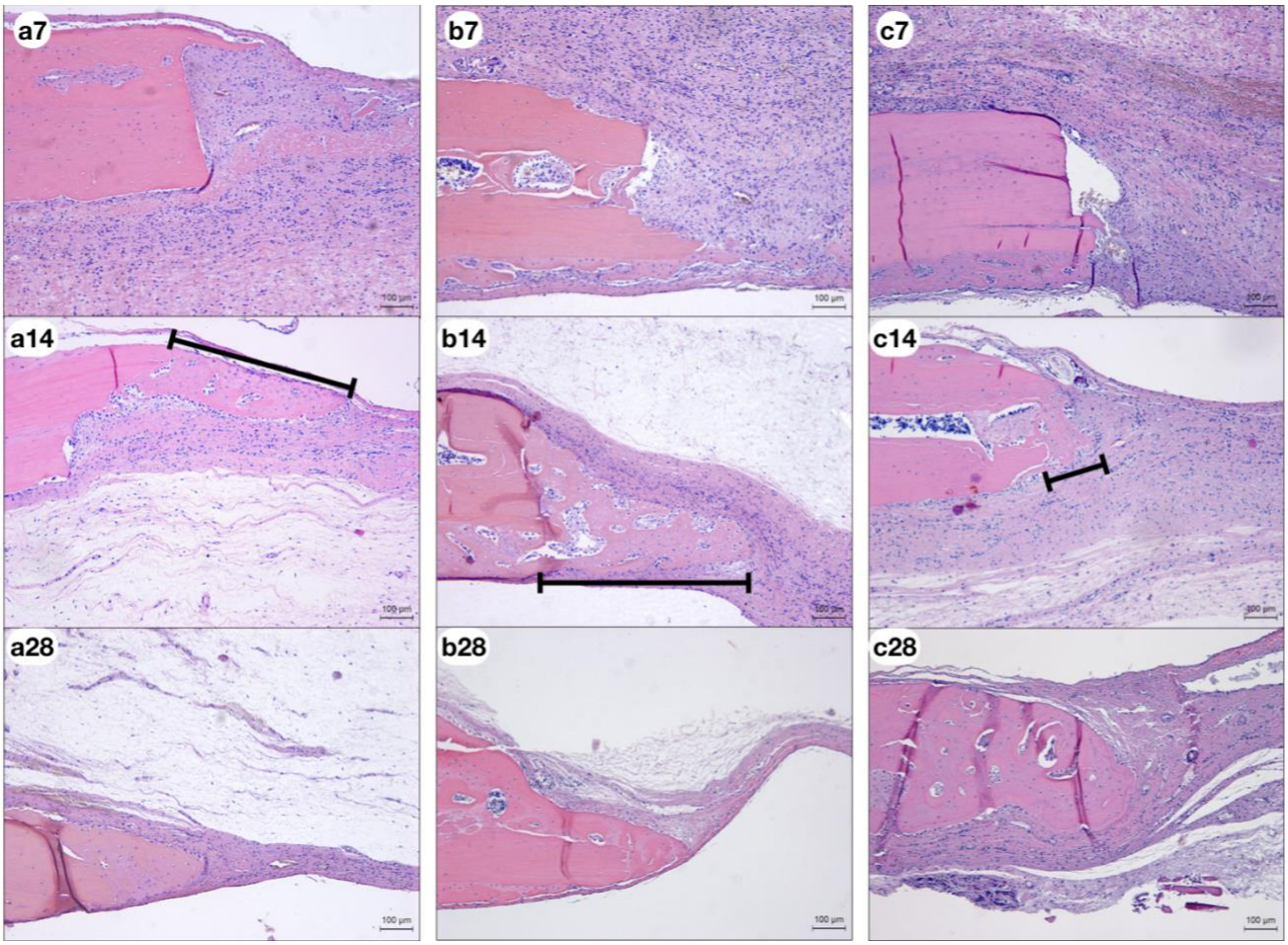


Figure 3 - Representative images of the histological according to experimental period and condition: **(a)** control group, **(b)** curcumin group and **(c)** vehicle group. The line indicates the newly formed bone tissue in each experimental group over the 14-day period. Curcumin increased the bone formation in relation to control group in this period (14 days).

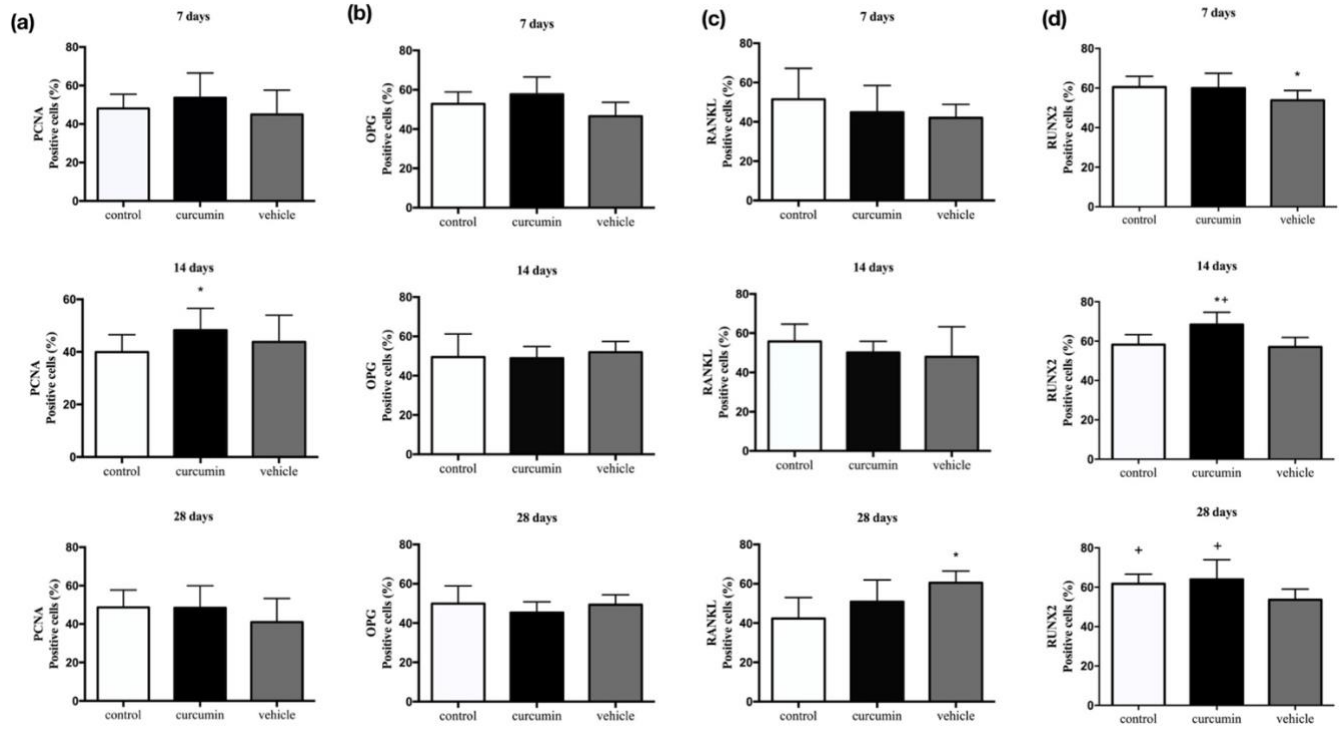


Figure 4 – Representative images of immunohistochemical staining of (**a**) PCNA, **(b)** OPG, **(c)** RANKL, **(d)** RUNX2. Expression of biologic markers was assessed in semi-serial histological sections of bone defect. Curcumin increased the expression of PCNA and Runx2 at 14 days, while the vehicle increased the expression of RANKL in the period of 28 days and reduced the expression of RUNX2 at 7 and 28 days. The bars indicate means and vertical lines the standard error of the mean. (+) indicates a significant difference ($p < 0.05$) in comparison with the vehicle group. (*) indicates a significant difference ($p < 0.05$) in comparison with the control group.

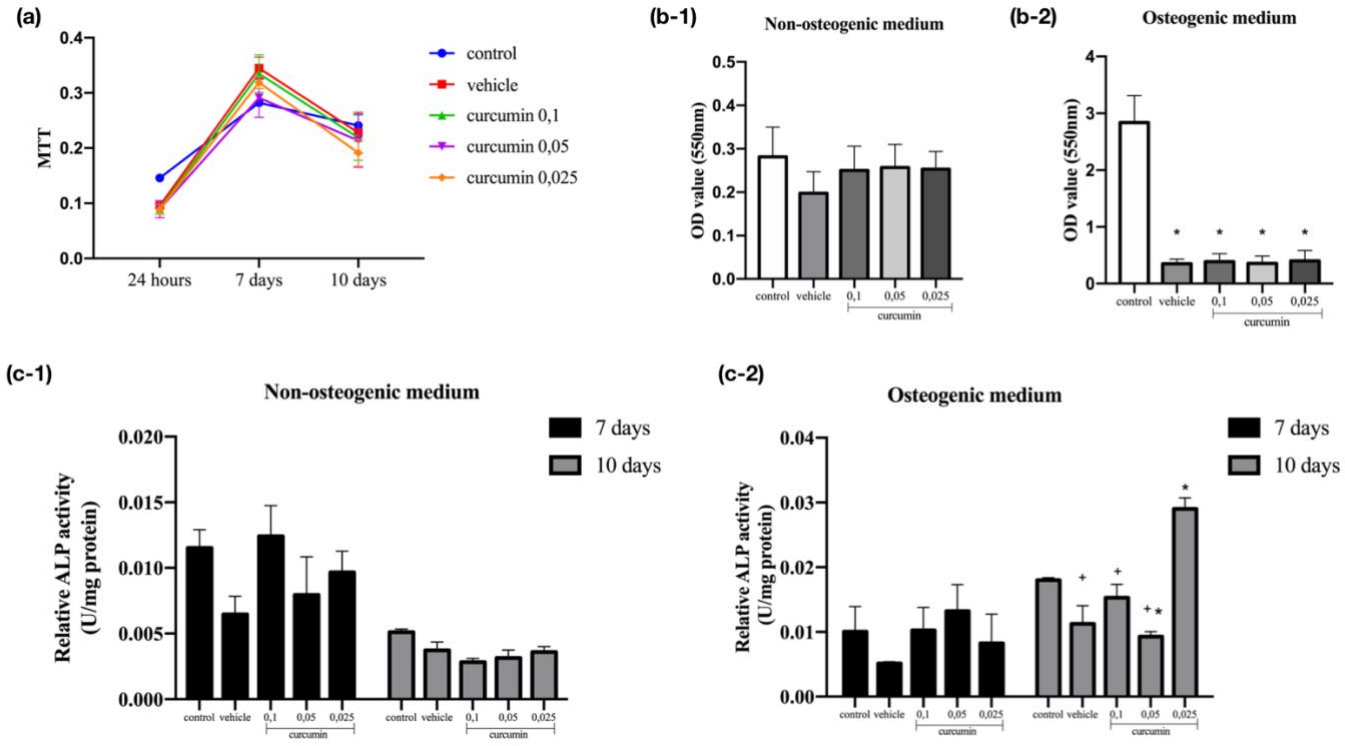


Figure 5 – **A**: Cytotoxicity of curcumin in BMSC cells. Cell viability was determined by an MTS-based assay 2 h after the addition of the mitochondrial enzymatic substrate MTS. Curcumin did not show cellular toxicity in any of the concentrations used for the experiments. **B**: Mineralized matrix stained with alizarin red. BMSC were maintained in and non-osteogenic (**b-1**) and osteogenic (**b-2**) medium. Curcumin did not stimulate the formation of mineralized matrix in non-osteogenic medium. When the BMSC were seeded in an osteogenic medium, the nanoparticles inhibited the production of calcification nodules. (*p<0.05 vs control). **C:** Alkaline phosphatase levels in BMSC stimulated with curcumin. Curcumin did not stimulate the production of ALP in a non-osteogenic medium (**c-1**). When the cells were seeded in addition to the synthetic stimulants (osteogenic medium) curcumin increased the levels of ALP at a time and dose-dependent manner. (*p < 0.05 vs control; + p<0.05 vs ao curcumin 0,025µg/ml). Bars represent means and vertical lines standard deviations of 3 independent experiments.

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-κB. 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-kappaB, 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 potently 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).

APÊNDICE A – METODOLOGIA

Preparo dos compostos:

O curcumin nanoparticulado, bem como as nanopartículas 'vazias' (veículo) foram preparados nos laboratórios dos Profs. Drs. Antonio Claudio Tedesco (Departamento de Química da Universidade de São Paulo) 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 carreadas com 0,05 mg/mL de curcumin (lot # 081M1611V, Sigma-Aldrich Co, São Paulo.Brazil) 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 à 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 e PBS, estocada a 4°C e usada em até 3 meses. A concentração do curcumin nanoparticulado utilizada neste estudo foi baseada em resultados anteriores do nosso grupo, mostrando redução da reabsorção óssea após aplicação local em modelo de doença periodontal experimental em rato.[52]

Estudo in vivo

Desenho Experimental

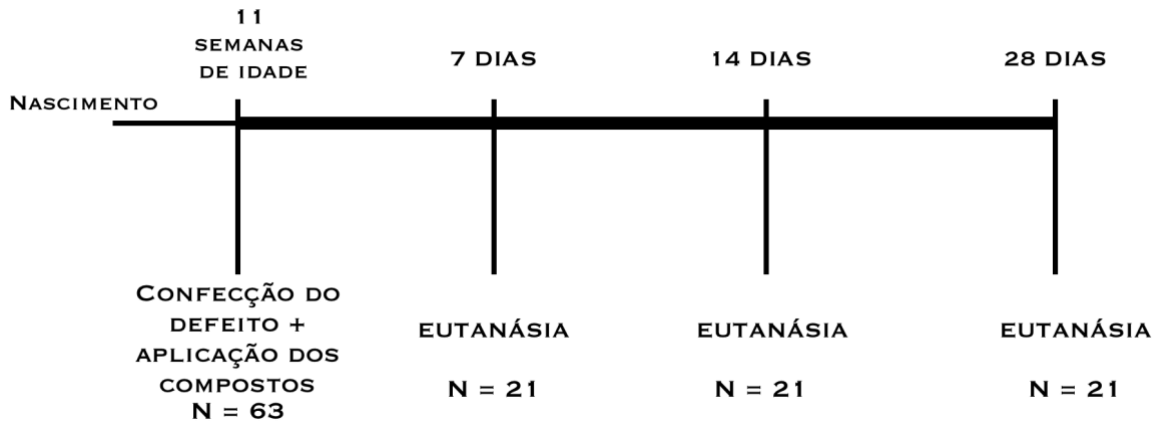
Foram utilizados 63 ratos Wistar, pesando entre 300-350g que foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, de acordo com o Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA) e o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número (40/2017). Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*, sendo pesados semanalmente. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, subdivididos em três períodos, com 7 animais cada, de acordo com o quadro 1, seguindo o desenho experimental delineado na Figura 1.

Quadro 1 - Grupos e períodos experimentais

Grupo (n=63)	Material aplicado sobre o defeito	Eutanásia
Controle	Solução Salina	7, 14, 28 dias
Curcumin	Curcumin nanoparticulado (0,05mg/ml)	7, 14, 28 dias
Veículo	Nanopartícula Vazia	7, 14, 28 dias

Fonte: Elaboração própria.

Figura 1 – Desenho experimental do estudo

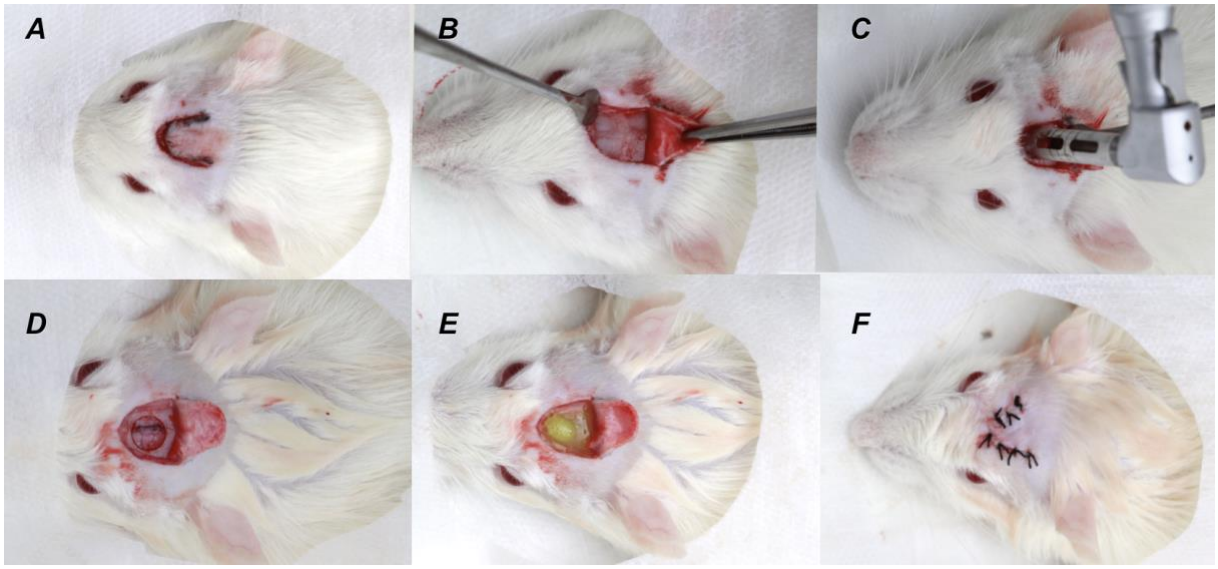


Fonte: Elaboração própria.

Para as intervenções cirúrgicas os animais foram previamente anestesiados e receberam analgésico (dipirona sódica - solução injetável 1mL para 1kg de peso via intramuscular). Após antissepsia com clorexidina 2%, foi feita uma incisão de 3cm no sentido ântero-posterior na região central da calota. Os tecidos moles foram divulsionados para exposição e incisão do periósteo. Após exposição da superfície óssea, um defeito esférico de 5mm de diâmetro foi criado na região central do osso frontal, utilizando-se uma broca trefina (Broca Trephine 5mm MK Dent) adaptada no contra-ângulo de um micromotor com 20.000 rpm. Todo procedimento foi feito sob irrigação constante com soro fisiológico estéril.

O defeito foi preenchido de acordo com os grupos experimentais: grupo **controle** (solução salina); Grupo curcumin curcumin nanoparticulado, 0,05mg/mL); **veículo** (nanopartícula "vazia"). Todos os compostos foram aplicados topicamente sobre os defeitos ósseos com o auxílio de uma micropipeta, no volume de 200µl. Na sequência, os tecidos foram suturados. A sequência dos procedimentos cirúrgicos estão apresentados na figura 2.

Figura 2 – Figura demonstrativa das etapas cirúrgicas realizadas



A – Incisão em forma de U em duas etapas. **B** – Divulsão do tecido mole e periósteo. **C** – Confecção do defeito com trefina. **D** – Defeito ósseo crítico de dimensões padronizadas realizado. **E** – Preenchimento com composto. **F** – Sutura em dois planos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Após a cirurgia os animais receberam novamente a administração de analgésico diariamente, durante os três dias subsequentes, 1x/dia via oral. Antibiótico, composto pela associação de benzilpenicilina benzatina, procaína e potássica também foi administrado através de injeção intramuscular logo após o término do procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos à eutanásia 7, 14 e 28 dias após o procedimento cirúrgico (n=7 animais em cada período experimental). Após a eutanásia, toda a porção superior da calota dos animais, foi removida e fixada em paraformoldeído 4% durante 24h horas, transferido para etanol 70% e armazenado à 4 C. Estas amostras foram utilizadas na avaliação do volume ósseo por microtomografia computadorizada e posteriormente nas análises histológicas e imuno-histoquímicas.

Avaliação do reparo ósseo por microtomografia computadorizada

As calvárias contendo o defeito ósseo cirurgicamente confeccionado foram escaneadas em microtomógrafo computadorizado do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP (Skyscan 117, SkyScan, Aartselaar, Belgium) com os

seguintes parâmetros: Pixel da câmera: 12.45; potencial do raio-x: 65 kVP, intensidade: 385 μA, filtro: Al-1 mm, e tamanho do voxel: 18 μm. As imagens geradas foram reconstruídas, espacialmente reorientadas, e analisadas usando o software (NRecon/DataViewer/CTan, Skyscan, Aartselaar, Belgium). Uma região circular para análise do volume ósseo de interesse (VOI), contendo o mesmo diâmetro do defeito ósseo, foi construído e posicionado sobre as margens do defeito, e a porcentagem de volume ósseo situada dentro do VOI determinada usando uma escala de cinza (*threshold*) de 55–255 (figura 3). A região de interesse selecionada foi a mesma em todos os animais. Todas as análises foram realizadas por um examinador treinado, e cego para os grupos experimentais.

Figura 3 – Imagem ilustrativas da análise de microtomografia óssea

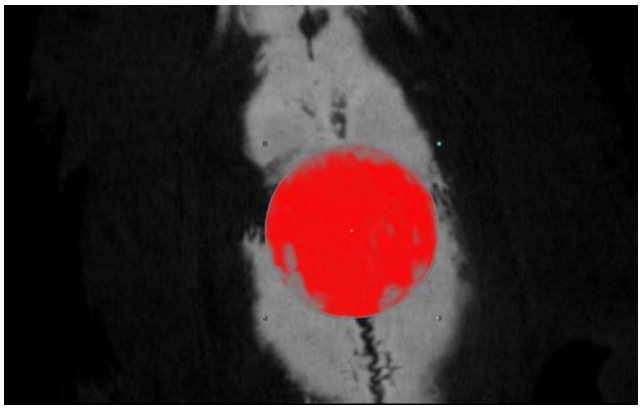


Imagem circular posicionada sobre as margens do defeito ósseo para determinar a porcentagem de volume ósseo através da microtomografia computadorizada.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Processamento histopatológico e obtenção das amostras

Após o escaneamento em microtomógrafo as peças foram descalcificadas em solução de EDTA 10%, pH 7.2 por 6 a 8 semanas para posterior preparo e inclusão em parafina. Para as análises histológicas e imuno-histoquímicas foram obtidos cortes seriados de 4 μm, montados em lâminas silanizadas e corados com Hematoxilina e Eosina (H/E) para análise histológica descritiva e análise histomorfométrica, Tricrômico de Masson para análise de quantificação de colágeno , ou destinados à imuno-histoquímica.

Análise Histopatológica Descritiva

Utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Alemanha) em um aumento de 10x, as imagens foram capturadas e transferidas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony EletronicsInc, Japão). As características histológicas dos defeitos (organização do tecido de granulação, neovascularização, presença de infiltrado inflamatório e reparo do tecido ósseo) foram avaliados através da análise histopatológica descritiva, por um examinador cego para os grupos experimentais.

Imuno-Histoquímica

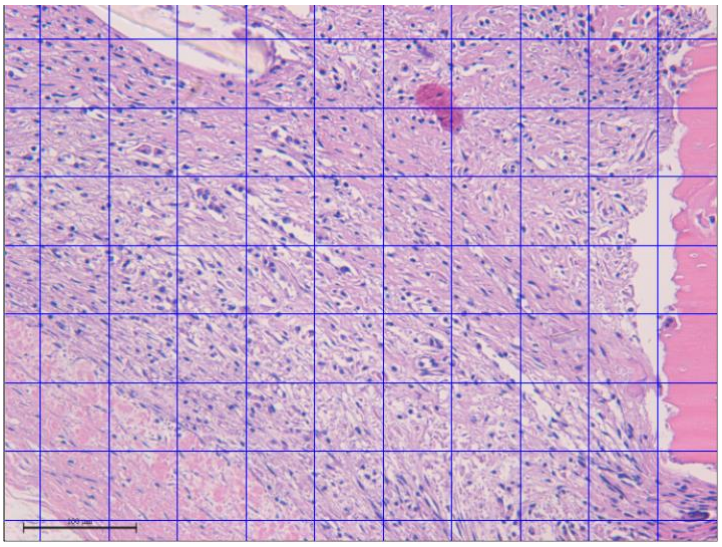
Para detectarmos a expressão e localização dos marcadores do *turnover* tecidual (PCNA, RANKL, OPG e Runx2) nas extremidades dos defeitos, os cortes histológicos foram montados em lâminas silanizadas e submetidos a reação de imuno-histoquímica utilizando anticorpos primários específicos e kit de visualização Dako Envision™ FLEX, High pH (Link) – (#K800021-2). As etapas da reação foram padronizadas para cada um dos anticorpos primários a serem avaliados. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, rehidratados e posteriormente incubados por 15 minutos com solução de peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram submetidos à etapa de recuperação antigênica com citrato de sódio durante 10 minutos e deixados sobre a bancada para resfriamento por mais 10 minutos (anti-RANKL, anti-OPG e anti-Runx2), ou incubados com a solução do kit (Target retrieval solution high pH) em panela de pressão (anti-PCNA). Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos primários (anti-RANK-L (sc-52950, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), anti-Runx2 (sc-8566, 1:200) anti-OPG (ab73400, 1:200,), ou anti-PCNA (ab29-Abcam 1:6000) e deixados por 18 h (‘overnight’) a 4º C em um compartimento umidificado. Em seguida os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Dako EnVision™ FLEX /HRP detection reagente), fornecido pelo kit. Cortes incubados com PBS foram usados como controle negativo (omissão do anticorpo primário). Todos os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carrazi e montados com Permount. Fotomicrografias em aumento de 400x foram obtidas usando um microscópio (LEICA microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) acoplado a uma câmera digital. Parâmetros de captura da imagem (brilho, contraste, tempo de exposição) foram padronizados e mantidos

em cada imagem (exposure – 62,0 ms, gain – 3,8x, saturation – 1,35 e gamma – 0,6). Foram analisados 4 cortes por animal, de pelo menos 4 animais por grupo. Os resultados foram analisados de por examinador calibrado e sem conhecimento dos grupos experimentais, através do software Image J e plugin IHC Profile, de acordo com Nguyen et al[53]. Esta análise é baseada na determinação da intensidade da marcação e quantidade de células marcadas. Os resultados foram usados para determinar um H-score para cada corte, e então combinados dentro de cada grupo experimental.

Estereometria

A técnica estereológica de contagem de pontos foi empregada em cortes corados com H&E para avaliar a proporção (ou densidade relativa) de células (sem distinção de tipo celular) e vasos sanguíneos. Após a captura das imagens, em um aumento de 20x, a quantificação foi realizada com a sobreposição de grades nas imagens digitalizadas das secções histológicas preenchendo as extremidades dos defeitos. Para cada grade, foram contados 80 pontos coincidentes nas estruturas histológicas. Em seguida, foi realizada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental, para a representação gráfica da estereometria. Cortes histológico de pelo menos 3 animais por grupo foram avaliados por um examinador cego para os grupos experimentais.

Figura 4 – Imagem ilustrativa da análise estereométrica



Posicionamento da grade sobre a região de interesse na imagem histológica. Os limites anatômicos utilizados para padronizar a posição da grade foram o início do defeito (limite lateral), e a porção mais apical do tecido de granulação (limite superior).

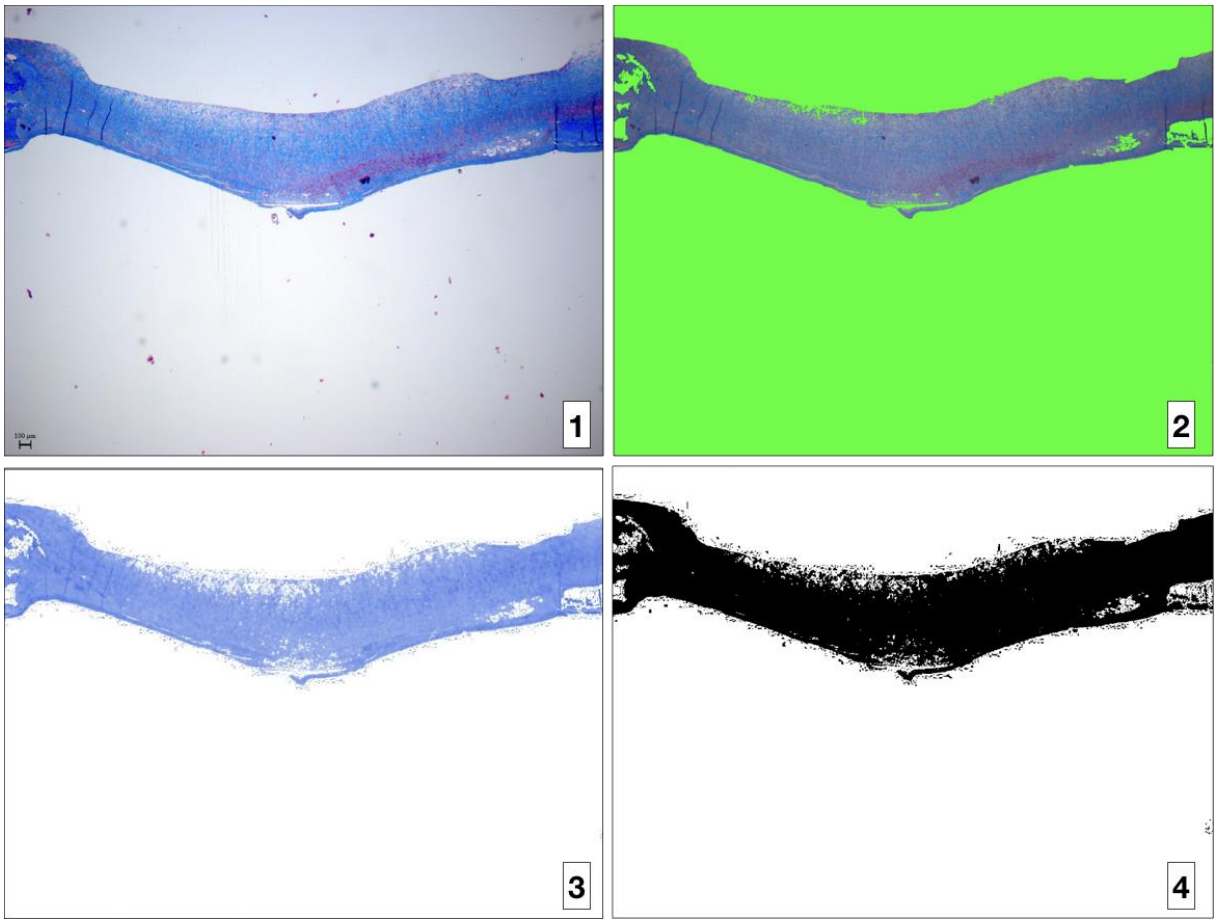
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Quantificação de Colágeno

Para realizar a quantificação de colágeno, lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson, e com o uso de um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Wetzlar, Alemanha) em um aumento de 25x. As imagens foram capturadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC-1107A/107AP (Sony EletronicsInc, Japão). O conteúdo colágeno foi analisado em toda a área entre as extremidades do defeito. Com o auxílio do software Photofiltre, essa região foi delimitada e excluída qualquer estrutura que não correspondia a fibra colágenas e matriz extracelular (figura 5(2)).

Em seguida, com auxílio do software ImageJ e utilizando o plugin "Colour Devolution" foi realizada a decomposição dos vetores de cor da imagem e isolado somente as fibras colágenas presentes (em azul) no tecido (figura 5(3)). Para o cálculo dos pixels de colágeno total foi usado o *threshold* de 0-200 (figura 5(4)). Após a aplicação do *threshold*, a quantificação precisa dos pixels foi realizada com o auxílio da ferramenta "analyze particles", e o valor obtido em porcentagem.

Figura 5 – Imagens ilustrativas da análise de quantificação de colágeno.



Em **1,** a imagem original do defeito corada com Tricrômico de Masson em um aumento de 25x. Em **2**, substituição de tecido ósseo, artefatos e lúmen de vasos pela cor verde, utilizando o software Photofiltre. Em **3**, imagem isolando apenas a cor azul através do software Image J, plugin Colour devolution. Em **4**, ajuste do *threshold* para quantificação em pixels do conteúdo de colágeno.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

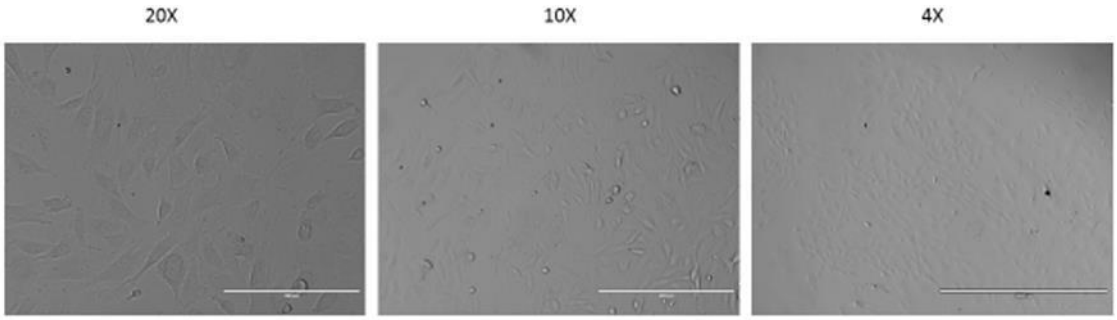
Estudo in vitro

Obtenção, cultivo e diferenciação osteogênica das BMSCs tratadas ou não com curcumin nanoparticulado:

BMSCs foram obtidas da medula óssea de ratos da espécie *Wistar*. Ratos com idade entre 3-4 semanas, pesando entre 100g e 110g foram eutanasiados através de aprofundamento anestésico com ketamina e xilasina (2:1). Cada fêmur foi dissecado e mantido em PBS (1X), posteriormente levados ao álcool 70% durante 1 minuto e finalmente deixados em meio α-MEM puro. Para a coleta das células, as epífises foram removidas com auxílio de tesouras, a

porção medular enxaguada com meio α-MEM puro e seu conteúdo coletado em tudo plástico de 50 ml, e submetidas a separação celular através do uso de filtros estéreis de nylon (cell strainer). As células coletadas foram lavadas (centrifugação a 350g / 5 min /4ºC) em PBS (1X) e ressuspendidas em α-MEM completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina) para realização dos experimentos iniciais. Abaixo demonstramos a morfologia celular 7 dias após obtenção das BMSCs (figura 6), em aumento de 4x, 10x e 20x. Nas imagens é possível observar as características fenotípicas das células tronco mesenquimais: capacidade de aderência ao plástico e morfologia semelhante a fibroblastos, com capacidade de formar colônias a partir de uma única célula. Estas células foram mantidas por 12 a 16 dias, com expansão das mesmas para outras placas, até que as células hematopoiéticas não-aderentes fossem eliminadas. Em todos os experimentos foram utilizadas células entre a 3º e a 5º passagem.

Figura 6 – Imagem da cultura de BMSC.



As imagens representam a morfologia das células plaqueadas em meio de cultura α-MEM com 10% de FBS e P/S, 7 dias após descongelamento. Imagens obtidas em microscópio digital invertido com magnificação de 20X, 10X e 4X em campo claro.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As concentrações de curcumin nanoparticulado utilizada nos experimentos in vitro foram: 0,1µg/mL, 0,05µg/ml, 0,025µg/ml. Os grupos experimentais foram:

Quadro 2 - Grupos experimentais in vitro

Grupo	Tratamento
Controle	Células não tratadas
veículo	Nanopartícula vazia
curc-nano I	Curcumin nanoparticulado (0,1 µg /ml)
curc-nano II	Curcumin nanoparticulado (0,05 µg /ml)
curc-nano III	Curcumin nanoparticulado (0,025 µg /ml)

Fonte: Elaboração própria.

Viabilidade celular

O efeito do curcumin nanoparticulado sobre a viabilidade celular foi determinado usando um kit comercial (Cell Titer 96 Aqueous; Promega Corp.) de acordo com as instruções do fabricante. Este kit avalia a viabilidade celular através da redução do componente tetrazolium em formazan por enzimas desidrogenases presentes em células metabolicamente ativas. 1 x 10^5 células foram plaqueadas em cada poço de placas de cultura de 96 poços. Após um período de 6 horas, para permitir adesão celular à placa, as células foram lavadas uma vez com PBS e então desinduzidas com meio de cultura com concentração reduzida de FBS (0,3%). Curcumin foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações experimentais (0,1µg/mL, 0,05µg/ml, 0,025µg/ml) para um experimento dose-resposta e as células incubadas por 1, 7 e 10 dias. 20 µl do reagente contendo o sal de tetrazolium (MTS) foi adicionado a cada poço, incubado por 1 e 2 horas e os resultados obtidos através da medição da absorbância a 490 nm em um leitor de microplacas (Spectramax L, Molecular Devices). O número de células viáveis nos poços tratados com curcumin nanoparticulado foi estimado em relação ao controle (não tratado) e ao veículo (nanopartícula vazia).

Os experimentos descritos a seguir foram delineados com objetivo primário de determinar os efeitos do curcumin nanoparticulado sobre a diferenciação osteogênica de BMSCs através da avaliação da atividade da fosfatase alcalina e indução de mineralização.

Atividade de Fosfatase Alcalina

Tendo em vista que os níveis de ALP são considerados marcadores da fase inicial da diferenciação osteoblástica, nós avaliamos o efeito dose-resposta do curcumin sobre a produção desta enzima pelas BMSCs. Para esta análise $1x10_4$ células/poço foram cultivadas em placa de 96 poços em meio osteogênico contendo (α-MEM + 20 uM de ácido ascórbico, 10mM de ß-glicerolfosfato, 10 uM dexametasona+ 10% FBS +P/S). Para avaliarmos o efeito do curcumin nanoparticulado sobre a produção de ALP na ausência do meio osteogênico (meio padrão), as células também foram cultivadas em meio α-MEM completo (contendo apenas 10% FBS e P/S). Após 24h as células foram tratadas com curcumin nanoparticulado (0.1µg/mL, 0.05µg/ml, 0.025µg/ml) ou veículo (em um volume correspodente ao maior volume utilizado no tratamento com curcumin), e novamente adicionados a um novo meio de cultura a cada 48 horas. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Ao final dos períodos experimentais (7 e 10 dias), as células foram coletadas e preparadas com tampão de lise (Cell Lysis Buffer, cat. 9803, Cell Signaling Tech., Inc.) suplementado com inibidores de protease (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, livre de EDTA, sc- 29131, Santa Cruz Biotech Inc., EUA) para extração da proteína total. Após a quantificação usando o método de Bradford (Quick Start Bradford protein 1x dye reagent, cat. 500-0205, Bio-Rad Lab. Inc., EUA), as proteínas foram utilizadas para determinação dos níveis de ALP utilizando o kit comercial da Labtest (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante, e a quantificação obtida através da leitura da absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 590nm. Os valores obtidos para cada amostra foram normalizados pela quantidade de proteína total.

Vermelho de Alizarina

A coloração com vermelho de alizarina foi realizada para determinar o potencial do curcumin nanoparticulado em induzir a presença de matriz mineralizada. As BMSCs foram cultivadas na densidade de 5 $x10_3$ céls/poço, em uma placa de 24 poços e tratadas com diferentes concentrações de curcumin nanoparticulado. No 14º as células foram lavadas com PBS (1X) e posteriormente fixadas em paraformol 4% por 1 hora a 4ºC. Após 2 lavagens com PBS as células foram coradas com vermelho de alizarina 2% (pH 4.2) a temperatura ambiente por 10 minutos para identificação de depósitos de cálcio em áreas de matriz mineralizada. Para a quantificação da produção de matriz mineral as células foram lavadas abundantemente com água destilada e posteriormente diluídas em cloreto de acetilpiridíneo (10% em PBS 1%) durante 5 minuto, e transferidas para uma

nova placa de 96 poços para leitura no espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 550nm.

Análise dos resultados

Após a tabulação dos dados, foi avaliada a distribuição normal ou não-normal e as avaliações tiveram ênfase na comparação dos resultados entre os grupos experimentais (controle, curcumin (NP)). As amostras de cada grupo experimental foram consideradas como independentes. Assim, as comparações foram feitas 2 a 2, utilizando métodos paramétricos (teste t para amostras independentes) ou não-paramétricos (ANOVA) segundo a distribuição dos dados. O nível de significância adotado foi de 95% (p=0.05).

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA)

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

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CURCUMINA VEICULADA EM NANOPARTÍCULAS SOBRE DEFEITO ÓSSEO EM CALVÁRIA DE RATOS"***, registrada com o nº 40/2017, sob a responsabilidade do(a) **Dr(a). Morgana Rodrigues Guimarães Stabili** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 23/02/2018.

Finalidade	( ) Ensino (**X**) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato – Wistar
Nº de animais	63
Peso/Idade	250-300g – 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNESP – Câmpus de Botucatu

Carina A. F. Andrade

Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 – Centro – CEP 14801-903 – Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA – SP
5º andar – fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@foar.unesp.br - home page: http://www.foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da defesa.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 20 de março de 2020.

Amanda Favoreto Silva