

Vanessa Barbosa Andrade

**EFEITOS DO HIALURONATO DE SÓDIO E DOS NANOTUBOS
DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM HIALURONATO DE
SÓDIO NO REPARO DE TÍBIAS DE RATOS**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - MG

Junho – 2012

Vanessa Barbosa Andrade

**EFEITOS DO HIALURONATO DE SÓDIO E DOS NANOTUBOS
DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM HIALURONATO DE
SÓDIO NO REPARO DE TÍBIAS DE RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

Junho - 2012

043

Andrade, Vanessa Barbosa.

Efeitos do hialuronato de sódio e dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio no reparo de tíbias de ratos [manuscrito] / Vanessa Barbosa Andrade. – 2012.

58 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: Anderson José Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Hialuronato de sódio - Teses. 2. Nanotubos de carbono - Teses. 3. Reparo ósseo. 4. Biologia celular - Teses. I. Ferreira, Anderson José. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.3



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE
VANESSA BARBOSA ANDRADE**

218/2012/10
entrada
2º/2010
2010720746

As quatorze horas do dia 19 de junho de 2012 reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “Efeitos do hialuronato de sódio e dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio no reparo de tíbias de ratos”, requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Anderson José Ferreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADA
Dr. Alfredo Miranda de Góes	UFMG	APROVADA
Dr. Rodrigo Ribeiro Resende	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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 junho de 2012.

Dr. Anderson José Ferreira _____
(orientador)

Dr. Alfredo Miranda de Góes _____

Dr. Rodrigo Ribeiro Resende _____

Cleida Aparecida de Oliveira
Prof. Cleida Aparecida de Oliveira
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

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

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Protozoos do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Contou com o auxílio das seguintes Agências de fomento:

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

Dedico este trabalho aos meus pais João Aldo (*in memoriam*) e Rosa Alice, ao meu irmão Alexandre e ao meu marido Alexandre que são os alicerces da minha vida e as pessoas que eu mais amo neste mundo.

“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar os meus passos;

Ao meu pai que, apesar da distância, sempre estará torcendo por mim;

À minha querida mãe, que exercendo cuidado, proteção e amor, nunca poupou esforços por mim;

Ao meu irmão Alexandre, pelo companheirismo e pelo incalculável estímulo;

Ao meu marido Alexandre, por todo carinho, amor, paciência e compreensão;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, pelos ensinamentos e pela confiança depositada;

Ao Prof. Marcelo Vidigal Caliari, por possibilitar a realização de uma parte deste trabalho em seu laboratório;

Ao Prof. Luiz Orlando Ladeira, por toda a ajuda com a parte dos nanotubos;

Ao Marcos e ao Renato que me acolheram neste universo de pesquisa e ensino;

À toda minha família, em especial às Tias Júlia, Wilma e Maria Ângela;

Às amigas Viviane, Jaqueline e Helga, pelo exemplo de amizade verdadeira;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Cardíaca, pelos momentos de trabalho e amizade;

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, em especial a Prof. Gerluza e o Chico;

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular;

À Diana pela dedicação ao curso de Pós-graduação;

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O hialuronato de sódio (HY) é um polissacarídeo de alto peso molecular que facilita a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. Já os nanotubos de carbono (NTC) podem ser importantes nos processos de reparo tecidual por servirem como sítio de nucleação para a deposição de matriz óssea e proliferação celular. Dessa maneira, o objetivo desse projeto foi avaliar os efeitos do HY e dos nanotubos de paredes simples (NTCPS) e múltiplas (NTCPM) funcionalizados (NTC-HY) ou não com HY no reparo de tíbias de ratos. Os animais foram divididos em seis grupos: (i) controle; (ii) HY (1%); (iii) NTCPS (100 µg/mL); (iv) NTCPS-HY (100 µg/mL); (v) NTCPM (100 µg/mL) e (vi) NTCPM-HY (100 µg/mL). Os ratos foram submetidos à cirurgia de perfuração da tíbia, tratados com os respectivos biocompósitos e sacrificados 7 ou 14 dias após estes procedimentos. As tíbias foram processadas para análise histológica, morfométrica e imunohistoquímica. As tíbias controle apresentaram um tecido de granulação muito jovem na região central do defeito e neoformação óssea escassa, com trabéculas imaturas localizadas na periferia. As tíbias tratadas com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY apresentaram aumento no número de trabéculas neoformadas ($38,58 \pm 2,57$ % - HY; $38,96 \pm 4,24$ % - NTCPS; $33,72 \pm 2,56$ % - NTCPS-HY; $35,78 \pm 2,11$ % - NTCPM; $39,42 \pm 2,40$ % - NTCPM-HY e $23,50 \pm 2,08$ - controle), que apresentaram-se mais organizadas e espessas em relação ao controle. Além disso, as tíbias tratadas com HY apresentaram uma menor expressão do VEGF que as tíbias controle. Por outro lado, uma maior expressão desse fator foi observada nas tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY e nenhuma diferença significativa foi observada entre tíbias controle e tratadas com NTCPS e NTCPS-HY. Dessa maneira, o tratamento com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM ou NTCPM-HY aceleraram o reparo em defeitos ósseos de tíbias de rato, aparentemente estimulando a expressão de fatores de crescimento como o VEGF.

Palavras chave: Hialuronato de sódio, Nanotubos de carbono, Reparo ósseo, VEGF

ABSTRACT

Sodium hyaluronate (HY) is an extracellular matrix component and it facilitates the cell migration, adhesion, proliferation and differentiation. Additionally, carbon nanotubes (CNT) serve as nucleation sites for deposition of bone matrix and cell proliferation. The aim of this study was to evaluate the effects of HY, single-wall (SWCNT) and multi-wall (MWCNT) CNT functionalized (CNT-HY) or not with HY on bone repair of tibia of rats. The animals were divided into six groups: (i) control, (ii) HY (1%), (iii) SWCNT (100 μ g/mL), (iv) SWCNT-HY (100 μ g/mL), (v) MWCNT (100 μ g/mL) and (vi) MWCNT-HY (100 μ g/mL). The bone defect was created by an 1.6mm diameter drill and after seven or fourteen days of the induction of the defects, the rats were sacrificed and the tibias were processed for histological, morphometric and immunohistochemistry analysis. The control group showed poor bone formation with immature bone trabeculae located in the periphery of the bone defect. On the other hand, tibias treated with HY, SWCNT, SWCNT-HY, MWCNT or MWCNT-HY presented an increased number of neoformed bone trabeculae which were more organized and thicker than the control. Morphometric analysis showed that HY, SWCNT, SWCNT-HY, MWCNT or MWCNT-HY treatment significantly increased the percentage of bone trabeculae when compared with tibias of control animals (38.58 ± 2.57 % - HY; 38.96 ± 4.24 % - SWCNT; 33.72 ± 2.56 % - SWCNT-HY; 35.78 ± 2.11 % - MWCNT; 39.42 ± 2.40 % - MWCNT-HY and 23.50 ± 2.08 % - control, $p < 0.05$). Furthermore, tibias treated with HY showed a lower expression of VEGF than tibias control. In contrast, the expression of this factor was greater in tibias treated with MWCNT and MWCNT-HY. No significant differences in VEGF expression were observed between control and tibias treated with SWCNT or SWCNT-HY. Thus, the results of this study indicate that the treatment with HY, SWCNT, SWCNT-HY, MWCNT or MWCNT-HY accelerates the bone repair of tibias of rats by a mechanism involving, at least in part, the stimulation of growth factors such as VEGF.

Keywords: Sodium hyaluronate, Carbon Nanotubes, Bone repair, VEGF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do hialuronato de sódio.	4
Figura 2: Representação esquemática de NTCPS (A) e NTCPM (B).	7
Figura 3: Procedimento cirúrgico de perfuração das tíbias.	14
Figura 4: Curva de termogravimetria (TG) referente a queima de HY.	19
Figura 5: Curva de termogravimetria (TG) referente a queima de NTCPS-HY.	20
Figura 6: Curva de termogravimetria (TG) referente a queima de NTCPM-HY.	21
Figura 7: Tíbias de rato dissecadas.....	23
Figura 8: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias 7 dias após as cirurgias.....	26
Figura 9: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias 14 dias após as cirurgias.	29
Figura 10: Efeito do HY1% no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos.....	30
Figura 11: Efeito dos NTCPS e NTCPS-HY 100µg/ml no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos.....	31
Figura 12: Efeito dos NTCPM e NTCPM-HY 100µg/ml no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos.	32
Figura 13: Efeitos do HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos ...	33
Figura 14: Fotomicrografias representativas da imunomarcação do VEGF sete dias após o procedimento cirúrgico	35
Figura 15: Fotomicrografias representativas da imunomarcação do VEGF sete dias após o procedimento cirúrgico.....	38
Figura 16: Fotomicrografias representativas da imunomarcação do VEGF sete dias após o procedimento cirúrgico.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- 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
- EPM: Erro padrão da média
- FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
- FGF: Fator de crescimento de fibroblastos
- GAGs: Glicosaminoglicanas
- HY: Hialuronato de sódio (ácido hialurônico)
- ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina
- MEC: Matriz extracelular
- MWCNT: Multi-wall carbon nanotubes
- NTC: Nanotubos de carbono
- NTCPS: NTC de paredes simples
- NTCPS-HY: NTCPS funcionalizados com hialuronato de sódio
- NTCPM: NTC de paredes múltiplas
- NTCPM-HY: NTCPM funcionalizados com hialuronato de sódio
- NTC-COOH: NTC carboxilados
- OPN: Osteopontina
- PBS: Solução tampão fosfato
- PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas
- SWCNT: Single-wall carbon nanotubes
- TG: Termogravimetria
- TGF- α : Fator de transformação do crescimento alfa
- TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
- VEGF: Fator de crescimento de endotélio vascular

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Fratura e reparo ósseo.....	1
2. Fatores de crescimento	2
3. Hialuronato de sódio	4
4. Nanotubos de carbono	6
5. Funcionalização dos nanotubos de carbono com o hialuronato de sódio....	8
II. JUSTIFICATIVA	9
III. OBJETIVOS	10
1. Objetivo geral	10
2. Objetivos específicos	10
IV-METODOLOGIA	11
1. Hialuronato de sódio	11
2. Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono funcionalizados ou não com hialuronato de sódio	11
3. Procedimento cirúrgico.....	12
4. Processamento histológico	15
5. Análise histológica e morfométrica.....	16
6. Análise imunohistoquímica.....	17
7. Análise estatística	18
V. RESULTADOS.....	19
1. Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono	19
2. Padronização do procedimento cirúrgico	22
3. Análise histológica.....	24
3.1 Efeitos do HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos.	24
3.2 Efeitos do HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias de ratos quatorze dias após os procedimentos cirúrgicos.	27
4. Análise morfométrica.....	30
4.1 Efeitos do HY no reparo ósseo de tíbias após sete dias do procedimento cirúrgico.....	30

4.2 Efeitos dos NTCPS e NTCPS-HY no reparo ósseo de tíbias após sete dias do procedimento cirúrgico	31
4.3 Efeitos dos NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias após sete dias do procedimento cirúrgico	32
5. Análise da expressão do VEGF	34
5.1 Análise da expressão do VEGF em tíbias tratadas com HY	34
5.2 Análise da expressão do VEGF em tíbias tratadas com NTCPS e NTCPS-HY	36
5.3 Análise da expressão do VEGF em tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY	39
VI. DISCUSSÃO	41
VII. CONCLUSÕES	46
VIII. PERSPECTIVAS.....	47
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

I. INTRODUÇÃO

1. Fratura e reparo ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo cuja matriz extracelular (MEC) é mineralizada, conferindo a ele propriedades ideais para a realização das funções de suporte e proteção do organismo vertebrado, devido à sua grande rigidez e resistência à pressão (Kolar *et al*, 2010). No entanto, são inúmeras as doenças e os acidentes que causam um defeito ósseo.

A tíbia é um osso longo, coberta somente por uma fina camada de pele e tecido subcutâneo, sem proteção muscular. Esta localização anatômica pode ser explicada pela necessidade de proteger os nervos e vasos sanguíneos da perna, porém a torna vulnerável a traumas, resultando com grande frequência em fraturas (Byrd *et al.*, 1985). Esta incidência é maior em adultos jovens do sexo masculino e as principais causas são os acidentes de trânsito (motociclísticos - 35,75%, atropelamentos - 28,50%, automobilísticos - 17,32% e ciclísticos - 4,47%) e os traumas esportivos (Grecco *et al.*, 2002). Após algum tempo, fraturas ósseas e pequenos defeitos produzidos por trauma ou patologia são reparados, com produção de um novo tecido ósseo no local, com características morfofuncionais semelhantes às do tecido ósseo que havia sido lesado.

O processo de reparo do osso é caracterizado por ações integradas de diferentes células e pode ser dividido em fases seqüenciais de inflamação, migração, proliferação e diferenciação de células osteogênicas (Sasaki & Watanabe, 1995; Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Schindeler *et al.*, 2008), síntese de MEC, mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea (Lalani *et al.*, 2005). Esse processo tem início com a hemostasia, responsável por bloquear a perda de sangue (Siqueira Jr. & Dantas, 2000).

O coágulo que ocorre após a fratura consiste em extravasamento de eritrócitos, fibrina e plaquetas, que liberam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento e transformação alfa (TGF- α), fatores quimiotáticos e reguladores

da atividade celular. A presença do coágulo é fundamental, pois ele gera uma malha de fibrina que auxilia o influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, além do crescimento de fibroblastos e novos capilares sanguíneos. Para que o reparo se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos e substituídos gradativamente por um tecido de granulação (Siqueira Jr. & Dantas, 2000).

Periosteó e endosteó, próximos ao local da lesão, apresentam uma intensa proliferação formando um tecido rico em células osteogênicas, que constitui um colar em torno da fratura e que penetra entre as extremidades rompidas, o que é chamado de calo fibroso (Junqueira & Carneiro, 1999). Os macrófagos liberam um fator de crescimento chamado fator angiogênico dependente de macrófago, quimiotáxico para células endoteliais. Estas células são importantes para a angiogênese, pois secretam o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (Lalani *et al.*, 2005), essencial nos processos de cicatrização de feridas (Savani *et al.*, 2001).

As células imaturas do tecido de granulação se diferenciam em osteoblastos e passam a sintetizar tecido osteóide (fibras colágenas e proteoglicanas), que após a mineralização formam um tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que se formam, como pela ossificação intramembranosa. O calo ósseo formado tem um aspecto desordenado, caracterizado por um arranjo irregular dos osteócitos e orientação irregular das fibras colágenas (Trowbridge & Emling, 1996). O tecido ósseo imaturo passa a ser substituído por tecido ósseo maduro, enquanto o processo osteogênico dentro da medula é reabsorvido e substituído pela medula hematopoética e tecido gorduroso.

Através de trações e pressões exercidas sobre o osso durante o processo de reparo ocorre a remodelação óssea, onde o calo formado torna-se desnecessário, sendo reabsorvido, e as trabéculas ósseas são então formadas e orientadas ao longo de linhas de esforços, se tornando funcionais e levando a reconstrução progressiva e total do osso (Trowbridge & Emling, 1996; Doblare *et al.*, 2004; Fazzalari, 2011).

2. Fatores de crescimento

Durante o desenvolvimento do osso e durante o reparo de fraturas é necessário que ocorra a migração, diferenciação e ativação de vários tipos celulares e teciduais (Colnot *et al.*, 2005). Neste caso, o desenvolvimento da microvasculatura é de extrema importância para a homeostasia e regeneração do tecido ósseo (Kanczler *et al.*, 2008).

Albrecht Von Haller, no ano de 1762, sugeriu que os vasos sanguíneos eram responsáveis pela formação óssea. Nesta mesma época, John Hunter demonstrou a importância da vascularização durante o desenvolvimento e o reparo do tecido ósseo lesado. Já em 1963, Trueta propôs que havia um fator de estimulação vascular presente e ativo no local da lesão óssea (Trueta, 1963).

Existem inúmeros fatores envolvidos na angiogênese que estão ativos durante o desenvolvimento e o reparo ósseo, sendo que os principais são: os membros da família FGF, o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), as proteínas morfogenéticas do osso (BMP), o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), o PDGF e o VEGF (Gerstenfeld *et al.*, 2003; Street *et al.*, 2000).

O VEGF é uma proteína homodimérica que regula a formação fisiológica e patológica de vasos. É um dos mais importantes fatores angiogênicos, com ação direta sobre células endoteliais desempenhando uma função chave na regulação da interação osteogênese-angiogênese (Bates *et al.*, 1999). Estudos recentes mostraram que o VEGF pode atuar como um mediador essencial no reparo ósseo, com múltiplas funções, não apenas na formação de vasos, mas também no desenvolvimento do osso, incluindo a diferenciação de condrócitos, osteoblastos e recrutamento de osteoclastos, sendo necessário para a reabsorção óssea normal durante a ossificação endocondral (Zelzer *et al.*, 2002).

No processo de reparo ósseo, o VEGF é expresso durante a atividade angiogênica do hematoma e do plasma. Estudos demonstraram que a inibição da atividade do VEGF atrasa o reparo ósseo em camundongos e diminui o fluxo sanguíneo no local da lesão, levando a não-união da fratura em coelhos e em ratos (Street *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2002; Fassbender *et al.*, 2011). Além

disso, o VEGF pode promover a formação óssea de maneira indireta, por estimular as células endoteliais a sintetizar fatores osteogênicos e a sua inibição pode prejudicar a diferenciação dos osteoblastos *in vitro* (Zelzer *et al.*, 2002).

O VEGF também tem efeito direto nos osteoclastos, por influenciar o recrutamento, sobrevivência, atividade e diferenciação destas células. Neste caso ele é capaz de regular a reabsorção osteoclástica normal durante a ossificação endocondral (Niida *et al.*, 1999; Engsig *et al.*, 2000; Kohno *et al.*, 2003).

3. Hialuronato de sódio

O hialuronato de sódio (HY) é uma glicosaminoglicana (GAG) de alto peso molecular (104-107Da), descoberta por Meyer e Palmer em 1934 no humor vítreo de olhos bovino (Krause *et al.*, 2001). Em 1955 foi realizada a primeira descrição da sua estrutura química (Figura 1) por Linker, Weissman e Meyer, quando foi demonstrado que este polissacarídeo é formado por repetidas unidades dissacarídicas não-sulfatadas de *N*-acetilglicosamina e ácido *D*-glucurônico e em 1964, foi sintetizada pela primeira vez *in vitro* (Linker *et al.* 1955; Schiller, 1964; Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004,).

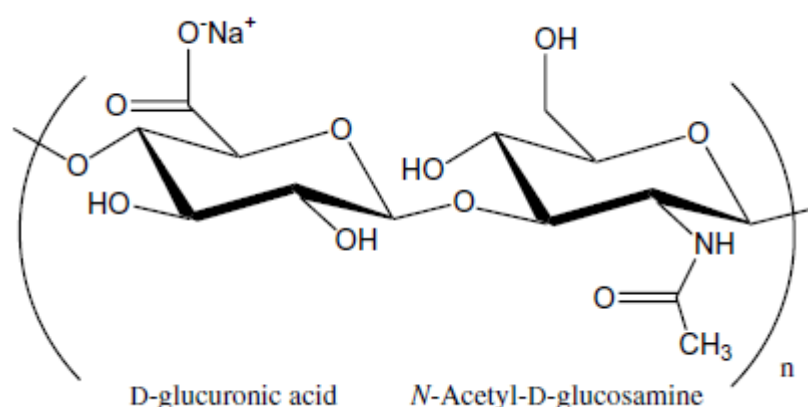


Figura 1: Estrutura química do hialuronato de sódio (FONTE: MALEKI; KJONIKSEN; NYSTROM, 2007).

Altas concentrações de HY podem ser encontradas na pele (Juhlin, 1997), nos fluidos das junções sinoviais, nos revestimentos dos tendões (Engström-Laurent, 1997; Fraser *et al.*, 1997), no humor vítreo, no cordão umbilical e na maioria dos líquidos corpóreos (Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004). O HY é um dos maiores componentes da 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), responsável pela manutenção visco-elástica dos tecidos conjuntivos e hidratação dos tecidos, além de participar da sinalização celular de vários processos biológicos como: mitose, migração, desenvolvimento de tumores, cicatrização e inflamação (Levdokimova *et al.*, 2008). Nos processos inflamatórios e de cicatrização o HY é capaz de estimular a migração, adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, além de 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).

As propriedades visco-elásticas e a sua biocompatibilidade fazem com que o HY tenha um grande potencial na área biomédica (Brown & Jones, 2005). Além de ser um marcador para o diagnóstico de doenças como câncer e artrite, pode ser utilizado na reposição do líquido sinovial, na regeneração de tecidos moles e em cirurgias oftalmológicas e odontológicas (Volpi *et al.*, 2009; Kogan *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2008).

No processo de reparo ósseo, o HY pode acelerar o processo inflamatório, aumentando o infiltrado celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Kobayashi *et al.*, 1997). Além disso, ele pode acelerar a formação óssea *in vitro* (Pilloni & Bernard, 1998) e *in vivo* (Sasaki & Watanabe, 1995), acelerar a revascularização (Giavaresi *et al.*, 2005) e promover a adesão de osteoclastos à superfície óssea (Prince, 2004). Estudos recentes tem demonstrado efeitos benéficos do HY em modelos de defeitos ósseos, seja isolado (Mendes *et al.*, 2008) 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), enxertos ósseos (Giavaresi *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2006) e associado à nanotubos de carbono

(NTC) (Mendes *et al.*, 2010). Quando utilizados em alvéolos dentários de ratos, após a exodontia dos primeiros molares superiores, o HY apresentou grande potencial osteoindutor, estimulando de forma significativa a neoformação óssea e reduzindo o número de núcleos celulares, o que sugere uma modulação do processo inflamatório (Mendes *et al.*, 2008).

4. Nanotubos de carbono

Os NTC são nanoestruturas cilíndricas com diâmetro na ordem de poucos nanômetros e comprimento da ordem de micrômetros, levando a grandes razões comprimento/diâmetro (Baughman, 2002). Podem ser compostos por uma ou várias folhas de grafite enroladas em torno de um mesmo eixo classificando-os em duas categorias: nanotubos de paredes únicas ou simples (NTCPS) - *single-wall carbon nanotubes* (SWCNT) que são constituídos por apenas uma única camada de grafite e nanotubos de paredes múltiplas (NTCPM) - *multi-wall carbon nanotubes* (MWCNT), que são constituídos de vários cilindros concêntricos de grafite (Figura 2). Os NTCPS apresentam diâmetro entre 0,7 e 2,0 nm e os NTCPM podem ter diâmetro acima de 100 nm (Mac Donald *et al.*, 2005; Smart *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2005; Boccaccini *et al.*, 2006).

Os NTC apresentam uma alta resistência mecânica devido à forte ligação covalente de seus átomos e uma alta condutividade térmica e elétrica devido ao seu caráter metálico. A ausência de ligações pendentes dá a este material grande inércia química, fundamental para o seu uso em aplicações biotecnológicas e bioquímicas.

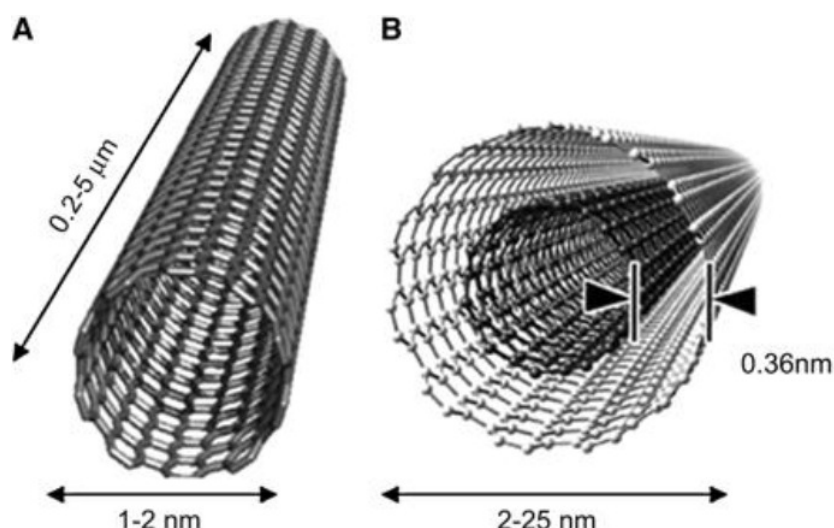


Figura 2: Representação esquemática de NTCPS (A) e NTCPM (B).

Atualmente, o potencial dos NTC em aplicações tecnológicas é imenso devido a suas propriedades térmicas, elétricas e mecânicas (Malarkey e Purpura, 2010), como, por exemplo, no desenvolvimento de sensores, filtro sem membranas e também na criação de novos biomateriais como compósitos na engenharia de reconstrução de tecidos. Diversos estudos tem demonstrado a utilização dos NTC na regeneração óssea, no encapsulamento de enzimas, na distribuição controlada de drogas e também como vesículas para entrega de DNA em células vivas (Mattson *et al.*, 2000; Hartgerink *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2001; Koltover *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2001).

No processo de reparo ósseo, os NTC podem controlar a nucleação de cristais e o crescimento do componente inorgânico do osso (Zhao *et al.*, 2005), além de sustentar o crescimento de osteoblastos (Price *et al.*, 2004) e acelerar a formação óssea (Zanello *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* demonstraram que os NTC estimulam a proliferação, adesão e expressão de genes relacionados a formação óssea em osteoblastos (Supronowicz *et al.*, 2002). Já estudos *in vivo* demonstraram que implantes de NTC possuem uma alta compatibilidade com o tecido ósseo e não induz a reabsorção óssea no local do implante (Usuy *et al.*, 2008).

Vários estudos têm avaliado o reparo ósseo frente à inserção de diferentes drogas e biomateriais (Boeck *et al.*, 1999; Shyng *et al.*, 1999; Wiltfang *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2010). Usuy *et al.* (2008) demonstraram que os NTC induzem uma pequena reação

inflamatória local, demonstrando uma alta compatibilidade com o tecido ósseo, além de estimular a formação óssea. A partir dos NTC é possível obter novos biocompósitos através de sua associação com outros compostos, como, por exemplo, o HY.

5. Funcionalização dos nanotubos de carbono com o hialuronato de sódio

A funcionalização dos NTC consiste em adicionar moléculas específicas na superfície desses materiais para que eles possam executar funções químicas bem definidas, aumentando, assim, as possibilidades de aplicações deste material. A funcionalização dos NTC agrega a eles importantes características devido a alterações de suas propriedades químicas e físicas e a facilitação de sua manipulação.

Atualmente, este processo vem recebendo um destaque bastante acentuado, pois através das técnicas envolvidas pode modificar drasticamente as propriedades dos NTC e diminuir seu grau de toxicidade (Liu *et al.*, 2009). Os métodos de funcionalização podem ser divididos em dois grupos: (i) não covalente e (ii) covalente (Islam *et al.*, 2003). Essas funcionalizações podem ocorrer através de suas paredes, suas pontas ou por encapsulamento.

A combinação das propriedades físicas dos NTC com as dos polímeros biocompatíveis a partir do processo de funcionalização permite a sua utilização como suporte para crescimento celular e reconstrução de tecidos sujeitos a altas tensões mecânicas (Mac Donald *et al.*, 2005). Além disso, a incorporação de NTC a polímeros pode reduzir a velocidade de degradação destas moléculas, permitindo um aumento de sua biodisponibilidade (Kam *et al.*, 2005). Como exemplo, a funcionalização dos NTC com o HY tem demonstrado grande potencial osteoindutor, estimulando de forma significativa a neoformação óssea e modulando o processo inflamatório, através da redução do número de núcleos celulares (Mendes *et al.*, 2010).

Por serem biocompósitos de fabricação e manipulação relativamente simples e com custo reduzido, a utilização dos NTC e da sua funcionalização com o HY, pode ser de grande importância em reparos de tecidos, implantes biodegradáveis e outras intervenções no campo da Medicina e da Odontologia.

II. JUSTIFICATIVA

Em um estudo anterior, demonstramos que o HY acelera a cicatrização de alvéolos dentários após exodontias de primeiros molares superiores (Mendes *et al.*, 2008). Os alvéolos tratados apresentaram um aumento significativo na formação de trabéculas ósseas, um menor número de células e um aumento no número de vasos sanguíneos. Além disso, a expressão da BMP-2 e da osteopontina (OPN), moléculas usualmente referidas como indicadoras do processo inicial de reparo ósseo, foi mais precoce e pronunciada nos alvéolos tratados em relação aos controles (Mendes *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que os NTC funcionalizados com HY também aceleraram a cicatrização de alvéolos dentários após exodontias dos primeiros molares superiores (Mendes *et al.*, 2010). Além disso, um estudo realizado em animais diabéticos demonstrou que o HY (1%) e os NTC-HY (100µg/mL) foram capazes de acelerar de forma significativa o reparo ósseo em alvéolos dentários quatorze dias após as exodontias dos primeiros molares (Sá *et al.*, 2012). Entretanto, estes trabalhos foram realizados utilizando um modelo de defeito ósseo pequeno (alvéolo dentário). Assim, no presente estudo avaliamos os efeitos do HY e da funcionalização dos NTC de parede simples (NTCPS-HY) e de paredes múltiplas (NTCPM-HY) com o HY em um defeito ósseo maior que aquele gerado com a extração de um dente, além de explorar as características fisiológicas distintas entre estes dois tipos de osso (alveolar e longo).

III. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do HY isoladamente e dos NTC de paredes simples e múltiplas funcionalizados com o HY no reparo de tíbias de ratos.

2. Objetivos específicos

- Avaliar histologicamente o processo de reparo ósseo 7 dias após a realização do defeito ósseo na tíbia de ratos tratados ou não com HY, NTCPS, NTCPM, NTCPS-HY ou NTCPM-HY;
- Avaliar morfometricamente o percentual de trabéculas ósseas formadas 7 dias após a realização do defeito ósseo na tíbia de ratos tratados ou não com HY, NTCPS, NTCPM, NTCPS-HY ou NTCPM-HY;
- Avaliar através da análise imunohistoquímica a expressão do VEGF após 7 dias de reparo de tíbias de ratos tratados ou não com HY, NTCPS, NTCPM, NTCPS-HY ou NTCPM-HY.
- Avaliar histologicamente o processo de reparo ósseo 14 dias após a realização do defeito ósseo na tíbia de ratos tratados ou não com HY, NTCPS, NTCPM, NTCPS-HY ou NTCPM-HY.

IV-METODOLOGIA

1. Hialuronato de sódio

Comercialmente, o HY apresenta-se em sua fórmula solúvel como gel $[(C_{14}H_{20}NNaO_{11})_n.Na]$. A análise do produto (lote galena 1007000808) fornecida pelo distribuidor Galena descreve-o como uma solução transparente, incolor, com pH 6,2 e com a presença de metais pesados e arsênio menor que 2 ppm, conteúdo de proteína menor que 0,002 %, ácido glucorônico 4,7 mg/mL e ácido hialurônico 9,71mg/mL. O HY é um polímero, por isso verifica-se a letra “n” na fórmula molecular e não há peso molecular definido.

2. Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono funcionalizados ou não com hialuronato de sódio

NTC de paredes simples e múltiplas foram sintetizados pelo método de descarga em arco utilizando um catalisador de cobalto/níquel, com atmosfera de hélio e a uma pressão total de 500 Torr (Trigueiro *et al.*, 2007), gerando também diversos tipos de subprodutos como carbono amorfo, fulerenos, nanopartículas de carbono, nanopartículas metálicas livres e encapsuladas com carbono. Em seguida, o material foi purificado por uma seqüência de oxidação térmica e tratamentos ácidos. Os NTC (1 g) foram submetidos a refluxos em ácido nítrico (3 mol/L) em microondas doméstico por 15 minutos. Através da queima em temperaturas inferiores a 400°C foi possível remover grande parte dos subprodutos carbonosos, principalmente carbono amorfo, além de expor muitas partículas metálicas presentes no interior de cápsulas de carbono. Após a purificação, os NTC foram centrifugados a 7000 rpm e lavados com água deionizada até completa remoção do ácido nítrico. A solução final ficou em uma estufa a 60°C para secar, por um período de 12 horas. O material resultante (~0,75 g de alta pureza) foi então funcionalizado através dos grupos COOH (NTC-COOH) (Mendes *et al.*, 2010).

Para a associação com o HY, inicialmente foi obtida uma mistura homogênea da solução de NTC-COOH (0,5 mg/mL) e HY (0,5 mg/mL). Em seguida, esta solução foi levada ao ultra-som por 30 minutos e, posteriormente,

lavada e filtrada em filtro de 0,45 µm para remover o HY não associado aos NTC. O material que ficou sobre o filtro foi transferido para um recipiente de vidro e colocado em estufa a 60°C para secar (Mendes *et al.*, 2010).

A funcionalização dos NTC com HY foi confirmada através de análise termogravimétrica que envolve o monitoramento contínuo da massa da amostra em função da temperatura em uma atmosfera controlada, enquanto a temperatura da amostra é aumentada. Esta técnica apresenta uma curva de aquecimento que varia de 20 a 800°C, com uma taxa de 5°C/minuto em atmosfera de ar seco. As amostras utilizadas pesavam entre 1,5 e 3,0 mg e foram colocadas dentro de cadinhos de alumina apropriados para o equipamento.

NTC-COOH e NTC-COOH-HY de paredes simples ou múltiplas sob a forma de pó foram misturados com carbopol, um gel inerte, para preparar os géis a serem utilizados (Mendes *et al.*, 2010).

3. Procedimento cirúrgico

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade média de 3 meses, pesando entre 200 e 250g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Os animais foram mantidos em biotério apropriado, com luminosidade e temperatura controladas, acondicionados em gaiolas plásticas contendo 2 animais em cada gaiola e com acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (documento em anexo). Dois dias antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose de benzilpenicilina/estreptomicina (0,84mg/100g de peso corporal) via intramuscular.

Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1mL/100g) e cloridrato de ketamina 10% (0,1mL/100g). Após imobilização dos animais, foi feita a tricotomia e anti-sepsia da área. Na região ventral da pata esquerda foi feita uma incisão com lâmina de bisturi no sentido longitudinal da tíbia. A musculatura foi afastada do periósteo e uma perfuração com uma broca de 1,6 mm com baixa rotação foi realizada no osso (Figura 3).

A região foi irrigada com uma solução de cloreto de sódio 0,9% (soro fisiológico) e a área do defeito foi lavada com a mesma solução. Foram realizados os diferentes tratamentos de acordo com os seguintes grupos experimentais: (i) controle (coágulo), (ii) ~0,1 mL do gel de HY, (iii) ~0,1 mL do gel de NTCPS, (iv) ~0,1 mL do gel de NTCPS-HY, (v) ~0,1 mL do gel de NTCPM e (vi) ~0,1 mL do gel de NTCPM-HY nas tíbias esquerdas de modo que toda a cavidade ficasse preenchida com o gel. Foi realizada a sutura da pele. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam mais uma dose de benzilpenicilina/estreptomicina (0,84mg/100g de peso corporal) e uma dose de flunixin meglumina (0,22mg/100g de peso corporal), via intramuscular. Após 7 ou 14 dias, os animais foram eutanasiados por decapitação e as tíbias foram imediatamente removidas e fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FNT) 10% à temperatura ambiente por 48 horas.

Disposição esquemática dos grupos experimentais

GRUPO	TRATAMENTO
I	Coágulo
II	HY 1%
III	NTCPS 100µg/mL
IV	NTCPS-HY 100µg/mL
V	NTCPM 100µg/mL
VI	NTCPM-HY 100µg/mL

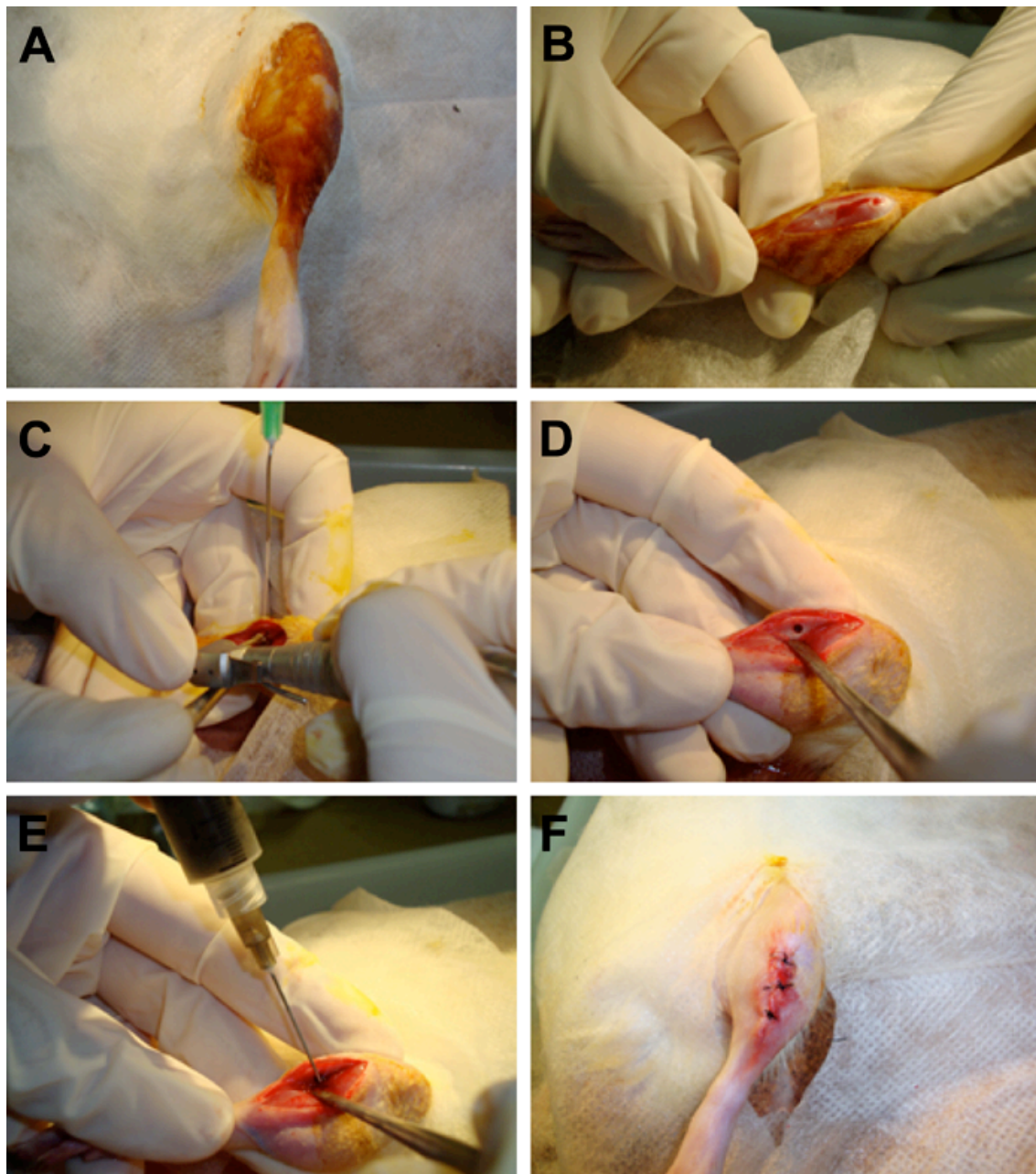


Figura 3: Procedimento cirúrgico de perfuração das tíbias. Em (A) é possível observar a tricotomia e anti-sepsia da pata esquerda do animal, seguida pela incisão (B). Após o afastamento da musculatura, uma perfuração com uma broca de 1,6 mm sob constante irrigação (C) é realizada no osso (D). Em (E) observa-se a aplicação dos tratamentos, seguida pela sutura da pele (F).

4. Processamento histológico

Após a fixação, as tíbias foram submetidas à imersão em água corrente para remoção do excesso de fixador e neutralização do ácido fórmico através de quatro banhos de 15 minutos. Em seguida, foram desmineralizadas em solução de Planck Rychlo por um período de aproximadamente 48 horas. Após a desmineralização, as tíbias foram imersas em água corrente para a remoção do excesso de descalcificador em quatro banhos de 15 minutos. O seguinte processo de inclusão foi utilizado:

- a) Fase de desidratação: imersão das amostras em banhos de álcool etílico por 30 minutos cada (70% I e II, 80% I e II, 90%, 95% e absoluto I, II e III);
- b) Fase de diafanização: 20 minutos de imersão das amostras em três banhos de xilol;
- c) Fase de infiltração: imersão das amostras em três banhos de parafina a 58°C, sendo o primeiro de 30 minutos e os demais de 40 minutos cada;
- d) Fase de inclusão: as amostras foram incluídas em parafina fluidificada contida em moldes pré-definidos e posicionadas de modo que as tíbias pudessem ser cortadas longitudinalmente.

Foram obtidos de cada amostra cerca de 30 cortes semi-seriados de 6µm de espessura no plano sagital, montados em lâminas histológicas previamente silanizadas com silano 2%. As lâminas de cada amostra foram armazenadas para processamento em Tricrômico de Masson e imunohistoquímica. Foram selecionados 4 cortes alternados de cada amostra para serem corados com Tricrômico de Masson.

Coloração com Tricrômico de Masson

Duas lâminas de cada amostra com 4 cortes no total contendo a área de interesse foram processadas para a coloração com Tricrômico de Masson, segundo as seguintes etapas:

- imersão em xilol (I) por 30 minutos
- imersão em xilol (II) por 15 minutos
- imersão em xilol (III) por 15 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 2 minutos

- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 90% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 80% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 70% por 2 minutos
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de Tricrômico de Masson por 8 minutos
- 3 mergulhos rápidos em água corrente
- imersão em álcool etílico a 90% por 1 minuto
- imersão em álcool etílico a 95% por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 1 minuto
- imersão em xilol (I) por 2 minutos
- imersão em xilol (II) por 2 minutos
- imersão em xilol (III) por 10 minutos

Após a coloração, lamínulas de 24x50mm foram montadas sobre os cortes utilizando-se Entellan como agente de união.

5. Análise histológica e morfométrica

Foram obtidas 20 imagens dos 4 cortes de cada defeito, visualizadas através da objetiva de 40X e digitalizadas através da microcâmera JVC TK-1270/RGB. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foram previamente descritas na literatura (Caliari, 1997).

Para a análise morfométrica foi considerado o percentual de trabéculas ósseas presentes em relação à área total. A área ocupada pelas trabéculas ósseas foi obtida através do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. Os pixels das trabéculas ósseas foram selecionados através da imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e obtenção da área em μm^2 . Foram excluídas as amostras que apresentaram

inclusão e coloração inadequadas e ausência de integridade dos cortes histológicos.

Cálculo para determinar o percentual de trabéculas ósseas neoformadas nas tíbias

$\frac{\text{Área de trabéculas (Imagem 1 + Imagem 2 + Imagem 3 + \dots + Imagem 20)}}{\text{Área total avaliada (10,66 x 10^5 \mu\text{m}^2)}}$
--

6. Análise imunohistoquímica

Para análise imunohistoquímica, os animais foram divididos em seis grupos experimentais (controle, HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY) e sacrificados após 7 dias do procedimento cirúrgico.

Foram selecionados cerca de 2 cortes de cada tíbia para processamento com o anticorpo anti-VEGF. Para avaliação da expressão deste fator, secções de tecido de 6µm foram desparafinizadas e reidratadas por meio de banhos em soluções de gradientes decrescentes de etanol, como descrito no tópico Processamento histológico. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação com uma solução de H₂O₂ 3% e, em seguida, a ligação com proteínas inespecíficas foi bloqueada com o uso de uma solução de proteína albumina do soro bovino (BSA) 2% e Tween 20 0,1% em PBS. A marcação do tecido foi realizada utilizando um anticorpo primário policlonal anti-VEGF [VEGF (A20): SC-152; Santa Cruz Biotechnology, Inc.] com diluição 1:50. Após incubação *overnight* a 4°C, foi adicionado o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com biotina (K0690 - LSAB/DAKO®, Glostrup) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada através da imersão em solução cromógena contendo 350 µM de diaminobenzidina (DAB) (D-5637 -Sigma®) e H₂O₂ 1% em PBS. As amostras foram contra coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas por meio de banhos em soluções de gradientes crescentes de etanol e montadas com a utilização de lamínulas. Para o controle negativo foi substituída a etapa de incubação com o anticorpo primário por BSA.

Foi realizada uma análise morfométrica onde foi considerado a área de imunomarcacão em relação à área total. A área ocupada pela imunomarcacão foi obtida através do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. Os pixels da imunomarcacão foram selecionados através da imagem real com subsequente criaçao de uma imagem binária e obtençao da área em μm^2 .

Cálculo para determinar o percentual de imunomarcacão nas tíbias

$\frac{\text{Área de imunomarcacão (Imagem 1 + Imagem 2 + Imagem 3 + \dots + Imagem 20)}}{\text{Área total avaliada (10,66 x 10^5 \mu\text{m}^2)}}$

7. Análise estatística

Os dados obtidos na análise morfométrica foram expressos como média \pm EPM e analisados através do teste t de Student ou One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

1. Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono

As amostras de NTC foram sintetizadas através do método de descarga em arco (Trigueiro *et al.*, 2007). Através de uma análise termogravimétrica (TG) foi possível quantificar as formas de carbono presentes nas amostras, bem como as impurezas. A Figura 4 mostra a curva termogravimétrica efetuada em atmosfera de ar sintético de 100mL/min em uma razão de aquecimento de 5°C/min para a amostra de HY. Podemos perceber duas quedas acentuadas no percentual de massa (linha em vermelho). A curva rosa detalha o momento da queda de massa, descrevendo as temperaturas onde foi iniciada e encerrada a queima de um dos componentes do material. Nota-se na curva TG, uma primeira queda de massa que chega a um máximo de 12,74% até 79,14°C, que representa a queima da água. A segunda queda de massa corresponde à queima do HY que apresenta uma perda de massa de aproximadamente 60%. Este evento acontece em uma temperatura média de 224°C.

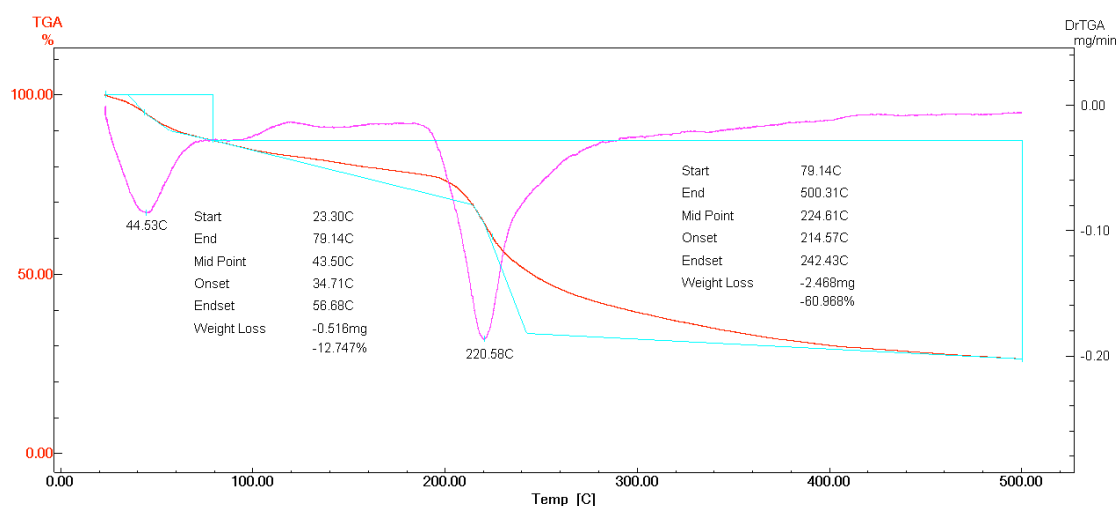


Figura 4: Curva de termogravimetria (TG) referente a queima de HY.

Através das curvas de TG é possível demonstrar a quantidade de HY que está imobilizada com NTC de paredes simples e múltiplas. A decomposição térmica dos NTCPS-HY pode ser observada na Figura 5. A perda de massa do HY começou por volta de 131°C e terminou por volta de 279°C. Essa perda foi de 13,18% e aconteceu a uma temperatura média de 204,76°C. A segunda queda de massa ocorreu em uma temperatura média de 374,66°C e corresponde a queima dos NTCPS. Cada variação de perda de massa corresponde a um tipo de degradação, e na curva rosa do gráfico podemos observar outros pontos onde ocorrem perdas de massa, que representa algumas impurezas. Essas impurezas podem ser resquícios de cobalto ou níquel, uma vez que essas substâncias atuam como catalisadores do processo de síntese dos NTCPS.

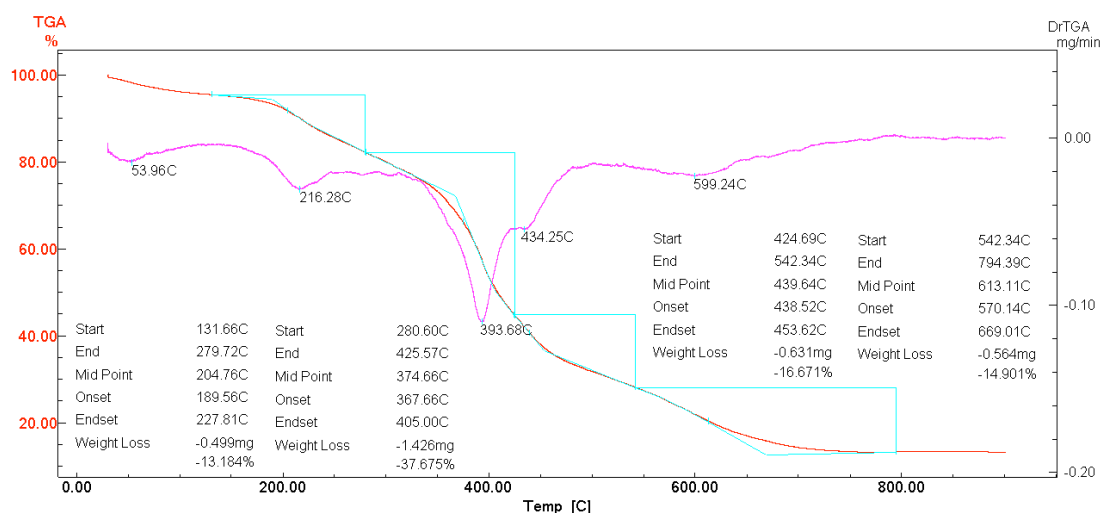


Figura 5: Curva de termogravimetria (TG) referente a queima de NTCPS-HY.

Através da análise termogravimétrica da amostra de NTCPM-HY podemos perceber duas quedas no percentual de massa (Figura 6). Como os NTC são mais resistentes ao aumento de temperatura, a primeira queda de massa corresponde a queima do HY. A perda de 34,92% de HY começou por volta de 172°C e terminou por volta de 339°C. Para os NTCPM a perda de massa teve início por volta de 340°C e terminou por volta de 524°C.

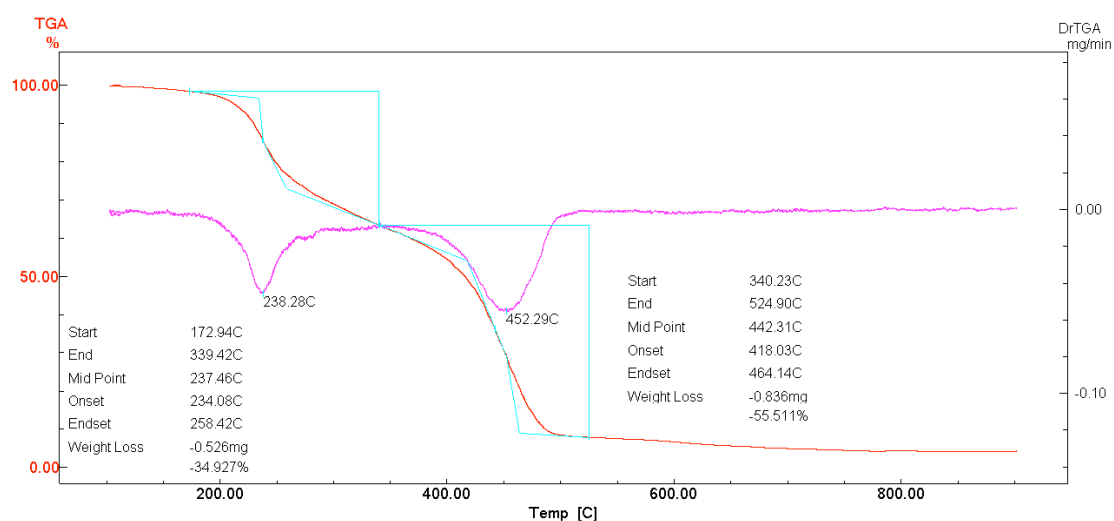


Figura 6: Curva de termogravimetria (TG) referente a queima de NTCPM-HY.

2. Padronização do procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico para produzir o modelo de defeito ósseo causou lesões ósseas esféricas com a utilização de uma broca odontológica. Para determinar qual seria o tamanho do defeito realizado nas tíbias dos animais foram utilizadas brocas de 3,3, 3,0, 2,0 e 1,6mm.

Inicialmente foi utilizada uma broca trefina de 3,3mm (Figura 7A) com baixa rotação e, após o procedimento cirúrgico, a pata esquerda dos animais foi imobilizada por ataduras gessadas. Todos os animais morreram antes do dia do sacrifício e as patas imobilizadas apresentaram grande quantidade de secreção purulenta. Em seguida foi utilizada a mesma broca trefina de 3,3mm (Figura 7 A), porém sem a imobilização gessada. Os animais sobreviveram até o dia proposto para o sacrifício e não apresentaram secreção purulenta na pata operada. Entretanto, somente 20% dos animais não apresentaram fratura na região do defeito.

Em seguida, uma broca trefina de 3,0mm (Figura 7B), sem a imobilização da pata, foi utilizada. Foi observado aproximadamente o mesmo índice de fratura que os animais operados com a broca de 3,3mm. Todos os animais sobreviveram até o dia do sacrifício.

A terceira broca testada apresentava um diâmetro de 2,0mm (Figura 7C) e as patas continuaram a ficar sem a imobilização. Cerca de 50% dos animais apresentaram fratura na região do defeito e 100% sobreviveram até o final do experimento.

A última broca testada foi de 1,6mm (Figura 7D) sem a imobilização da pata. Todos os animais sobreviveram até o fim do experimento e o índice de fraturas foi menor do que 5%. Dessa maneira, essa foi a broca escolhida para a realização dos procedimentos cirúrgicos.

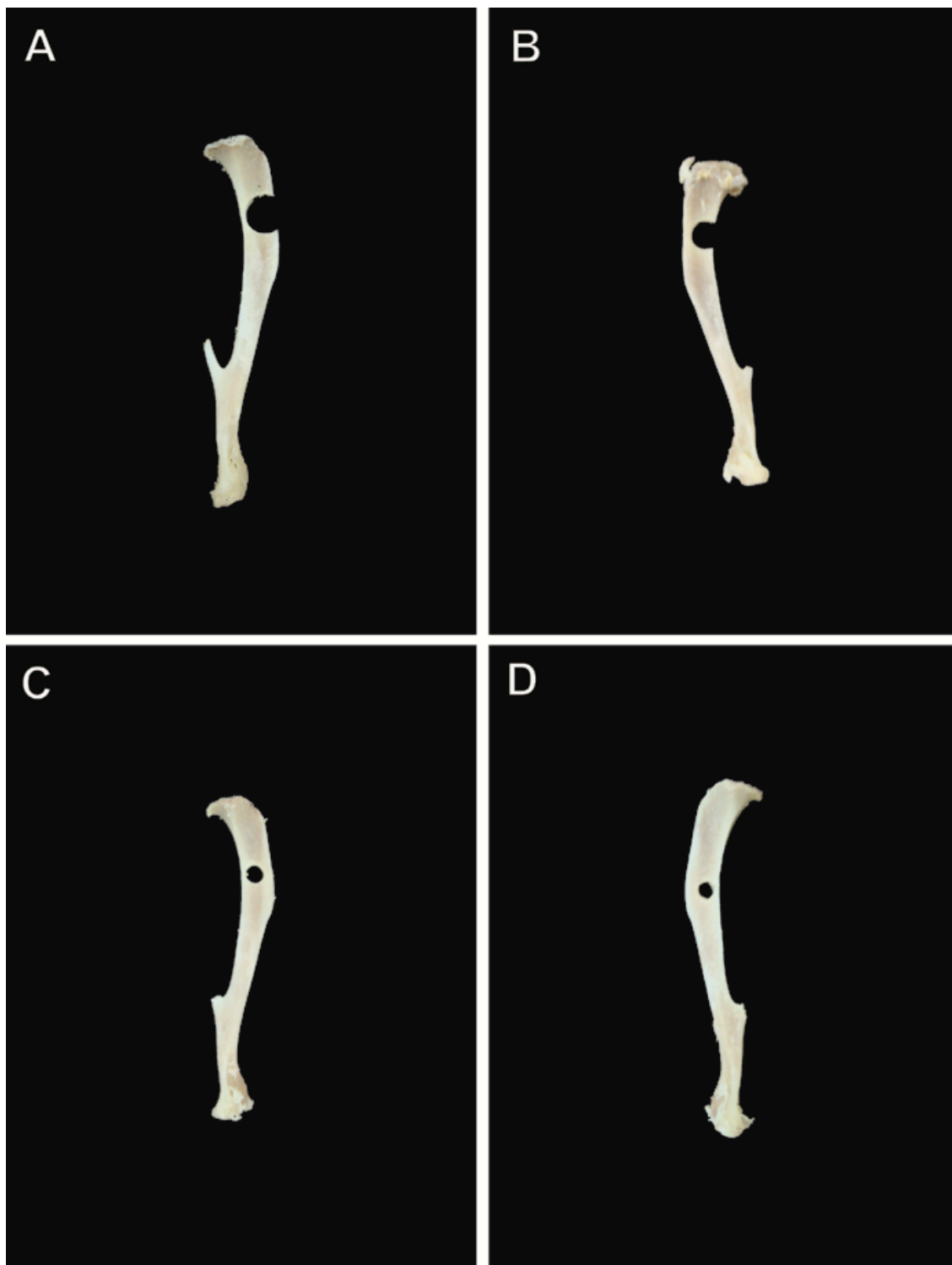


Figura 7: Tíbias de rato dissecadas. Em (A) observa-se um defeito realizado com uma broca de 3,3mm de diâmetro. Em (B) um defeito realizado com uma broca de 3,0mm de diâmetro. Em (C) um defeito realizado com uma broca de 2,0mm de diâmetro e em (D) com uma de 1,6mm de diâmetro.

3. Análise histológica

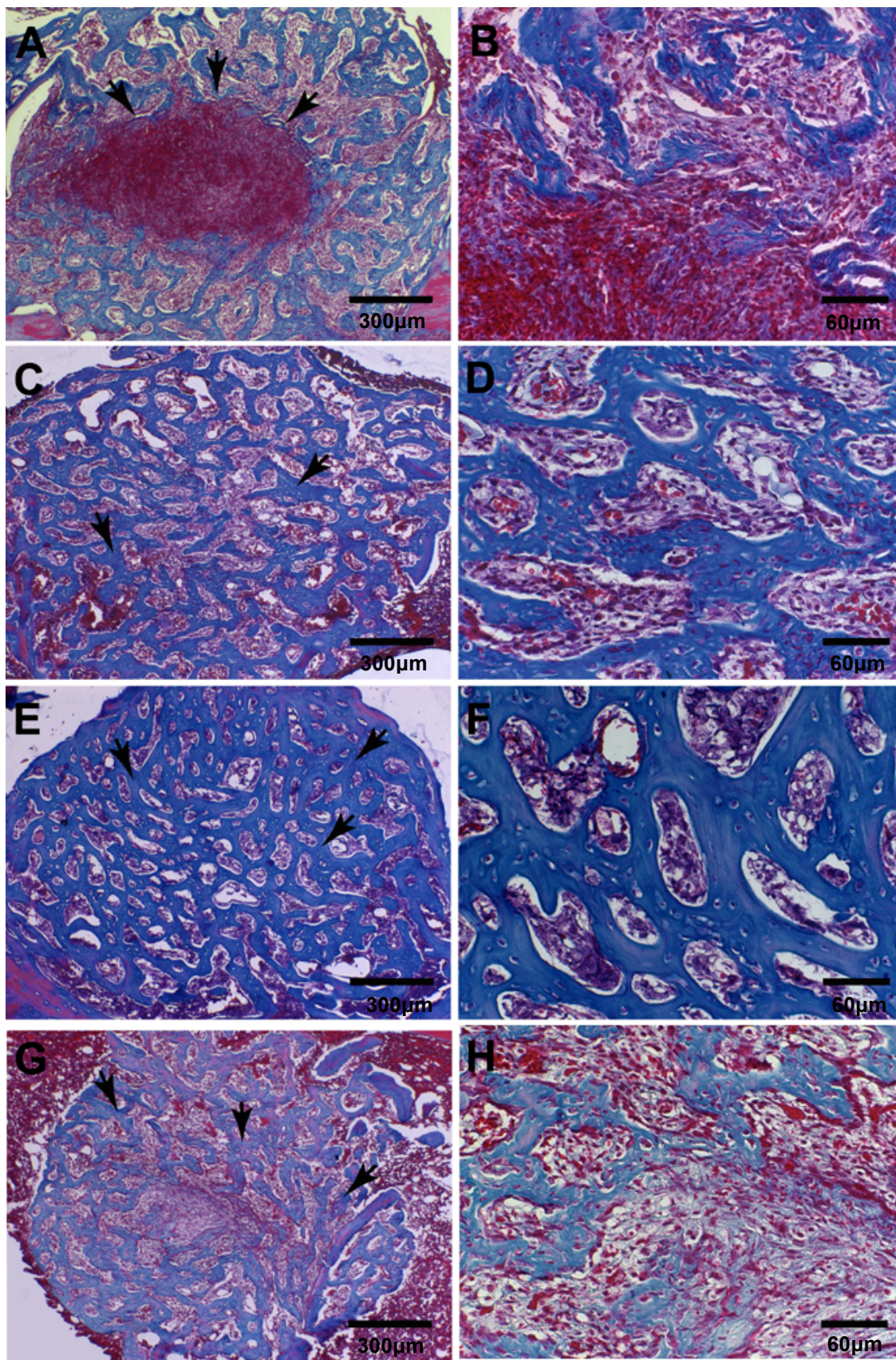
3.1 Efeitos do HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos.

Sete dias após a cirurgia, as tíbias controle apresentaram numerosos núcleos celulares, além de um tecido de granulação muito jovem na região central do defeito, rico em capilares recém formados e uma neoformação óssea escassa localizada na periferia (Figuras 8A e 8B). As trabéculas ósseas das tíbias controle apresentaram-se imaturas e desorganizadas.

Nos animais tratados, a região do defeito encontrou-se praticamente ocupada por tecido ósseo neoformado. As tíbias tratadas com HY (Figuras 8C e 8D), NTCPS (Figuras 8E e 8F) e NTCPS-HY (Figuras 8G e 8H) apresentaram redução no número de núcleos celulares e aumento no número de trabéculas neoformadas, que apresentaram-se mais organizadas e espessas em relação ao controle.

Foi possível observar nas tíbias tratadas com NTCPM (Figuras 8I e 8J) e NTCPM-HY (Figuras 8K e 8L) um aumento no número de trabéculas ósseas com padrão histológico semelhante aos animais tratados com HY, NTCPS e NTCPS-HY, porém uma maior quantidade de espaços inter-trabeculares.

Assim, ao analisar o reparo ósseo nos grupos de tíbias controle e tratadas, observou-se em ambos a formação de trabéculas ósseas, porém nas tíbias tratadas esse processo estava mais acelerado. Nenhuma diferença histológica significativa foi observada entre as tíbias tratadas com HY, NTCPS, NTCPM, NTCPS-HY e NTCPM-HY.



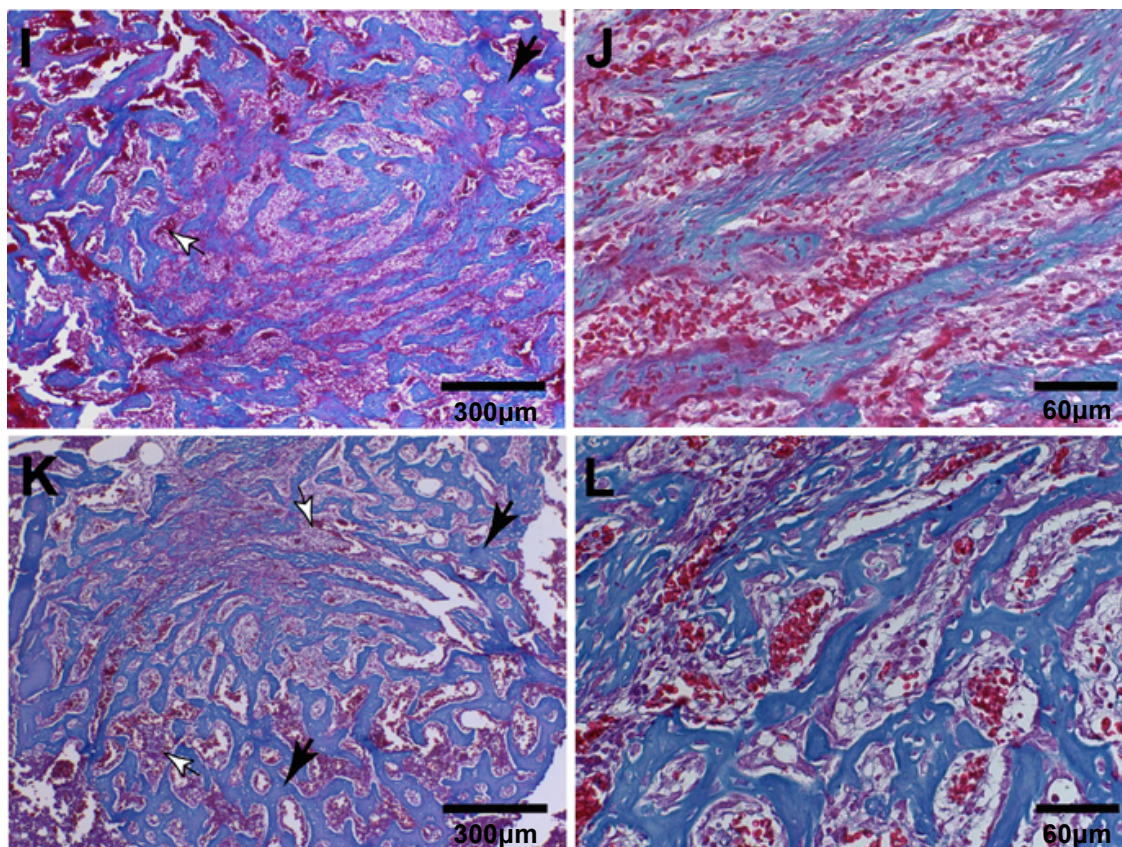


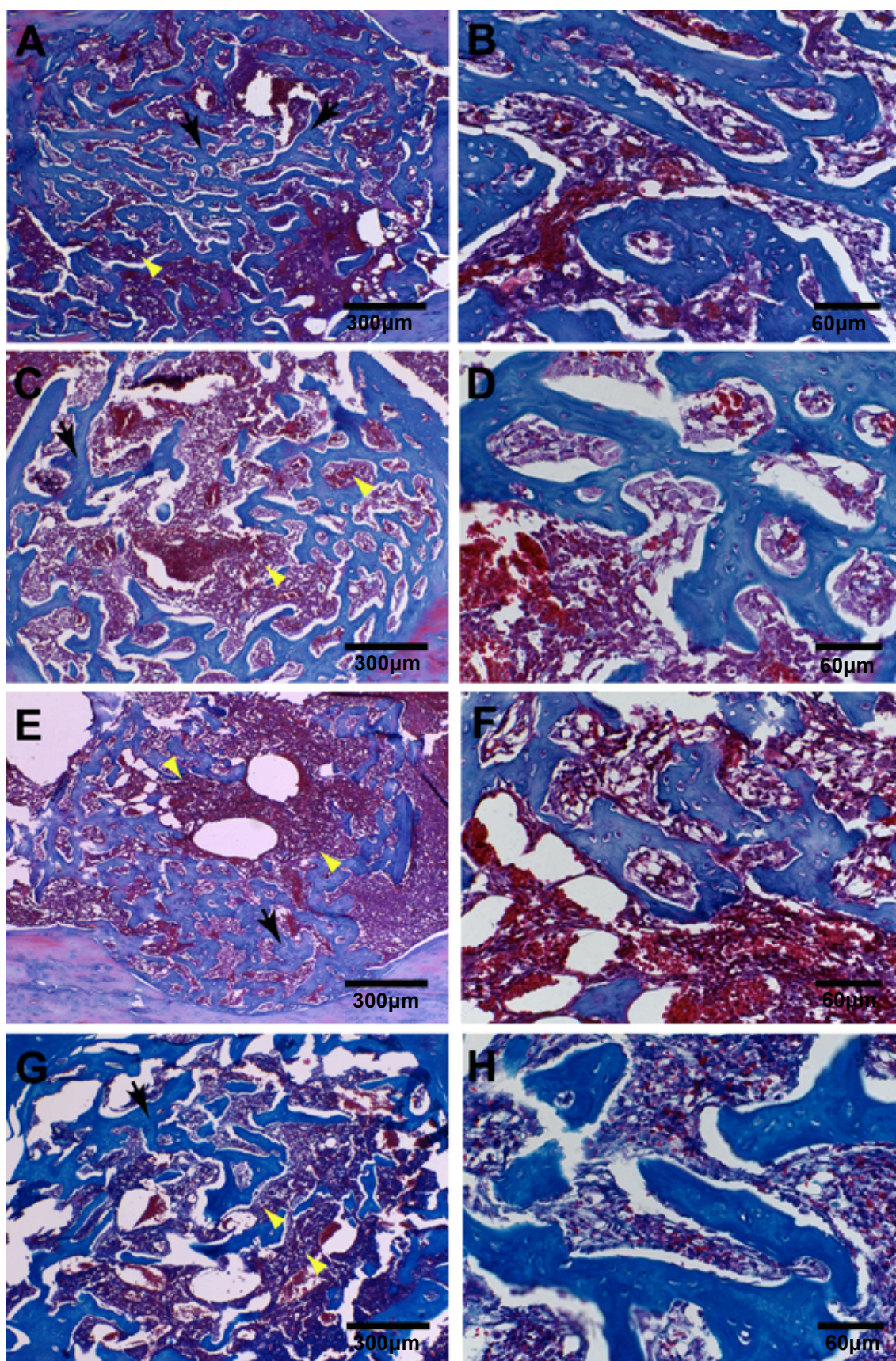
Figura 8: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias 7 dias após as cirurgias. Tíbias controle (coágulo) – (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias tratadas com HY1% – (C) baixa e (D) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPS 100µg/mL - (E) baixa e (F) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPS-HY 100µg/mL – (G) baixa e (H) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPM - (I) baixa e (J) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPM-HY 100µg/mL – (K) baixa e (L) alta magnitude. As tíbias tratadas com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM ou NTCPM-HY apresentaram maior formação de trabéculas ósseas em relação às tíbias controle. Setas pretas (A): Tecido de granulação muito jovem na região central do defeito. Setas pretas (C, E, G, I, K): trabéculas ósseas. Setas brancas (I, K): espaço inter-trabecular.

3.2 Efeitos do HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias de ratos quatorze dias após os procedimentos cirúrgicos.

Após um período de 14 dias foi observado que as tíbias controle apresentavam uma grande quantidade de trabéculas ósseas maduras, espessas e bem organizadas, além de uma redução do número de núcleos celulares e espaços inter-trabeculares mais restritos (Figuras 9A e 9B).

As tíbias tratadas com HY (Figuras 9C e 9D), NTCPS (Figuras 9E e 9F) e NTCPS-HY (Figuras 9G e 9H) apresentaram trabéculas maduras, espessas e bem organizadas e um aumento discreto na quantidade de espaços inter-trabeculares. Além disso, o tratamento com NTCPM (Figuras 9I e 9J) e NTCPM-HY (Figuras 9K e 9L) foi capaz de acelerar o reparo ósseo, apresentando trabéculas com padrão histológico semelhante aos outros tratamentos, entretanto com um aumento expressivo na quantidade de espaços inter-trabeculares.

Essas análises histológicas sugerem que o processo de reparo ósseo encontrava-se mais atrasado em animais controle e que os tratamentos com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY foram capazes de acelerar de forma expressiva esse processo. O aumento considerável na quantidade de espaços inter-trabeculares sugere que o osso recém-formado já está em processo de reabsorção e o canal medular já está começando a ser preenchido pela medula óssea.



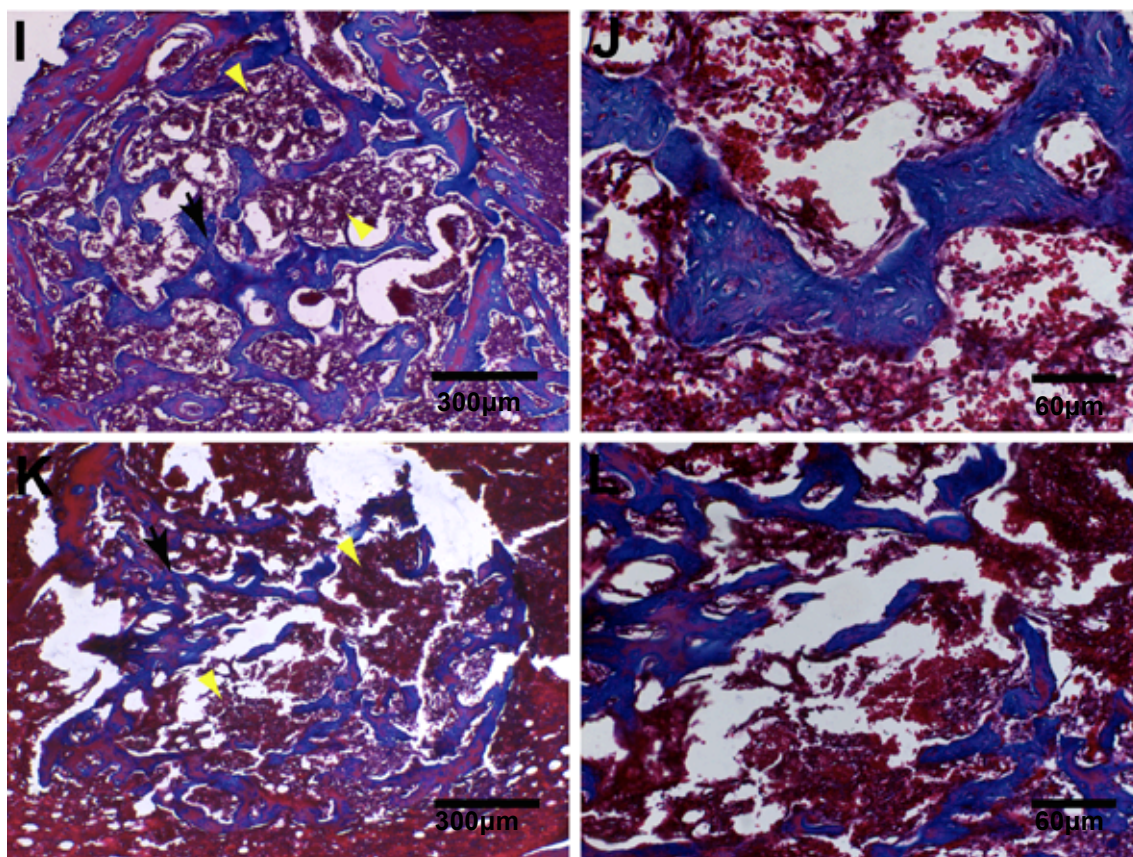


Figura 9: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias 14 dias após as cirurgias. Tíbias controle (coágulo) – (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias tratadas com HY1% – (C) baixa e (D) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPS 100µg/mL - (E) baixa e (F) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPS-HY 100µg/mL – (G) baixa e (H) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPM - (I) baixa e (J) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPM-HY 100µg/mL – (K) baixa e (L) alta magnitude. As tíbias tratadas com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM ou NTCPM-HY apresentaram maior quantidade de espaços inter-trabeculares em relação às tíbias controle. Setas pretas: trabéculas ósseas. Setas amarelas: espaço inter-trabecular.

4. Análise morfométrica

4.1 Efeitos do HY no reparo ósseo de tíbias após sete dias do procedimento cirúrgico

Sete dias após a realização do procedimento cirúrgico, a análise morfométrica demonstrou que o percentual de trabéculas ósseas, em relação à área total, foi significativamente maior nas tíbias tratadas com HY ($38,58 \pm 2,57\%$ vs $23,50 \pm 2,08\%$) em relação às tíbias controle (Figura 10).

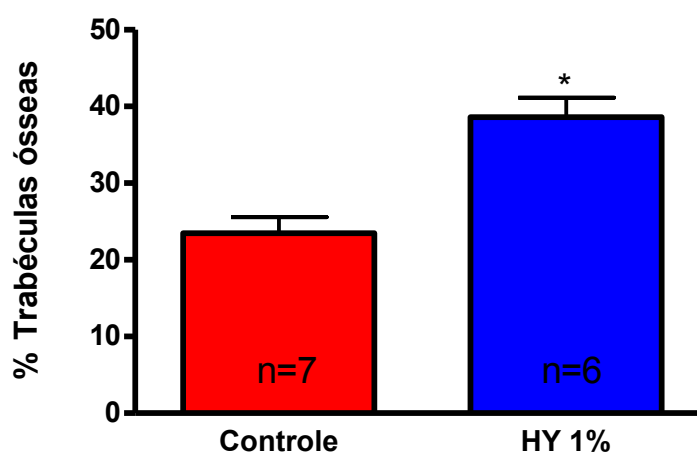


Figura 10: Efeito do HY1% no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos. Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. O tratamento com HY causou um aumento significativo na formação de trabéculas em relação aos animais controle. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ (teste t de Student).

4.2 Efeitos dos NTCPS e NTCPS-HY no reparo ósseo de tíbias após sete dias do procedimento cirúrgico

A análise morfométrica demonstrou que sete dias após a realização do procedimento cirúrgico o percentual de trabéculas ósseas, em relação à área total, foi significativamente maior nas tíbias tratadas com NTCPS ($38,96 \pm 4,24\%$) e NTCPS-HY ($33,72 \pm 2,56\%$) em relação às tíbias controle ($23,50 \pm 2,08\%$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos com NTCPS e NTCPS-HY (Figura 11).

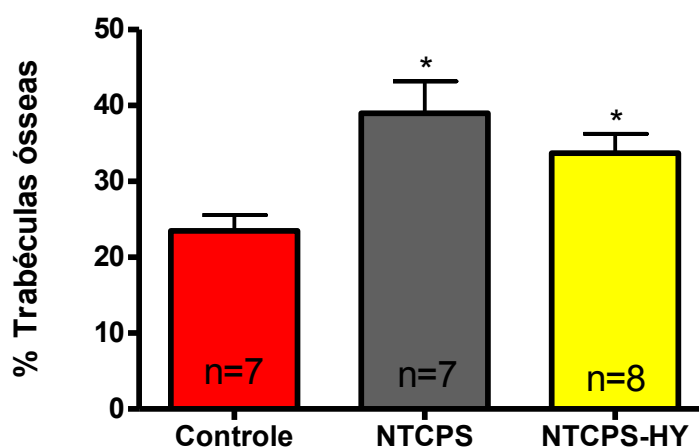


Figura 11: Efeito dos NTCPS e NTCPS-HY 100µg/ml no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos. Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. O tratamento com NTCPS e NTCPS-HY causou um aumento significativo na formação de trabéculas em relação aos animais controle. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

4.3 Efeitos dos NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias após sete dias do procedimento cirúrgico

Os tratamentos com NTCPM ($35,78 \pm 2,11\%$) e NTCPM-HY ($39,42 \pm 2,40\%$) foram capazes de aumentar significativamente o percentual de trabéculas ósseas em relação às tíbias controle ($23,50 \pm 2,08\%$). Sete dias após a realização do procedimento cirúrgico as tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY demonstraram morfometricamente um aumento nesse percentual. Entre as tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY não houve diferença significativa (Figura 12).

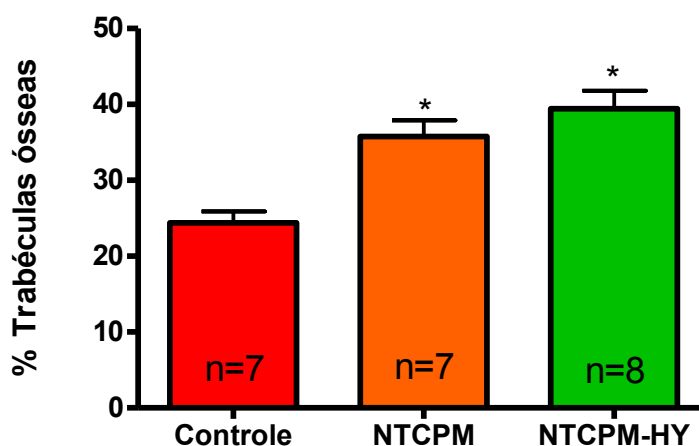


Figura 12: Efeito dos NTCPM e NTCPM-HY 100µg/ml no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos. Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. O tratamento com NTCPM e NTCPM-HY causou um aumento significativo na formação de trabéculas em relação aos animais controle. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

Assim, sete dias após a realização do procedimento cirúrgico, as tíbias tratadas com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY apresentaram um aumento significativo no percentual de trabéculas ósseas quando comparado com as tíbias controle. Esse aumento foi demonstrado através da análise morfométrica. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos (Figura 13).

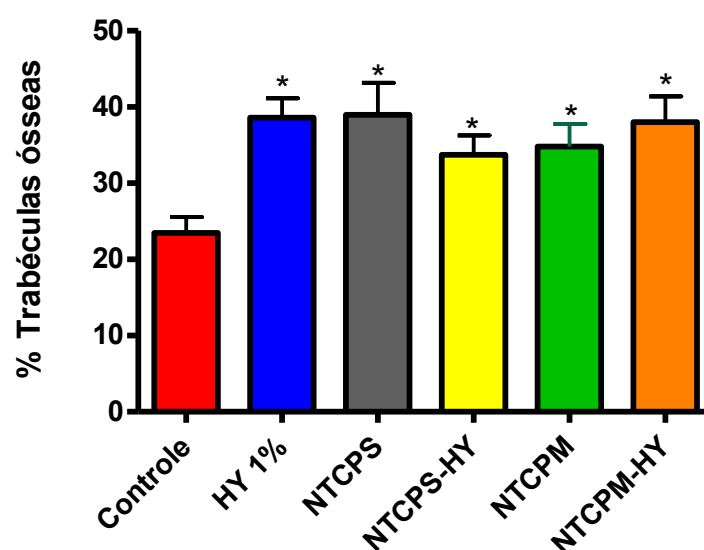


Figura 13: Efeitos do HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY no reparo ósseo de tíbias de ratos sete dias após os procedimentos cirúrgicos. Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. Todos os tratamentos apresentaram um aumento significativo na formação de trabéculas em relação aos animais controle. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5. Análise da expressão do VEGF

5.1 Análise da expressão do VEGF em tíbias tratadas com HY

Sete dias após o procedimento cirúrgico, a expressão do VEGF foi observada tanto no tecido conjuntivo quanto nas trabéculas ósseas das tíbias controle e tratadas. A análise da imunoexpressão do VEGF demonstrou que as tíbias controle (Figuras 14A e 14B) apresentaram uma maior expressão na região central do defeito e as tíbias tratadas com HY (Figuras 14C e 14D) apresentaram essa expressão distribuída de maneira uniforme por todo o defeito.

Morfometricamente, as tíbias tratadas com HY ($13,61 \pm 1,37\%$) apresentaram uma redução na expressão do VEGF quando comparadas às tíbias controle ($20,90 \pm 1,84\%$) (Figura 14E).

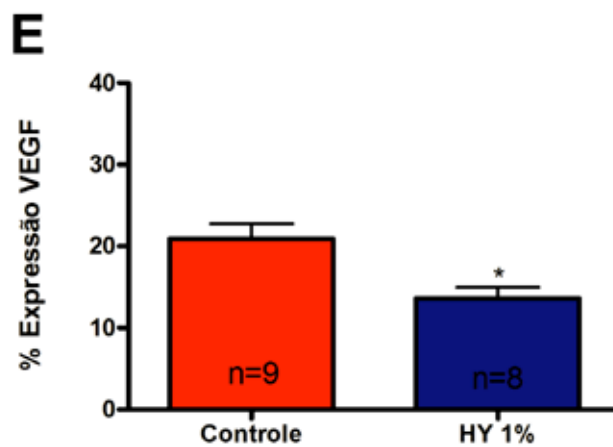
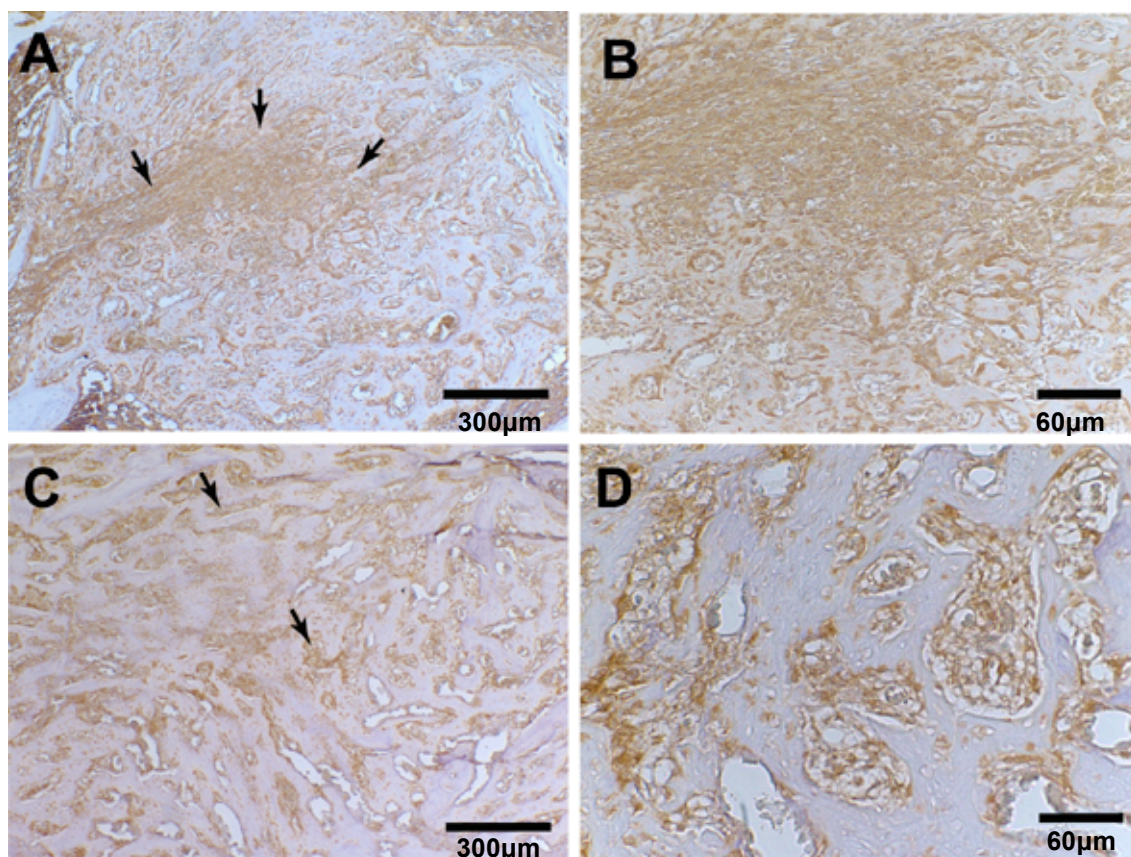
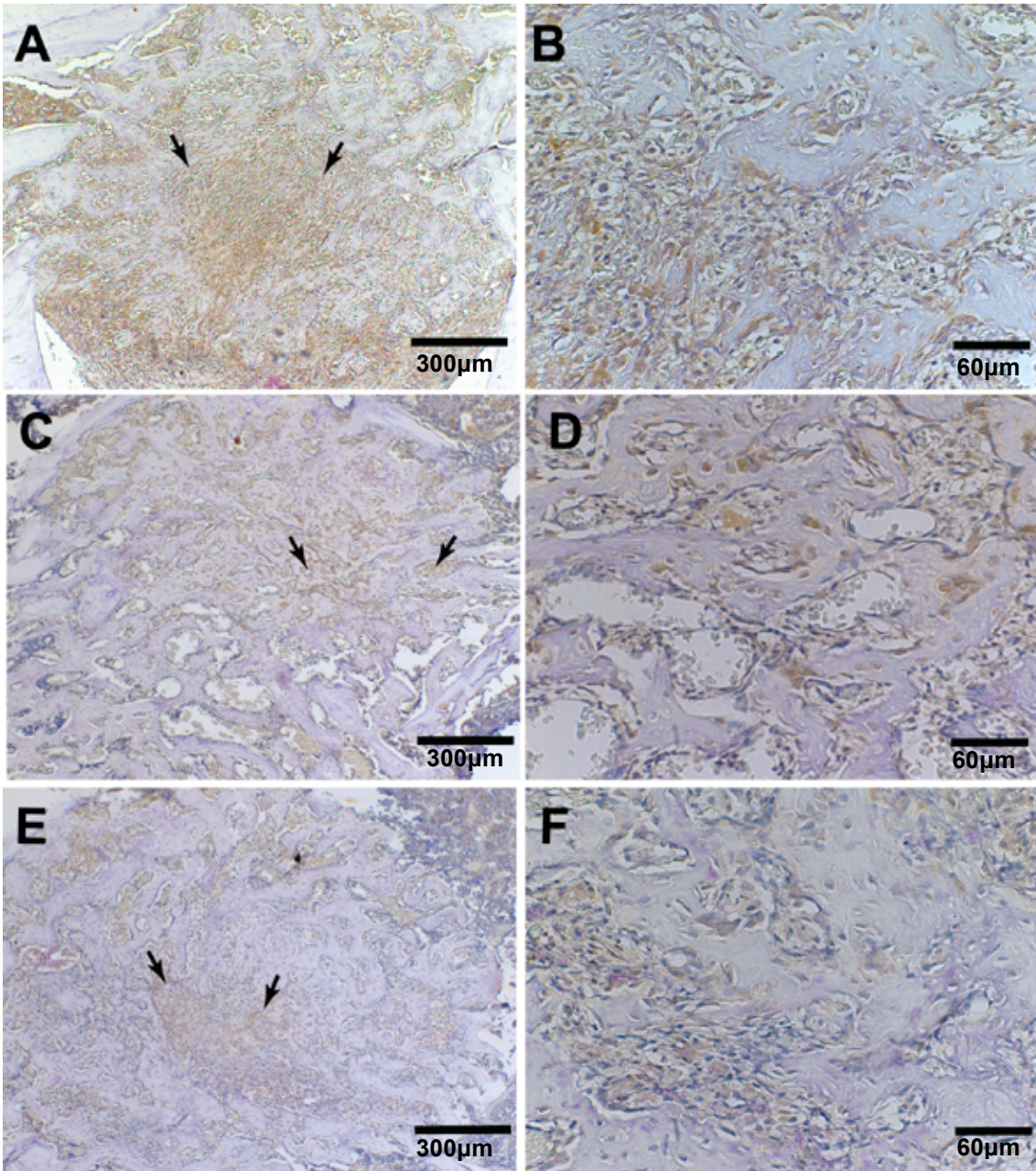


Figura 14: Fotomicrografias representativas da imunomarcação do VEGF sete dias após o procedimento cirúrgico. Tíbias controle (coágulo) – (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias tratadas com HY 1% – (C) baixa e (D) alta magnitude. Tíbias tratadas com HY apresentaram expressão reduzida de VEGF em relação   tíbias controle. Setas:  rea de imunomarca o. (E) Quantifica o do percentual de expressão do VEGF. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ (teste t de Student).

5.2 Análise da expressão do VEGF em tíbias tratadas com NTCPS e NTCPS-HY

A análise da imunoexpressão do VEGF demonstrou que tíbias controle (Figuras 15A e 15B) apresentaram uma maior expressão na região central do defeito e as tíbias tratadas com NTCPS (Figuras 15C e 15D) e NTCPS-HY (Figuras 15E e 15F) apresentaram essa expressão distribuída de maneira uniforme por todo o defeito. Morfometricamente, não houve diferença significativa entre a expressão do VEGF em tíbias tratadas com NTCPS ($13,65 \pm 2,32\%$) e NTCPS-HY ($14,75 \pm 1,45\%$) e tíbias controle ($20,90 \pm 1,84\%$) (Figura 15G).



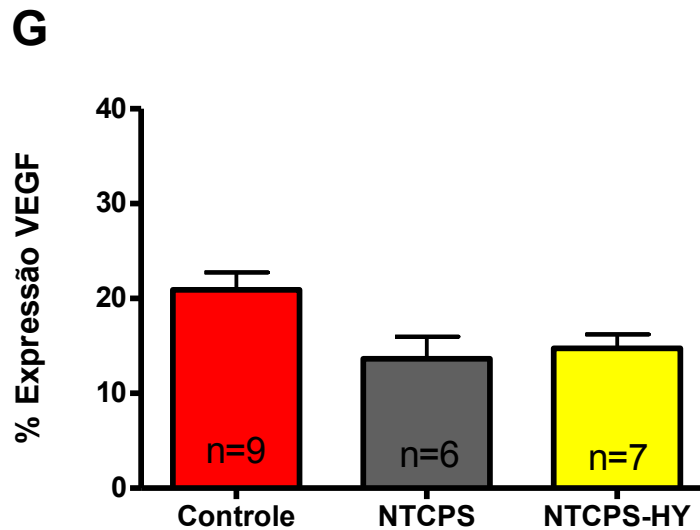
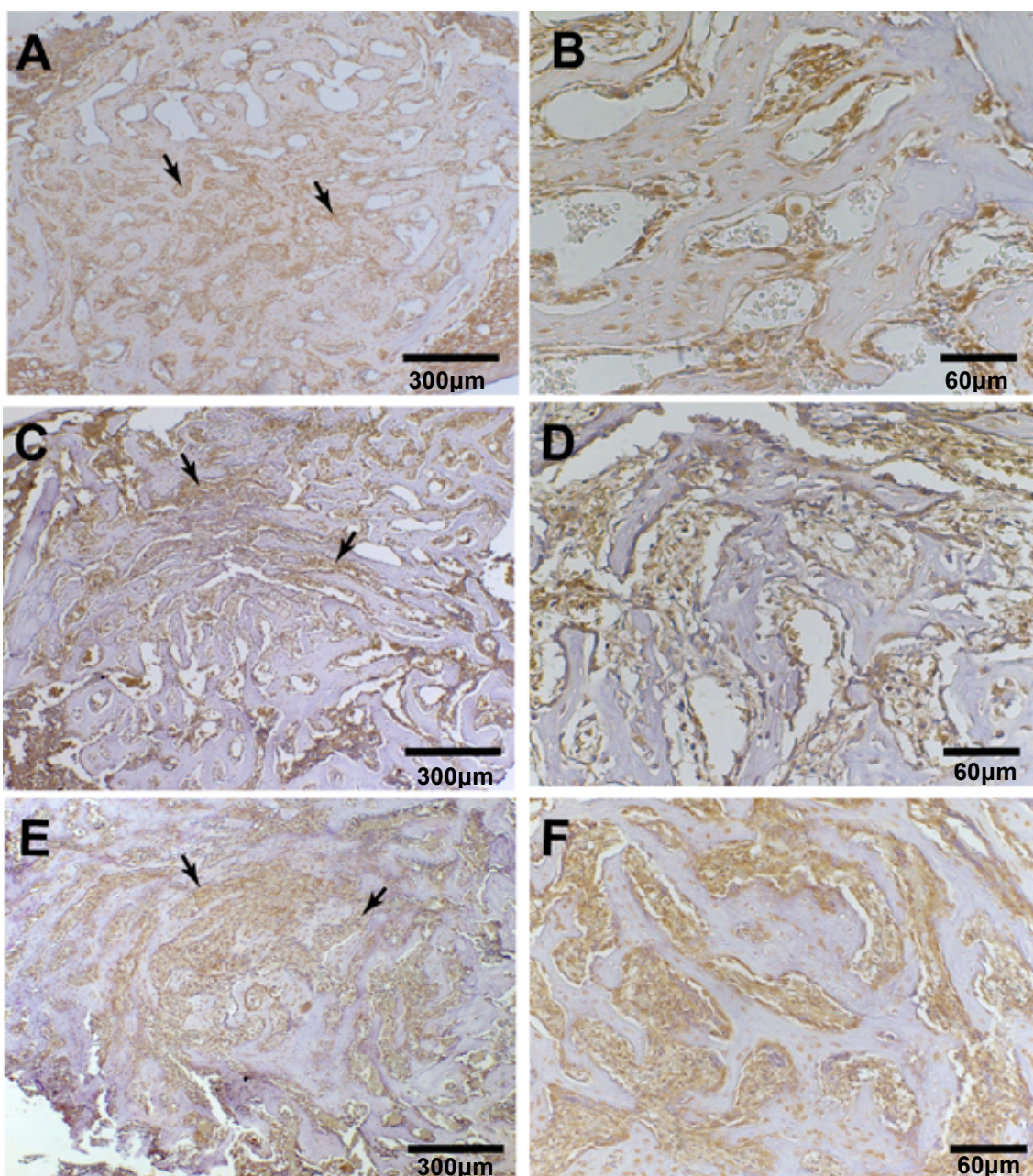


Figura 15: Fotomicrografias representativas da imunomarcação do VEGF sete dias após o procedimento cirúrgico. Tíbias controle (coágulo) – (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPS – (C) baixa e (D) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPS-HY - (E) baixa e (F) alta magnitude. Não houve diferença significativa entre tíbias controle e tíbias tratadas. Setas:  rea de imunomarca o. (G) Percentual de expressão do VEGF. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

5.3 Análise da expressão do VEGF em tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY

A análise da imunexpressão do VEGF demonstrou que tíbias controle (Figuras 16A e 16B) apresentaram uma expressão do VEGF mais discreta do que as tíbias tratadas com NTCPM (Figuras 16C e 16D) e NTCPM-HY (Figuras 16E e 16F). Essa expressão apresentava-se mais pronunciada na região intertrabecular do que na região trabecular nas tíbias tratadas. Morfometricamente, as tíbias tratadas com NTCPM ($32,54 \pm 2,39\%$) e NTCPM-HY ($32,73 \pm 4,12\%$) apresentaram um aumento na expressão do VEGF quando comparadas às tíbias controle ($20,90 \pm 1,84\%$) (Figura 16D).



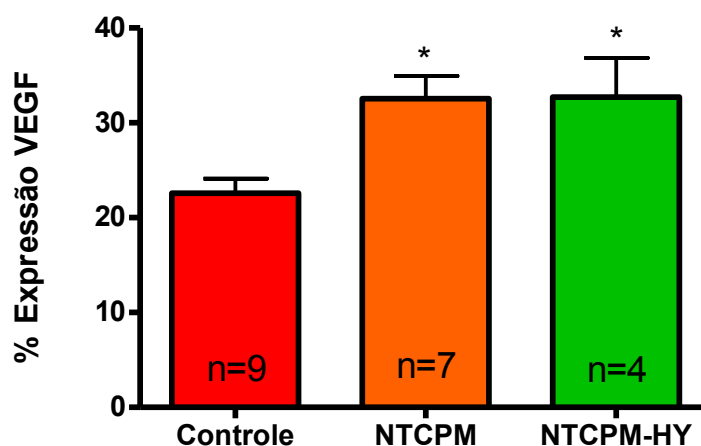
G

Figura 16: Fotomicrografias representativas da imunomarcção do VEGF sete dias após o procedimento cirúrgico. Tíbias controle (coágulo) – (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPM – (C) baixa e (D) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPM-HY - (E) baixa e (F) alta magnitude. As tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY apresentaram maior expressão de VEGF do que tíbias controle. Setas: área de imunomarcção. (G) Percentual de expressão do VEGF. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

VI. DISCUSSÃO

O tecido ósseo está continuamente sob processo de remodelação, importante para a manutenção da sua homeostase e para a reparação dos microtraumas frequentes. Entretanto, nos processos de descontinuidade óssea os reparos por meio da remodelação fisiológica podem estar limitados. Desta forma, para obter o reparo tecidual e a manutenção da função, recorre-se a procedimentos cirúrgicos, uso de enxertos, terapia celular e biomateriais.

Apesar de apresentar uma formação óssea mais lenta, pôde-se observar que o processo de reparo também estava acontecendo nos animais controle, o que demonstra que esse defeito não é de um “tamanho crítico”, sendo possível a sua completa cicatrização. Segundo Schmitz & Hollinger (1986), defeitos de “tamanho crítico” são definidos como aqueles onde a regeneração óssea espontânea não acontece ao longo da vida do indivíduo. No presente estudo, os defeitos ósseos cirurgicamente criados apresentaram 1,6 mm de diâmetro. De acordo com Lewandrowski *et al.* (1999), um defeito de 3 mm de diâmetro criado em tíbias de rato não responde a cicatrização espontânea, sendo considerado um defeito de “tamanho crítico”. No entanto, Melo *et al.* (2005) utilizaram um modelo com defeito de 4 mm de altura e 3 mm de largura em tíbias de rato e concluíram que esse não era um “tamanho crítico”, sendo possível a regeneração espontânea. Uma possível explicação é que os animais utilizados no trabalho de Melo *et al.* (2005) eram maiores (350-400g) e por isso foi possível a realização do experimento com completa regeneração do tecido ósseo em um modelo de defeito bem maior. Assim, diante destas discrepâncias, antes de iniciar os nossos experimentos, testamos vários diâmetros de defeitos tendo em vista o peso dos nossos animais (200-250 g) com o objetivo de obter um defeito compatível com o reparo espontâneo.

Estudos realizados em nosso laboratório avaliaram os efeitos do HY 1% e dos NTCPS-HY (100 µg/mL) no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos normais e diabéticos apresentando resultados expressivos (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2012). No presente trabalho analisamos os efeitos do HY 1%, NTCPS (100 µg/mL), NTCPS-HY (100 µg/mL), NTCPM

(100 µg/mL) e NTCPM-HY (100 µg/mL) no reparo ósseo de tíbias de ratos sete e catorze dias após a realização do procedimento cirúrgico, através de análises histológicas, morfométricas e imunohistoquímicas. O HY e os NTC de paredes simples e múltiplas foram capazes de acelerar o processo de reparo ósseo, assim como a funcionalização dos NTCPs e NTCPM com HY, entretanto sem diferenças significativas entre os diversos tratamentos.

Previamente à execução dos experimentos biológicos foi realizada a caracterização dos biocompósitos. A análise termogravimétrica do HY indicou que a perda máxima desse material ocorre em torno de 220°C. Valores semelhantes foram observados para a queima do HY nas amostras de NTCPs-HY e NTCPM-HY. Quando as temperaturas de máxima perda de massa de NTCPs e NTCPM nas amostras de NTCPs-HY e NTCPM-HY foram comparadas, foi possível notar que os NTCPM são mais estáveis termicamente, o que pode ser explicado pelo fato dos NTCPM apresentarem, na superfície, menores tensões de curvatura do que os NTCPs (Musumesi *et al.*, 2008). Os NTCPM foram capazes de estabilizar mais que o dobro de HY (NTCPM-HY:34,92% vs NTCPs-HY: 13,18%) quando comparado aos NTCPs, o que já era esperado devido à maior área dos NTCPM.

Após essa caracterização, os experimentos biológicos foram iniciados. O período escolhido para análise foi de 7 dias, pois ele representou com clareza o processo de reparo ósseo através de análises qualitativas e quantitativas. O nosso estudo teve como um dos objetivos avaliar os efeitos dos NTCPM e sua funcionalização com o HY, diferente dos trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório que utilizaram apenas o HY 1% e os NTCPs-HY. A justificativa para a incorporação dos NTCPM no nosso estudo é o seu menor custo e maior rendimento na síntese quando comparados com os NTCPs.

Análises histológicas demonstraram que, após um período de 7 dias, tíbias tratadas com HY, NTCPs, NTCPs-HY, NTCPM e NTCPM-HY apresentaram uma aceleração no processo de reparo e uma maior organização tecidual. Após a deposição de matriz orgânica, observa-se a substituição do tecido conjuntivo por trabéculas ósseas que apresentam menor quantidade de células. Os animais controle apresentaram uma extensa área de tecido de

granulação na região central do defeito, indicando que a formação óssea teve início nas bordas e seguiu a direção periferia-centro. De fato, análises histológicas de tíbias de ratos 10 dias após a realização do procedimento cirúrgico demonstraram grandes espaços inter-trabeculares na região do defeito e um tecido conjuntivo bem vascularizado e rico em fibroblastos (Melo *et al.*, 2005). Nossos resultados também mostraram, após um período de 7 dias, uma neoformação óssea escassa nos animais controle e um tecido conjuntivo rico em capilares neoformados. Morfometricamente, a comparação entre os grupos tratados e o grupo controle demonstrou que as tíbias tratadas com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY apresentaram maior deposição de trabéculas ósseas sete dias após a realização do procedimento cirúrgico, confirmando um reparo mais acelerado em relação às tíbias controle. Mendes *et al.* (2010) utilizaram HY 1% e NTCPS-HY (100 µg/mL) em alvéolos dentários de ratos e observaram um aumento significativo na deposição de trabéculas ósseas e na expressão de colágeno tipo I sete dias após as exodontias. Os resultados do presente estudo corroboram com esses dados, uma vez que o HY 1% e os NTCPS-HY (100 µg/mL) foram capazes de aumentar significativamente o percentual de trabéculas ósseas. Entretanto, diferente dos resultados de Mendes e colaboradores (2010), os NTCPS sozinhos também foram capazes de acelerar o processo de reparo ósseo. Estes resultados discrepantes podem ser explicados, pelo menos em parte, pela diferença do tipo de osso avaliado, ou seja, alveolar versus compacto (longo). Assim, estes dados evidenciam o impacto que as diferenças fisiológicas e morfológicas dos ossos podem ter nas terapias de reparo. Além disso, de acordo com os nossos resultados, Usui *et al.* (2008) demonstraram que os NTCPM apresentam uma alta compatibilidade com o tecido ósseo e são capazes de acelerar a neoformação óssea em tíbias de camundongos. De fato, observamos que as tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY apresentaram um aumento significativo no percentual de trabéculas ósseas, apresentando resultados tão expressivos quanto aos encontrados com o uso dos NTCPS e NTCPS-HY.

Após um período de 14 dias, as tíbias controle tiveram praticamente toda a região do defeito preenchida por trabéculas ósseas com maior

organização tecidual e as tíbias tratadas apresentaram uma redução na quantidade de trabéculas ósseas com uma maior quantidade de espaços intertrabeculares. Na evolução do reparo normal dos ossos longos, o tecido ósseo imaturo é substituído por tecido ósseo maduro, enquanto o processo osteogênico dentro da medula é reabsorvido e substituído pela medula hematopoética e tecido gorduroso. De fato, Sasaki & Watanabe (1995) observaram cavidades medulares completamente ocupadas por tecido ósseo neoformado após um período de 14 dias e, análises histológicas, demonstraram a formação completa da medula óssea após um período de 30 dias (Melo *et al.*, 2005). Assim, nossos resultados corroboram esses achados e evidenciam que o processo de reparo estava em um estágio mais avançado nos animais tratados, onde provavelmente as trabéculas neoformadas na região do defeito já estavam sendo reabsorvidas e esse espaço estava sendo preenchido pela medula óssea. Além disso, os tratamentos com NTCPM e NTCPM-HY aceleraram ainda mais o processo de reparo ósseo, uma vez que nesses animais o defeito estava preenchido em grande parte pela medula óssea.

O reparo ósseo é um processo que envolve a migração, a proliferação, a diferenciação e a ativação de diversos tipos celulares, e um importante aspecto para que esses eventos ocorram de forma coordenada é a vascularização (Filvaroff, 2003; Tisiridis *et al.*, 2007). Neste estudo observamos uma menor expressão do VEGF nas tíbias tratadas com HY quando comparadas às tíbias controle, além de uma tendência de redução nas tíbias tratadas com os NTCPM e NTCPM-HY. Essa expressão foi mais pronunciada na região central do defeito, o que indica que a vascularização estava associada a reabsorção do coágulo e formação de trabéculas. Street *et al.* (2002) observaram que a presença do VEGF nos estágios iniciais do reparo estava relacionada ao coágulo sanguíneo. Nossos resultados corroboram esses achados. Por outro lado, as tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY apresentaram uma maior expressão do VEGF que as tíbias controle. A imunomarcação do VEGF nesses animais provavelmente estava associada a reabsorção do tecido ósseo neoformado e a formação da medula óssea. Segundo Filvaroff (2003), durante a ossificação endocondral, os condrócitos

hipertróficos secretam VEGF para que a vascularização seja restabelecida, trazendo para o local componentes hematopoiéticos que se diferenciam em osteoclastos para a degradação da cartilagem mineralizada e formação do tecido medular. Assim, de um modo geral, os nossos resultados estão de acordo com a literatura que relata um aumento na expressão de VEGF tanto durante o processo de reabsorção do coágulo quanto durante o processo de remodelamento ósseo (Street *et al.*, 2002; Tarkka *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2002). Uma vez que a expressão do VEGF está associada ao remodelamento ósseo, estes resultados também sugerem um reparo mais acelerado nas tíbias tratadas.

Quando comparamos os resultados dos NTCPS e NTCPM, observamos que os tratamentos com NTCPM foram mais eficazes que os tratamentos com NTCPS. Essa diferença pode ser explicada devido ao fato dos NTCPM possuírem uma área maior que os NTCPS, apresentando uma maior quantidade de grupos funcionais ativos, que quando entram em contato com o sangue resultam em uma interação mais eficaz. Além disso, através das análises de TG podemos observar uma queima de 37,67% de NTCPS na amostra de NTCPS-HY e 55,51% de NTCPM na amostra de NTCPM-HY, sugerindo que as amostras de NTCPM apresentavam uma maior quantidade de NTC. Os NTCPS e NTCPM utilizados para as funcionalizações foram da mesma amostra dos NTCPS e NTCPM utilizados para os tratamentos. Quando funcionalizados, 34,92 % de HY estavam imobilizados nas amostras de NTCPM, enquanto as amostras de NTCPS apresentavam somente 13,00 % de HY. Dessa maneira, a maior área dos NTCPM e a maior quantidade de NTC e HY nas amostras de NTCPM-HY podem explicar a capacidade deste biomaterial em acelerar ainda mais o processo de reparo ósseo.

Em síntese, demonstramos que os tratamentos propostos foram capazes de acelerar de forma expressiva o reparo ósseo em um modelo de defeito com características diferentes e bem maior que os alvéolos dentários. Além disso, observamos que os NTCPM apresentaram resultados tão expressivos ou melhores que os NTCPS. Este último dado é de grande importância, uma vez que o custo dos NTCPM é bem inferior ao dos NTCPS. Assim, estes resultados ampliam as perspectivas da aplicabilidade do HY e dos NTC, pois além da Odontologia ampliamos a sua utilização para a Ortopedia.

VII. CONCLUSÕES

1. Os tratamentos das tíbias com HY 1%, NTCPs (100µg/mL), NTCPs-HY (100µg/mL), NTCPM (100µg/mL) e NTCPM-HY (100µg/mL) aumentaram a neoformação óssea sete dias após a realização do procedimento cirúrgico.

2. HY 1%, NTCPs (100µg/mL), NTCPs-HY (100µg/mL), NTCPM (100µg/mL) e NTCPM-HY (100µg/mL) foram capazes de acelerar de forma significativa o reparo ósseo em tíbias de ratos quatorze dias após a realização do procedimento cirúrgico, com destaque para os NTCPM e NTCPM-HY.

3. Tíbias tratadas com HY apresentaram uma menor expressão de VEGF que tíbias controle enquanto tíbias tratadas com NTCPM e NTCPM-HY apresentaram uma maior expressão de VEGF que tíbias controle. Não houve diferença significativa entre tíbias controle e tratadas com NTCPs e NTCPs-HY.

Assim, nossos resultados demonstram que esses biocompósitos podem ser utilizados nas terapias de reparo ósseo, reduzindo de forma significativa o tempo necessário para o reparo de uma lesão.

VIII. PERSPECTIVAS

- ▶ Avaliar os efeitos do HY e dos NTC-HY na expressão de citocinas inflamatórias;
- ▶ Avaliar os efeitos do HY, dos NTC e NTC-HY no reparo ósseo em um modelo de patologia óssea;
- ▶ Avaliar a qualidade do osso neoformado;
- ▶ Elucidar os mecanismos de ação pelos quais o HY e os NTC-HY são capazes de acelerar o reparo ósseo através de ensaios *in vitro*;
- ▶ Avaliar a toxicidade sistêmica dos NTC e dos NTC-HY através de análises histológicas e fisiológicas;
- ▶ Avaliar os efeitos da radiação gama na esterilização do HY e dos NTC-HY.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agren U. M.; Tammi R. H.; Tammi M. I. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 23, 996-1001 p., 1997;

Arosarena, O. A.; Collins, W. L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngology: Head and Neck Surgery*, v. 132, 592-597 p., 2005;

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*, v. 20, 209-219 p., 2006;

Bakos, D.; Soldán, M.; Hernández-Fuentes, I. Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite. *Biomaterials*, v. 20, 191-195 p., 1999;

Bates D.O.; Lodwick D.; Williams B. vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation*, v. 6, 83-96p., 1999;

Baughman, R. H. Synthesis of SiC nanorods from sheets of single-walled carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*, v. 359, 397-402 p., 2002;

Bhattacharyya, S.; Guillot, S.; Dabboue, H.; Tranchant, J-F.; Salvetat, J-P. Carbon Nanotubes as Structural Nanofibers for Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. *Biomacromolecules*, v. 9, 505-509 p., 2008;

Bhattacharya, M., Wutticharoenmongkol-Thitiwongsawet, P., Hamamoto D. T., Lee D., Cui T., Prasad H. S., Ahmad M. Bone formation on carbon nanotube composite. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 96, 75-82 p., 2010;

Byrd, H. S.; Spicer, T.E.; Cierney, G. Management of open tibial fractures. *Plastic and Reconstructive Surgery*, Baltimore, v. 76, 719-730 p., 1985;

Boccaccini, A. R.; Cho, J.; Roether, J. A.; Thomas, B. J. C.; Minay, E. J.; Shaffer, M. S. P. Electrophoretic deposition of carbon nanotubes - review. *Carbon*, v. 44, 3149-3160 p. 2006;

Boeck, E. M.; Pansani, C. A.; Okamoto, T.; Goissis, G.; Boeck Neto, R. J.; Marcantonio Júnior, E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais: estudo histopatológico em ratos. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, v. 28, 83-96 p., 1999;

Brown, M. B. & JONES, S.A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 19, 308-318 p., 2005;

Caliari, M. V. *Princípios Básicos de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes*. Belo Horizonte: UFMG, 149 p., 1997;

Chang, T. M. & Prakash, S. Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. *Molecular Biotechnology*, v. 17, 126-148 p., 2001;

Chu T. W.; Wang Z. G.; Zhu P. F.; Jiao W. C. Wen J. L.; Gong S. G. Effect os vascular endothelial growth factor in fracture healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, v. 16, 75-78 p., 2002;

Colnot, C.; Romero, D. M.; Huang, S.; Helms, J. A. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 435, 69-78 p., 2005;

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*, v. 16, 274-287 p., 2008;

Dechert, T. A.; Ducale, A. E.; Ward, S. I.; Yager, D. R. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound repair and regeneration*, v. 14, 252-258 p., 2006;

Deschrevel, B.; Tranchepain, F.; Vincent, J-C. Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase. *Matrix Biology*, v. 27, 475-486 p., 2008;

Doblaré, M.; Garcia, J. M. ; Gómez, M. J. Modelling bone tissue fracture

and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, v. 71, 1809-1840 p., 2004.

Engsig M. T.; Chen Q. J.; Vu T.H.; Pedersen A. C.; Therkidsen B.; Lund L. R. et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *The Journal of Cell Biology*, v. 151, 879-889 p., 2000;

Engström-Laurent, A. Hyaluronan in joint disease. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, 57-60 p., 1997;

Fassbender M.; Strobel C.; Rauhe J. S.; Bergmann C.; Schmidmaier G.; Wildemann B. Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model. *European Cells and Materials*, v. 22, 1-11p., 2011;

Fazzalari N. L. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporosis International*, v. 22, 2003–2006 p., 2011;

Filvaroff, E. H. VEGF and bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, v. 3, 304-307 p., 2003;

Fraser, J. R. E.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, 27-33 p., 1997;

Gerstenfeld L. C.; Cullinane D. M.; Barnes G. L.; Graves D. T.; Einhorn T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 88, 873-884 p., 2003;

Giavaresi, G.; Torricelli, P.; Fornasari, P. M.; Giardino, R.; Barbucci, R.; Leone, G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials*, v. 26, 3001-3008 p., 2005;

Grigolo, B.; Roseti, L.; Fiorini, M.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Aldini, N. N.; Giardino, R.; Facchini, A. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff[®]-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*, v. 22, 2417-2424 p., 2001;

Grecco, M. A. S.; Junior, I. P.; Rocha, M. A.; Barros, J. W. Epidemiology of tibial shaft fractures. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 10, 10-17 p., 2002;

Hartgerink, J. D.; Beniash & Stupp, S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, v. 294, 1684 p., 2001;

Islam, M.F., Rojas, E., Bergey, D.M., Johnson, A.T., and Yodh, A.G., High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water. *Nano Letters*, v. 3, 269-273 p., 2003;

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*, v. 12, 575-581 p., 2001;

Juhlin, L. Hyaluronan in skin. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, 61-66 p., 1997;

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. Tecido ósseo. *Histologia básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 111-128 p., 1999;

Kam, N. W. S.; O'Connell, M.; Wisdom, J. A.; Dai, H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, 11600-11605 p., 2005;

Kanczler J. M.; Oreffo R. O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European Cells and Materials Journal*, v.15, 100–114p., 2008;

Kappler, J.; Hegener, O.; Baader, S. L.; Franken, S.; Gieselmann, V.; Häberlein, H.; Rauch, U. Transport of a hyaluronan-binding protein in brain tissue. *Matrix Biology*, v. 28, 396-405 p., 2009;

Kobayashi H., Terao T. Hyaluronic acid-specific regulation of cytokines by human uterine fibroblasts. *American Journal of Physiology*, v. 273, 1151–1159 p., 1997;

Kogan, G.; Soltés, L.; Stern, R. & Gemeiner, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, v. 29, 17-25 p., 2006;

Kohno S.; Kaku M.; Tsutsui K.; Motokawa M.; Ohtani J.; Tenjo K. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. *Journal of Dental Research*, v. 82, 177-182 p., 2003;

Kolar P.; Schmidt-Bleek K.; Schell H.; Gaber T.; Toben D.; Schmidmaier G.; Perka C.; Buttgereit F.; Duda G. N. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. *Tissue Engineering*, v.16, 427-434 p., 2010;

Koltover, I.; Salditt, T.; Radler, J. O. & Safinya C.R. An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science*, v. 281, 78-81 p., 1998;

Krause, W. E.; Bellomo, E. G.; Colby, R. H. Rheology of Sodium Hyaluronate under Physiological Conditions. *Biomacromolecules*, v. 2, 65-69 p., 2001;

Lalani, Z.; Wong, M.; Brey, E. M.; Mikos, A. G.; Duke, P. J.; Miller, M. J.; 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*, v. 63, 1500-1508 p., 2005;

Lewandrowski, K. U.; Cattaneo, M. V.; Gresser, J. D.; Wise, D. L.; White, R. L.; Bonassar, L. & Trantolo, D.J. Effect of a poly (propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects. *Tissue Engineering*, v. 5, 305–316 p., 1999;

Levdokimova, N. Hyaluronic acid, receptor CD44, and their role in diabetic complications. *Ukr Biokhim Zh*, v. 80, 5-44 p., 2008;

Linker A, Meyer K, Weissmann B. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. *The Journal of Biological Chemistry*, v.213, 237-48 p., 1955;

Lisignoli, G.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Aldini, N. N.; 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*, v. 23, 1043-1051 p., 2002;

Liu, Z., Tabakman, S.; Welsher, K & Dai H. Carbonnanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Research*, v. 2, 85-120 p., 2009;

Macdonald, R. A.; Laurenzi, B. F.; Viswanathan, G.; Ajayan, P. M.; Stegemann, J. P. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 74A, 489-496 p., 2005;

Maeda, H., Sawa, T. & Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of Controlled Release*, v. 74, 47-61 p., 2001;

Malarkey, E. B.; M & Purpura V. Carbon Nanotubes in Neuroscience. *Acta Neurochirurgica Supplement*, v. 106, 337-341 p., 2010;

Maleki, A.; Kjoniksen, A.; Nystromn, B. Characterization of the chemicaldegradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents. *Carbohydrate Research*, v. 342, 2776-2779 p., 2007;

Mattson, M. P., Haddon, R. C & Rao, A. M. Molecular functionalization of carbon nanotubes use as substrates for neuronal growth. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 14, 175-182 p., 2000;

- Melo, L. G. N.; Nagata, M. J. H.; Bosco, A. F.; Ribeiro, L. L. G.; Leite, C. M. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials: A histological and histometric study in rat tibias. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, 683-691 p., 2005;
- Mendes, R.; Silva, G. A.; Lima, M.; Caliari, M.; Almeida, A.; Alves, J. B.; Ferreira, A. J. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology*, v. 53, 1155-1162 p., 2008;
- Mendes, R.; Silva, G. A.; Caliari, M.; Silva, E.; Ladeira, L.O.; Ferreira, A. J. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences*, v. 87, 215-222 p., 2010;
- Meyer, K.; Palmer, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 107, 629-634 p., 1934;
- Moseley, R.; Leaver, M.; Walker, M.; Waddington, R. J.; Parsons, D.; Chen, W. Y. J.; Embery, G. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF[®]-11p75, AQUACEL[®] and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. *Biomaterials*, v. 23, 2255-2264 p., 2002;
- Musumeci A. W., Waclawik E. R., Frost R. L. A comparative study of single-walled carbon nanotube purification techniques using Raman spectroscopy. , v. 71, 140-142 p. 2008;
- Niida S.; Kaku M.; Amano H.; Yoshida H.; Kataoka H.; Nishikawa S. et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *Journal of Experimental Medicine*, v. 190, 293-298 p., 1999;
- 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 hyaluronanbased scaffold suitable for tissue repair. *Journal of Anatomy*, v. 213, 520-530 p., 2008;

Peng H., Wright V., Usas A., et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *Journal of Clinical Investigation*, v. 110, 751–759 p., 2002;

Pilloni, A.; Bernard, G. W. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. *Cell and Tissue Research*, v. 294, 323-333 p., 1998;

Price, R. L.; Haberstroh, K. M.; Webster, T. J. Improved osteoblast viability in the presence of smaller nanometer dimensioned carbon fibres. *Nanotechnology*, v. 15, 892-900 p., 2004;

Prince, C. W. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 5, 12 p., 2004;

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*, v. 28, 390-395 p., 2009;

Sá, M.A.; Andrade V.B.; Mendes R.M.; Caliarí M.V.; Ladeira L.O.; Silva E.E.; Silva G. A. B.; Correa-Júnior J.D.; Ferreira A.J. Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral Disease*, 2012;

Sasaki, T.; Watanabe, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, v. 16, 9-15 p., 1995;

Savani, R. C.; Cao, G.; Pooler, P. M.; Zaman, A.; Zhou, Z.; Delisser, H. M. 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*, v. 276, 36770-36778 p., 2001;

Schiller S. Synthesis of hyaluronic acid by a soluble enzyme system from mammalian tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 15, 250-255 p., 1964;

Schindeler A.; McDonald M. M.; Bokko P.; Little D. G., Bone remodeling during fracture repair: The cellular Picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology* , v. 19, 459–466 p., 2008;

Schmitz, J.P. & Hollinger, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 205, 299–308 p., 1986;

Shyng, Y. C.; 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*, v. 44, 751-757 p., 1999;

Siqueira Jr., J. F.; Dantas, C. J. S. *Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 238 p., 2000;

Smart, S. K.; Cassady, A. I.; Martin, D. J. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*, v. 44, 1034-1047 p., 2006;

Street J.; Wang J. H.; Power C. W. A.; Redmond H. P. Multiple angiogenic cytokines protect against osteoblast apoptosis. *Surgery forum*, v.1, 465-467 p., 2000;

Street J.; Bao M.; deGuzman L.; Bunting S.; Peale F. V. Jr.; Ferrara N. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, 9656-9661 p., 2002;

Supronowicz P. R.; Ajayan P. M.; Ullmann K. R.; Arulanandam B. P. Metzger D. W.; Bizios R. Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 59, 499-506 p., 2002;

Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, et al. Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *Journal of Gene Medicine*, v.5, 560–566 p., 2003;

Tsiridis, E.; Upadhyay, N.; Giannoudis, P. Molecular aspects of fracture

healing : wich are the important molecules? *Injury*, v. 38,11-25 p., 2007;

Toole, B.P.; Wight, T.N.; Tammi, M.I. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease – minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, 4593-4596 p., 2002;

Trigueiro, J. P.; Silva, G. G.; Lavall, R. L.; Furtado, C. A.; Oliveira, S.; Ferlauto, A. S.; Lacerda, R. G.; Ladeira, L. O.; Liu, J. W.; Frost, R. L.; George, G. A. Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM and SEM methods. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 7, 3477-3486 p., 2007;

Trowbridge, H.O.; Emling, R.C. Regeneração e cicatrização. *Inflamação: uma revisão do processo*. São Paulo: Quintessence, 146-147 p., 1996;

Trueta J. The role of the vessels in osteogenesis. *Journal of Bone & Joint Surgery*, v. 45b, 402-418 p., 1963;

Usui, Y.; Aoki, K.; Narita, N.; Murakami, N.; Nakamura, I.; Nakamura, K.; Ishigaki, N.; Yamazaki, H.; Horiuchi, H.; Kato, H.; Taruta, S.; Kim, Y. A.; Endo, M.; Saito, N. Carbon Nanotubes with High Bone-Tissue Compatibility and Bone-Formation Acceleration Effects. *Small*, v. 4, 240-246 p., 2008;

Volpi N., Schiller J., Stern R. Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry*, v.16, 1718-1745 p., 2009;

Wiltfang, J.; Kloss, F. R.; Kessler, P.; Nkenke, E.; Schultze- Mosgau, S.; Zimmermann, R.; Schlegel, K. A. 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*, v. 15, 187-193 p., 2004;

Zanello, L. P.; Zhao, B.; HU, H.; Haddon, R. C. Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes. *Nano Letters*, v. 6, 562-567 p., 2006;

Zelzer E.; McLean W.; Ng Y. S.; Fukai N.; Reginato A. M.; Lovejoy S. et al.

Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*, v. 129, 1893-1904 p., 2002;

Zhao, B.; Hu, H.; Mandal, S. K.; Haddon, R. C. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chemistry of Materials*, v. 17, 3235-3241 p., 2005.