

Renato de Melo Mendes

**Efeitos dos Nanotubos de Carbono Funcionalizados com
Hialuronato de Sódio em Reparos Ósseos, na Deposição
de Cristais Inorgânicos no Titânio e no Comportamento
de Osteoblastos**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2010

Renato de Melo Mendes

Efeitos dos Nanotubos de Carbono Funcionalizados com Hialuronato de Sódio em Reparos Ósseos, na Deposição de Cristais Inorgânicos no Titânio e no Comportamento de Osteoblastos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

2010



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Renato de Melo Mendes

88/2010/09

entrada

1º/2007

2006651816

Às **quartoze horas** do dia **19 de novembro de 2010** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Efeitos dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio em reparos ósseos, na deposição de cristais inorgânicos no titânio e no comportamento de osteoblastos”** requisito final para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dr. Anderson José Ferreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADO
Dra. Cristiane Batista Bezerra Torres	UFPI	Aprovado
Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira	PUC/MG	Aprovado
Dra. Cláudia Rocha Carvalho	UFMG	Aprovado
Dra. Tarcília Aparecida da Silva	UFMG	aprovado.
Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente o(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de novembro de 2010.**

Dr. Anderson José Ferreira _____
(Orientador)

Dra. Cristiane Batista Bezerra Torres _____

Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira _____

Dra. Cláudia Rocha Carvalho _____

Dra. Tarcília Aparecida da Silva _____

Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva _____

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof.ª Denise Carmona Cara Machado
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular, ICB/UFMG

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral do ICB - UFMG;
- Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas - UFMG.

Contou com apoio financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Aos meus pais José Raimundo Mendes e
Magda Maria de Mello Mendes e aos meus
orientadores Anderson José Ferreira e
Gerluza Aparecida Borges Silva.

“Se algum dia alguém te perguntar o que
você tem, diga-lhe quem você é”

TER ou SER

Renato de Melo Mendes

AGRADECIMENTOS

A Deus, quando tudo parece não funcionar, vislumbra-se um novo caminho.

Aos meus pais José Raimundo Mendes e Magda Maria de Mello Mendes pelo incentivo e apoio eternos.

Ao Prof. Anderson José Ferreira, sua objetividade transforma desafios complexos em “tarefas simples”.

À Profa. Gerluza Aparecida Borges Silva, o prazer em fazer bem feito, com amor.

Ao Prof. Luiz Orlando Ladeira, fonte de novas idéias, o mais otimista.

À Edelma Eleto Silva pelo auxílio com a funcionalização dos nanotubos.

Ao Prof. Marcelo Vidigal Caliari, por possibilitar as análises morfométricas.

À Ana Maria Silva Penna e ao Garcia pelas imagens e ensinamentos em microscopia eletrônica e microanálise.

À Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda e Heloísa Colleta por me auxiliarem no desenvolvimento da cultura celular.

Aos amigos da Tratar Odontologia (Daniel, Fabrício, Juliana, Mirelle e Paola) pelo apoio à minha formação profissional.

Aos amigos do curso de pós-graduação em Biologia Celular e, em especial, ao Francisco de Assis e demais amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, pelo companheirismo demonstrado nesses anos.

Ao Marcos Augusto de Sá e à Vanessa Barbosa Andrade pelo auxílio com os experimentos e por darem continuidade à linha de pesquisa.

À Sibeles Abreu, pelo seu apoio e compreensão a todos os alunos do programa de pós-graduação em Biologia Celular.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, o apoio financeiro destas instituições torna possível o desenvolvimento tecnológico brasileiro.

RESUMO

O hialuronato de sódio (HY) acelera o reparo de defeitos ósseos maxilares. Entretanto, sua baixa estabilidade física tem dificultado sua ampla utilização em reconstruções teciduais ósseas. Por outro lado, a funcionalização de nanotubos de carbono (NTC) com HY (NTC-HY) resulta em um hidrogel com melhores propriedades mecânicas e reológicas quando comparado com o HY sozinho. Assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* os efeitos dos NTC e NTC-HY na cicatrização de alvéolos dentários de ratos após exodontia dos primeiros molares superiores e, *in vitro*, na deposição de cristais inorgânicos no titânio e no comportamento de osteoblastos. Ratos Wistar machos foram submetidos à exodontia dos primeiros molares superiores e os alvéolos foram tratados com NTC, HY, NTC-HY ou carbopol (veículo). Análises histomorfométricas foram realizadas, aos sete dias de cicatrização, para avaliar a formação de osso trabecular e o número de núcleos celulares. A expressão dos colágenos tipos I e III foi avaliada por imunohistoquímica. Pastilhas de titânio tratadas com NTC, HY, NTC-HY ou carbopol foram imersas em uma solução aquosa subsaturada contendo CaCl_2 e Na_2HPO_4 por 14 e 28 dias. A deposição de cristais sobre as pastilhas foi analisada através da MEV. Além disso, osteoblastos foram plaqueados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY, ou cultivados diretamente em placas de cultura contendo meio DMEN acrescido de NTC ou NTC-HY. Foram realizadas análises de viabilidade celular por MTT e atividade da fosfatase alcalina. Alvéolos tratados com NTC apresentaram percentual de trabéculas ósseas e número de núcleos celulares semelhantes aos alvéolos controle. Por outro lado, tanto o HY como os NTC-HY induziram um aumento similar e significativo na formação óssea, e diminuíram a quantidade de

núcleos celulares. Além disso, observou-se uma maior expressão de colágeno tipo I nos alvéolos tratados com HY 1% ou com NTC-HY (100µg/mL). Nenhuma diferença significativa na expressão de colágeno tipo III foi observada entre os grupos. Os experimentos *in vitro* demonstraram que as pastilhas de titânio cobertas com NTC-HY (100µg/mL) apresentaram maior deposição de íons cálcio, sódio e fósforo. Concentrações mais altas de NTC e NTC-HY (100-400µg/mL) induziram morte celular em osteoblastos enquanto concentrações mais baixas (3,125-50µg/mL) acarretaram apenas em uma discreta diminuição na viabilidade celular e na atividade da fosfatase alcalina. Desta forma, os resultados *in vivo* indicam que os NTC-HY aceleram a cicatrização de forma semelhante ao HY quando utilizados em terapias de reparo ósseo. Além disso, os NTC-HY induziram, *in vitro*, uma maior deposição de cristais em pastilhas de titânio, sugerindo que este biomaterial poderia ser usado com um agente coadjuvante no reparo ósseo periimplantar.

Palavras chave: Hialuronato de sódio, Nanotubos de carbono, Cicatrização, Implantes, Osteoblastos.

ABSTRACT

The sodium hyaluronate (HY) accelerates the repair of bone defects. However, the weak stability of HY has hindered its wide use in bone tissue reconstructions. Moreover, the functionalization of carbon nanotubes (CNT) with HY (HY-CNT) produces a reinforced hydrogel with improved mechanical and rheological properties when compared with HY alone. Thus, the main aim of this study was to evaluate *in vivo* the effects of CNT and HY-CNT in the healing process of tooth sockets of rats after extraction of upper first molars and, *in vitro*, on deposition of inorganic crystals on the titanium surface and in the behavior of osteoblasts in culture. Wistar male rats were subjected to the extraction of upper first molars and the sockets were treated with CNT, HY, HY-CNT or carbopol (vehicle). Histomorphometric analyses were performed, seven days after the surgeries, to assess the trabecular bone formation and the number of cell nuclei. The expression of collagen types I and III was assessed by immunohistochemistry. Titanium discs treated with CNT, HY, HY-CNT or carbopol were immersed in an aqueous unsaturated solution containing CaCl_2 and Na_2HPO_4 during 14 and 28 days. The deposition of crystals over the titanium discs was analyzed utilizing SEM. Moreover, osteoblasts were plated on titanium discs treated with CNT or HY-CNT or plated directly on culture plates containing DMEM medium supplemented with CNT or HY-CNT. Analyses of alkaline phosphatase activity and cell viability were performed. Treatment with CNT did not alter the bone deposition as well as the counting of cell nuclei. On the other hand, both CNT and HY-CNT induced a similar and significant increase in bone formation and decreased the amount of cell nuclei. Moreover, the expression of type I collagen in sockets treated with 1% HY or HY-CNT (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was increased. No significant changes

in the expression of type III collagen was observed among any of the groups. The *in vitro* experiments revealed that titanium discs coated with 100µg/mL HY-CNT showed a higher deposition of calcium, sodium and phosphorus ions. CNT and HY-CNT at higher concentrations (100-400µg/mL) induced death of osteoblasts, while lower concentrations (CNT and HY-CNT: 3.125-50µg/mL) resulted only in a slight decrease in activity of the alkaline phosphatase and cell viability. Altogether, these findings indicate that, like HY, HY-CNT accelerated the healing process when used in therapies for bone repair. In addition, HY-CNT induced a greater deposition of crystals in titanium discs, suggesting that this biomaterial could be used as an adjuvant agent in the bone repair in dental implants.

Keywords: Sodium hyaluronate, Carbon Nanotubes, Healing, Implants, Osteoblasts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da hialuronana contendo repetidas unidades dissacarídicas de <i>N</i> -acetilglicosamina e ácido <i>D</i> -glucorônico	29
Figura 2	Representação esquemática de (A) NTC de paredes simples e (B) NTC de paredes múltiplas	32
Figura 3	Divisão anatômica do alvéolo em terços apical, médio e cervical	44
Figura 4	Micrografia eletrônica de transmissão dos NTCPS	54
Figura 5	Espectroscopia de Raman dos NTCPS-COOH e NTCPS-HY	55
Figura 6	Espectroscopia FTIR dos NTCPS, HY e NTC-HY	56
Figura 7	Fotomicrografias representativas de secções histológicas de alvéolos 7 dias após as exodontias	58
Figura 8	Análise histológica dos alvéolos 7 dias após as exodontias	59
Figura 9	Análise histológica dos alvéolos 7 dias após as exodontias	60
Figura 10	Efeitos dos NTC na cicatrização de alvéolos dentários de ratos sete dias após as exodontias	62
Figura 11	Efeitos dos NTC-HY na cicatrização de alvéolos dentários de ratos sete dias após as exodontias	63
Figura 12	Efeitos dos NTC-HY e do HY na cicatrização de alvéolos dentários de ratos sete dias após as exodontias	64
Figura 13	Fotomicrografias representativas da imunomarcção do colágeno tipo I sete dias após as exodontias	66
Figura 14	Fotomicrografias representativas da imunomarcção do colágeno tipo III sete dias após as exodontias	67
Figura 15	Análise com auxílio de MEV (elétrons secundários) da deposição de cristais inorgânicos nas pastilhas de titânio após 14 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4	70

Figura 16	Análise com auxílio de MEV (elétrons secundários) da deposição de cristais inorgânicos nas pastilhas de titânio após 28 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4	71
Figura 17	Análise em MEV por meio de elétrons retro-espalhados após 14 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4	72
Figura 18	Análise em MEV por meio de elétrons retro-espalhados após 28 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4	73
Figura 19	Espectros representativos obtidos por meio de energia dispersiva de raios-X após análise das partículas presentes sobre as pastilhas imersas em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 por 14 dias	75
Figura 20	Espectros representativos obtidos por meio de energia dispersiva de raios-X após análise das partículas presentes sobre as pastilhas imersas em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 por 28 dias	76
Figura 21	Fotomicrografias representativas de cultura de osteoblastos isolados	78
Figura 22	Fotomicrografias representativas da análise por MTT de cultura de osteoblastos isolados	79
Figura 23	Fotomicrografias representativas da atividade da fosfatase alcalina em cultura de osteoblastos isolados	80

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 1	Grupos experimentais para tratamentos dos alvéolos após as exodontias	42
Quadro 2	Cálculo do percentual de trabéculas ósseas presentes nos terços apical e médio dos alvéolos	44
Tabela 1	Percentual de trabéculas ósseas e quantidade de núcleos celulares nos terços apical e médio	65
Tabela 2	Intensidade de imunomarcacão dos colágenos tipos I e III, sete dias após as exodontias	68

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina
BMP-2	Proteína morfogenética do osso tipo 2
BMPs	Proteínas morfogenéticas do osso
BSA	Albumina do soro bovino
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAB	Diaminobenzidina
DP	Doença periodontal
EDS	Análise de energia dispersiva de raios-X
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FN	Fibronectina
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho
GAGs	Glicosaminoglicanas
HA	Hialuronana
HY	Hialuronato de sódio (ácido hialurônico)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LP	Ligamento periodontal
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NBT	Nitroblue tetrazolio clorídrico
NTC	Nanotubos de carbono
NTC-HY	NTC funcionalizados com hialuronato de sódio
NTCPM	NTC de paredes múltiplas
NTCPS	NTC de paredes simples
NTCPS-COOH	NTCPS carboxilados
OCC	Osteocalcina
ONC	Osteonectina
OPN	Osteopontina
PBS	Solução tampão fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RBM	Modo de respiração radial
RHAMM	Receptores para mobilidade mediada por HA
SDS	Duodecil sulfato de sódio
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADRO E TABELA	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
I. INTRODUÇÃO	19
1. Biologia do reparo alveolar	21
2. Indicadores do reparo ósseo alveolar	24
3. Hialuronana	27
4. Nanotubos de carbono	31
5. Implantes dentários	34
II. OBJETIVOS	36
1. Objetivo geral	37
2. Objetivos específicos	37
III. METODOLOGIA	39
1. Síntese de nanotubos de carbono	40
2. Caracterização dos nanotubos de carbono	40
3. Hialuronato de sódio	41
4. Funcionalização de nanotubos de carbono com hialuronato de sódio	41
5. Animais	42
6. Procedimentos cirúrgicos de exodontia	42
7. Análises histológica e morfométrica	43
8. Análise da expressão dos colágenos tipos I e III	45
9. Preparo de pastilhas de titânio para uso em ensaios de indução de deposição de cristais inorgânicos no titânio	46
10. Análise de indução de deposição de cristais inorgânicos em pastilhas de titânio	46
11. Extração de osteoblastos	47

12.	Análise do comportamento de osteoblastos cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC e NTC-HY e sobre placas de cultura com meio DMEN contendo NTC e NTC-HY.....	48
13.	Análise estatística	50
IV.	RESULTADOS	51
1.	Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono	52
2.	Análise histológica	56
3.	Análise morfológica	61
4.	Análise da expressão dos colágenos tipos I e III	65
5.	Análise de indução de deposição de cristais inorgânicos em pastilhas de titânio	69
5.1	Análise morfológica por meio de elétrons secundários	69
5.2	Análise em MEV por meio de elétrons retro-espalhados	72
5.3	Análise da composição química das partículas por meio de energia dispersiva de raios-X	74
6.	Análise do comportamento de osteoblastos cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC e NTC-HY e sobre placas de cultura com meio DMEN contendo NTC e NTC-HY	77
V.	DISCUSSÃO	81
VI.	CONCLUSÕES	88
VII.	REFERÊNCIAS	91
VIII.	PERSPECTIVAS	102
IX.	ANEXOS	104
1.	Certificado aprovação CETEA	105
2.	Certificado aprovação CETEA	106
3.	Produções	107

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A perda precoce dos dentes, em decorrência de cáries e doença periodontal, acomete um percentual significativo da população brasileira. Medidas preventivas adotadas pelo Sistema Único de Saúde, como a fluoretação da água e maior acesso da população a campanhas de prevenção, têm propiciado a redução da prevalência de cáries na população, atestando que a prevenção é o caminho mais eficaz e financeiramente viável para a promoção da saúde bucal. Entretanto, a melhoria dos índices de saúde bucal trouxe um novo desafio, pois ao mesmo tempo em que se aumenta a longevidade dos dentes, cresce a prevalência de doença periodontal (DP) na população adulta (Meneghim *et al.*, 2002; Ministério da Saúde, 2005). A evolução do processo inflamatório observada na DP afeta os tecidos de suporte do dente podendo acarretar em reabsorção óssea do processo alveolar e perda do elemento dentário (Lindhe, 1999; Bodic *et al.*, 2005).

A reconstrução óssea é, muitas vezes, pré-requisito essencial à reabilitação funcional do sistema estomatognático com implantes osseointegrados, especialmente na correção de perdas dentárias traumáticas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula (Wiltfang *et al.*, 2004). A recuperação da estrutura óssea perdida pode demandar a realização de cirurgias de enxerto ósseo ou inserção de biomateriais (Arosarena & Collins, 2005; Izuka *et al.*, 2005), processos lentos e onerosos para os pacientes. Diminuir o tempo de cicatrização alveolar e/ou a maturação de enxertos ósseos poderia auxiliar no restabelecimento da função mastigatória de forma mais confortável e menos dispendiosa para os pacientes. Neste aspecto, o desenvolvimento de matrizes para suporte estrutural e direcionamento da proliferação celular tem sido

de bastante interesse tanto em medicina quanto em engenharia para reconstrução tecidual óssea (Abarategi *et al.* 2008; Bhattacharyya *et al.* 2008; Sitharaman *et al.* 2008; Silva *et al.* 2009; Tutak *et al.* 2009). A matriz ideal deve possuir boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade, biopermeabilidade, estrutura tridimensional e promover crescimento tecidual ósseo controlado (Chłopek *et al.*, 2006; Sitharaman *et al.*, 2008).

A despeito dos avanços obtidos nas terapias de regeneração óssea guiada, muito ainda precisa ser compreendido sobre a interação de biomoléculas envolvidas na cicatrização óssea, e sobre o melhor método de administração destes fatores (Arosarena & Collins, 2005). Uma vez que a busca por um material ideal para enxertia óssea permanece como um grande desafio (Wong & Rabie, 2005), a pesquisa por biomateriais que auxiliam na manutenção da estrutura óssea imediatamente após exodontias, ou na reconstrução da estrutura óssea perdida é de fundamental importância.

1. Biologia do reparo alveolar

O processo de cicatrização óssea pode ser dividido em fases sequenciais de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas, resultando em síntese de matriz extracelular (MEC), mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea (Sasaki & Watanabe, 1995; Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Lalani *et al.*, 2005). O reparo tecidual observado após a extração de um dente inicia-se com a hemostasia, responsável por bloquear a perda de sangue através de vasos rompidos. A formação da rede de fibrina auxilia inicialmente o influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, característicos da resposta inflamatória aguda (Siqueira Jr. & Dantas, 2000;

Yugoshi *et al.*, 2002). Fibroblastos e células osteoprogenitoras oriundas do ligamento periodontal (LP) (Devlin & Sloan, 2002; Yugoshi *et al.*, 2002), da medula óssea (Shyng *et al.*, 1999; Devlin & Sloan, 2002) e do perióstio (Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Rasubala *et al.*, 2004) são essenciais para a remodelação e formação óssea inicial em processos de cicatrização alveolar (Lekic *et al.*, 1997).

Macrófagos e fibroblastos imaturos parecem ser atraídos para áreas com baixa concentração de oxigênio e altos níveis de lactato, observados nas fases iniciais do reparo alveolar, em consequência do metabolismo de células inflamatórias. Macrófagos liberam um fator de crescimento chamado fator angiogênico dependente de macrófago, quimiotático para células endoteliais. Estas secretam o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) que auxilia a angiogênese, essencial nos processos de cicatrização de feridas (Savani *et al.*, 2001; Lalani *et al.*, 2005). Paralelamente, fibroblastos sintetizam uma delicada matriz de colágeno que, junto com os capilares neoformados, caracteriza o tecido de granulação (Yugoshi *et al.*, 2002). As fibras colágenas inicialmente depositadas formam uma trama preliminar na qual ocorre a deposição de osso neoformado (Shyng *et al.*, 1999). Por fim, os eventos de cicatrização alveolar culminam no preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular (Devlin & Sloan, 2002).

Análises histológicas do processo de cicatrização de alvéolos dentários de ratos demonstraram que, dois dias após as exodontias, o alvéolo encontra-se preenchido com coágulo sanguíneo (Kanyama *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008). Aos três dias de cicatrização, macrófagos, capilares neoformados e fibroblastos estão presentes em grande quantidade, sendo estes últimos, claramente visíveis no LP remanescente (Pinto *et al.*, 2001). Observa-se reabsorção do septo ósseo

interradicular por osteoclastos, um passo importante no processo de cicatrização alveolar (Shyng *et al.*, 1999; Kurihashi *et al.*, 2002), e proliferação do epitélio da mucosa oral nas bordas da ferida cirúrgica, com invaginação em direção ao interior do alvéolo (Zied *et al.*, 2005). Após quatro dias de cicatrização, observa-se a migração de células endoteliais e fibroblastos para o tecido de granulação e a presença de osteoclastos e pré-osteoblastos na superfície do osso trabecular adjacente ao alvéolo (Kanyama *et al.*, 2003). Ainda é possível observar a presença de pequenas espículas ósseas após quatro e sete dias de reparo (Boeck *et al.*, 1999). Ao final da primeira semana de cicatrização, o alvéolo encontra-se preenchido com um tecido conjuntivo imaturo, rico em fibroblastos e exibindo pronunciada rede vascular (Pinto *et al.*, 2001; Yugoshi *et al.*, 2002; Kanyama *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008). A deposição de matriz óssea bem como a presença de grande quantidade de células com aspecto morfológico semelhante a osteoblastos concentra-se, aos sete dias, no terço apical do alvéolo (Mendes *et al.*, 2008). O epitélio da mucosa gengival apresenta solução de continuidade com a presença de linfócitos e macrófagos no conjuntivo subjacente (Yugoshi *et al.*, 2002; Kanyama *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008). Entretanto, alguns autores relatam que, nesta fase, o epitélio quase recobre o alvéolo (Pinto *et al.*, 2001) ou o oblitera completamente (Zied *et al.*, 2005). Além disso, observa-se diminuição do infiltrado inflamatório em relação aos períodos iniciais de cicatrização (Kurihashi *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2008). Dez dias após a exodontia, o alvéolo exibe grande quantidade de trabéculas ósseas e, após quatorze dias de cicatrização, apresenta-se quase completamente preenchido por tecido ósseo que sofreu remodelação (Kanyama *et al.*, 2003) e maturação quase idêntica ao tecido ósseo pré-existente (Kurihashi *et al.*, 2002). Entretanto, alguns

autores relatam que o alvéolo encontra-se, neste período, igualmente ocupado por tecido conjuntivo e trabéculas ósseas (Teófilo *et al.*, 2001). Após quinze dias de reparo, observa-se a ferida recoberta com epitélio da mucosa gengival (Boeck *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2001) e cristas ósseas inter e intra radiculares completamente remodeladas (Zied *et al.*, 2005). Ao final da terceira semana de cicatrização, o alvéolo encontra-se preenchido por uma espessa rede de trabéculas ósseas, circundando pequenos espaços medulares (Teófilo *et al.*, 2001; ; Mendes *et al.*, 2008). O preenchimento do alvéolo com trabéculas ósseas bem definidas, vinte e quatro dias após a extração, praticamente define o estágio final do processo de reparo (Zied *et al.*, 2005). Alguns trabalhos relatam que, apesar de o alvéolo estar completamente preenchido por trabéculas ósseas, a densidade óssea alveolar máxima é alcançada, aparentemente, apenas no trigésimo dia pós-operatório (Lamano Carvalho *et al.*, 1997).

2. Indicadores do reparo ósseo alveolar

Fatores de crescimento exercem influência sobre a sinalização celular, portanto, atuam diretamente nos processos de migração, proliferação e diferenciação celular, além de síntese de MEC (Lieberman *et al.*, 2002). Alguns fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e VEGF são expressos de modo temporal durante o reparo ósseo alveolar (Street *et al.*, 2002). O PDGF pode estimular a proliferação de fibroblastos periodontais e sua migração em direção ao coágulo, em estágios iniciais da cicatrização alveolar (Teófilo *et al.*, 2001). O VEGF, por sua vez, induz um aumento da permeabilidade vascular e atua como um potente fator angiogênico *in vivo*, ao estimular a diferenciação e proliferação

de células endoteliais (Bouletreau *et al.*, 2002; Pacicca *et al.*, 2003; Lalani *et al.*, 2005). A vasculogênese ou neoformação vascular possibilita um aumento do influxo de células mesenquimais indiferenciadas (Pacicca *et al.*, 2003; Wong & Rabie, 2005) e de precursores de osteoblastos e osteoclastos para a região de cicatrização, portanto, o VEGF influencia diretamente o reparo ósseo alveolar (Giavaresi *et al.*, 2005).

Além dos fatores de crescimento, a expressão de algumas macromoléculas da MEC como colágeno, fibronectina (FN) e osteopontina (OPN), tem sido referenciada como um aspecto indicativo de reparo ósseo (Siqueira Jr. & Dantas, 2000). Colágenos, de forma geral, são descritos como os principais constituintes da MEC. Os colágenos tipos I e II, expressos na fase de proliferação, são considerados componentes essenciais da matriz óssea (Schultze-Mosgau *et al.*, 2005). Nas fases iniciais de cicatrização, após extração dentária, observa-se um aumento da expressão de colágeno tipo III (Kurita *et al.*, 1985). O colágeno tipo III é produzido transitoriamente durante a neoformação e remodelação do tecido ósseo bucal, desaparecendo com a calcificação da matriz. Portanto, sua expressão é correlacionada a tecidos ósseos recém-formados (Becker *et al.*, 1986; Carter *et al.*, 1991). Uma vez que ocorre a mineralização da matriz, o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I que corresponde a mais de 90% da matriz óssea (Page *et al.*, 1986; Carter *et al.*, 1991; Stoffel *et al.*, 2007). Assim, cada tipo de colágeno apresenta um modelo de distribuição distinto, podendo ser associado a diferentes estágios de diferenciação osteogênica (Becker *et al.*, 1986; Carter *et al.*, 1991). Enfim, o colágeno tipo I, produzido pelos fibroblastos durante os processos de cicatrização, juntamente com outras proteínas como OPN, osteocalcina (OCC), osteonectina (ONC) e FN, compõe a

matriz orgânica do tecido ósseo (Shyng *et al.*, 1999; Siqueira Jr. & Dantas, 2000). Em áreas de reparo alveolar, a formação de fibrilas colágenas é iniciada quando filamentos de colágeno, liberados por osteoblastos, se agregam extracelularmente em fibras estriadas para formar o osteóide. O osteóide orienta a deposição de cristais de hidroxiapatita, responsáveis pela mineralização da matriz e formação de espículas ósseas iniciais (Bouletreau *et al.*, 2002).

Proteínas da matriz não-colagenosas incluem ONC, OCC e OPN (Bouletreau *et al.*, 2002). Após exodontias, células progenitoras presentes no alvéolo, passam por vários estágios de maturação expressando sequencialmente ONC, OPN e OCC (Devlin & Sloan, 2002). Tais proteínas parecem induzir a maturação dos componentes da MEC por meio da mineralização da matriz óssea (Schultze-Mosgau *et al.*, 2005). Paralelamente, a expressão de OPN coincide com a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas durante a formação óssea (Perrien *et al.*, 2002). Sua expressão no processo de cicatrização alveolar em ratos inicia-se aos três dias de cicatrização, com forte evidência após quatro e cinco dias de reparo, o que pode indicar um papel regulatório na mineralização (Shyng *et al.*, 1999; Mendes *et al.*, 2008).

Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são membros da superfamília de TGF- β , altamente conservada entre as espécies. São os mais potentes fatores de crescimento ósseo conhecidos, apresentando propriedades mitogênicas e morfogenéticas (Lieberman *et al.*, 2002; Arosarena & Collins, 2005). Estes efeitos, em fibroblastos e osteoblastos, induzem a síntese de componentes da MEC como colágeno e fibras elásticas, além de outras proteínas da matriz óssea (Schultze-Mosgau *et al.*, 2005). A expressão inicial de proteínas morfogenéticas do osso tipo 2 (BMP-2) estimula a diferenciação de células

mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras que, mais adiante, diferenciam-se em pré-osteoblastos e osteoblastos maduros (Wong & Rabie, 2005; Schultze-Mosgau *et al.*, 2005). A utilização de BMP-2 parece acelerar o reparo ósseo em modelos de cicatrização óssea (Lieberman *et al.*, 2002; Rasubala *et al.*, 2004; Arosarena & Collins, 2005), enquanto a ausência de sua expressão causa transdução insuficiente de sinal e menor síntese de proteínas da matriz óssea (Schultze-Mosgau *et al.*, 2005). Ela pode ser utilizada como marcador do processo de cicatrização, sendo correlacionada com diferentes estágios de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (Rasubala *et al.*, 2004; Wiltfang *et al.*, 2004). A expressão de BMP-2 em alvéolos dentários de ratos inicia-se dois dias após as exodontias. Apresenta dois picos distintos de expressão, aos 3 e 5 dias, e menor evidência aos 4 e 7 dias de cicatrização, indicando um papel regulatório distinto em diferentes fases do reparo alveolar (Mendes *et al.* 2008).

3. Hialuronana

Por um longo período, acreditava-se que a MEC, produzida por quase todos os organismos multicelulares, servia apenas como uma estrutura inerte para estabilizar a estrutura física dos tecidos. Entretanto, sabe-se hoje que ela influencia a migração, proliferação, adesão, estrutura e função das células com as quais faz contato (Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Alberts *et al.*, 2004). Duas classes principais de macromoléculas extracelulares compõem a matriz: as glicosaminoglicanas (GAGs) e as proteínas fibrosas, incluindo o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina. GAGs são cadeias polissacarídicas não-ramificadas compostas de unidades dissacarídicas, nas quais um dos dois

açúcares é sempre um amino açúcar (*N*-acetilglucosamina ou *N*-acetilgalactosamina), enquanto o segundo açúcar é, normalmente, um ácido urônico (glucorônico ou idurônico). As GAGs são classificadas de acordo com seus açúcares, o tipo de ligação entre eles e o número e localização dos grupos sulfato, em quatro grupos principais: sulfato de condroitina e dermatana, sulfato de heparan, sulfato de queratana e hialuronana (Alberts *et al.*, 2004).

Hialuronana (HA) ou hialuronato de sódio (ácido hialurônico - HY) foi isolada inicialmente em 1934 (Meyer & Palmer, 1934) e teve sua estrutura primária descrita em 1955 (Linker *et al.*, 1955). É um polissacarídeo de alto peso molecular (10^4 - 10^7 Da), composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido *D*-glucorônico e *N*-acetilglicosamina (Fig. 1). Hialuronana encontra-se amplamente distribuída na MEC de mamíferos (Agren *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1997; Juhlin, 1997; Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004; Aslan *et al.*, 2006; Dechert *et al.*, 2006; Deschrevel *et al.*, 2008; Kappler *et al.*, 2009; Rügheimer *et al.*, 2009). É sintetizada no citoplasma e liberada diretamente na superfície celular por um complexo enzimático presente na membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2004). Apresenta sítios de ligação específicos para proteoglicanas, contribuindo para a formação de malhas moleculares complexas. Deste modo, é capaz de funcionar como um esqueleto central da MEC (Siqueira Jr. & Dantas, 2000). Sua alta viscosidade (Fraser *et al.*, 1997) sugere que possa servir como um lubrificante biológico (Moseley *et al.*, 2002).

Hialuronana exerce influência no comportamento celular pela interação direta com receptores de superfície celular (Turley *et al.*, 1991; Dechert *et al.*, 2006), especialmente CD44 (Lesley *et al.*, 2000; Sugahara *et al.*, 2003; Lesley *et al.*, 2004) e receptores para mobilidade mediada por HA (RHAMM) (Toole, 1997;

Savani *et al.*, 2001; Turley *et al.*, 2002; Nedvetzki *et al.*, 2004; Ghatak *et al.*, 2005), via ativação de proteínas quinases (Zhang *et al.*, 1998; Bourguignon *et al.*, 2002; Slevin *et al.*, 2002; Ghatak *et al.*, 2005). RHAMM, descrito inicialmente em 1992 (Hardwick *et al.*, 1992), é expresso em superfície celular, citoplasma, núcleo e citoesqueleto (Nedvetzki *et al.*, 2004). A transdução do sinal, após ligação à HA, acarreta rearranjos estruturais do citoesqueleto (Toole *et al.*, 2002; Bourguignon *et al.*, 2002). O bloqueio específico destes receptores indica que RHAMM regula a migração de células endoteliais, enquanto CD44 influencia a proliferação destas células (Savani *et al.*, 2001), fornecendo evidências do envolvimento de HA na angiogênese (Savani *et al.*, 2001; Slevin *et al.*, 2002; Giavaresi *et al.*, 2005). A interação entre CD44 e HA é implicada na adesão primária de leucócitos ao endotélio em sítios de inflamação (Lesley *et al.*, 2004). CD44 e RHAMM desempenham, também, papel crítico na migração e proliferação de células normais e tumorais (Annabi *et al.*, 2004; Nedvetzki *et al.*, 2004; Ghatak *et al.*, 2005).

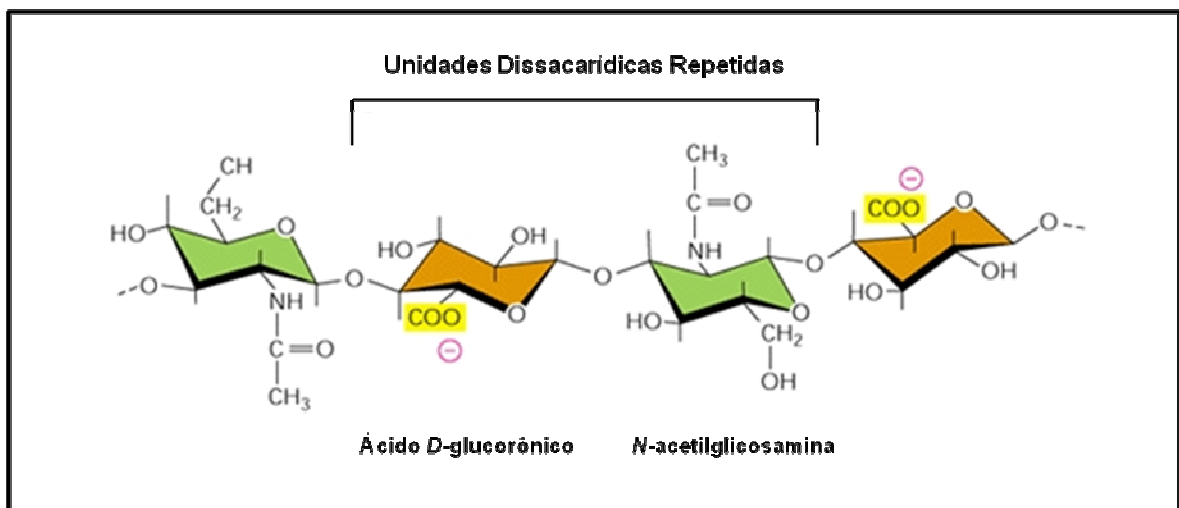


Figura 1: Estrutura da hialuronana contendo repetidas unidades dissacarídicas de *N*-acetilglicosamina e ácido *D*-glucorônico (Alberts *et al.*, 2004).

Hialuronana desempenha um papel crucial no reparo tecidual durante a cicatrização de feridas e em processos inflamatórios por estimular a migração, adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas bem como por induzir sua diferenciação em células osteoblásticas (Grigolo *et al.*, 2001; Lisignoli *et al.*, 2002; Toole *et al.*, 2002; Arosarena & Collins, 2005; Aslan *et al.*, 2006; ; Dechert *et al.*, 2006; David-Raoudi *et al.*, 2008; Pasquinelli *et al.*, 2008). Uma vez que a formação tecidual esteja completa, sua concentração é reduzida, sendo substituída por GAGs sulfatadas (Gerdin & Hällgren, 1997; Toole, 1997; Piloni & Bernard, 1998; Dechert *et al.*, 2006). O alto peso molecular da HA é um fator chave em sua habilidade de atuar como antioxidante, por competir diretamente com sítios de ligação celulares e moleculares para fixação de radicais livres (Moseley *et al.*, 2002). A aplicação tópica de HA em feridas dérmicas, além da remoção de radicais livres, tem como benefícios a hidratação da ferida e o bloqueio do excesso de hialuronidase que possa estar presente (Dechert *et al.*, 2006). Como resultado da ação de hialuronidases e radicais livres, a HA de alto peso molecular é seccionada em fragmentos menores (Liu *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005). O tamanho da cadeia de HA influencia sua ligação aos receptores celulares, alterando a proliferação e migração celular (Lesley *et al.*, 2000; Slevin *et al.*, 2002; Sugahara *et al.*, 2003).

Durante os processos de reparo ósseo, a HA pode atuar na retenção de fatores de crescimento osteoindutores dentro do ambiente local, em virtude de suas propriedades físico-químicas (Sasaki & Watanabe, 1995), além de mediar a adesão de osteoclastos à superfície óssea (Prince, 2004) e acelerar a revascularização (Giavaresi *et al.*, 2005) e a formação óssea (Sasaki & Watanabe, 1995; Piloni & Bernard, 1998). A inserção de grande quantidade de

HA em áreas de injúria tecidual previne inicialmente a agregação celular, possibilitando intensa migração e divisão celular. A ação de hialuronidases liberadas por fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas, presentes na região de reparo, é responsável por regular os níveis de HA, permitindo a formação de pontes de ligação entre HA e seus receptores celulares, um mecanismo importante na agregação celular (Pilloni & Bernard, 1998). Desta forma, matrizes à base de HA podem ser potencialmente úteis para o reparo de defeitos teciduais ósseos acelerando a formação e deposição de matriz óssea (Pasquinelli *et al.*, 2008). Géis à base de HA têm sido utilizados em modelos de defeitos ósseos, isoladamente ou como carreadores para BMP-2 (Itoh *et al.*, 2001; Arosarena & Collins, 2005), matriz óssea desmineralizada (Colnot *et al.*, 2005), compósitos de hidroxiapatita (Bakos *et al.*, 1999) e enxertos ósseos (Giavaresi *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2006), além do tratamento de osteoartrites (Barbucci *et al.*, 2002). Alvéolos dentários de ratos tratados com HY apresentam maior deposição de trabéculas ósseas em relação a alvéolos controle, após sete dias de cicatrização (Mendes *et al.*, 2008). Além disso, a expressão das proteínas osteogênicas OPN e BMP-2 é mais precoce e exacerbada nos alvéolos tratados com HY (Mendes *et al.*, 2008).

4. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (NTC) foram descobertos em 1991 quando Iijima tentava produzir fulerenos pela técnica de descarga em arco (Iijima, 1991). NTC são formas metaestáveis de carbono resultantes do enrolamento de um plano de átomos de carbono (Dresselhaus *et al.*, 1996; Ajayan, 1999). Estão divididos em duas categorias: NTC de paredes simples (NTCPS) com diâmetro

variando entre 0,7 e 2,0nm (Fig. 2A) e NTC de paredes múltiplas (NTCPM) que podem ter até 100nm de diâmetro (Fig. 2B) (MacDonald *et al.*, 2005; Smart *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Boccaccini *et al.*, 2006). A forte ligação covalente de seus átomos proporciona aos NTC alta resistência mecânica e, devido ao seu caráter metálico, alta condutividade térmica e elétrica. Além disso, a ausência de ligações pendentes dá a este material uma grande inércia química, fundamental para o seu uso em aplicações biotecnológicas e bioquímicas (Dresselhaus *et al.*, 1996). As suas extraordinárias propriedades físico-químicas despertaram grande interesse nos mais diversos ramos da ciência, permitindo supor uma variada gama de aplicações que vão desde o armazenamento de energia e hidrogênio até utilização em aplicações médicas (Terrones, 2004).

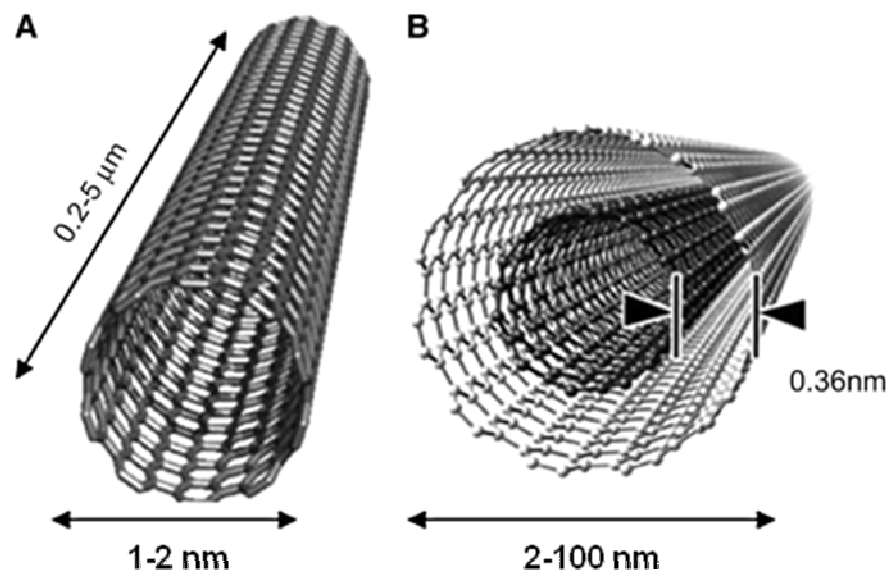


Figura 2: Representação esquemática de (A) NTC de paredes simples e (B) NTC de paredes múltiplas.

Durante o processo de síntese de matriz óssea e organização de um sistema trabecular, observado em tecidos ósseos, as tríplexes hélices de colágeno formam, espontaneamente, feixes que atuam como um sítio de nucleação para a deposição de nanocristais de hidroxiapatita. NTC podem, da mesma forma, controlar eventos de nucleação de cristais e crescimento do componente inorgânico (Zhao *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que NTC sustentam o crescimento de osteoblastos e a formação óssea, portanto, representam um enorme avanço tecnológico no campo da bioengenharia (Price *et al.*, 2004; Zanello *et al.*, 2006; Tutak *et al.*, 2009).

Matrizes à base de NTC permitem boa adesão, espalhamento e crescimento celular (Correa-Duarte *et al.*, 2004; Chłopek *et al.*, 2006; Galvan-Garcia *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007) e apresentam excelente biocompatibilidade (Chłopek *et al.*, 2006). A associação de NTC a outros polímeros, naturais ou sintéticos, melhora as propriedades mecânicas destes polímeros (Abarrategi *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Sitharaman *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009). Além disso, a interação entre NTC e polímeros pode resultar em biomateriais com a capacidade aumentada de nucleação e crescimento de cristais de hidroxiapatita (Silva *et al.*, 2009), assim como de osteogênese (Sitharaman *et al.*, 2008), em relação à utilização dos polímeros de forma isolada. Assim, a combinação dos NTC com polímeros pode permitir sua utilização como suporte para crescimento celular e reconstrução tecidual (MacDonald *et al.*, 2005).

5. Implantes dentários

Pacientes com perdas dentárias frequentemente são reabilitados com auxílio de implantes dentários osseointegráveis. Ligas de titânio são os materiais mais utilizados na confecção de implantes, tendo em vista as suas propriedades biomecânicas, a possibilidade de tratamento e acabamento do implante, e a facilidade no processo de esterilização. O início do reparo ósseo peri-implantar após a inserção de implantes no tecido ósseo depende do recrutamento e do íntimo contato de células mesenquimais indiferenciadas e pré-osteoblásticas com a superfície do implante (Adell *et al.*, 1981; Albrektsson *et al.*, 1988; Cooper *et al.*, 1998; Degasne *et al.*, 1999; Cooper, 2000; Schneider *et al.* 2003; Zhao *et al.*, 2005). Aspectos do desenho do implante como tamanho, posicionamento e distância entre as roscas e microporosidades, além do tratamento de superfície, influenciam diretamente na migração, adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas (Degasne *et al.*, 1999; Cooper, 2000; Schneider *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005). Observa-se que o tratamento de superfícies de titânio com fatores de crescimento também modula o comportamento celular (Postiglione *et al.*, 2003).

Paralelamente, estudos demonstram que NTC são capazes de induzir nucleação e crescimento de cristais de hidroxiapatita sob concentrações fisiológicas de cálcio e fosfato (Zhao *et al.*, 2005). A interação de NTC com polímeros acentua sua capacidade de induzir mineralização (Silva *et al.*, 2009) e osteogênese (Sitharaman *et al.*, 2008). Aproveitando-se das propriedades biológicas do HY, que induz migração, diferenciação e proliferação celular, o recobrimento de implantes com um biomaterial composto da associação entre

NTC e HY poderia gerar uma superfície de implante mais bioativa, resultando assim, em menor tempo de cicatrização.

Em síntese, o desenvolvimento de biomateriais que estimulam mecanismos celulares de migração, diferenciação e proliferação, acelerando a deposição de matriz óssea, pode ajudar na manutenção da estrutura óssea dos maxilares imediatamente após exodontias e auxiliar no processo de osseointegração do titânio, contribuindo, assim, para uma reabilitação protética mais rápida, menos desconfortável e dispendiosa para os pacientes.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar *in vivo* os efeitos dos NTC isoladamente ou funcionalizados com hialuronato de sódio (NTC-HY) no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos, após exodontia dos primeiros molares superiores e, *in vitro*, na deposição de cristais inorgânicos no titânio e no comportamento de osteoblastos.

2. Objetivos específicos

- Avaliar histologicamente os alvéolos controle e tratados com HY 1%, NTC (50, 100 e 400 µg/mL) e NTC-HY (50, 100 e 400 µg/mL), após 7 dias de cicatrização.
- Avaliar morfometricamente, o percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controle e tratados com HY 1%, NTC (50, 100 e 400 µg/mL) e NTC-HY (50, 100 e 400 µg/mL), após 7 dias de cicatrização.
- Avaliar histologicamente o número de núcleos celulares nos alvéolos controle e tratados com HY 1%, NTC (50, 100 e 400 µg/mL) e NTC-HY (50, 100 e 400 µg/mL), após 7 dias de cicatrização.
- Avaliar morfometricamente o número de núcleos celulares nos alvéolos controle e tratados com HY 1%, NTC (50, 100 e 400 µg/mL) e NTC-HY (50, 100 e 400 µg/mL), após 7 dias de cicatrização.
- Avaliar a expressão através de imunohistoquímica do colágeno tipo I, após 7 dias de cicatrização, nos alvéolos controle e tratados com HY, NTC (100 µg/mL) e NTC-HY (100 µg/mL).

- Avaliar a expressão através de imunohistoquímica do colágeno tipo III, após 7 dias de cicatrização, nos alvéolos controle e tratados com HY, NTC (100 µg/mL) e NTC-HY (100 µg/mL).
- Avaliar com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), através de análises por elétrons secundários, retro-espalhados e de energia dispersiva de raios-X, a deposição de cristais inorgânicos em pastilhas de titânio tratadas com NTC (100 µg/mL de carbopol), HY 1%, NTC-HY (100 µg/mL de carbopol) e NTC + HY (100 µg/mL de HY).
- Avaliar a viabilidade celular por MTT e a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos cultivados em meio de cultura contendo NTC e NTC-HY.

METODOLOGIA

III. METODOLOGIA

1. Síntese de nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono de paredes simples foram preparados no laboratório de nanomateriais do departamento de física do instituto de ciências exatas da UFMG pelo método de descarga em arco, utilizando cobalto e níquel (0,6/0,6 em %) como catalisadores numa atmosfera de hélio e a uma pressão total de 500 Torr (Trigueiro *et al.*, 2007). O material foi purificado por uma sequência de oxidação térmica e tratamentos ácidos. Os NTCPS purificados foram submetidos a refluxos em ácido nítrico (3 mol/L) em microondas por 15 minutos para adicionar grupos carboxílicos à estrutura dos NTCPS. Em seguida, eles foram centrifugados a 7000 rpm e lavados repetidamente com água deionizada até a completa remoção do ácido nítrico. A solução final contendo NTCPS carboxilados (NTCPS-COOH) foi seca por 12 h em estufa a 60°C.

2. Caracterização dos nanotubos de carbono

Microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada para caracterizar os NTCPS, como descrito previamente (Ajayan, 1999; Zhao *et al.*, 2005). A análise dos NTC em MET permitiu verificar o número e a espessura das paredes dos NTC. Adicionalmente, espectros de Raman foram obtidos com auxílio de um laser de argônio com comprimento de onda de 514 nm acoplado a um espectrômetro (Jobin-Ivon, França). Foram analisadas as regiões de energia chamadas de banda D e banda G. Sabe-se que a banda D centrada a 1350 cm^{-1} é relacionada à presença de carbono amorfo e defeitos estruturais nos NTC (Zhou *et al.*, 2001; Jorio *et al.*, 2003; Arepalli *et al.*, 2004), enquanto que a banda G é

originada no modo tangencial E_{2g} do grafite, que também é ativo em NTCPS e NTCPM. Assim, a intensidade relativa entre as bandas D e G pode ser utilizada como um indicador da presença de carbono amorfo e/ou defeitos em NTC.

3. Hialuronato de sódio

O HY (NIKKOL, Galena, Brasil) utilizado nos experimentos continha menos de 2 ppm de metais pesados e arsênio, 0% de proteína, 5,2 mg/mL de ácido glucurônico e 1% de ácido hialurônico (pH 6,1) (Mendes *et al.*, 2008).

4. Funcionalização de nanotubos de carbono com hialuronato de sódio

Uma solução contendo NTCPS carboxilados (0,5 mg/mL) e HY 1% (0,5 mg/mL) foi preparada usando uma cuba ultra-sônica. Esta solução foi lavada com água deionizada várias vezes e filtrada com filtro Millipore. Este processo eliminou o excesso de HY e NTCPS da amostra. O material retido sobre o filtro foi secado e utilizado para os protocolos experimentais. O sucesso da funcionalização dos NTCPS com HY (NTC-HY) foi confirmado por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) (Bhattacharyya *et al.*, 2008). Espectros em infravermelho foram coletados com microscópio Nexus (ampliação de 10x, região sondada - $150 \times 150 \mu\text{m}^2$) acoplado a um espectrômetro Nicolet na região do infravermelho médio ($650\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$). Nanotubos de carbono de paredes simples carboxilados e nanotubos de carbono de paredes simples carboxilados funcionalizados com hialuronato de sódio sob a forma de pó foram misturados com carbopol, um gel inerte, para preparar géis com diferentes concentrações de NTC e NTC-HY, respectivamente.

5. Animais

Ratos Wistar machos (3 meses de idade) pesando entre 260 e 300 g foram acondicionados em um ambiente com luminosidade e temperatura controladas e com acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com as orientações para o uso humanitário dos animais de laboratório e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolos números 142/04 e 217/2009 – ANEXOS 1 e 2).

6. Procedimentos cirúrgicos de exodontia

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina 10% e xilazina 2% (1:1, 0,1 mL/100 g de peso corporal, i.m.) e submetidos à exodontia dos primeiros molares superiores. Imediatamente após as exodontias, os alvéolos foram tratados com NTC (50, 100 e 400 µg/mL); HY 1%; NTC-HY (50, 100 e 400 µg/mL) ou com carbopol 0,5% (veículo) (quadro 1).

Quadro 1: Grupos experimentais para tratamentos dos alvéolos após as exodontias.

NTC (50; 100; 400 µg/mL de Carbopol)
HY 1%
NTC-HY (50; 100; 400 µg/mL de Carbopol)
Carbopol 0,5% (veículo)

Foi injetado aleatoriamente 0,1 mL de cada produto, com auxílio de uma seringa pequena (26G), de modo que preenchesse todo o alvéolo. Os alvéolos não foram suturados. Para manter os géis na cavidade alveolar após a cirurgia, os animais foram mantidos em posição supina por aproximadamente 4h, período de duração da anestesia. Além disso, os animais receberam dieta pastosa (farelo de ração umedecido) por 2 dias após os procedimentos cirúrgicos.

7. Análises histológica e morfométrica

Sete dias após as exodontias, os animais foram sacrificados por decapitação sob anestesia com ketamina 10% e xilazina 2% (1:1, 0,1 mL/100 g de peso corporal, i.m.). Os alvéolos foram dissecados e fixados em formalina neutra tamponada 10% por 48 h à temperatura ambiente para análises histológica e morfométrica. Após a fixação, as maxilas foram desmineralizadas em ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 10% (pH entre 7,2 e 7,4) durante cerca de 40 dias, desidratadas através de soluções graduadas e crescentes de álcool, embebidas em parafina e cortadas serialmente com 6 µm de espessura no plano sagital. As secções foram coradas com Tricrômico de Masson para análises histológica e morfométrica. Os alvéolos foram divididos anatomicamente em terços apical, médio e cervical (Fig. 3). Foram obtidas, de cada alvéolo, em quatro cortes histológicos diferentes, na região medial dos alvéolos, doze imagens (objetiva 40x) do terço apical e doze imagens do terço médio (área total de $6,4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ por terço). O número de alvéolos analisados variou entre os grupos, uma vez que apenas alvéolos com limites bem estabelecidos foram aproveitados, sendo: NTC 50µg/mL (n=8); NTC 100µg/mL (n=11); NTC 400µg/mL (n=6); HY 1% (n=11); NTC-HY 50µg/mL (n=6); NTC-HY 100µg/mL (n=7); NTC-HY 400µg/mL

(n=6). O percentual de trabéculas ósseas obtido em cada terço do alvéolo foi calculado dividindo a área trabecular presente nas doze imagens, medidas com o auxílio do programa KS300, pela área total analisada (Quadro 2). Este programa também foi utilizado para quantificar o número de núcleos celulares na área total dos terços apical e médio (Mendes *et al.*, 2008, 2010).

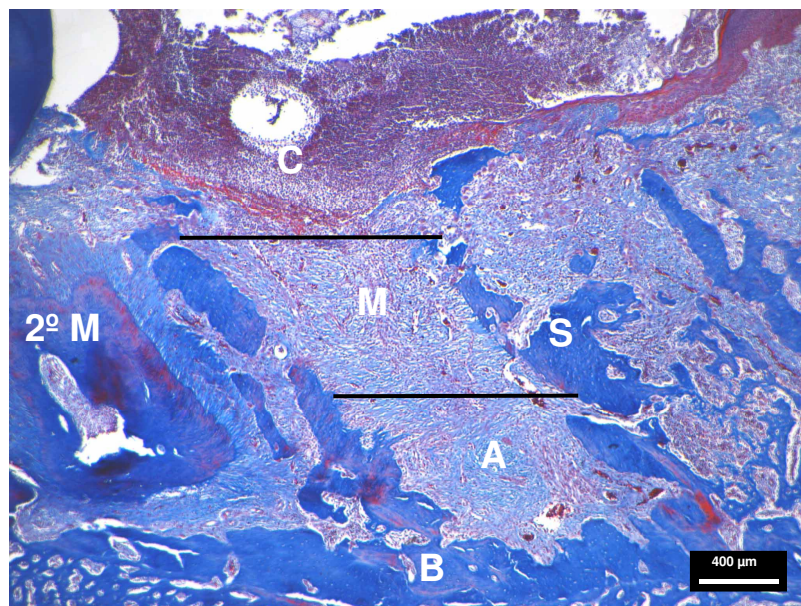


Figura 3: Divisão anatômica do alvéolo em terços apical, médio e cervical. A: terço apical; M: terço médio; C: terço cervical; 2ºM: segundo molar superior; B: osso basal; S: septo ósseo. Barra = 400µm; Tricrômico de Masson.

Quadro 2: Cálculo do percentual de trabéculas ósseas presentes nos terços apical e médio dos alvéolos.

$\frac{\text{Área de trabéculas (Imagem 1 + Imagem 2 + Imagem 3 + \dots + Imagem 12)}}{\text{Área Total Avaliada por Terço (6.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2)}}$

8. Análise da expressão dos colágenos tipos I e III

Cortes histológicos de alvéolos tratados com NTC (100 µg/mL), HY 1%, NTC-HY (100 µg/mL) ou carbopol (n=4 por grupo) foram utilizados para avaliação da expressão através de imunohistoquímica dos colágenos tipos I e III. Inicialmente, os cortes, colocados em lâminas silanizadas, foram desparafinizados com xilol e reidratados através de soluções graduadas de álcool. Em seguida, foram incubados com H₂O₂ 3% para neutralizar a atividade da peroxidase endógena, lavados com solução tampão fosfato (PBS) e incubados com proteína albumina do soro bovino (BSA) 2% e Tween 20 0,1% em PBS por 1h para bloquear sítios de ligação inespecífica. Em seguida, foram incubados por 18 horas a 4°C com anticorpos primários policlonais (coelho anti-rato) anti-colágeno tipo I (1:50; Fitzgerald, 70R-CR007X) ou anti-colágeno tipo III (1:50; Fitzgerald, 70R-CR014). Para a diluição dos anticorpos foi utilizada uma solução de PBS contendo BSA 0,2% e Tween 20 0,01%. Após lavagens em PBS, os cortes foram incubados, por 30min em temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com biotina (K0690 - LSAB/DAKO®, Glostrup, Dinamarca). Os cortes foram novamente lavados com PBS e, em seguida, incubados com conjugado streptoavidina/peroxidase por 30min. A reação foi revelada através de imersão em solução cromógena contendo 350 µM de diaminobenzidina (DAB) (D-5637 -Sigma®) e H₂O₂ 1% em PBS. A contra-coloração foi realizada com solução de hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários. O experimento foi conduzido com todas as amostras ao mesmo tempo, para evitar diferenças entre os ensaios. Foram obtidas oito imagens (40x) de cada alvéolo. A área de imunomarcação foi quantificada pela intensidade de cor marrom, com auxílio do programa KS300.

9. Preparo de pastilhas de titânio para uso em ensaios de indução de deposição de cristais inorgânicos no titânio

Barras de titânio tipo IV, utilizadas comercialmente para a fabricação de implantes dentários, foram obtidas junto à empresa PecLab. As barras foram seccionadas e polidas através de lixas sequenciais e de maneira uniforme, para a obtenção de pastilhas com 4,76 mm de diâmetro e 2,0 mm de espessura. Após limpeza com acetona em cuba ultrasônica, as pastilhas foram secas, embaladas em grau cirúrgico e esterilizadas em autoclave. Em seguida, as pastilhas foram cobertas com NTC (100µg/mL de carbopol); HY 1%; NTC-HY (100µg/mL de carbopol); NTC + HY (100µg/mL de HY) ou carbopol (~30 µL por pastilha), secas à temperatura ambiente (~30°C) em capela de fluxo laminar (~12 horas) e armazenadas em ambiente estéril. Pastilhas de titânio polidas adicionais foram utilizadas como controle.

10. Análise de indução de deposição de cristais inorgânicos em pastilhas de titânio

As pastilhas foram imersas em uma solução aquosa subsaturada contendo CaCl_2 0,5mM e Na_2HPO_4 0,25mM. Cada pastilha foi imersa em um recipiente individual e tampado. Substratos de silício foram utilizados como controle negativo de mineralização, uma vez que eles não induzem a deposição de íons ou a formação de precipitados quando imersos em soluções salinas subsaturadas. As pastilhas foram mantidas sob lenta vibração tipo vaivém e à temperatura ambiente durante 14 e 28 dias. Em seguida, elas foram lavadas com água Milli-Q para a remoção do excesso da solução salina, secas em estufa a

37°C e armazenadas para análises em MEV. Para a análise do aspecto morfológico das partículas por elétrons secundários, algumas pastilhas foram metalizadas com ouro, enquanto que outras foram cobertas com carbono para a obtenção de imagens por elétrons retro-espalhados e análise de energia dispersiva de raios-X (EDS).

Elementos químicos com maior número atômico refletem elétrons com maior intensidade que elementos com menor número atômico, após incidência de um feixe de elétrons. Assim, a análise por elétrons retro-espalhados em MEV possibilita a visualização de contraste entre áreas com diferentes composições químicas (Riccardis *et al.*, 1994).

EDS é uma técnica utilizada para identificar os elementos químicos presentes na amostra ou numa pequena área de interesse da mesma. A amostra é exposta a um feixe de elétrons dentro do microscópio eletrônico de varredura. Estes elétrons colidem com os elétrons da amostra, fazendo com que alguns deles saiam de sua órbita. As posições vazias são preenchidas por elétrons de maior energia que emitem raios-X durante o processo. Uma vez que cada elemento possui seu próprio conjunto de níveis de energia, os fótons emitidos são indicativos dos elementos que os produzem. Assim, a composição dos elementos pode ser determinada pela análise dos raios-X emitidos (Paransky *et al.*, 2000).

11. Extração de osteoblastos

Osteoblastos foram isolados de calvária de ratos Wistar neonatos com 1 a 5 dias de idade (Valério *et al.*, 2004). As calvárias foram dissecadas, cortadas em pedaços menores e lavadas com PBS estéril sem cálcio e magnésio. Os

fragmentos ósseos foram incubados com colagenase 0,2% em PBS em quatro repetições de 30 minutos cada em estufa de CO₂ a 37° C. Os sobrenadantes da primeira e segunda digestão foram descartados por conterem alta proporção de fibroblastos periosteais. Após centrifugação a 1000g por 5 minutos, o pelete da terceira e quarta digestão foi ressuspendido em 5 mL de meio DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50µg/mL). As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² e mantidas em estufa de CO₂ a 37° C.

12. Análise do comportamento de osteoblastos cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY e sobre placas de cultura com meio DMEN contendo NTC ou NTC-HY

Osteoblastos de segunda a quarta passagens foram plaqueados sobre pastilhas de titânio tratadas com solução aquosa de NTC (25, 50, 75, 100, 200 e 400 µg/mL) e NTC-HY (25, 50, 75, 100, 200 e 400 µg/mL) em placas de cultura com 24 poços (1 mL de meio DMEN contendo 1x10⁴ células). Paralelamente, osteoblastos foram plaqueados diretamente em placas de cultura com 96 poços (100 µL de meio DMEN contendo 1x10⁴ células). Neste último experimento foram adicionados aos poços 20 µL de solução aquosa de NTC ou NTC-HY de modo que os 120 µL de solução presentes nos poços apresentassem NTC ou NTC-HY nas seguintes concentrações: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL. Para avaliar se os NTC e os NTC-HY influenciam na adesão celular, eles foram adicionados imediatamente após a incubação e, em outro experimento, duas horas após. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Foram realizadas análises de viabilidade celular por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-

difenil brometo de tetrazolina] e atividade da fosfatase alcalina após 1, 7 e 14 dias nos experimentos realizados com as pastilhas de titânio e após 2 e 4 dias nos experimentos realizados em placas de cultura. O ensaio de MTT baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, de converter o substrato dimetiliazol, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS, incubadas por 2 horas com 170 μL (placa com 24 poços) ou 34 μL (placa com 96 poços) de MTT (5 mg/mL, Sigma) e analisadas ao microscópio de luz para a verificação da formação de cristais de formazan. Posteriormente, as células foram lisadas e os precipitados foram solubilizados com solução aquosa contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e HCl 0,3%, e incubadas novamente por 12 horas para a completa solubilização dos cristais. O sobrenadante foi quantificado através de leitura dos valores de absorbância a 595 nm em leitor de ELISA.

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT (Gibco). Este ensaio é baseado em uma reação cromógena, iniciada pela clivagem do grupo fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina) pela fosfatase alcalina presente nas células. Esta reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazolio clorídrico) a um precipitado de cor púrpura. Inicialmente, o meio de cultura foi removido e as células lavadas três vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados 200 μL (placa com 24 poços) ou 40 μL (placa com 96 poços) de solução BCIP-NBT em cada poço. Após duas horas de incubação, as células foram observadas em microscópio de luz e os precipitados

solubilizados com SDS 10% em HCl por 12 horas. A leitura dos valores de absorbância foi realizada a 595 nm em leitor de ELISA.

13. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls com o auxílio do programa GraphPad Prism 4. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono

A síntese dos NTC foi realizada através do método de descarga em arco. Análises em MET revelaram que os NTC apresentaram-se dispostos em feixes formando redes tridimensionais (Fig. 4A). Cada NTC media aproximadamente 1,25nm de espessura e era formado por paredes simples (Fig. 4B). Em relação à análise com espectroscopia de Raman, a baixa intensidade relativa da banda D comparada com a banda G indicou que havia uma quantidade muito pequena de carbono amorfo e poucos defeitos estruturais nos NTCPS (Fig. 5A). Além disso, o modo de respiração radial (RBM) demonstrou a presença de picos com espectro de baixa energia que são característicos dos NTCPS (Fig. 5B). Em conjunto, estes resultados indicam que os NTC obtidos pelo método de descarga em arco apresentavam paredes simples. A presença de bandas nos espectros de baixa energia permitiu estimar o diâmetro dos NTC em aproximadamente 1-1,3nm. Nenhuma diferença significativa foi observada entre NTCPS-COOH e NTCPS-COOH funcionalizados com o HY.

Como era esperado para os NTCPS-COOH, a análise de FTIR apresentou o seguinte perfil: um pico em 1741 cm^{-1} atribuído à extensão C=O do grupo carboxila; um pico em 1595 cm^{-1} devido à união molecular C-C; e um pico em 1234 cm^{-1} correlacionado à extensão C-O (Fig. 6). Em relação ao espectro do HY, foram observados os seguintes picos: de 950 a 1200 cm^{-1} correspondentes à extensão do C-OH; 1160 cm^{-1} atribuído à assimetria da ligação C-O-C no grupo glicosídico; 1400 cm^{-1} relacionado à simetria da extensão COO- do grupo carboxila; de 1500 a 1700 cm^{-1} atribuído à amida I e amida II; de 2500 a 3600 cm^{-1}

correspondendo às extensões N-H e O-H na união hidrogênio; e 3100 cm^{-1} relacionado à extensão N-H da amida II (Fig. 6). Diferentemente, o espectro FTIR dos NTCPS-HY apresentou os seguintes picos: $950\text{ a }1200\text{ cm}^{-1}$ representando a extensão C-O; 1160 cm^{-1} atribuído à assimetria da ligação C-O-C no grupo glicosídico; o pico 1720 cm^{-1} estava pouco evidente, e 3100 cm^{-1} correlacionado ao grupo hidroxila. Assim, a espectroscopia FTIR revelou que o espectro obtido do produto da associação entre NTCPS e HY diferiu em relação aos espectros do NTCPS e do HY, demonstrando que os NTCPS estavam funcionalizados com o HY (NTCPS-HY) (Fig. 6).

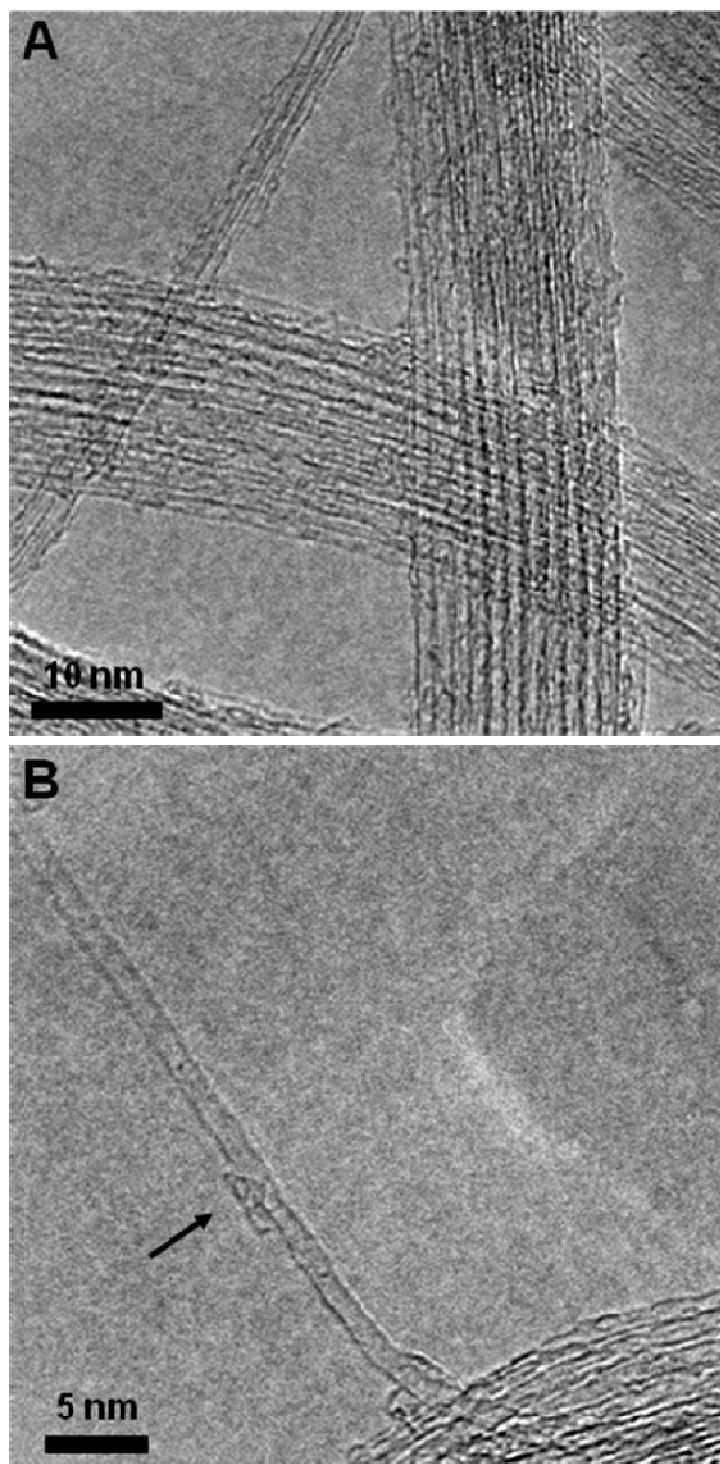


Figura 4: Micrografia eletrônica de transmissão dos NTCPS. (A) NTCPS organizados em feixes formando redes tridimensionais. (B) Detalhe de um NTCPS isolado apresentando aproximadamente 1,25 nm de espessura. A seta indica uma secção transversa de um NTCPS.

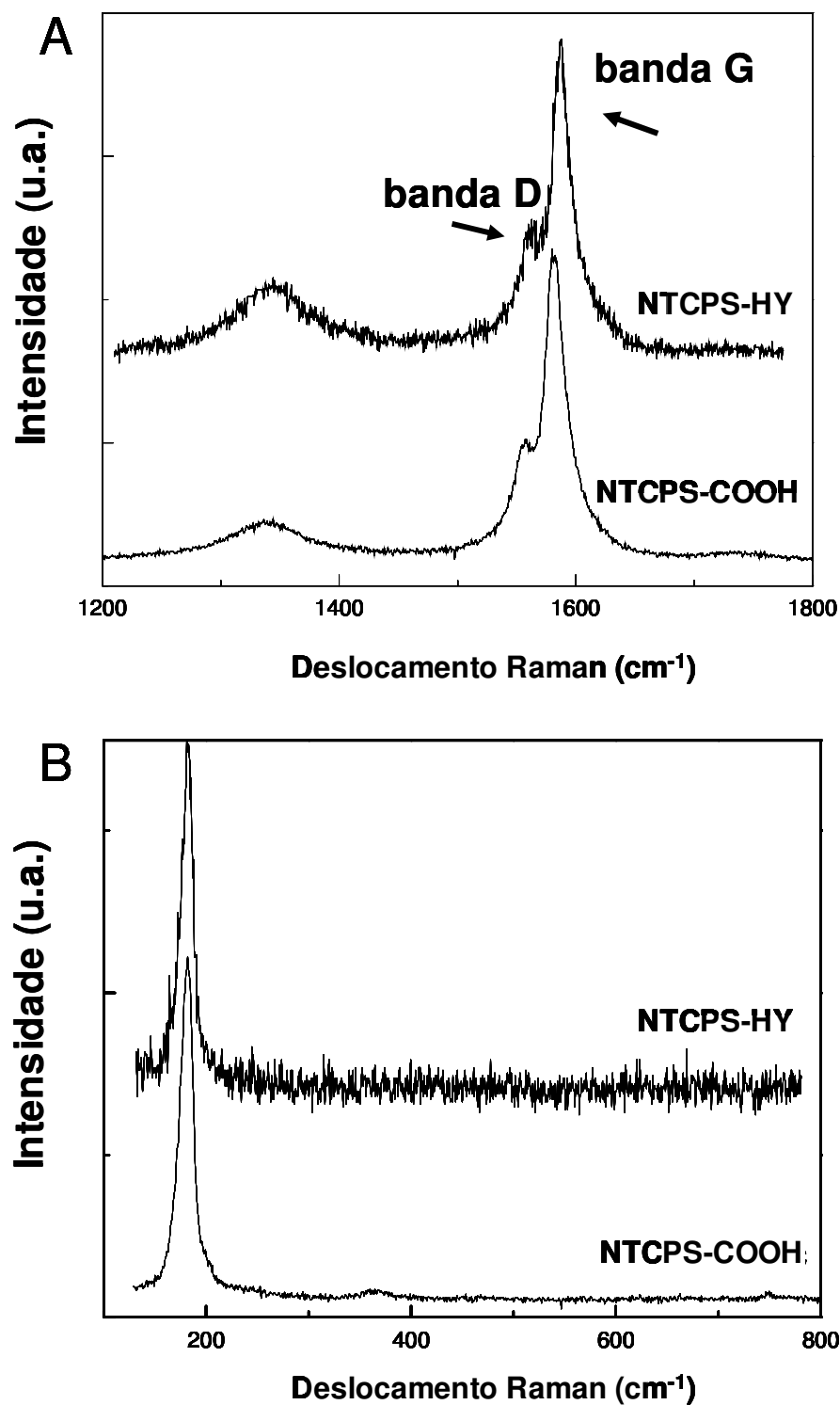


Figura 5: Espectroscopia de Raman dos NTCPS-COOH e NTCPS-HY. (A) A relação entre a intensidade das bandas D e G revelou que há uma quantidade muito pequena de carbono amorfo e poucos defeitos estruturais nos NTC. (B) O modo RBM demonstrou que os NTC sintetizados são de paredes simples.

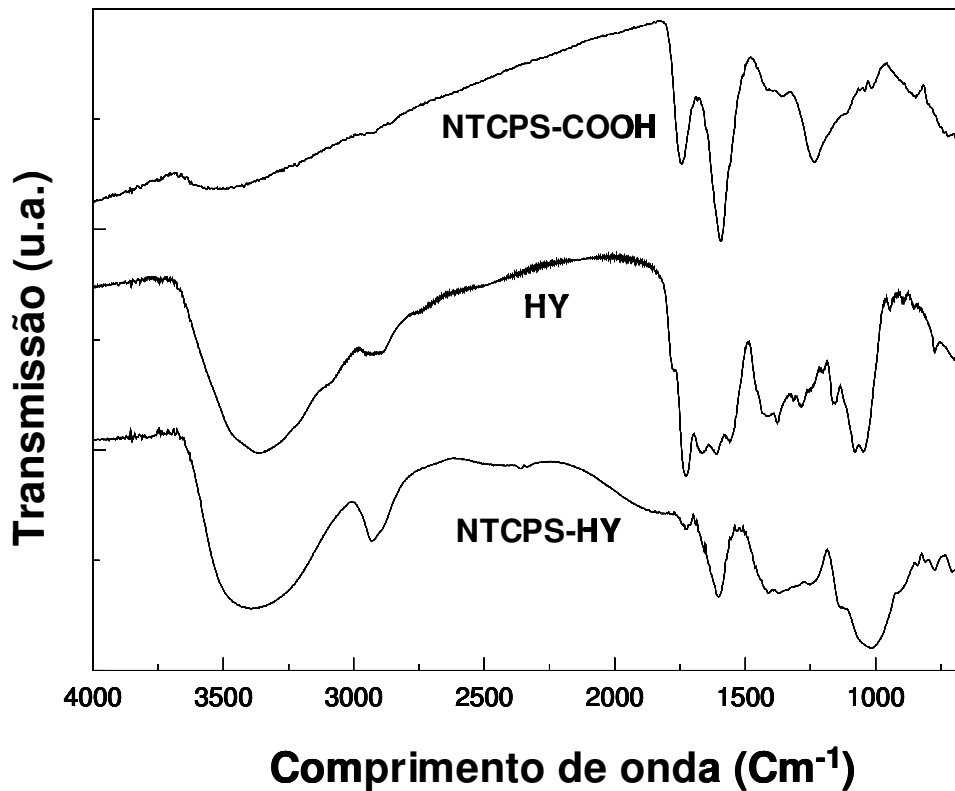


Figura 6: Espectroscopia FTIR dos NTCPS, HY e NTC-HY. O espectro obtido do produto da associação entre NTCPS e HY diferiu dos espectros dos NTCPS e do HY, demonstrando que os NTCPS estavam funcionalizados com o HY (NTCPS-HY).

2. Análise histológica

Sete dias após as exodontias, os alvéolos controle (tratados com carbopol) estavam preenchidos com um denso tecido conjuntivo. Numerosos vasos sanguíneos e núcleos celulares, e poucas trabéculas ósseas neoformadas também foram observados nos alvéolos controle (Fig. 7A e 7B). Alvéolos tratados com NTC nas diferentes concentrações (50; 100 e 400 µg/mL) não apresentaram diferenças histológicas significativas quando comparados ao grupo controle. Da

mesma forma que nos controles, apresentaram pouca deposição de trabéculas ósseas e grande quantidade de núcleos celulares (Fig. 7C e 7D – NTC 100 µg/mL). Por outro lado, alvéolos tratados com HY ou com NTC-HY 100 µg/mL apresentaram marcante deposição de matriz óssea (trabéculas ósseas), 7 dias após a extração dentária (HY: Fig. 7E e 7F; NTC-HY 100 µg/mL: 7G e 7H). Nestes alvéolos, as trabéculas ósseas se apresentaram como um tecido imaturo com grandes espaços medulares, porém mais organizados que nos alvéolos controle. Além disso, os alvéolos tratados com HY ou NTC-HY 100 µg/mL apresentaram, nos terços apicais, menor quantidade de núcleos celulares em relação aos alvéolos controle (Controle: Fig. 8A; NTC-HY 100 µg/mL: 8B), sugerindo uma cicatrização acelerada nestes alvéolos. Nenhuma diferença histológica significativa foi observada entre os alvéolos tratados com HY e com NTC-HY 100 µg/mL, indicando que a funcionalização dos NTC com HY não interferiu no efeito estimulatório do HY na cicatrização óssea. Em todos os tratamentos observou-se reabsorção do septo ósseo interradicular por osteoclastos (Fig. 9A). A presença de osteoblastos margeando vasos sanguíneos ou sintetizando matriz óssea próximo às bordas dos alvéolos sugere que estas células podem ser advindas tanto do ligamento periodontal como de vasos sanguíneos neoformados (Fig. 9B e 9C).

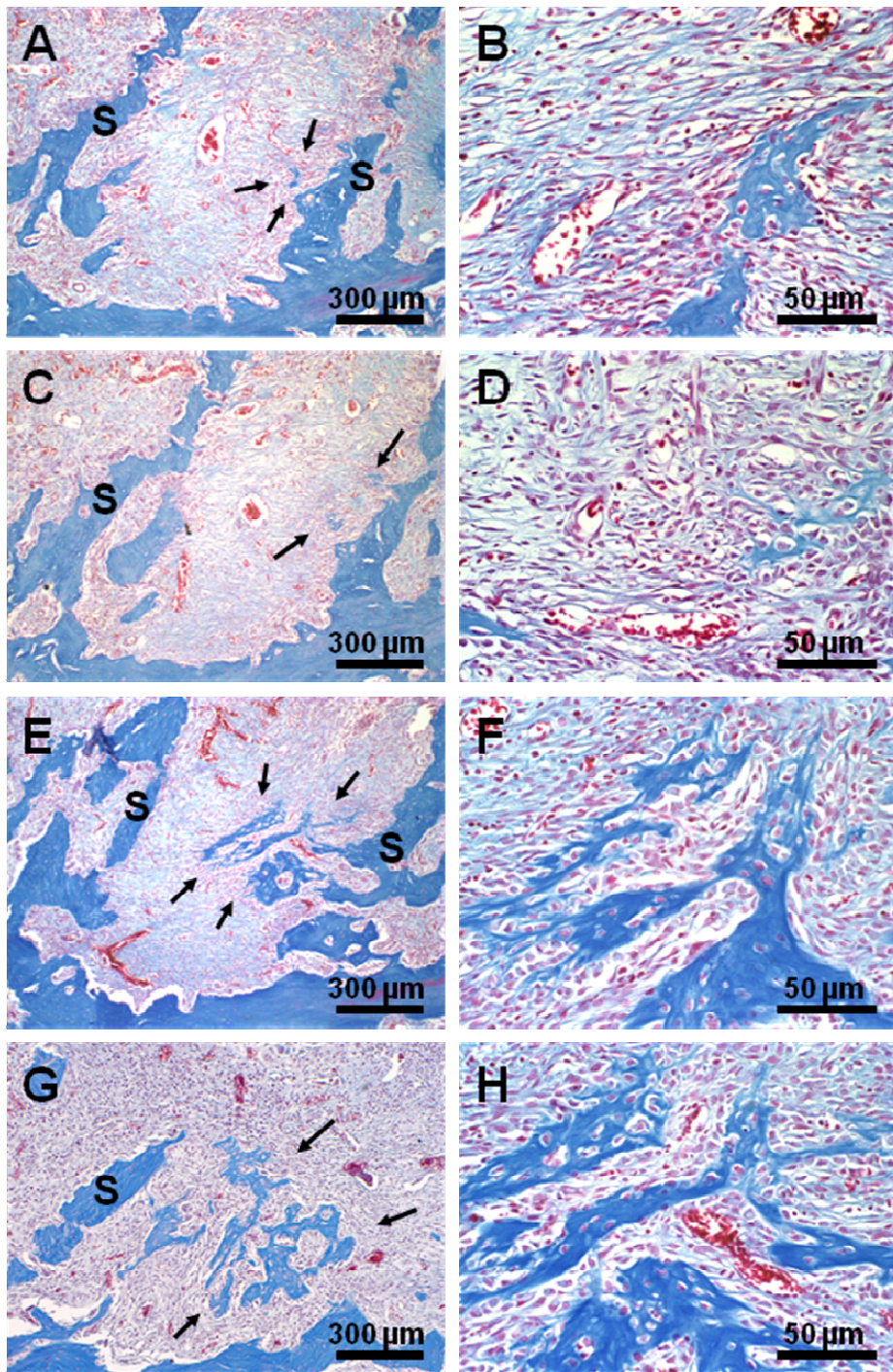


Figura 7: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de alvéolos 7 dias após as exodontias. Alvéolos controle (tratados com carbopol) – (A) baixa e (B) alta magnitude; Alvéolos tratados com NTC 100µg/mL – (C) baixa e (D) alta magnitude; Alvéolos tratados com HY – (E) baixa e (F) alta magnitude; Alvéolos tratados com NTC-HY 100µg/mL – (G) baixa e (H) alta magnitude. Os alvéolos tratados com HY ou NTC-HY 100µg/mL apresentaram maior formação de trabéculas ósseas em relação aos alvéolos controle (setas). S: Septo ósseo.

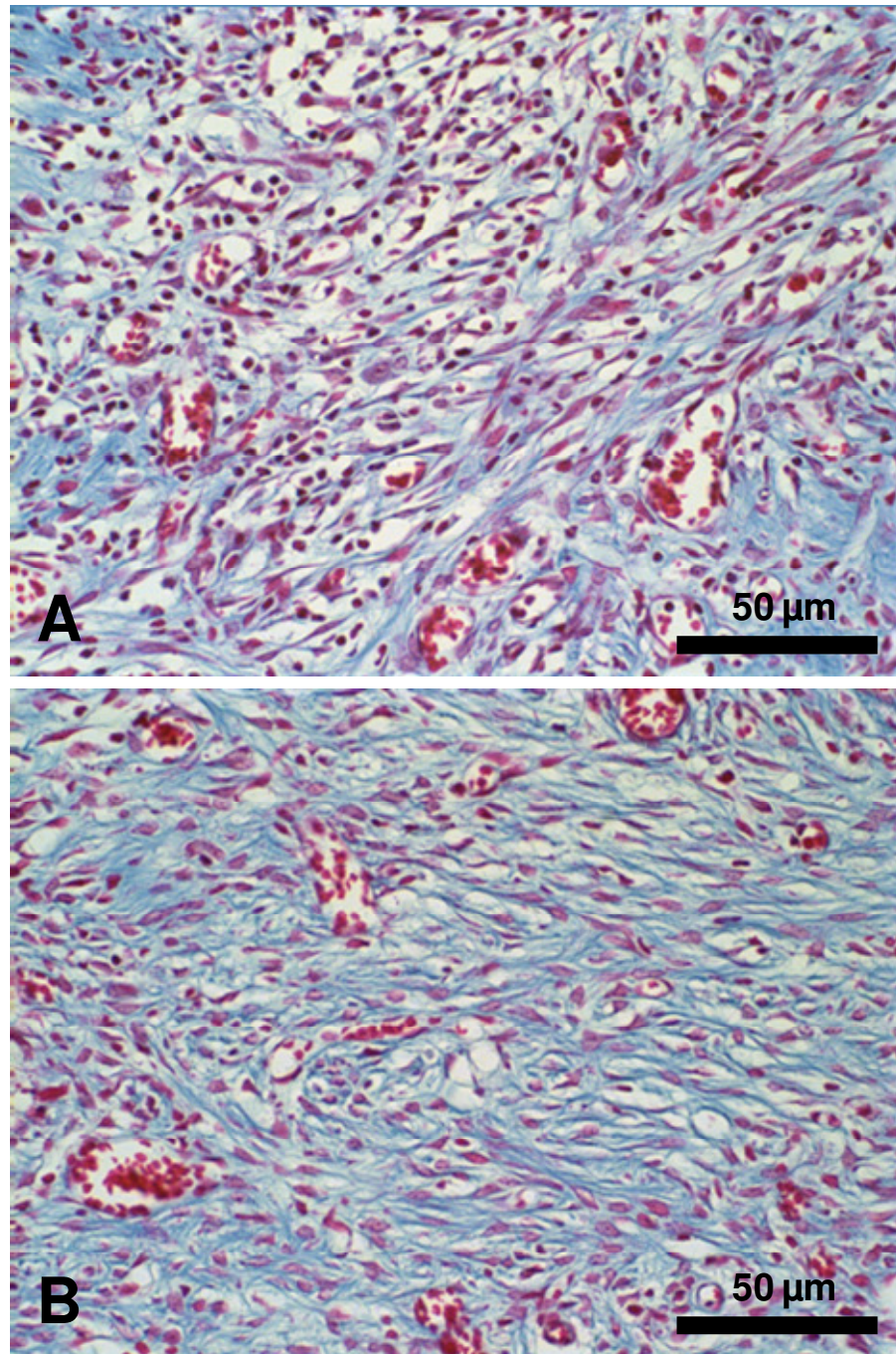


Figura 8: Análise histológica dos alvéolos 7 dias após as exodontias. Observa-se, no terço apical, maior quantidade de núcleos celulares nos (A) alvéolos controle quando comparados com os (B) alvéolos tratados com NTC-HY 100µg/mL, sugerindo cicatrização mais acelerada nestes alvéolos. Tricrômico de Masson.

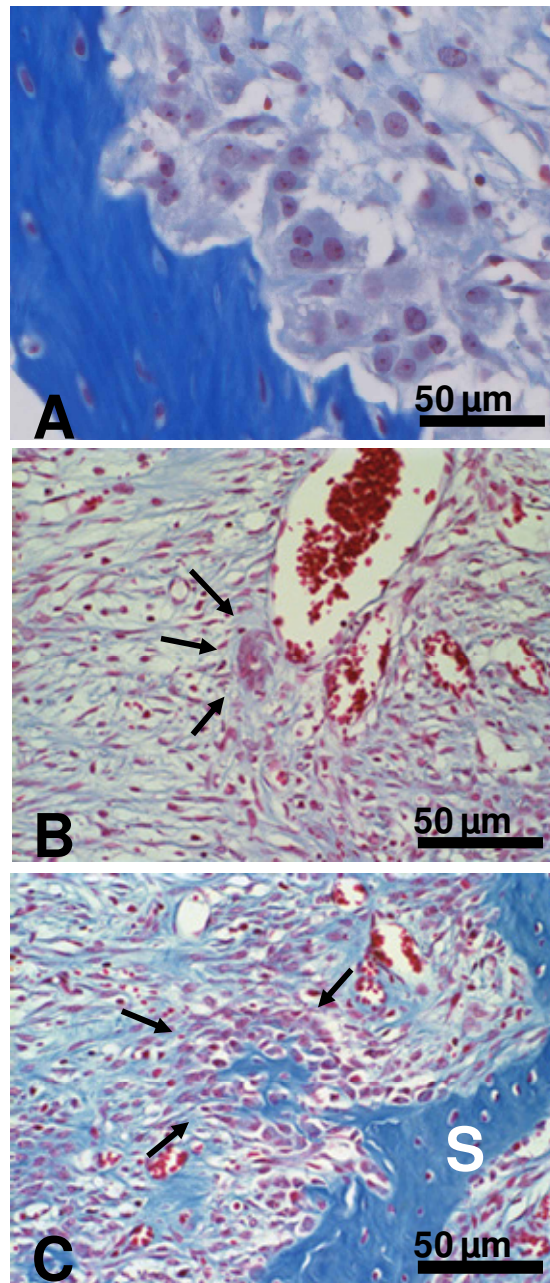


Figura 9: Análise histológica dos alvéolos 7 dias após as exodontias. (A) A reabsorção do septo ósseo interradicular por osteoclastos foi observada em todos os alvéolos (controle e tratados). Células com aspecto morfológico de osteoblastos (B) margeando vasos sanguíneos neoformados e (C) depositando matriz óssea próximo às bordas do alvéolo. S: septo ósseo. Setas: osteoblastos. Tricrômico de Masson.

3. Análise morfométrica

O tratamento dos alvéolos com NTC em diferentes concentrações (50; 100 e 400 µg/mL) não alterou significativamente a quantidade de trabéculas ósseas depositadas ($3,66 \pm 1,15\%$ nos NTC 100 µg/mL vs. $3,69 \pm 1,17\%$ nos alvéolos controle, Fig. 10A) nem o número de núcleos celulares (22.070 ± 607 nos NTC 100 µg/mL vs. 22.010 ± 861 nos alvéolos controle, Fig. 10B) quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, NTC funcionalizados com HY na concentração de 100 µg/mL aumentaram significativamente a quantidade de trabéculas ósseas ($10,90 \pm 1,13\%$ nos NTC-HY 100 µg/mL vs. $3,69 \pm 1,17\%$ nos alvéolos controle, Fig. 11A) sem nenhum efeito significativo na contagem de núcleos celulares (Fig. 11B). O efeito dos NTC-HY 100 µg/mL na deposição óssea foi comparável ao efeito observado quando os alvéolos foram tratados apenas com HY ($10,10 \pm 1,99\%$ no HY vs. $10,90 \pm 1,13\%$ nos NTC-HY 100 µg/mL, Fig. 12A). Entretanto, diferentemente ao que foi observado com o tratamento com NTC-HY 100 µg/mL, o HY causou uma redução significativa no número de núcleos celulares (Fig. 12B). Devido à diferença na dinâmica de cicatrização dos terços apical e médio, com o terço apical apresentando cicatrização mais precoce (Mendes *et al.*, 2008), a quantificação do número de núcleos celulares e da formação de trabéculas ósseas também foi realizada em cada terço separadamente. Foi observado que o HY e os NTC-HY 100 µg/mL aumentaram o percentual de trabéculas ósseas nos terços apical e médio, mas os alvéolos tratados com NTC-HY 100 µg/mL diminuíram o número de núcleos celulares apenas no terço apical (Tabela 1).

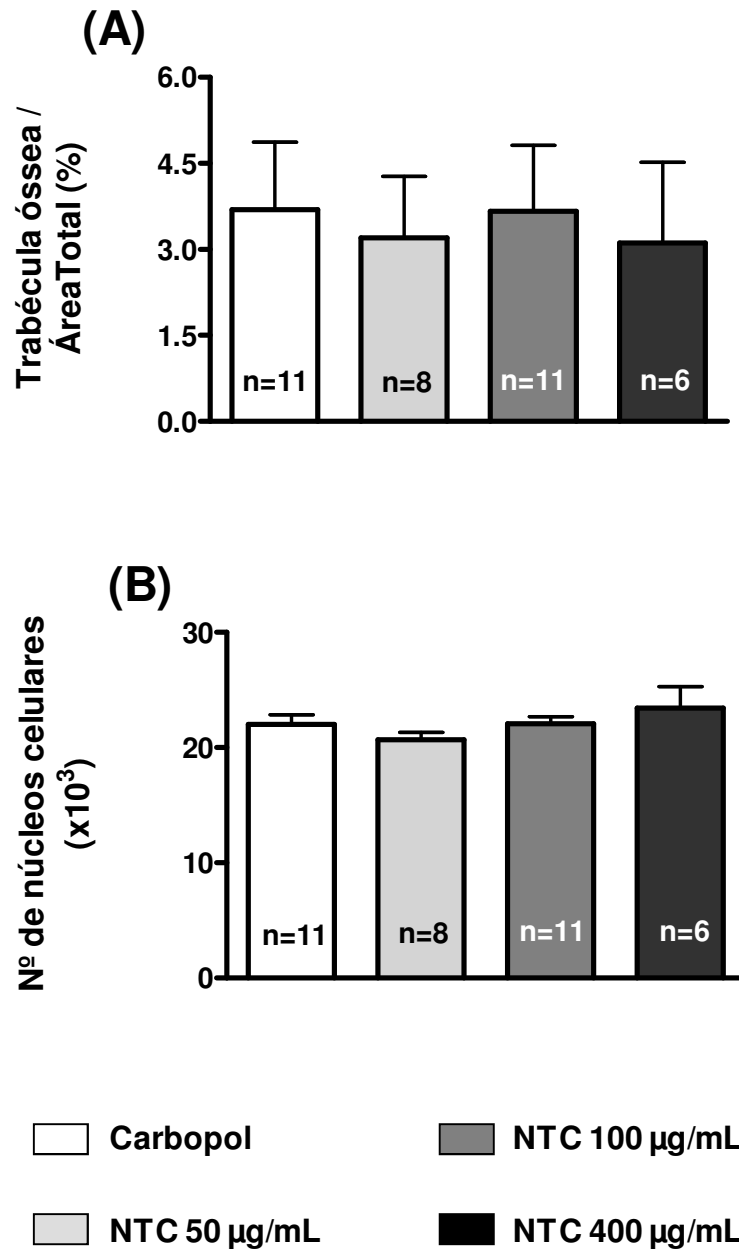


Figura 10: Efeitos dos NTC na cicatrização de alvéolos dentários de ratos sete dias após as exodontias. Alvéolo total (Σ terços apical + médio). (A) Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. (B) Contagem de núcleos celulares. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os alvéolos tratados com NTC e o grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M.

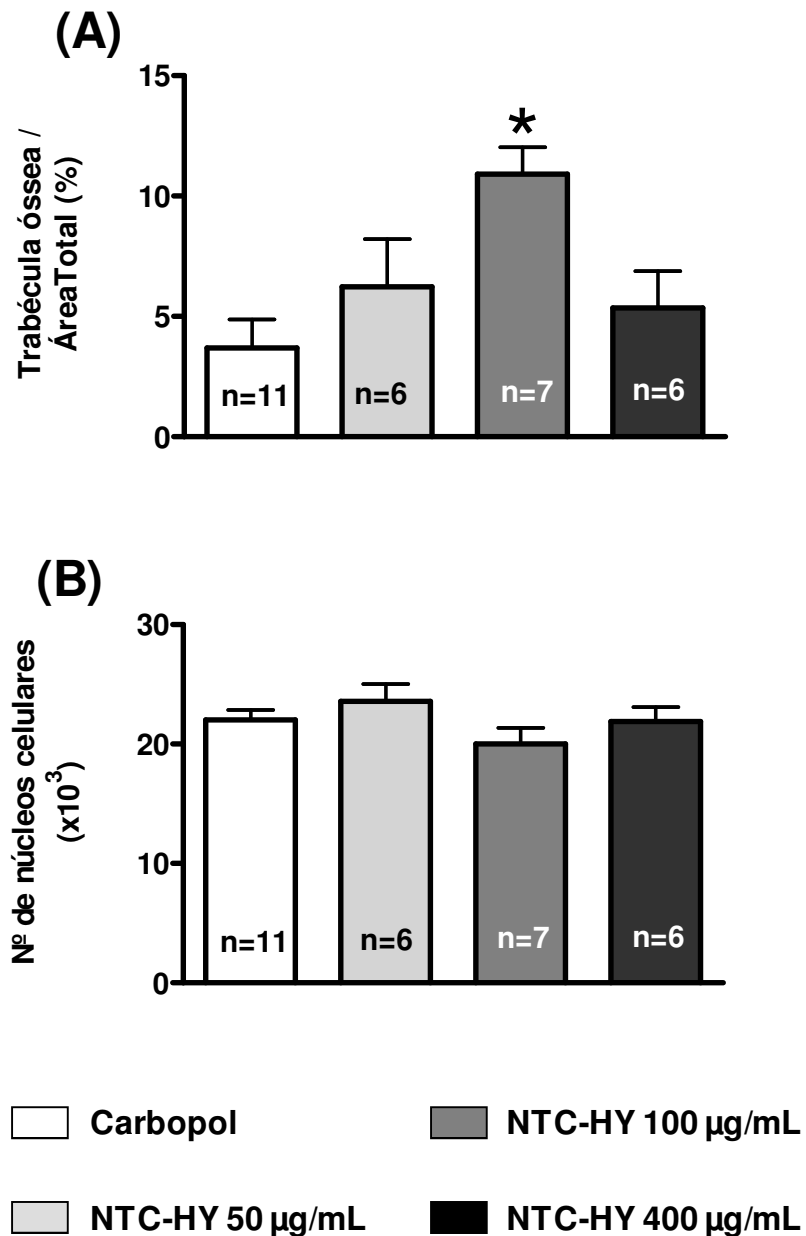


Figura 11: Efeitos dos NTC-HY na cicatrização de alvéolos dentários de ratos sete dias após as exodontias. Alvéolo total (Σ terços apical + médio). (A) Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. (B) Contagem de núcleos celulares. NTC-HY 100 µg/mL induziram uma maior formação de trabéculas ósseas em relação ao grupo controle. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ vs. carbopol.

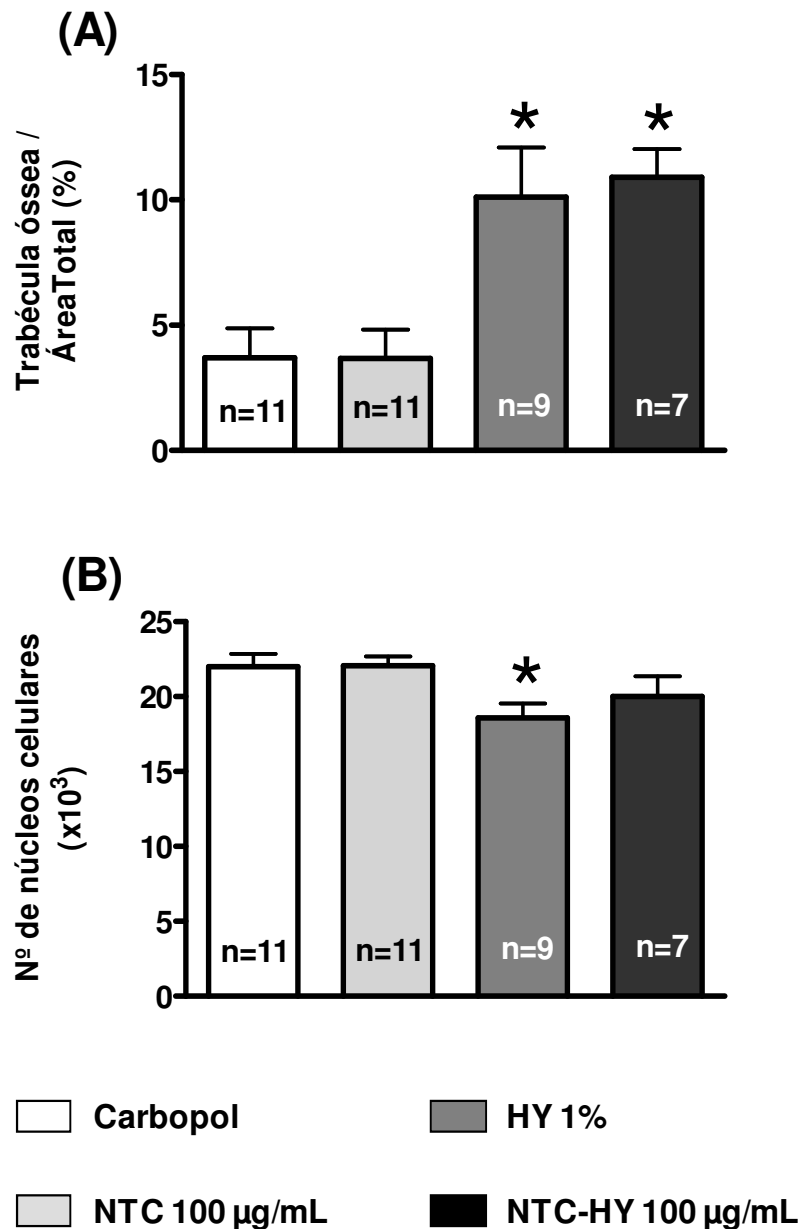


Figura 12: Efeitos dos NTC-HY e do HY na cicatrização de alvéolos dentários de ratos sete dias após as exodontias. Alvéolo total. (A) Percentual de trabéculas ósseas. (B) Contagem de núcleos celulares. Os alvéolos tratados com NTC-HY 100 µg/mL ou com HY 1% apresentaram maior deposição óssea em relação ao grupo controle. O tratamento com o HY também diminuiu o número de núcleos celulares. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. * $p < 0.05$ vs. carbopol.

Tabela 1 – Percentual de trabéculas ósseas e quantidade de núcleos celulares nos terços apical e médio, sete dias após as exodontias.

	Terço apical		Terço Médio	
	Trabécula (%)	Núcleo Celular ($\times 10^3$)	Trabécula (%)	Núcleo Celular ($\times 10^3$)
Carbopol	5,92 \pm 1,90	11570 \pm 467	1,70 \pm 0,60	10440 \pm 558
NTC 100μ/mL	6,62 \pm 2,18	11410 \pm 314	0,51 \pm 0,32	10660 \pm 361
HY 1%	17,07 \pm 3,48 *	9406 \pm 453 *	3,26 \pm 0,74 *	9186 \pm 627
NTC-HY 100μ/mL	18,16 \pm 1,92 *	9404 \pm 723 *	3,71 \pm 0,44 *	10610 \pm 828

Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. Carbopol no respectivo terço alveolar.

4. Análise da expressão dos colágenos tipos I e III

Sete dias após as exodontias, tanto o colágeno tipo I quanto o colágeno tipo III estavam expressos no tecido conjuntivo e em trabéculas ósseas presentes nos alvéolos controle e tratados. A análise quantitativa revelou que a expressão do colágeno tipo I foi 122% e 46% maiores nos alvéolos tratados com HY 1% e NTC-HY (100 μ g/mL), respectivamente, em comparação aos alvéolos controle (Fig. 13; Tabela 2). Não foi observada nenhuma diferença significativa em relação à expressão do colágeno tipo III entre os alvéolos controle e tratados (Fig. 14; Tabela 2). Além disso, NTC (100 μ g/mL) isoladamente não promoveram nenhuma alteração significativa na expressão dos colágenos tipos I e III em alvéolos de ratos (Figs. 13 e 14; Tabela 2).

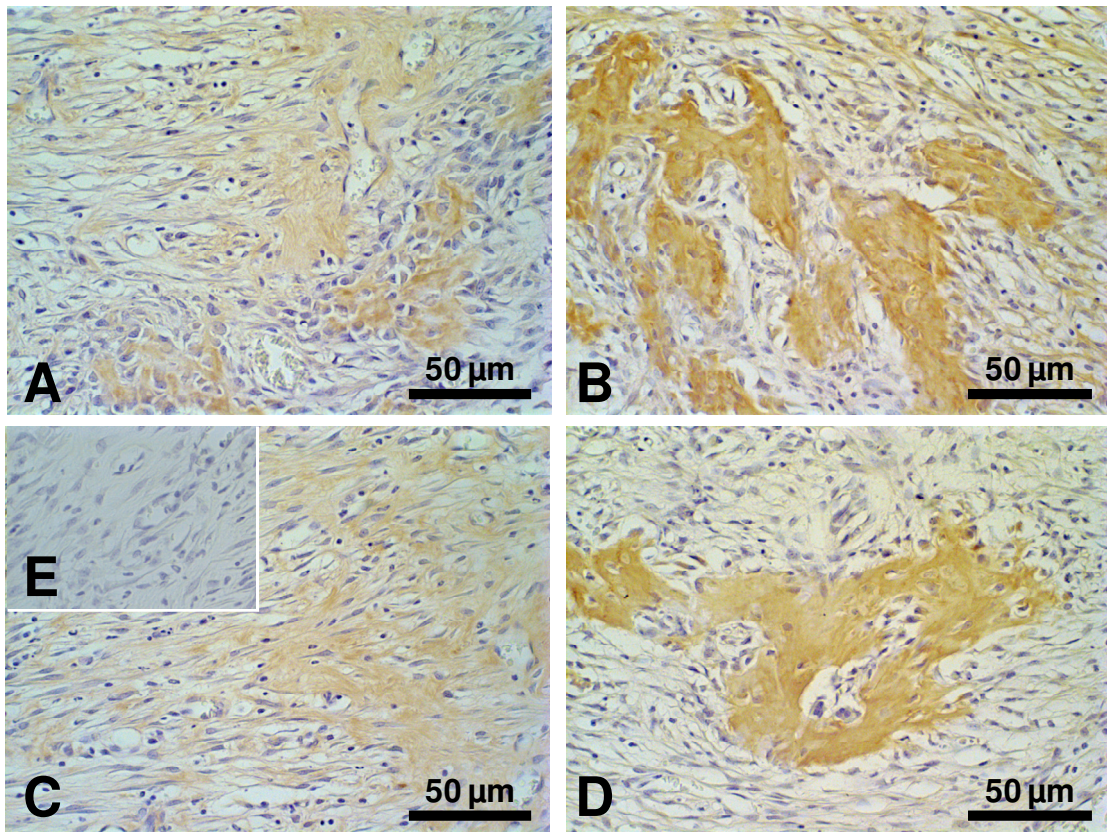


Figura 13: Fotomicrografias representativas da imunomarcação do colágeno tipo I sete dias após as exodontias. (A) Alvéolos tratados com carbopol; (B) Alvéolos tratados com HY 1%; (C) Alvéolos tratados com NTC (100 µg/mL); (D) Alvéolos tratados com NTC-HY (100 µg/mL); e (E) Controle negativo. Alvéolos tratados com NTC (100 µg/mL) apresentaram expressão de colágeno tipo I similar aos alvéolos controle. Entretanto, a expressão do colágeno tipo I estava aumentada nos alvéolos tratados com HY 1% ou com NTC-HY (100 µg/mL).

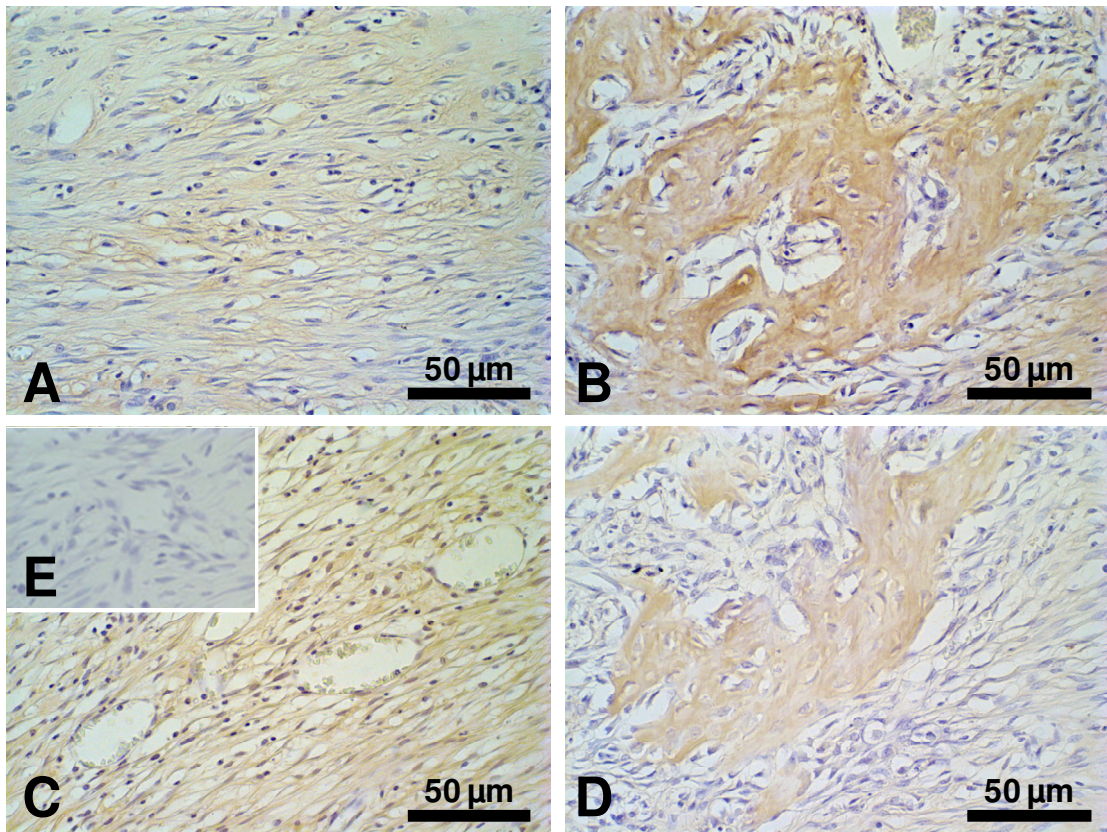


Figura 14: Fotomicrografias representativas da imunomarcação do colágeno tipo III sete dias após as exodontias. (A) Alvéolos tratados com carbopol; (B) Alvéolos tratados com HY 1%; (C) Alvéolos tratados com NTC (100 µg/mL); (D) Alvéolos tratados com NTC-HY (100 µg/mL); e (E) Controle negativo. Não foi observada nenhuma altera o significativa em rela o   expressão do colágeno tipo III entre os diferentes grupos.

Tabela 2 – Intensidade de imunomarcção dos colágenos tipos I e III, sete dias após as exodontias.

	Colágeno Tipo I	Colágeno Tipo III
Carbopol	10,15 ± 2,95	10,72 ± 5,95
NTC 100µ/mL	6,98 ± 3,26	7,47 ± 2,83
HY 1%	22,63 ± 6,39	10,70 ± 5,11
NTC-HY 100µ/mL	14,88 ± 4,40	10,77 ± 3,12

Alvéolo total (Σ terços apical + médio). Os dados estão expressos como média \pm EPM.

5. Análise de indução de deposição de cristais inorgânicos em pastilhas de titânio

5.1 Análise morfológica por meio de elétrons secundários

Após 14 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 , as pastilhas de titânio não-tratadas (Ti) e as cobertas com carbopol apresentaram deposição insignificante de partículas. Além disso, as pastilhas de titânio tratadas com NTC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol), HY 1% ou NTC + HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HY) apresentaram uma deposição de partículas pequenas, porém maiores que as pastilhas de titânio não-tratadas durante este mesmo período de observação (Fig. 15). Entretanto, as pastilhas cobertas com NTC-HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol) apresentaram uma deposição mais exacerbada quando comparadas com os outros tratamentos (Fig. 15). Como esperado, a deposição de partículas foi significativamente maior após 28 dias do que após 14 dias nos diferentes grupos. Assim, após 28 dias de imersão, verificou-se que as pastilhas de titânio não-tratadas e as cobertas com carbopol apresentaram apenas pequenos depósitos de partículas na sua superfície. Neste mesmo período, as pastilhas de titânio tratadas com NTC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol), HY 1% ou NTC + HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HY) apresentaram, em sua superfície, uma maior deposição de partículas em comparação com as pastilhas de titânio não-tratadas (Fig. 16). Já as pastilhas tratadas com NTC-HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol) apresentaram, aos 28 dias, maior quantidade de partículas que as demais pastilhas tratadas. Além disso, o aspecto morfológico de suas partículas sugeriu uma organização estrutural sob a forma de cristais (Fig. 16). Os substratos de silício, utilizados como controles negativos, não apresentaram deposição de partículas após 14 e 28 dias de imersão (dados não mostrados).

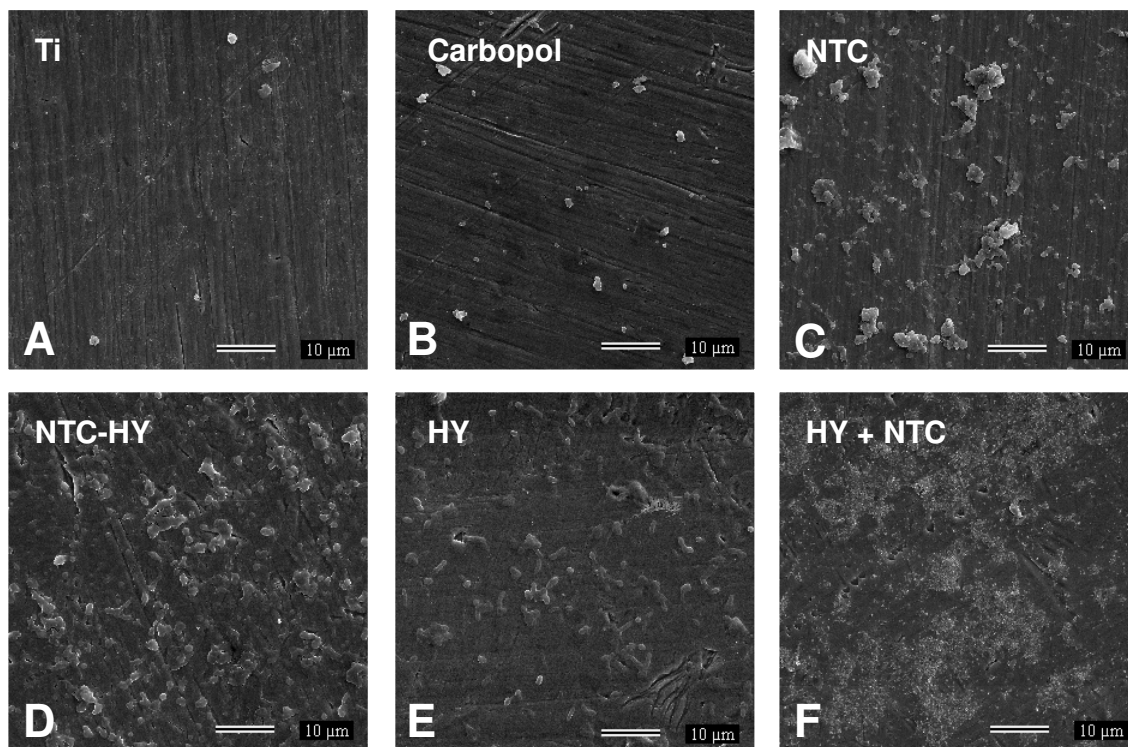


Figura 15: Análise com auxílio de MEV (elétrons secundários) da deposição de cristais inorgânicos nas pastilhas de titânio após 14 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 . As pastilhas cobertas com (C) NTC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol), (E) HY 1% ou (F) NTC + HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HY) apresentaram maior deposição de partículas em relação às de (A) titânio não-tratadas e às cobertas com (B) carbopol. Entretanto, as partículas tratadas com (D) NTC-HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol) apresentaram deposição mais exacerbada de partículas em relação às demais pastilhas tratadas. Três experimentos por período.

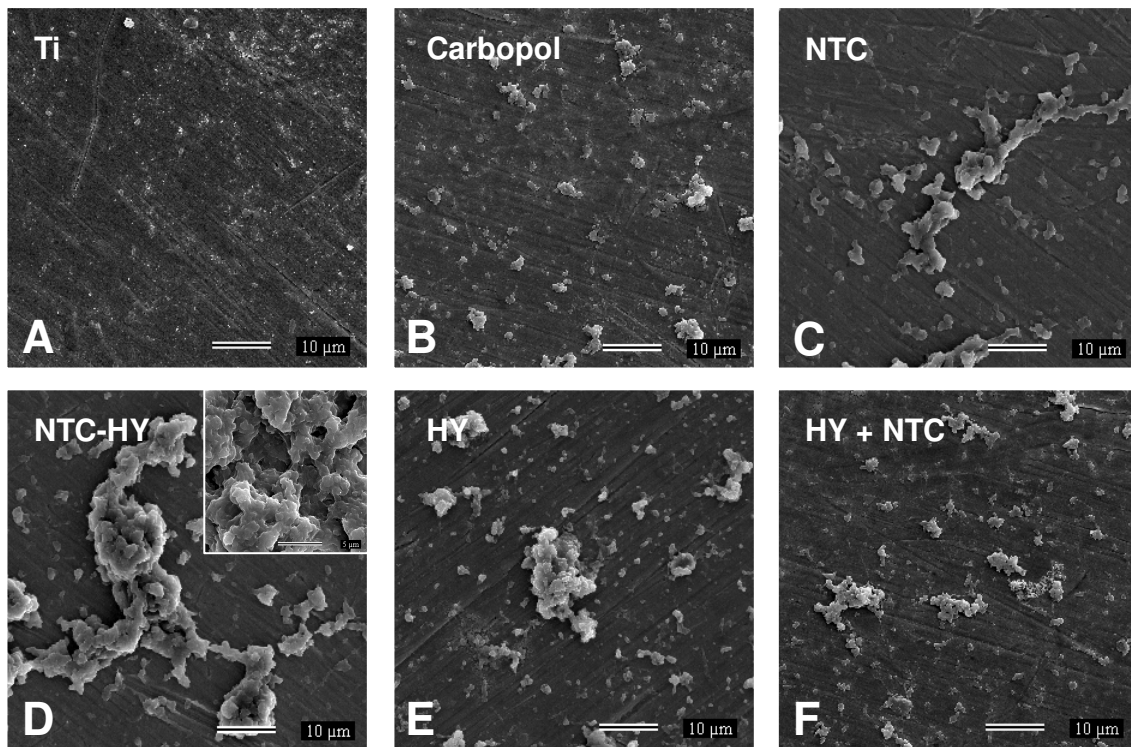


Figura 16: Análise com auxílio de MEV (elétrons secundários) da deposição de cristais inorgânicos nas pastilhas de titânio após 28 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 . As pastilhas de (A) titânio não-tratadas e as cobertas com (B) carbopol apresentaram pequena deposição de partículas. No mesmo período de tempo, as pastilhas cobertas com (C) NTC (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol), (E) HY 1% ou (F) NTC + HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de HY) apresentaram uma maior deposição de partículas em relação às de titânio não-tratadas. Entretanto, as partículas tratadas com (D) NTC-HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol) apresentaram grande deposição de partículas quando comparadas com os demais tratamentos e com grau de organização sugerindo a formação de cristais (D - detalhe). Três experimentos por período.

5.2 Análise em MEV por meio de elétrons retro-espalhados

Os resultados obtidos demonstram que existem diferentes fases ou grupamentos químicos representados por pontos escuros de diferentes intensidades nas imagens de MEV. Observa-se uma alta intensidade dos pontos escuros nas pastilhas cobertas com NTC-HY (100 µg/mL de carbopol), após 14 e 28 dias de imersão na solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 , em relação às demais partículas (Figs. 17 e 18). A maior quantidade de fases neste grupo experimental sugere que o tratamento das pastilhas com NTC-HY (100 µg/mL) induziu um aumento da precipitação de partículas inorgânicas (Figs. 17 e 18).

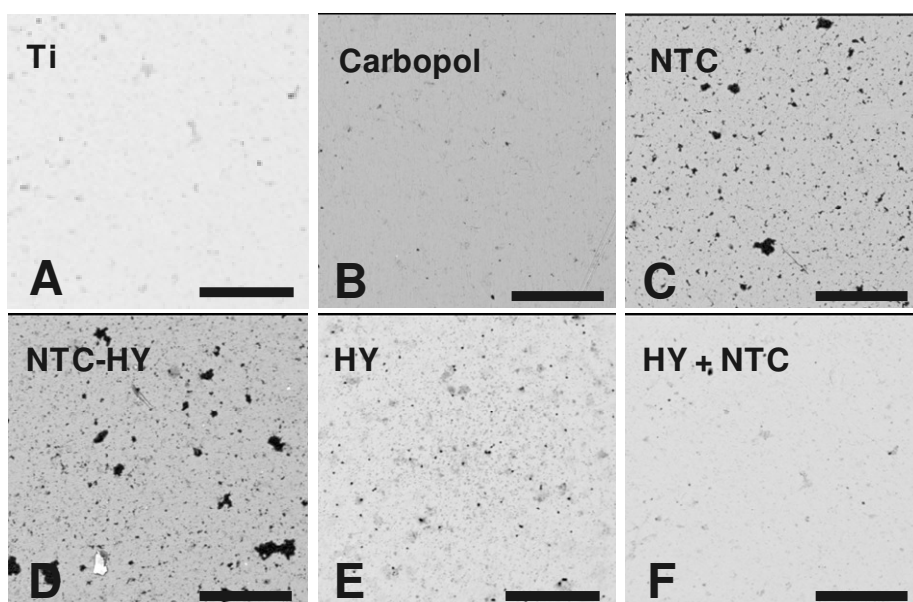


Figura 17: Análise em MEV por meio de elétrons retro-espalhados após 14 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 . As pastilhas tratadas com NTC-HY (100 µg/mL de carbopol) apresentaram aglomerados mais intensos que os demais tratamentos. Os pontos escuros observados demonstram que existem diferentes fases ou grupamentos químicos. Barra = 150µm.

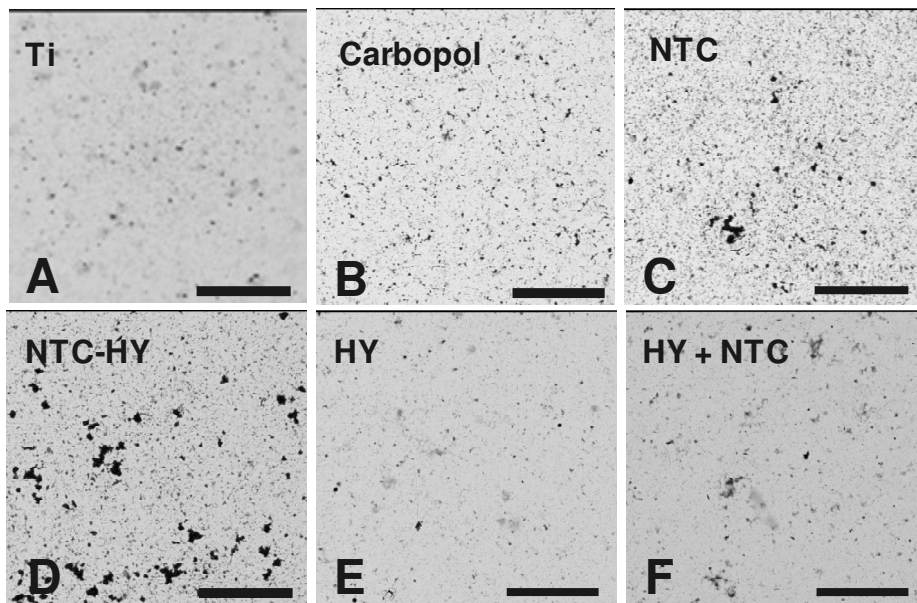


Figura 18: Análise em MEV por meio de elétrons retro-espalhados após 28 dias de imersão em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 . De forma semelhante ao observado aos 14 dias, as pastilhas tratadas com NTC-HY (100 $\mu\text{g/mL}$ de carbopol) apresentaram maior quantidade de fases ou grupamentos químicos. Barra = 150 μm .

5.3 Análise da composição química das partículas por meio de energia dispersiva de raios-X

Os espectros obtidos a partir das pastilhas de titânio não-tratadas demonstraram que as partículas depositadas sobre as pastilhas apresentavam apenas íons cálcio após 14 e 28 dias (Figs. 19A e 20A). As partículas depositadas sobre as pastilhas tratadas com HY 1%, NTC (100 µg/mL de carbopol), NTC-HY (100 µg/mL de carbopol) ou NTC + HY (100 µg/mL de HY) apresentaram, por sua vez, aos 14 dias, deposição dos íons cálcio e fósforo (NTC-HY 100 µg/mL de carbopol, Fig. 19B). Após 28 dias, observou-se a presença dos íons cálcio, sódio e fósforo nas pastilhas tratadas com HY, NTC, NTC-HY ou NTC + HY, sendo que esta deposição foi mais exacerbada nas pastilhas tratadas com NTC-HY (NTC-HY 100 µg/mL de carbopol, Fig. 20B). A presença destes íons, aliada à organização estrutural sob a forma de cristais, observada nas partículas depositadas sobre as pastilhas tratadas com NTC-HY (100 µg/mL de carbopol), pode indicar a presença de grupamentos químicos de fosfatos, carbonatos ou hidroxiapatita. Este fenômeno é similar à mineralização observada durante o processo biológico de osseointegração de implantes dentários de titânio. A presença de picos exacerbados de titânio foi devida à composição da pastilha. Os íons de carbono observados nos espectros são oriundos da deposição de carbono durante a preparação das amostras, enquanto que o oxigênio pode ter sido incorporado através de oxidação.

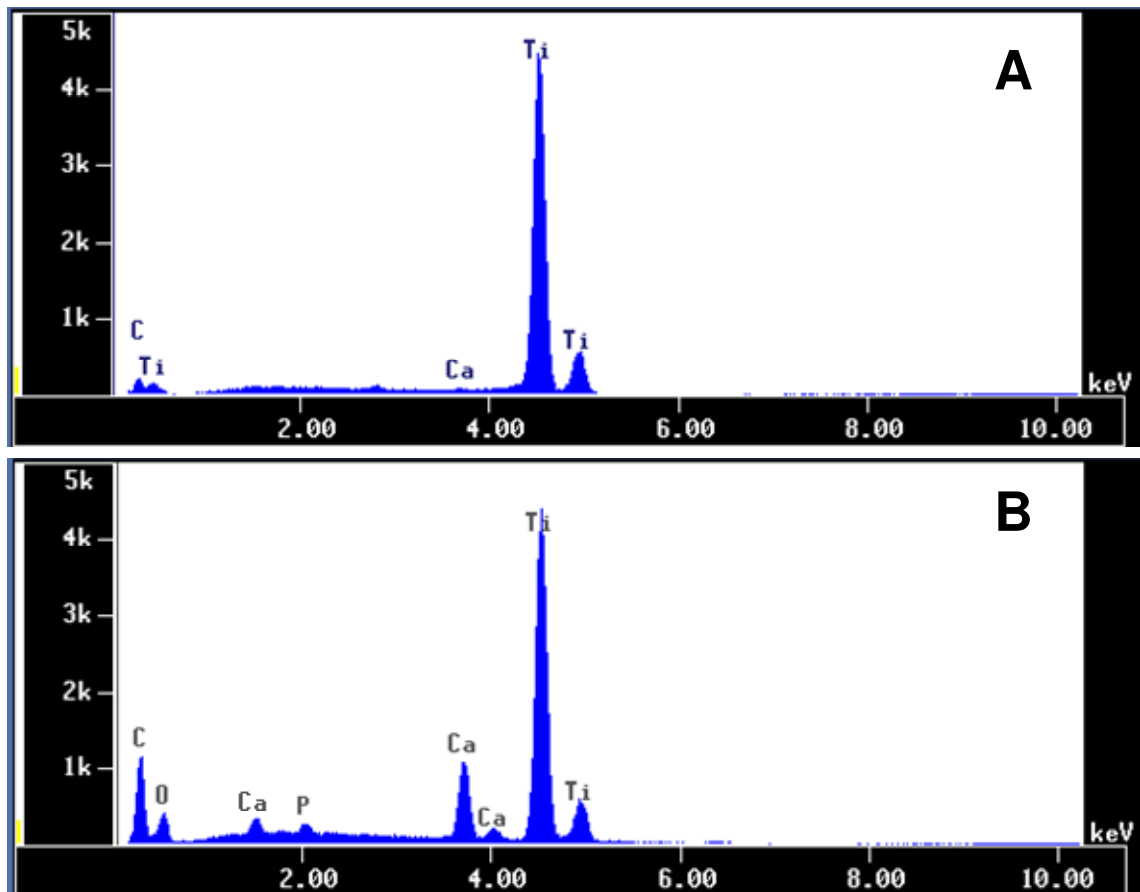


Figura 19: Espectros representativos obtidos por meio de energia dispersiva de raios-X após análise das partículas presentes sobre as pastilhas imersas em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 por 14 dias. (A) Pastilha de titânio não-tratada e (B) pastilha tratada com NTC-HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol). As partículas observadas sobre as pastilhas tratadas com NTC-HY apresentavam íons cálcio e fósforo indicando maior complexidade em relação às partículas observadas sobre as pastilhas de titânio não-tratadas que apresentavam apenas íons cálcio. C: carbono; Ca: cálcio; O: oxigênio; P: fósforo; Ti: titânio.

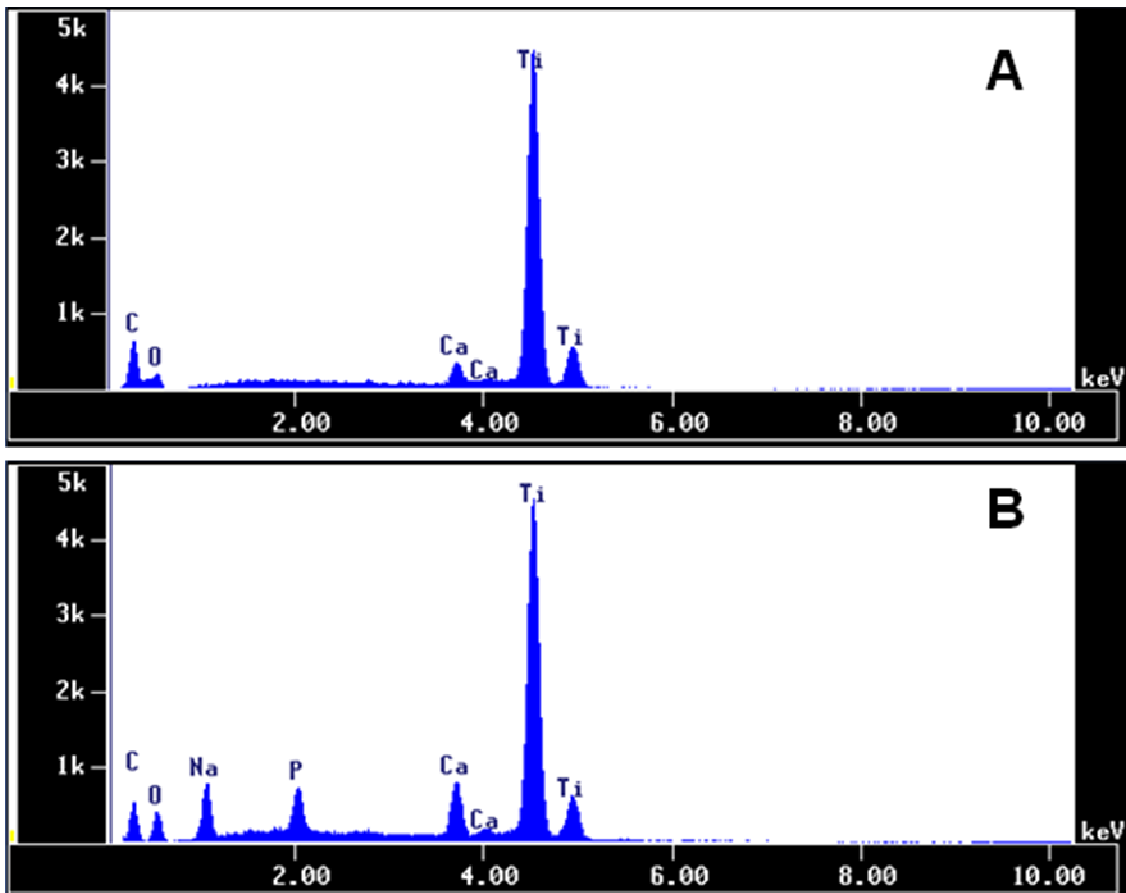


Figura 20: Espectros representativos obtidos por meio de energia dispersiva de raios-X após análise das partículas presentes sobre as pastilhas imersas em uma solução aquosa subsaturada de CaCl_2 e Na_2HPO_4 por 28 dias. (A) Pastilha de titânio não-tratada e (B) pastilha tratada com NTC-HY (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbopol). As partículas observadas nas pastilhas tratadas com NTC-HY apresentavam íons cálcio, sódio e fósforo, podendo indicar a presença de grupamentos químicos de fosfatos, carbonatos ou hidroxiapatita. C: carbono; Ca: cálcio; Na: sódio; O: oxigênio; P: fósforo; Ti: titânio.

6. Análise do comportamento de osteoblastos cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY e sobre placas de cultura com meio DMEM contendo NTC ou NTC-HY

Análises em microscopia de luz demonstraram que osteoblastos isolados cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY ou sobre placas de cultura com meio DMEM contendo NTC ou NTC-HY, adicionados na cultura imediatamente após o plaqueamento dos osteoblastos ou duas horas após, apresentam em concentrações mais altas de NTC e de NTC-HY (100-400µg/mL) morte celular. Por outro lado, a presença de NTC e de NTC-HY em concentrações mais baixas (3,125-50µg/mL) parece induzir uma discreta diminuição na quantidade de osteoblastos (Fig. 21).

Análises por MTT em osteoblastos isolados cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY ou sobre placas de cultura com meio DMEN contendo NTC ou NTC-HY, adicionados na cultura imediatamente após o plaqueamento dos osteoblastos ou duas horas após, revelaram que não houve formação de cristais de formazan em concentrações mais altas de NTC e de NTC-HY, enquanto concentrações mais baixas de NTC e de NTC-HY (3,125-50µg/mL) induziram uma pequena diminuição na quantidade de cristais, apresentando, portanto, discreta diminuição da viabilidade celular quando comparado ao controle (Fig. 22).

Análises da atividade da fosfatase alcalina mensurada em osteoblastos isolados cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY ou sobre placas de cultura com meio DMEN contendo NTC ou NTC-HY, adicionados na cultura imediatamente após o plaqueamento dos osteoblastos ou duas horas após, demonstraram que os NTC e os NTC-HY em diversas concentrações

(3,125-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aparentemente não interferiram na atividade desta enzima (Fig. 23).

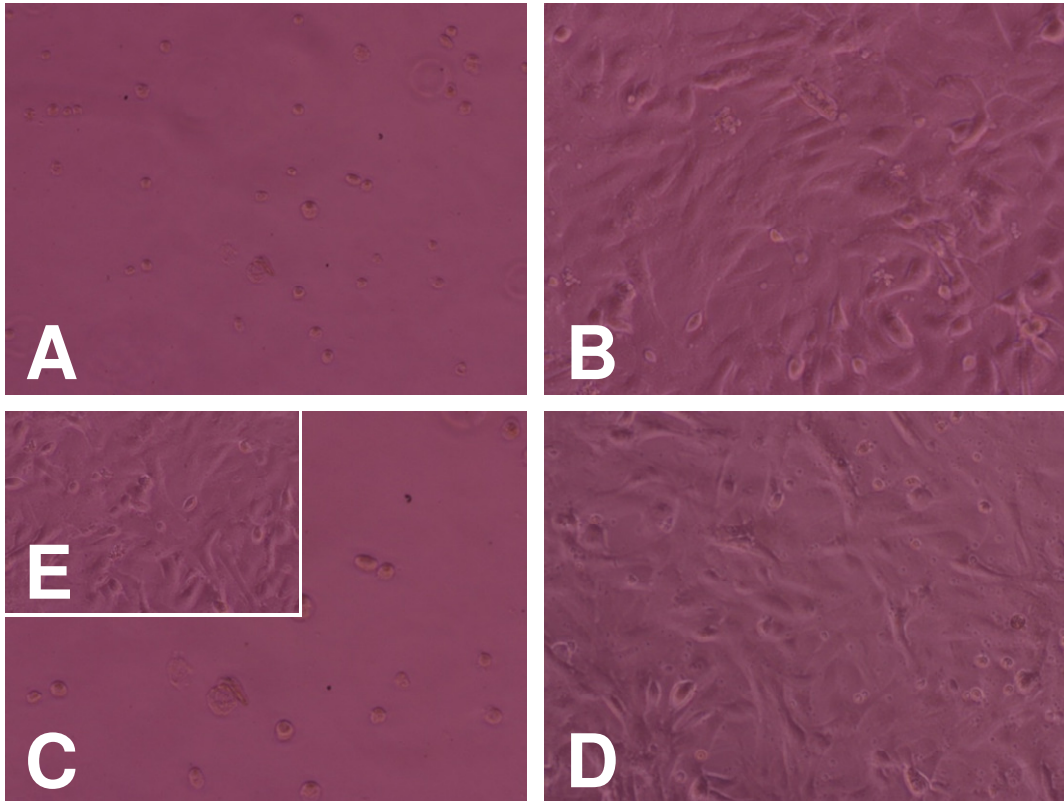


Figura 21: Fotomicrografias representativas de culturas de osteoblastos isolados. (A) NTC 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (B) NTC 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (C) NTC-HY 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (D) NTC-HY 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (E) Controle positivo. Osteoblastos cultivados em concentrações mais altas de NTC e NTC-HY apresentaram morte celular. A presença de NTC ou NTC-HY em concentrações mais baixas parece induzir uma discreta diminuição na quantidade de osteoblastos.

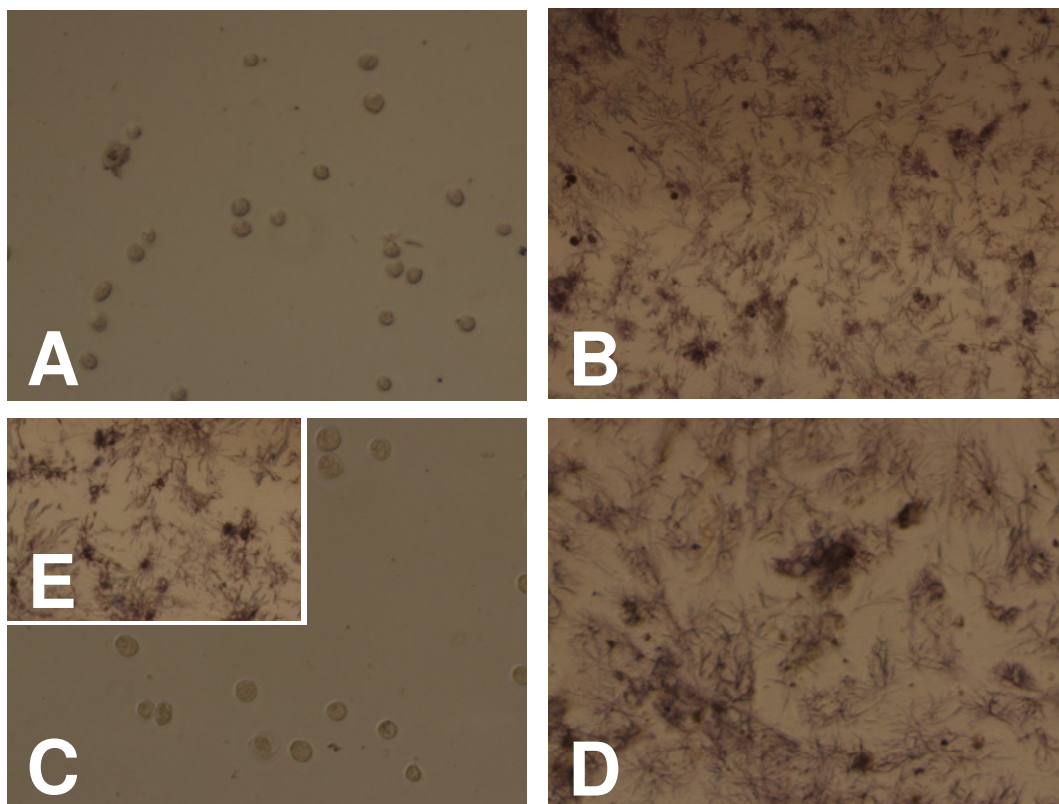


Figura 22: Fotomicrografias representativas da análise por MTT de culturas de osteoblastos isolados. (A) NTC 400 $\mu\text{g/mL}$; (B) NTC 25 $\mu\text{g/mL}$; (C) NTC-HY 400 $\mu\text{g/mL}$; (D) NTC-HY 25 $\mu\text{g/mL}$; (E) Controle positivo. Não houve formação de cristais de formazan em concentrações mais altas de NTC e NTC-HY, enquanto concentrações mais baixas de NTC e NTC-HY induziram uma pequena diminuição na quantidade de cristais quando comparado ao controle.

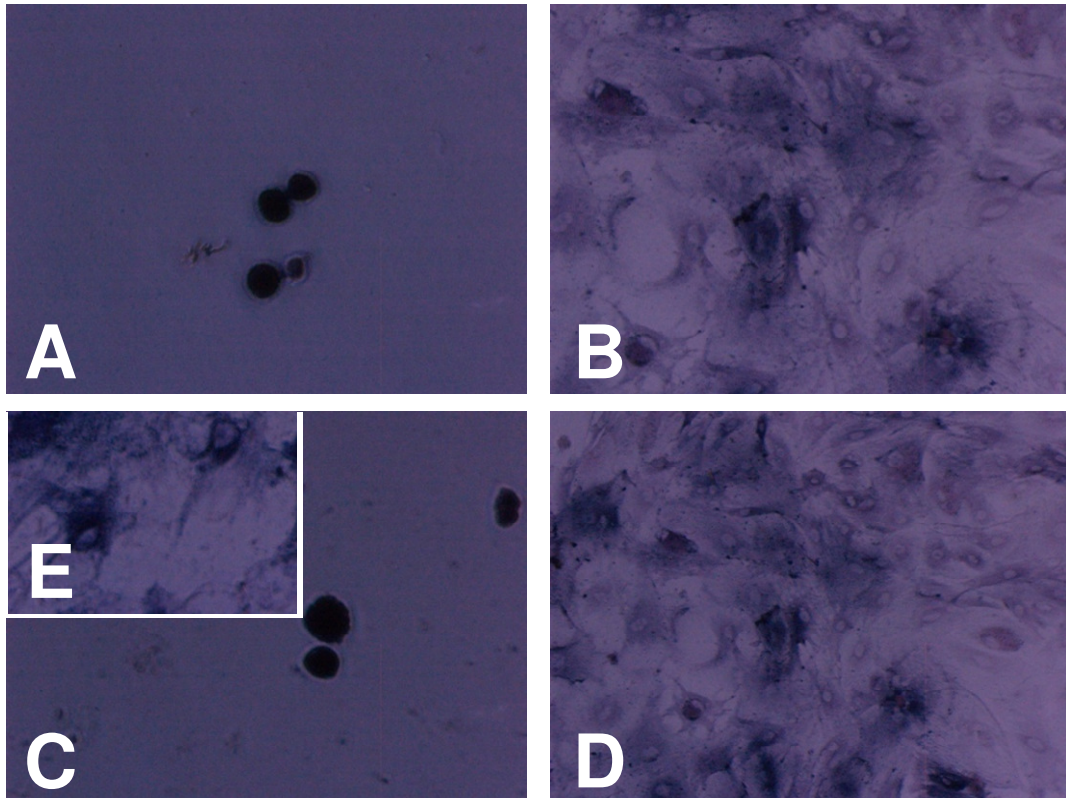


Figura 23: Fotomicrografias representativas da atividade da fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos isolados. (A) NTC 400 $\mu\text{g/mL}$; (B) NTC 25 $\mu\text{g/mL}$; (C) NTC-HY 400 $\mu\text{g/mL}$; (D) NTC-HY 25 $\mu\text{g/mL}$; (E) Controle positivo. Osteoblastos cultivados em concentrações mais altas de NTC e NTC-HY apresentaram morte celular. Concentrações mais baixas de NTC e NTC-HY aparentemente não interferiram na atividade da fosfatase alcalina.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi avaliar se o biomaterial (NTC-HY) preserva a bioatividade do HY. Para isto, foram utilizados alvéolos de extração dentária como modelo de estudo, uma vez que possibilita avaliar diferentes fatores que interferem no processo de reparo ósseo alveolar, acelerando-o ou retardando-o (Boeck *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2001; Kurihashi *et al.*, 2002; Yugoshi *et al.*, 2002; Kanyama *et al.*, 2003; Teófilo, *et al.*, 2004; Zied *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2008).

A interação entre os NTC e o HY foi demonstrada num estudo anterior, por Bhattacharyya e colaboradores. Observou-se que a associação entre os NTC e o HY resultou em um biomaterial com melhores propriedades mecânico-dinâmicas quando comparado com o HY sozinho (Bhattacharyya *et al.*, 2008). Entretanto, estes autores não avaliaram as propriedades biológicas dos NTC-HY.

Neste estudo foram analisados os efeitos dos NTC e NTC-HY no reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos, na deposição de cristais inorgânicos no titânio e no comportamento de osteoblastos em cultura celular. De maneira importante, a funcionalização de NTC com HY (NTC-HY) preservou os efeitos biológicos benéficos do HY no processo de cicatrização. Observou-se que, de forma semelhante ao HY 1%, os NTC-HY (100 µg/mL) induziram um aumento significativo na deposição de trabéculas ósseas e na expressão de colágeno tipo I em alvéolos sete dias após as exodontias. Desta forma, os NTC-HY aceleram o processo cicatricial de maneira semelhante ao observado com o tratamento com o HY (Mendes *et al.*, 2008). Além disso, pastilhas de titânio tratadas com NTC-HY (100 µg/mL) tiveram uma maior deposição de cristais inorgânicos em relação às pastilhas controle e às tratadas apenas com HY quando imersas em uma solução

aquosa subsaturada contendo CaCl_2 0,5mM e Na_2HPO_4 0,25mM. Observou-se, também, que NTC e NTC-HY em altas concentrações (100-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induzem morte celular de osteoblastos isolados. Entretanto, NTC e NTC-HY em concentrações mais baixas (3,125-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) causaram apenas uma discreta diminuição na quantidade e viabilidade de osteoblastos e nenhuma alteração na atividade da fosfatase alcalina.

O reparo ósseo alveolar observado nos alvéolos controle, aos sete dias de cicatrização, foi semelhante ao relatado na literatura. Os alvéolos controle encontravam-se preenchidos por tecido conjuntivo, exibindo poucas trabéculas ósseas depositadas e pronunciada rede vascular (Mendes *et al.*, 2008). A formação dos vasos sanguíneos é fundamental para o início da deposição óssea (Kanyama *et al.*, 2003; Giavaresi *et al.*, 2005; Wong & Rabie, 2005). Uma vez que o suporte sanguíneo é restabelecido, observa-se migração, diferenciação e proliferação de osteoblastos, além de síntese de matriz óssea (Pacicca *et al.*, 2003; Lalani *et al.*, 2005). A presença de células com aspecto morfológico de osteoblastos, próximas a vasos sanguíneos ou de remanescentes do LP, corrobora com relatos que indicam que osteoblastos possam ser derivados do LP, perióstio ou de vasos sanguíneos (Lekic *et al.*, 1997; Shyng *et al.*, 1999; Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Devlin & Sloan, 2002; Yugoshi *et al.*, 2002; Rasubala *et al.*, 2004). Osteoclastos visualizados nos septos ósseos são responsáveis pela remodelação óssea, uma importante etapa do processo de cicatrização alveolar (Lindhe, 1999; Shyng *et al.*, 1999; Kurihashi *et al.*, 2002).

O hialuronato de sódio, na concentração de 1%, apresenta-se como um gel, devido à sua alta capacidade higroscópica. O carbopol foi utilizado como controle e veículo por apresentar consistência semelhante à do HY. Em um

estudo prévio demonstramos que o carbopol não interfere na cicatrização de alvéolos dentários de ratos (Mendes *et al.*, 2008).

A utilização dos NTC em aplicações clínicas depende de estudos que avaliem sua interação biológica (Flahaut *et al.*, 2006). De fato, muitos trabalhos foram desenvolvidos para avaliar a toxicidade dos NTC. NTCPS não causaram citotoxicidade quando adicionados a culturas de fibroblastos (Galvan-Garcia *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2007), osteoblastos (Tutak *et al.*, 2009) ou de células endoteliais (Flahaut *et al.*, 2006). Entretanto, nossos resultados indicam que, em altas concentrações, os NTC e os NTC-HY podem causar morte celular. É importante ressaltar que os nossos estudos usando osteoblastos isolados são preliminares. Por outro lado, estudos *in vivo* demonstraram ausência de toxicidade dos NTCPS em mamíferos (Cherukuri *et al.*, 2006). Corroborando com esses dados, nossos resultados também não mostraram nenhuma evidência significativa de toxicidade em alvéolos tratados com NTCPS. Além disso, NTCPS (50, 100 e 400 µg/mL) não influenciaram o processo de reparo ósseo 7 dias após as exodontias, indicando que os NTCPS são um material inerte. Entretanto, estudos mais aprofundados de citotoxicidade e biodistribuição dos NTC devem ser realizados com o objetivo de estabelecer a segurança deste material em aplicações biológicas humanas.

Análises histológica e morfométrica demonstraram que os alvéolos tratados com HY 1% ou NTC-HY (100 µg/mL) apresentaram maior deposição de trabéculas ósseas sete dias após as exodontias, indicando uma cicatrização mais acelerada em relação aos alvéolos controle. Uma vez iniciada a deposição de matriz orgânica pelos osteoblastos, observa-se a substituição do tecido conjuntivo por trabéculas ósseas. Com isso, o processo de reparo ósseo resulta numa diminuição tempo-dependente do número de núcleos celulares (Brandão *et al.*,

2002; Mendes *et al.*, 2008). Neste sentido, o menor número de núcleos celulares observado nos alvéolos tratados com HY 1% ou NTC-HY (100 µg/mL) também indica um processo de cicatrização mais avançado. Alvéolos tratados com NTC-HY nas concentrações de 50 e 400 µg/mL apresentaram cicatrização semelhante aos alvéolos controle. Enquanto a concentração de 50 µg/mL pode ter sido insuficiente para influenciar o processo de cicatrização em alvéolos, a alta concentração de NTC-HY (400 µg/mL) pode ter funcionado como uma barreira física dificultando a migração e proliferação celular. No entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

Os eventos celulares envolvidos no processo de cicatrização alveolar são regulados por fatores de crescimento (Shyng *et al.*, 1999; Teófilo *et al.*, 2001; Lieberman *et al.*, 2002; Lalani *et al.*, 2005). Em um estudo anterior, verificamos que o HY 1% acelera o processo de cicatrização em alvéolos dentários de ratos por estimular a deposição precoce de trabéculas ósseas, além da expressão das proteínas osteogênicas OPN e BMP-2 (Mendes *et al.*, 2008). No presente estudo, avaliamos a expressão, através de imunohistoquímica, dos colágenos tipos I e III nos alvéolos controle e tratados com NTC (100 µg/mL), HY 1% ou NTC-HY (100 µg/mL) após sete dias de cicatrização. Nas fases iniciais de cicatrização, após extração dentária, observa-se um aumento da expressão de colágeno tipo III (Kurita *et al.*, 1985). O colágeno tipo III é produzido transitoriamente durante a neoformação e remodelação do tecido ósseo bucal, desaparecendo com a calcificação da matriz. Portanto, sua expressão é correlacionada ao início da deposição de matriz óssea (Becker *et al.*, 1986; Carter *et al.*, 1991). Uma vez que ocorre a mineralização da matriz, o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I que corresponde a mais de 90% da matriz óssea (Page *et al.*, 1986; Carter

et al., 1991; Stoffel *et al.*, 2007). Assim, cada tipo de colágeno apresenta um modelo de distribuição distinto, podendo ser associado a diferentes estágios de diferenciação osteogênica (Becker *et al.*, 1986; Carter *et al.*, 1991). No presente estudo não foi observada diferença significativa na expressão do colágeno tipo III entre os alvéolos controle e tratados. Entretanto, verificou-se uma maior expressão do colágeno tipo I nos alvéolos tratados com HY 1% ou NTC-HY (100 µg/mL) em relação aos alvéolos controle. Uma vez que a expressão do colágeno tipo I está associada à mineralização da matriz, estes resultados também sugerem uma cicatrização mais acelerada nestes alvéolos.

Estudos anteriores demonstraram que os NTC são capazes de induzir nucleação e crescimento de cristais de hidroxiapatita sob concentrações fisiológicas de cálcio e fosfato (Zhao *et al.*, 2005). A interação de NTC com materiais de preenchimento poliméricos melhora suas propriedades mecânicas e reológicas (Abarrategi *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Sitharaman *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009) e acentua a capacidade dos polímeros de induzir mineralização (Silva *et al.*, 2009). Da mesma forma, no presente estudo verificou-se que NTC-HY (100 µg/mL) induziram um aumento da deposição de partículas sobre pastilhas de titânio após imersão numa solução aquosa subsaturada contendo CaCl_2 0,5mM e Na_2HPO_4 0,25mM quando comparado com as pastilhas controle ou tratadas apenas com HY 1%. Este efeito pode ter um papel relevante no processo de osseointegração do titânio.

Desta forma, nossos resultados demonstraram que os NTC-HY (100 µg/mL) preservaram as propriedades biológicas benéficas do HY no processo de cicatrização em alvéolos dentários de ratos. Estes efeitos foram similares aos resultados obtidos com o uso do HY sozinho. Entretanto, os experimentos com

pastilhas de titânio mostraram que os NTC-HY (100 µg/mL) apresentam maior potencial indutor de deposição de cristais inorgânicos do que o HY. Assim, sua utilização associados a implantes dentários poderia acelerar a osseointegração dos implantes.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

1. O tratamento dos alvéolos com NTCPS (50-400 µg/mL) não alterou o processo de cicatrização, sete dias após as exodontias, em relação aos alvéolos controle.
2. NTC-HY (100 µg/mL) aceleraram o processo de reparo ósseo dos alvéolos, sete dias após as exodontias, em relação aos alvéolos controle, de forma semelhante aos alvéolos tratados com HY 1%.
3. A funcionalização de NTC com HY permitiu o carreamento do HY, preservando o efeito biológico desta molécula.
4. O tratamento de pastilhas de titânio com NTC-HY (100 µg/mL) induziu uma maior deposição de cristais na superfície das pastilhas quando comparado com as pastilhas controle ou tratadas com HY ou NTC.
5. Osteoblastos isolados cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY (100-400µg/mL), ou sobre placas de cultura com meio DMEN contendo NTC ou NTC-HY (100-400µg/mL) apresentaram morte celular.
6. Osteoblastos isolados cultivados sobre pastilhas de titânio tratadas com NTC ou NTC-HY (3,125-50µg/mL), ou sobre placas de cultura com meio DMEN contendo NTC ou NTC-HY (3,125-50µg/mL) apresentaram discreta diminuição na viabilidade celular e nenhuma alteração na atividade da fosfatase alcalina.

Assim, estes resultados indicam que os NTC-HY (100 µg/mL) aceleram a cicatrização de forma semelhante ao HY quando utilizados em terapias de reparo ósseo. Além disso, os NTC-HY (100 µg/mL) induziram uma maior deposição de cristais em pastilhas de titânio, sugerindo que este biomaterial poderia ser usado com um agente coadjuvante no reparo ósseo peri-implantar. Desta forma, matrizes à base de NTC-HY são biomateriais promissores na engenharia de reconstrução tecidual óssea.

REFERÊNCIAS

VII. REFERÊNCIAS

1. Abarrategi A, Gutiérrez MC, Moreno-Vicente C, Hortigüela MJ, Ramos V, López-Lacomba JL, Ferrer ML, del Monte F. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials*, 29, 94-102, 2008.
2. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark P-I. A 15- year study of osseointegrated implants in the edentulous jaw. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 10, 387-416, 1981.
3. Ågren UM, Tammi RH, Tammi MI. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radical Biology & Medicine*, 23, 996-1001, 1997.
4. Ajayan PM. Nanotubes from Carbon. *Chemical Reviews*, 99, 1787-99, 1999.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Trad. Veiga ABG. Porto Alegre: Artmed, 4.ed. 1463 p., 2004.
6. Albrektsson T, Dahl E, Enboyn L, Engevall S, Engquist B, Eriksson RA. A multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *Journal of Periodontology*, 59, 287-96, 1988.
7. Annabi B, Thibeault S, Moumdjian R, Béliveau R. Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 21888-96, 2004.
8. Arepalli S, Nikolaev P, Gorelik O, Hadjiev VG. Protocol for the characterization of single-wall carbon nanotube material quality. *Carbon*, 42, 1783-91, 2004.
9. Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngology: Head and Neck Surgery*, 132, 592-7, 2005.
10. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *Journal of Biomaterials Applications*, 20, 209-19, 2006.
11. Bakos D, Soldán M, Hernández-Fuentes I. Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite. *Biomaterials*, 20, 191-5, 1999.
12. Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, Giardino R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, 4503-13, 2002.
13. Becker J, Schuppan D, Benzian H, Bals T, Hahn EG, Cantaluppi C, Reichart P. Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 34, 1417-29, 1986.

14. Bhattacharyya S, Guillot S, Dabboue H, Tranchant J-F, Salvétat J-P. Carbon Nanotubes as Structural Nanofibers for Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. *Biomacromolecules*, 9, 505-9, 2008.
15. Boccaccini AR, Cho J, Roether JA, Thomas BJC, Minay EJ, Shaffer MSP. Electrophoretic deposition of carbon nanotubes - review. *Carbon*, 44, 3149-60, 2006.
16. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Baslé MF, Chappard D. Bone loss and teeth. *Join Bone Spine*, 72, 215-21, 2005.
17. Boeck EM, Pansani CA, Okamoto T, Goissis G, Boeck Neto RJ, Marcantonio Júnior E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais: estudo histopatológico em ratos. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 28, 83-96, 1999.
18. Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker MT. The molecular biology of distraction osteogenesis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 30, 1-11, 2002.
19. Bourguignon LYW, Singleton PA, Zhu H, Zhou B. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor β receptor I in metastatic breast tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, p. 39703-12, 2002.
20. Brandão AC, Brentegani LG, Novaes Jr. AB, Grisi MFM, Souza SLS, Taba Jr. M, Salata LA. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. *Brazilian Dental Journal*, 13, 147-54, 2002.
21. Carter DH, Sloan P, Aaron JE. Immunolocalization of collagen types I and III, tenascin, and fibronectin in intramembranous bone. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 39, 599-606, 1991.
22. Cherukuri P, Gannon CJ, Leeuw TK, Schmidt HK, Smalley RE, Curley SA, Weisman RB. Mammalian pharmacokinetics of carbon nanotubes using intrinsic near-infrared fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 18882-6, 2006.
23. Chłopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon*, 44, 1106-11, 2006.
24. Colnot C, Romero DM, Huang S, Helms JA. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 435, 69-78, 2005.
25. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 13, 163-74, 1998.

26. Cooper LF. A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 84, 522-34, 2000.
27. Correa-Duarte MA, Wagner N, Rojas-Chapana J, Morsczeck C, Thie M, Giersig M. Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Letters*, 4, 2233-6, 2004.
28. David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent J-C, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol J-P. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 274-87, 2008.
29. Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 14, 252-8, 2006.
30. Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B. Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcified Tissue International*, 64, 499-507, 1999.
31. Deschrevel B, Tranchepain F, Vincent J-C. Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase. *Matrix Biology*, 27, 475-86, 2008.
32. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 31, 641-5, 2002.
33. Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Eklund PC. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. Academic Press, San Diego, 1996.
34. Flahaut E, Durrieu MC, Remy-Zolghadri M, Bareille R, Baquey Ch. Investigation of the cytotoxicity of CCVD carbon nanotubes towards human umbilical vein endothelial cells. *Carbon*, 44, 1093-9, 2006.
35. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242, 27-33, 1997.
36. Galvan-Garcia P, Keefer EW, Yang F, Zhang M, Fang S, Zakhidov AA, Baughman RH, Romero MI. Robust cell migration and neuronal growth on pristine carbon nanotube sheets and yarns. *Journal of Biomaterial Science*, 18, 1245-61, 2007.
37. Gerdin B, Hällgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 242, 49-55, 1997.
38. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 8875-83, 2005.

39. Giavaresi G, Torricelli P, Fornasari PM, Giardino R, Barbucci R, Leone G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials*, 26, 3001-8, 2005.
40. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R, Facchini A. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff[®]-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*, 22, 2417-24, 2001.
41. Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor. *The Journal of Cell Biology*, 117, 1343-50, 1992.
42. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56-8, 1991.
43. Itoh S, Matubara M, Kawauchi T, Nakamura H, Yukitake S, Ichinose S, Shinomiya K. Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12, 575-81, 2001.
44. Izuka T, Häfliger J, Seto I, Rahal A, Mericske-Stern R, Smolka K. Oral rehabilitation after mandibular reconstruction using an osteocutaneous fibula free flap with endosseous implants - factors affecting the functional outcome in patients with oral cancer. *Clinical of Oral Implants Research*, 16, 69-79, 2005.
45. Jorio A, Pimenta MA, Souza AG, Saito R., Dresselhaus G, Dresselhaus M S. Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. *New Journal of Physics*, 5, 139, 2003.
46. Juhlin L. Hyaluronan in skin. *Journal of Internal Medicine*, 242, 61-6, 1997.
47. Kanyama M, Kuboki T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, Kubota S, Nakanishi T, Takigawa M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of Oral Biology*, 48, 723-30, 2003.
48. Kappler J, Hegener O, Baader SL, Franken S, Gieselmann V, Häberlein H, Rauch U. Transport of a hyaluronan-binding protein in brain tissue. *Matrix Biology*, 28, 396-405, 2009.
49. Kurihashi T, Iwata H, Nasu M. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after x-ray irradiation. *Odontology*, 90, 35-42, 2002.
50. Kurita K, Hashimoto Y, Takei T, Kawai T, Hayakawa T. Changes in Collagen Types During the Healing of Rabbit Tooth Extraction Wounds. *Journal of Dental Research*, 64, 28-32, 1985.
51. Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ, Miller MJ, Johnston C, Montufar-Solis D. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 63, 1500-8, 2005.

52. Lamano Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Brazilian Dental Journal*, 8, 9-12, 1997.
53. Lekic P, Rubbino I, Krasnoshtein F, Cheifetz S, McCulloch CAG, Tenenbaum H. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *The Anatomical Record*, 247, 329-40, 1997.
54. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 26967-75, 2000.
55. Lesley J, Gál I, Mahoney DJ, Cordell MR, Rugg MS, Hyman R, Day AJ, Mikecz K. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 25745-54, 2004.
56. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 84, 1032-44, 2002.
57. LINDHE, Jan. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro: 3. ed., 720 p., 1999.
58. Linker A, Meyer K, Weissmann B. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. *The Journal of Biological Chemistry*, 213, 237-48, 1955.
59. Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Toneguzzi S, Facchini A. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. *Biomaterials*, 23, 1043-51, 2002.
60. Liu L, Thompson AY, Heidaran MA, Poser JW, Spiro RC. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials*, 20, 1097-108, 1999.
61. MacDonald RA, Laurenzi BF, Viswanathan G, Ajayan PM, Stegemann JP. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *The Journal of Biomedical Materials Research*, 74A, 489-96, 2005.
62. Matsumoto K, Sato C, Naka Y, Kitazawa A, Whitby RLD, Shimizu N. Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 216-20, 2007.
63. Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB, Ferreira AJ. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology*, 53, 1155-62, 2008.
64. Mendes RM, Silva GAB, Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences*, 87, 215-22, 2010.

65. Meneghim MC, Pereira AC, Silva FRB. Prevalência de cárie radicular e condição periodontal em uma população idosa institucionalizada de Piracicaba - SP. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 16, 50-6, 2002.
66. Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*, 107, 629-34, 1934.
67. Ministério da Saúde. *Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais*. Brasília: Ministério da Saúde, 68 p., 2005.
68. Moseley R, Leaver M, Walker M, Waddington RJ, Parsons D, Chen WYJ, Embery G. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF[®]-11p75, AQUACEL[®] and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. *Biomaterials*, 23, 2255-64, 2002.
69. Nedvetzki S, Gonen E, Assayag N, Reich R, Willians RO, Thurmond RL, Huang J, Neudecker BA, Wang F, Turley EA, Naor D. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 18081-6, 2004.
70. Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone*, 33, 889-98, 2003.
71. Page M, Hogg J, Ashhurst DE. The effects of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fracture healing. *Histochemical Journal*, 18, 251-65, 1986.
72. Paransky YM, Berner AI, Gotman IY, Gutmanas EY. Phase Recognition in AlN-Ti System by Energy Dispersive Spectroscopy and Electron Backscatter Diffraction. *Microchimica Acta*, 134, 171-7, 2000.
73. Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C, Raimondo S, Penna C, Geuna S, Pagliaro P, Freyrie A, Stella A, Calderera C M, Muscari C. Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. *Journal of Anatomy*, 213, 520-30, 2008.
74. Perrien DS, Brown EC, Aronson J, Skinner RA, Montague DC, Badger TM, Lumpkin Jr. CK. Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50, 567-74, 2002.
75. Piloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. *Cell and Tissue Research*, 294, 323-33, 1998.
76. Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats – a histological study. *Brazilian Dental Journal*, 12, 3-9, 2001.

77. Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, Salzano S, Di Meglio F, Sbordone L, Vitale M, Rossi G. Behavior of SaOS-2 Cells Cultured on Different Titanium Surfaces. *Journal of Dental Research*, 82, 692-6, 2003.
78. Price RL, Haberstroh KM, Webster TJ. Improved osteoblast viability in the presence of smaller nanometer dimensioned carbon fibres. *Nanotechnology*, 15, 892-900, 2004.
79. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BCM Musculoskeletal Disorders*, 5, 12, 2004.
80. Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AAS, Nagata K, Lijima T, Ohishi A. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42, 315-22, 2004.
81. Riccardis ACD, Merli PG, Nacucchi M, Tapfer L. Theoretical Simulation of backscattered electron images of Si/Si_3N_4 structures with a scanning electron microscope. *Mikrochimica Acta*, 261-6, 1994.
82. Rügheimer L, Olerud J, Johnsson C, Takahashi T, Shimizu K, Hansell P. Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *Matrix Biology*, 28, 390-5, 2009.
83. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, 16, 9-15, 1995.
84. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, Delisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 36770-8, 2001.
85. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, Zaharias R, Seabold D, Keller J. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *Journal of Dental Research*, 82, 372-6, 2003.
86. Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rödel F, Wehrhan F, Amann K, Kopp J, Thorwarth M, Nkenke E, Grabenbauer G. Expression of bone morphogenetic protein 2/4, transforming growth factor- β_1 , and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 61, 1189-96, 2005.
87. Shi X, Sitharaman B, Pham QP, Spicer PP, Hudson JL, Wilson LJ, Tour JM, Raphael RM, Mikos AG. In vitro cytotoxicity of single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 813-23, 2007.
88. Shyng YC, Devlin H, Riccardi D, Sloan P. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Archives of Oral Biology*, 44, 751-7, 1999.

89. Silva EE, Colleta HHMD, Ferlauto AS, Moreira RL, Resende RR, Oliveira S, Kitten GT, Lacerda RG, Ladeira LO. Nanostructured 3-d collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds. *Nano Research*, 2, 462-73, 2009.
90. Siqueira Jr. JF, Dantas CJS. *Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 238 p., 2000.
91. Sitharaman B, Shi X, Walboomers XF, Liao H, Cuijpers V, Wilson LJ, Mikos AG, Jansen JA. In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone*, 43, 362-70, 2008.
92. Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 41046-59, 2002.
93. Smart SK, Cassady AI, Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*, 44, 1034-47, 2006.
94. Stoffel K, Engler H, Kuster M, Riesen W. Changes in biochemical markers after lower limb fractures. *Clinical Chemistry*, 53, 131-4, 2007.
95. Street J, Bao M, Deguzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, Bruggen NV, Redmond HP, Carano RAD, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9656-61, 2002.
96. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 32259-65, 2003.
97. Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, Heldin P. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 24195-204, 2005.
98. Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Archives of Oral Biology*, 46, 375-79, 2001.
99. Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Archives of Oral Biology*, 49, 755-62, 2004.
100. Terrones M. Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and other emerging applications. *International Materials Reviews*, 49, 325-77, 2004.

101. Toole BP. Hyaluronan in morfogenesis. *Journal of Internal Medicine*, 242, 35-40, 1997.
102. Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease – minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 4593-96, 2002.
103. Trigueiro JPC, Silva GG, Lavall RL, Furtado CA, Oliveira S, Ferlauto AS, Lacerda RG, Ladeira LO, Liu JW, Frost RL, George GA. Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM, and SEM methods. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 3477-86, 2007.
104. Turley EA, Austen L, Vandeligt K, Clary C. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of Ras-transformed cells. *The Journal of Cell Biology*, 112, 1041-7, 1991.
105. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors – minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 4589-92, 2002.
106. Tutak W, Park KH, Vasilov A, Starovoytov V, Fanchini G, Cai S-Q, Partridge NC, Sesti F, Chhowalla M. Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks. *Nanotechnology*, 20, 255101, 2009.
107. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 25, 2941-8, 2004.
108. Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects – an animal experiment. *Clinical Oral Implants Research*, 15, 187-193, 2004.
109. Wong RWK, Rabie ABM. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43, 46-50, 2005.
110. Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Brazilian Dental Journal*, 13, 92-6, 2002.
111. Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes. *Nano Letters*, 6, 562-7, 2006.
112. Zhang S, Chang MCY, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 11342-8, 1998.
113. Zhao B, Hu H, Mandal SK, Haddon RC. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chemistry of Materials*, 17, 3235-41, 2005.

114. Zhou W, Ooi Yh, Russo R, Fischer JE, Papanek P. Structural characterization and diameter-dependent oxidative stability of single wall carbon nanotubes synthesized by the catalytic decomposition of CO. *Chemical Physics Letters*, 350, 6-14, 2001.
115. Zied IC, Milanezi LA, Okamoto T, Okamoto R. Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. *Revista Odontológica de Araçatuba*, 26, 9-13, 2005.

PERSPECTIVAS

VIII. PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de experimentos em cultura celular para obter dados quantitativos.
- Avaliar os efeitos da radiação gama na esterilização dos NTC-HY.
- Realizar análises de toxicidade sistêmica dos NTC e dos NTC-HY.
- Avaliar os efeitos dos NTC e dos NTC-HY no reparo de defeitos ósseos maiores.
- Avaliar os efeitos dos NTC e dos NTC-HY no reparo ósseo em ratos diabéticos.
- Avaliar os efeitos *in vivo* dos NTC e dos NTC-HY na osseointegração do titânio.

ANEXOS

ANEXO 1 - Certificado aprovação CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **142/04** relativo ao projeto intitulado "***Avaliação morfológica e imunohistoquímica do potencial osteoindutor do ácido hialurônico em alvéolos de ratos***", que tem como responsável Gerluza Aparecida Borges Silva, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo ***Comitê de Ética em Experimentação Animal*** (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **15.12.2004**.

Este certificado expira-se em **15.12.2009**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **142/04** related to the project entitled "***Immunohistochemical and morphological evaluation of osteoindutor potential of hyaluronic acid in sockets of rats***", under the supervision Gerluza Aparecida Borges Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation*** (CETEA/UFMG) and was approved in **15.12.2004**.

This certificate expires in **15.12.2009**.

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2004


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil
Telefone: (31) 3499-4031 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)

ANEXO 2 - Certificado aprovação CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 217/2009**, relativo ao projeto intitulado "*Efeitos do hialuronato de sódio e dos nanotubos de carbono funcionalizados ou não com hialuronato de sódio na cicatrização de alvéolos dentários de ratos diabéticos*", que tem como responsável(is) **Anderson José Ferreira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 03/ 2010**.

Este certificado expira-se em **10/ 03/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 217/2009**, related to the project entitled "*Effects of sodium hyaluronate and carbon nanotubes functionalized or not with sodium hyaluronate in the healing process of tooth sockets of diabetic rats*", under the supervisors of **Anderson José Ferreira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 10, 2010**.

This certificate expires in **March 10, 2015**.

Belo Horizonte, 22 de Março de 2010.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod Cert. v1.0)

ANEXO 3 - Produções

3.1 Patente

Os autores Renato de Melo Mendes, Gerluza Aparecida Borges e Silva, Luiz Orlando Ladeira e Anderson José Ferreira depositaram um pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual, denominado **"DISPOSITIVO DE IMPLANTE NO OSSO REVESTIDO POR NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO HIALURÔNICO E USO"**, no dia 04/09/2009, que recebeu o seguinte número de protocolo: 14090004137.



DEPOSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
1.2 CNPJ/CPF: 17217985000104
1.3 Endereço completo: AV. ANTONIO CARLOS, 6627 - PAMPULHA - BELO HORIZONTE -MG
1.4 CEP: 31270-901
1.5 Telefone: (31) 3409-6429 1.6 Fax: (31) 3409-6430
1.7 E-mail: info@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO**

3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):

"DISPOSITIVO DE IMPLANTE NO OSSO REVESTIDO POR NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO HIALURÔNICO E USO"

continua em folha anexa

3.2 Apresentação de trabalho em congressos

Resumo: Efeitos dos nanotubulos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio na cicatrização de alvéolos dentários de ratos, apresentado na *25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*, em 2008, sob a forma de painel.

Resumo: Efeitos dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio no reparo de defeitos ósseos e na osseointegração do titânio, apresentado na *27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*, em 2010, sob a forma de painel, onde recebeu a premiação “Primeiro Lugar” da Sessão de Painéis C - Área 8.

3.3 Artigo Publicado

Mendes RM, Silva GAB, Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences*, 87, 215-22, 2010.