

Vanessa Barbosa Andrade

**AVALIAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS BASEADOS NO
HIALURONATO DE SÓDIO E NOS NANOTUBOS DE CARBONO
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE**

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Novembro – 2016

Vanessa Barbosa Andrade

**AVALIAÇÃO DE BIOCAMPÓSITOS BASEADOS NO
HIALURONATO DE SÓDIO E NOS NANOTUBOS DE CARBONO
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Dr. Anderson José Ferreira

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Novembro – 2016



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
VANESSA BARBOSA ANDRADE

164/2016
entrada
2º/2012
2012743581

Às oito horas do dia 24 de novembro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "AVALIAÇÃO DE BIOCÓMPÓSITOS BASEADOS NO HIALURONATO DE SÓDIO E NOS NANOTUBOS DE CARBONO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE", requisito final para obtenção do grau de Doutora em 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 de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADA
Dra. Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda	Newton Paiva	APROVADA
Dr. Fernando Antônio Mauad de Abreu	Newton Paiva	APROVADA
Dr. Ricardo Alves de Mesquita	UFMG	APROVADA
Dra. Erika Cristina Jorge	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, 24 de novembro de 2016.**

Dr. Anderson José Ferreira (Orientador) _____

Dra. Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda _____

Dr. Fernando Antônio Mauad de Abreu _____

Dr. Ricardo Alves de Mesquita _____

Dra. Erika Cristina Jorge _____

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

Profa. Luciana de Oliveira Andrade
COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

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 Protozoos do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia 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;
- Laboratório de Materiais Cerâmicos do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Difração e Espectroscopia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro).

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, ao meu marido Alexandre e ao meu filho Gabriel que são os alicerces da minha vida e que fazem/ fizeram a minha vida tão feliz e tão especial, tornando-me uma pessoa privilegiada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu forças e sempre está ao meu lado guiando os meus passos;

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

À minha querida mãe, fonte de inesgotável experiência e conhecimento, não os das ciências, mas da alma, com sábios conselhos, apoio incondicional e cuidado e amor sem igual.

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

A meu marido, Alexandre, pelo companheirismo, amor, amizade e cumplicidade;

Ao meu filho, Gabriel, o meu anjinho, por todo amor, carinho e alegria que traz para minha vida;

À toda minha família, em especial às tias Júlia, Wilma e Maria Ângela, Vivi e Jaque, por sempre acreditarem e torcerem por mim;

Ao meu orientador, professor Anderson José Ferreira, pelos ensinamentos, por toda sua ética profissional, pela confiança depositada e por ser uma pessoa de grande importância na minha formação;

Aos professores Luiz Orlando Ladeira, Marcelo Vidigal Caliari, Rodrigo R. Resende, Luiz Gustavo Cançado e Wander Vasconcelos por possibilitarem a realização de uma parte deste trabalho em seus laboratórios;

Ao Renato e especialmente ao Marcos que me acolheram neste universo de pesquisa e ensino, e contribuíram muito para a minha formação;

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

À Pós-graduação em Biologia Celular e a todos os professores pelos ensinamentos e oportunidades oferecidos;

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, em especial

à Thalita;

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Fratura e Reparo Ósseo	1
1.2 Fatores quimiotáticos e reguladores da atividade celular.....	3
1.2.1 TGF- β	4
1.2.2 PDGF.....	4
1.2.3 BMPs	5
1.3 Osteoporose.....	5
1.4 Biomateriais e Reparo ósseo.....	8
1.4.1 Ácido hialurônico.....	8
1.4.2 Nanotubos De Carbono.....	10
1.4.3 Funcionalização dos nanotubos de carbono com o hialuronato de sódio.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio	18
4.1.1 Síntese de NTCs.....	18
4.1.2 Caracterização dos NTCs.....	18
4.1.3 Funcionalização de NTCs com HY.....	19
4.2 Indução da osteoporose	19
4.3 Procedimento cirúrgico de perfuração da tíbia	21

4.4 Processamento histológico.....	23
4.5 Análise histológica e morfométrica	25
4.6 Microtomografia computadorizada.....	26
4.7 PCR quantitativo.....	27
4.8 Espectroscopia de Raman.....	30
4.9 Análise Estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Caracterização dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio	32
5.2 Peso do útero.....	34
5.3 Análises histológicas e morfométricas	34
5.3.1 Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 7 dias após os procedimentos cirúrgicos	34
5.3.2 Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 14 dias após os procedimentos cirúrgicos	38
5.3.3 Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 21 dias após os procedimentos cirúrgicos	41
5.4 Microtomografia computadorizada.....	44
5.4.1 Análise da reconstrução 2D.....	44
5.4.2 Análise da reconstrução 3D	46
5.4.3 Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT	48
5.5 Expressão de BMPs e fatores de crescimento.....	50
5.6 Espectroscopia de Raman.....	51
5.6.1 Análise qualitativa.....	51
5.6.2 Análise quantitativa.....	57

5.6.2.1 Área do pico 950 cm ⁻¹ - Hidroxiapatita.....	57
5.6.2.2 Área do pico 1450 cm ⁻¹ - Colágeno.....	59
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP-2: Proteína morfogenética do osso tipo 2

BMP-4: Proteína morfogenética do osso tipo 4

BMP-6: Proteína morfogenética do osso tipo 6

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

IL-1 : Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

MEC: Matriz extracelular

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MWCNTs: *Multi-walled carbon nanotubes*

NTCs: Nanotubos de carbono

NTCPSs: NTCs de paredes simples

NTCPSs-HY: NTCPSs funcionalizados com hialuronato de sódio

NTCPMs: NTCs de paredes múltiplas

NTCPMs-HY: NTCPMs funcionalizados com hialuronato de sódio

NTCs-COOH: NTCs carboxilados

OPN: Osteopontina

PBS: Solução tampão fosfato

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

SWCNT: *Single-walled carbon nanotubes*

TG: Termogravimetria

TGF- α : Fator de transformação do crescimento alfa

TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF: Fator de crescimento de endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do processo de reparo ósseo.

Figura 2: Estrutura química do hialuronato de sódio

Figura 3: Representação esquemática de NTCPSs e NTCPMs.

Figura 4: Procedimento cirúrgico de perfuração da tibia

Figura 5: MET e Raman dos NTCPMs e NTCPMs-HY

Figura 6: Peso do útero

Figura 7: Fotomicrografias e análise morfométrica-7 dias

Figura 8: Fotomicrografias e análise morfométrica-14 dias

Figura 9: Fotomicrografias e análise morfométrica-21 dias

Figura 10: Micro CT- Reconstrução 2 D

Figura 11: Micro CT - Reconstrução 3 D

Figura 12: Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT

Figura 13: Expressão de BMPs e citocinas inflamatórias

Figura 14: Espectros de Raman-7 dias

Figura 15: Espectros de Raman-14 dias

Figura 16: Espectros de Raman-21 dias

Figura 17: Análise quantitativa area pico 950 cm^{-1} - Hidroxiapatita

Figura 18: Análise quantitativa area pico 1450 cm^{-1} - Colágeno

RESUMO

O hialuronato de sódio (HY) auxilia na migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. Já os nanotubos de carbono (NTCs) são importantes no processo de reparo tecidual por servirem como sítio de nucleação para a deposição de matriz óssea e proliferação celular. Nesse estudo foram avaliados os efeitos do HY isoladamente e dos NTCs de paredes múltiplas funcionalizados ou não com HY (NTCPMs-HY) no reparo ósseo e na composição tecidual óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas (OVX) (ratas osteoporóticas). Os animais foram divididos em cinco grupos: sham coágulo; OVX coágulo; OVX HY 1%; OVX NTCPMs 100 μ g/mL e OVX NTCPMs-HY 100 μ g/mL. 3 meses após a ovariectomia as ratas foram submetidas à cirurgia de perfuração da tíbia, tratadas com os respectivos biomateriais e depois de 7, 14 e 21 dias os animais foram eutanaziados e as tíbias foram processadas para as seguintes análises: histo-morfometria, microtomografia 3D por raio X policromático (μ CT), PCR quantitativo e espectroscopia de Raman. Tíbias OVX controle apresentaram neoformação óssea escassa com trabéculas imaturas. Já as tíbias OVX tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY apresentaram aumento no número de trabéculas neoformadas, que mostraram-se mais organizadas e espessas em relação ao controle. Análises de μ CT revelaram aumento na quantidade de trabéculas ósseas em tíbias OVX tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY em relação às tíbias OVX coágulo. A expressão de BMPs foi maior em tíbias OVX tratadas com NTCPMs e NTCPM-HY em relação às tíbias OVX coágulo. A espectroscopia de Raman demonstrou uma incorporação mais pronunciada de hidroxiapatita e colágeno em tíbias OVX tratadas com HY e NTCPMs-HY. Assim, esse resultados indicam que NTCs sozinhos ou associados ao HY são biomateriais promissores para a engenharia de tecido ósseo.

Palavras – chave: Nanotubos de carbono, Hialuronato de sódio, Reparo ósseo,
Osteoporose

ABSTRACT

Sodium hyaluronate (HY) and carbon nanotubes (CNTs) are biomaterials that are able to accelerate the process of bone repair in rats. HY is an extracellular matrix component and it facilitates the cell migration, adhesion, proliferation and differentiation. Additionally, CNTs serve as nucleation sites for deposition of bone matrix and cell proliferation. The aim of this study was to evaluate the effects of HY, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and MWCNTs functionalized with HY (MWCNTs-HY) on bone repair of tibiae of rats ovariectomized (OVX) (osteoporotic rats). The animals were divided into five groups: sham, OVX control, OVX 1% HY, OVX MWCNTs (100 μ g/mL) and OVX MWCNTs-HY (100 μ g/mL). The bone defect was created by an 1.6 mm diameter drill and after 7, 14 and 21 days of induction of the defects in tibiae, the rats were eutanized and the tibiae were processed for histological analysis, X-ray micro CT (μ CT), quantitative PCR and spectroscopy of Raman. OVX control tibiae showed little bone formation with immature trabeculae. On the other hand, tibiae treated with HY, MWCNTs and MWCNT-HY showed an increase in the number of newly formed trabeculae which were more organized and thicker compared to OVX control. μ CT analysis demonstrated an increase in the amount of trabecular bone in tibiae treated with HY, MWCNTs and MWCNTs-HY when compared to OVX control. In addition, the expression of BMPs was higher in tibiae treated with MWCNTs and MWCNTs-HY. Raman spectroscopy showed that incorporation of hydroxyapatite and collagen was more pronounced in tibiae treated with HY and MWCNTs-HY. Thus, the results of this study indicate that MWCNTs alone or combined with HY are promising biomaterials for bone tissue engineering.

Keywords: Carbon nanotubes, Sodium hyaluronate, Bone repair, Osteoporosis

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fratura e reparo ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo que possui uma matriz extracelular (MEC) mineralizada, sendo composto por componentes orgânicos e inorgânicos (Robey & Boskey, 2008). A sua parte orgânica (35%) é responsável pela relativa flexibilidade óssea, sendo composta principalmente por fibras colágenas tipo I (90%) e uma pequena quantidade de proteoglicanos (ricos em condroitino sulfato, queratan sulfato e ácido hialurônico) e proteínas não colagenosas (osteocalcina, osteopontina e osteonectina). A sua parte inorgânica (65%) é composta, principalmente, por fosfato de cálcio que quando interage com o hidróxido de cálcio forma uma estrutura cristalina denominada hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A medida que ocorre a formação dos cristais de hidroxiapatita, outros íons como Na, K, Mg, CO_3 vão se incorporando a eles em diferentes proporções (Kalfas, 2001; Constantinescu *et al.*, 2002; Kierszenbaum, 2008). Devido à sua grande rigidez e resistência à pressão, o tecido ósseo possui propriedades ideais para a realização das funções de suporte e proteção do organismo vertebrado (Kolar *et al.*, 2010). No entanto, ele é frequentemente acometido por fraturas.

A tibia é um osso longo, localizado na região antero-medial da perna, coberto por uma fina camada de pele e tecido subcutâneo, sem proteção muscular. Esta localização pode ser justificada pela importância em proteger os vasos sanguíneos e os nervos da perna, porém a torna bastante vulnerável a traumas, resultando, com grande frequência, em fraturas (Byrd *et al.*, 1985).

As fraturas constituem a principal patologia do tecido ósseo, podendo ter causas primárias (traumas) ou secundárias (doenças prévias) (Kumar *et al.*, 2007). Os

acidentes de trânsito (motociclísticos - 35,75%, atropelamentos - 28,50%, automobilísticos - 17,32% e ciclísticos - 4,47%) são a principal causa das fraturas primárias (Grecco *et al.*, 2002) e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a osteoporose é a principal etiologia responsável pelas fraturas secundárias.

É interessante ressaltar que o reparo ósseo ocorre diferentemente de outros tecidos, uma vez que o novo tecido ósseo formado no local da lesão apresenta características morfofuncionais semelhantes às do tecido ósseo que havia sido lesado (SBPOT, 2007). O processo de reparo ósseo é caracterizado por ações de diferentes células e pode ser dividido em diversas fases: inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas (Sasaki & Watanabe, 1995; Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Schindeler *et al.*, 2008), síntese de MEC, mineralização do osteóide e maturação e remodelação óssea (Lalani *et al.*, 2005) (Figura 1).

Inicialmente, ocorre a formação do coágulo composto, principalmente, por eritrócitos, fibrina e plaquetas que liberam diversos fatores quimiotáticos e reguladores da atividade celular, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento e transformação alfa (TGF- α) (Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Allori *et al.*, 2008). Em seguida, ocorre a migração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos (Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Fazzalari, 2011) e o calo fibroso, que é um tecido rico em células osteogênicas, começa a se formar em torno da fratura. Ocorre, então, a formação de um tecido ósseo imaturo, devido à síntese de colágeno e matriz pelos osteoblastos. O calo ósseo formado tem um aspecto desorganizado, caracterizado por um arranjo irregular dos osteócitos e orientação irregular das fibras colágenas (Trowbridge & Emling, 1996; Klein *et al.*, 2003). Enquanto o reparo continua, ocorre a remodelação óssea, caracterizada pelo equilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e osteoblastos. Nessa

fase, o calo formado torna-se desnecessário, sendo reabsorvido, e as trabéculas ósseas são, então, formadas e orientadas ao longo das linhas de esforços se tornando funcionais (Fazzalari, 2011).

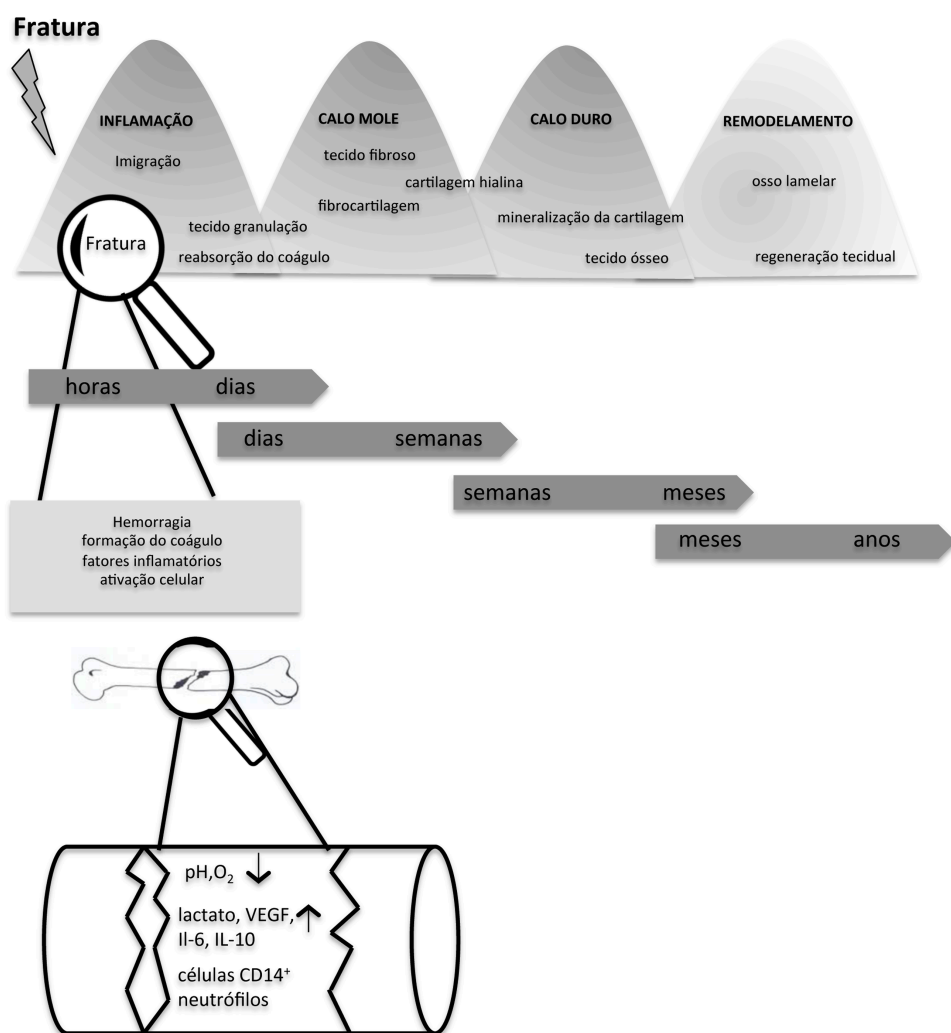


Figura 1: Representação esquemática do processo de reparo ósseo. Adaptado de Kolar *et al.*, 2010.

1.2 Fatores quimiotáticos e reguladores da atividade celular

Durante o processo de reparo ósseo é necessário que ocorra a migração, diferenciação e ativação de vários tipos celulares e teciduais (Colnot *et al.*, 2005). Juntamente com as células ósseas, existem inúmeros fatores envolvidos nesse

processo, sendo que os principais são: os membros da família FGF, o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), o PDGF, o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e as proteínas morfogênicas do osso (BMPs) (Gerstenfeld *et al.*, 2003; Street *et al.*, 2000; Devescovi *et al.*, 2008; Carreira *et al.*, 2014).

1.2.1 TGF- β

O TGF- β é uma proteína responsável por controlar a proliferação e diferenciação celular, sendo sintetizado por osteoblastos e condrócitos. No reparo de uma fratura, altos níveis de TGF- β são observados quando começa a formação do calo mole, onde um número crescente de células progenitoras imaturas, osteoblastos e condroblastos invadem o local lesionado (Zimmermann *et al.*, 2005). Além disso, o TGF- β exerce um papel importante no bloqueio da reabsorção óssea e apoptose dos osteoclastos (Hughes *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2002).

1.2.2 PDGF

O PDGF é sintetizado por plaquetas, monócitos, macrófagos, células endoteliais e osteoblastos e participa dos processos de migração e proliferação celular (Lieberman *et al.*, 2002). Durante a cicatrização de uma fratura, promove o recrutamento de células-tronco mesenquimais (Phipps *et al.*, 2012), que são células capazes de se diferenciar em osteoblastos, estabiliza os pericitos da neovasculatura (Mills *et al.*, 2013) e promove a regeneração através da secreção de citocinas imunomoduladoras e fatores de crescimento (Glowacki *et al.*, 2015). Além disso, o PDGF interfere no processo de angiogênese e é capaz de estimular a síntese de

componentes da MEC, como colágeno e ácido hialurônico (Matsuda *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 2009).

1.2.3 BMPs

BMPs são membros da superfamília de TGF- β e estão entre os mais potentes fatores de crescimento ósseo conhecidos, apresentando propriedades mitogênicas e morfogenéticas (Lieberman *et al.*, 2002; Arosarena & Collins, 2005). Durante o processo de reparo ósseo são produzidos por células mesenquimais, osteoblastos e condrócitos e participam dos processos de quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células mesenquimais, angiogênese e síntese de MEC (Sakou, 1998; Reddi, 2001). Embora as BMPs apresentem uma forte relação estrutural e funcional, eles são expressos em diferentes estágios do processo de reparo ósseo.

A expressão de BMP-2 é mais pronunciada no estágio inicial do processo de reparo, estimulando a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células osteoprogenitoras que, mais adiante, diferenciam-se em pré-osteoblastos e osteoblastos maduros (Wong & Rabie, 2005; Schultze-Mosgau *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2014). Já BMP-4 apresenta a sua maior expressão no período de formação do tecido ósseo primário (Sato *et al.*, 1999). Além disso, BMP-4 e BMP-6 atuam em um estágio mais tardio do processo de reparo ósseo, quando ocorre a reabsorção óssea e o recrutamento de osteoblastos não está mais ativo (Fischerauer *et al.*, 2012).

1.3 Osteoporose

O aumento da expectativa de vida proporcionou um incremento acentuado na população mais idosa e, com isso, um aumento na prevalência de comorbidades relacionadas ao envelhecimento, como a osteoporose. A osteoporose é uma doença

esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura (Thormann *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016). Inicialmente, a osteoporose é uma doença assintomática, o que a define como “a epidemia silenciosa do século XX” ou “doença traiçoeira”(Danowski, 1996), uma vez que as primeiras manifestações clínicas aparecem quando já houve uma perda de 30% a 40% da massa óssea.

Aproximadamente 50% dos indivíduos acometidos por fraturas osteoporóticas tornam-se totalmente dependentes de outras pessoas, muletas ou bengalas para auxiliá-los em suas atividades de vida diária, sendo que cerca de 15% desses pacientes vão a óbito no primeiro ano após a fratura (Devogelaer *et al.*, 1996; Johnell & Kanis, 2005). Estima-se que 10 milhões de brasileiros tenham osteoporose e que a cada ano ocorram cerca de 2,4 milhões de fraturas decorrentes dessa doença (Ministério da Saúde).

As conseqüências clínicas dessas fraturas tornaram um grande problema de saúde pública, uma vez que a qualidade de vida e o grau de independência das pessoas acometidas ficam prejudicados, gerando enormes repercussões sociais e econômicas (Dequeker *et al.*, 2003; Geusens & van den Bergh *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2016).

Na osteoporose a concentração de cálcio na matriz óssea é normal, porém a quantidade de tecido ósseo é menor, apresentando o osso amplos canais de reabsorção, o que o torna menos resistente. Tudo isso acontece devido a diminuição na formação óssea, aumento na reabsorção do osso formado ou da combinação dos dois fatores (Huang *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2017).

A doença pode se desenvolver na senescência ou associada a processos

inflamatórios, alterações endócrinas, uso de drogas como os glicocorticóides ou pela deficiência de hormônios sexuais como o estrógeno (Manolagas, 2000; Riesco *et al.*, 2013). O estrógeno exerce uma função importante no tecido ósseo e seus receptores estão presentes tanto nos osteoblastos quanto em osteócitos (Tomkinson *et al.*, 1997; 1998). No tecido ósseo, ele é capaz de aumentar a diferenciação osteoblástica (Bland, 2000) e estimular a síntese e mineralização da matriz óssea (Chow *et al.*, 1992), regulando a expressão de genes que codificam colágeno I, osteopontina, osteocalcina e osteonectina (Bland, 2000). No processo de reabsorção óssea, o estrógeno atua de maneira indireta regulando a síntese e a liberação de fatores de crescimento, citocinas e prostaglandinas (Hillard e Stevenson, 1991; Bilezikian *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 2000). Neste contexto, ele atua nos monócitos promovendo uma redução plasmática de IL-1 e TNF- α (Pacifici *et al.*, 1989; Pacifici, 1996), o que estimula a produção de citocinas como IL-6 e M-CSF as quais regulam a fusão e a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Além disso, ele promove a liberação de TGF- β , que atua sobre osteoclastos, estimulando a sua morte e inibindo a reabsorção óssea (Hughes *et al.*, 1997).

É descrito na literatura que a osteoporose altera o metabolismo ósseo, tanto no processo de remodelação quanto no processo de reparo (Cortet, 2011; Liu *et al.*, 2013). Alguns estudos demonstraram um atraso no reparo ósseo de tíbias de ovelhas e de fêmures de ratas com osteoporose (Walsh *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2007). Além disso, Hsieh *et al.* (1995) observaram que a deficiência estrogênica pode afetar a remodelação óssea de alvéolos dentários de ratas ovariectomizadas. Segundo Xu *et al.* (2004), a osteoporose influencia a quantidade e a qualidade do calo ósseo em estágios precoces do reparo ósseo, podendo estar relacionado com a diminuição da expressão de TGF- β em osteoblastos. Entretanto, Blythe e Burchsbaum (1976)

avaliaram o efeito do estrógeno no reparo de fraturas de fíbulas e não observaram diferenças na resistência óssea entre os grupos tratados e controle.

1.4 Biomateriais e reparo ósseo

Vários estudos tem avaliado o reparo ósseo frente à inserção de diferentes drogas e biomateriais (Shyng *et al.*, 1999; Wiltfang *et al.*, 2004; Usui *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2010; Alt *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2013; Einhorn and Gerstenfeld 2015; Andrade *et al.*, 2016; Frasca *et al.*, 2017) com o objetivo de diminuir o tempo do processo de reparo, assim como o aparecimento de complicações. Nos últimos anos, os nanotubos de carbono (NTCs) e o hialuronato de sódio (HY) surgiram como potenciais biomateriais capazes de acelerar o reparo ósseo (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2013; Martins-Júnior *et al.*, 2016; Sá *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2016).

1.4.1 Ácido hialurônico

O HY é uma glicoaminoglicana de alto peso molecular ($\sim 10^7$ Da) composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido *D*-glucorônico e *N*-acetilglicosamina (Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004). A primeira descrição da sua estrutura química foi realizada por Linker em 1955 (Figura 2) (Linker *et al.* 1955). Por ser um dos principais componentes da MEC (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), altas concentrações de HY podem ser observadas na pele (Juhlin, 1997), nos fluidos das junções sinoviais, nos revestimentos dos tendões (Engström-Laurent, 1997; Fraser *et al.*, 1997, Altman *et al.*, 2015), no humor vítreo, no cordão umbilical e na maioria dos

líquidos corpóreos (Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004). Sua síntese ocorre no citoplasma e sua liberação ocorre por meio de um complexo enzimático presente na membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2004).

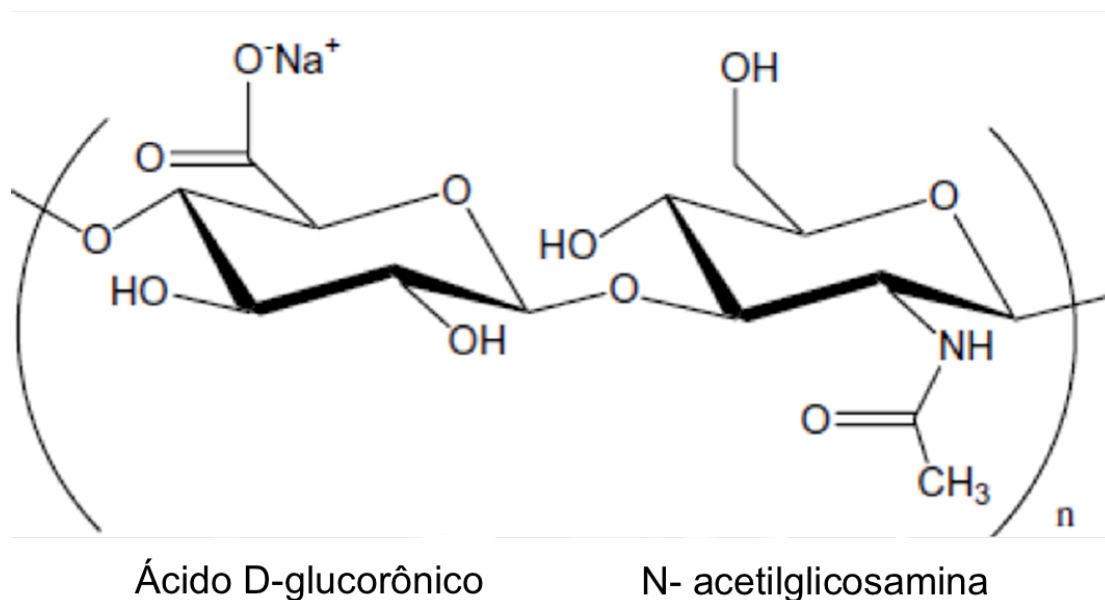


Figura 2: Estrutura química do hialuronato de sódio (Fonte: Maleki *et al.*, 2007).

A interação direta do HY com receptores de superfície, como CD44 (Knudson *et al.*, 2002), RHAMM (Lapcik *et al.*, 1998) e ICAM-1 (Laurent *et al.*, 1986), ativa vias intracelulares como Akt, ERK1/2 (David-Raoudi *et al.*, 2008), c-Src, Ras e MAP quinases (Xu *et al.*, 2012). Essas vias de sinalização estão envolvidas em diversas funções celulares como adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Turley *et al.*, 2002). Sendo assim, o HY desempenha um papel crucial no processo de reparo tecidual.

No processo de reparo ósseo, o HY pode acelerar a formação óssea *in vitro* (Pilloni & Bernard, 1998) e *in vivo* (Sasaki & Watanabe, 1995), acelerar a revascularização (Giavaresi *et al.*, 2005), promover a adesão de osteoclastos à superfície óssea (Prince, 2004) e acelerar o processo inflamatório, aumentando o

infiltrado celular e a produção de citocinas pró-resolutivas (Kobayashi *et al.*, 1997). Estudos recentes tem observado efeitos benéficos do HY em modelos de defeitos ósseos, isolado ou associado a outros materiais (Mendes *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2001; Arosarena & Collins, 2005). Mendes *et al.* (2008) descreveram o potencial osteoindutor do HY em alvéolos dentários de ratos pela estimulação de 2 fatores: BMP-2 e osteopontina. Outros estudos demonstraram que a associação do HY com outros materiais induz efeitos positivos no processo de reparo ósseo, seja como carreador para BMP-2 (Itoh *et al.*, 2001) ou associado à NTCs (Mendes *et al.*, 2010).

1.4.2 Nanotubos de carbono

O carbono é um dos elementos químicos mais fascinantes, além de ser um dos mais abundantes na natureza. No princípio, acreditava-se que o carbono era capaz de dar origem apenas ao grafite e ao diamante, mas em 1985 foi descoberta a existência dos fulerenos (Kroto *et al.*, 1985) e em 1991 Sumio Iijima observou pela primeira vez os NTCs (Iijima 1991).

Os NTCs são formas metaestáveis resultantes do enrolamento de um plano de átomos de carbono (Dresselhaus *et al.*, 1996) e estão entre os mais duros e fortes materiais conhecidos na área de engenharia de materiais. Podem ser classificados em NTCs de paredes simples (NTCPSs) – *single walled carbon nanotubos* (SWCNTs) ou NTCs de paredes múltiplas (NTCPMs) – *multi walled carbon nanotubes* (MWCNTs) (MacDonald *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Boccaccini *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2016). OS NTCPMs foram observados pela primeira vez em 1991 por Iijima e, 2 anos depois, a síntese dos NTCPSs foi publicada simultaneamente por Iijima e colaboradores no Japão e Bethune e colaboradores nos EUA. Os NTCPSs possuem apenas uma folha de grafite enrolada em torno de um mesmo eixo e diâmetros de 1,0

nm a 1,5 nm, com comprimentos de centenas e até dezenas de vezes maiores que seu diâmetro (Ajayan, 1999). Já os NTCPMs possuem uma estrutura de múltiplas folhas de grafite enroladas em torno de um mesmo eixo e os seus diâmetros podem ser superiores a 100 nm (Tran *et al.*, 2009). A Figura 3 mostra NTCPs e NTCPMs através de uma representação esquemática.

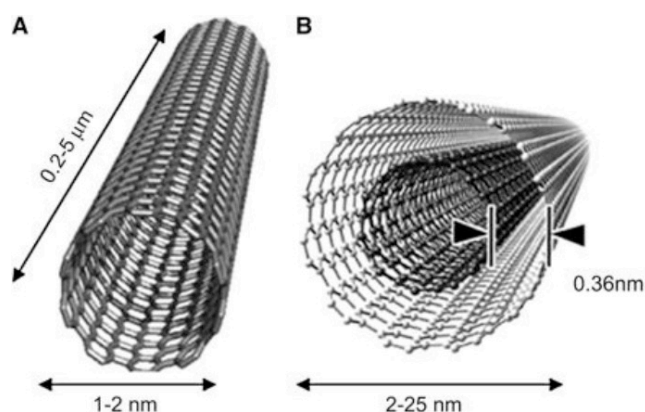


Figura 3: Representação esquemática de NTCPs (A) e NTCPMs (B).

As principais formas de síntese dos NTCs são: deposição via descarga de arco elétrico, deposição química na fase vapor (CVD) e ablação por laser. No primeiro processo, uma descarga de arco elétrico é gerada entre dois eletrodos de grafite em uma atmosfera inerte dentro de uma câmara à baixa pressão. Para produzir essa descarga, as pontas dos eletrodos são aproximadas até que a distância entre elas se torne suficientemente pequena para que forme um arco elétrico entre os eletrodos. Quando a pressão interna da câmara é igualada à externa, a câmara é então aberta e o material gerado pelo processo é recolhido da superfície da câmara e, em seguida, é feito o processo de purificação. Este processo ocorre a temperaturas elevadíssimas e

os NTCs produzidos por esta técnica não apresentam defeitos em sua estrutura, porém o material é menos puro e sua produção ocorre em pequena escala (Khan *et al.*, 2006).

A CVD consiste basicamente em utilizar um gás que tenha carbono como elemento constituinte e juntamente com catalisadores metálicos submetê-los a uma alta temperatura. Quando a temperatura é suficientemente alta ocorre a decomposição térmica do precursor de carbono sobre a superfície do catalisador produzindo os NTCs. Os NTCs produzidos por essa técnica podem apresentar defeitos em sua estrutura, porém são produzidas quantidades comerciais de relativa pureza (Khan *et al.*, 2006).

No método de ablação a laser o grafite é vaporizado pela irradiação laser em um fluxo de gás inerte. Para a produção de NTCPMs, apenas o grafite puro é submetido a ablação, e para a síntese de NTCPSs uma pequena quantidade de metal de transição é misturada ao grafite (Guo *et al.*, 1995; Yakobson and Smalley, 1997).

Os NTCs apresentam propriedades físicas, químicas e mecânicas bem interessantes. Dependendo de seu raio e simetria (ou quiralidade) eles podem se comportar como um metal ou semicondutor. São materiais que apresentam uma grande resistência mecânica devido à forte ligação covalente entre os seus átomos, uma alta condutividade térmica devido ao seu caráter metálico, além de apresentar inércia química, devido a ausência de ligações pendentes (Dresselhaus *et al.*, 1996; Tonelli *et al.*, 2012).

As propriedades dos NTCPSs e dos NTCPMs são bem parecidas, porém os NTCPMs apresentam uma melhor resistência e uma maior pureza em relação aos NTCPSs, além de ter a vantagem de suas paredes externas protegerem as paredes internas de interações químicas com diferentes substâncias (Eatemadi *et al.*, 2014).

Por serem materiais bastante versáteis, com propriedades bem distintas,

biocompatíveis e de fácil capacidade de funcionalização, o potencial dos NTCs para aplicações biológicas é elevado (Malarkey and Purpura, 2010; Irineu *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013; Cancian *et al.*, 2016). Diversos estudos tem demonstrado a utilização dos NTCs no encapsulamento de enzimas, na distribuição de drogas, como vesículas para entrega de DNA em células vivas e também no processo de reparo ósseo (Mattson *et al.*, 2000; Hartgerink *et al.*, 2001; Koltover *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2010).

No processo de reparo ósseo, os NTCs podem promover a nucleação de cristais e o crescimento do componente inorgânico do osso (Zhao *et al.*, 2005), sustentar e promover o crescimento de osteoblastos (Price *et al.*, 2004) e acelerar a formação óssea (Zanello *et al.*, 2006). Supronowicz *et al.* (2002) demonstraram *in vitro* que os NTCs estimulam a proliferação celular e aumentam a expressão de genes relacionados a formação óssea. Embora a maioria dos estudos que demonstram a interação do tecido ósseo com os NTCs tenham sido feitos *in vitro*, alguns estudos *in vivo* também foram realizados (Saito *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Abarrategi *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2008; Usui *et al.*, 2008; Martins-Júnior *et al.*, 2016).

Quando associados a outros materiais, os NTCs podem gerar compósitos diferenciados, servindo como elemento de reforço e conferindo ao novo material melhorias nas propriedades físico-químicas e mecânicas (Abarrategi *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Sitharaman *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2013; Martins-Júnior *et al.*, 2013; Cancian *et al.*, 2016). Diversos estudos mostraram que implantes a base de NTCPMs combinados com outras substâncias, tais como quitosana ou HY, possuem uma alta compatibilidade com o tecido ósseo, promovendo um crescimento desse tecido sem apresentar uma resposta inflamatória acentuada (Abarrategi *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2016).

1.4.3 Funcionalização dos NTCs com o HY

NTCs são materiais com uma grande inércia química e, portanto, de difícil interação com outros materiais, como os polímeros. Um dos principais motivos para isto é a baixa dispersão dos NTCs em água ou solventes orgânicos. Para utilizar os NTCs como reforço de um material é necessário aumentar a sua interação através do processo de funcionalização. Este processo consiste na inserção de grupos funcionais nas paredes e extremidades dos NTCs a fim de promover uma melhor solubilização e dispersão em solventes e uma melhor interação dos NTCs com a matriz (Bhattacharyya *et al.*, 2008).

Um dos materiais que são frequentemente utilizados como matrizes tridimensionais ou *scaffolds* no campo da engenharia de tecidos são os polímeros (Thomas *et al.*, 2007) e, neste contexto, polissacarídeos, como o HY, são muito interessantes por estarem relacionados aos mecanismos de reparo (Crompton *et al.*, 2007; Martins-Júnior *et al.*, 2013). No entanto, para que materiais hidrogéis sejam utilizados como matrizes tridimensionais, algumas propriedades essenciais devem ser destacadas, como a capacidade de absorção de água e a estabilidade mecânica da estrutura porosa. Assim, diversos estudos tem demonstrado que as interações dos NTCs com hidrogéis são capazes de melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis sem alterar algumas propriedades originais desse material, como a capacidade de absorção de água e o seu inchamento natural (Li *et al.*, 2005; Bhattacharyya *et al.* 2008). Dentro desse contexto, Mendes *et al.*, (2010), Sá *et al.*, (2012, 2016), Martins-Júnior *et al.*, (2016) e Andrade *et al.*, 2016 demonstraram que a funcionalização de NTCs com HY é uma estratégia viável para melhorar as propriedades físicas do HY com a preservação dos efeitos biológicos.

2. JUSTIFICATIVA

Em estudo prévio avaliamos os efeitos do HY e dos NTCs de paredes simples ou múltiplas funcionalizados ou não com HY no reparo ósseo de tíbias de ratos (Andrade *et al.*, 2016). A análise morfométrica revelou que todos os tratamentos promovem um aumento significativo na formação de trabéculas ósseas e imunohistoquímica demonstrou, qualitativa e quantitativamente, uma menor expressão do VEGF nas tíbias tratadas com HY quando comparadas às tíbias controle. Nas tíbias tratadas com NTCPMs e NTCPMs-HY, a expressão do VEGF foi maior em relação às tíbias controle, sugerindo uma capacidade maior destes biomateriais em acelerar o processo de reparo ósseo (Andrade *et al.*, 2016). Estes dados indicam que o HY, os NTCs e os NTCs de paredes simples ou múltiplas funcionalizados com HY aceleram o processo de reparo em tíbias de ratos.

No entanto, é importante salientar que esses experimentos foram conduzidos em animais normais, sem evidências de comprometimento do processo de remodelação óssea. Desta maneira, no presente estudo, o reparo ósseo das tíbias foi reproduzido em animais osteoporóticos, de modo a verificar se o tratamento das tíbias com HY ou NTCs-HY também é efetivo em condições patológicas ósseas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do HY, dos NTCPMs e NTCPMs funcionalizados com o HY, no reparo e na composição tecidual óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas (osteoporóticas).

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as amostras de NTCPMs e NTCPMs funcionalizados com HY;
- Avaliar histologicamente o processo de reparo ósseo 7, 14 e 21 dias após a realização do defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY;
- Avaliar morfometricamente o percentual de trabéculas ósseas 7, 14 e 21 dias após a realização do defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY;
- Avaliar a formação óssea 7, 14 e 21 dias após a realização do defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY utilizando a micro-CT;
- Avaliar morfometricamente a densidade mineral óssea e o processo de reparo ósseo 7 dias após a realização do defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY utilizando a micro-CT;

- Avaliar a expressão de BMPs, TGF- β e PDGF-B 7 dias após a realização do defeito ósseo em tíbias de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY;
- Avaliar por meio da espectroscopia de Raman a composição tecidual óssea após 7, 14 e 21 dias de reparo de tíbias de ratas ovariectomizadas tratadas ou não com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY.

4. METODOLOGIA

4.1 Síntese e caracterização dos NTCs funcionalizados com o HY

4.1.1. Síntese de NTCs

NTCPMs foram sintetizados no laboratório de Nanomateriais do departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, em supervisão do professor Luis Orlando Ladeira. O método utilizado para a síntese foi o de deposição de vapor químico utilizando ferroceno e etileno como catalisadores a uma temperatura de 750°C (Trigueiro *et al.*, 2007). Em seguida, o material foi purificado através de tratamentos ácidos e oxidação térmica e foram então submetidos a refluxos em ácido nítrico (3 mol/L) em microondas por um período de 15 minutos com o objetivo de adicionar grupos carboxílicos à estrutura dos NTCPMs. Por fim, NTCPMs foram centrifugados a 7000 rpm e lavados diversas vezes com água deionizada até a completa remoção do ácido nítrico. Os NTCPMs carboxilados (NTCPMs-COOH) foram mantidos na estufa a 60°C por 12 h para secarem.

4.1.2. Caracterização dos NTCs

Para a caracterização dos NTCPMs, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada a fim de verificar o número e a espessura das paredes dos NTCPMs. Além disso, em espectros de Raman foram analisadas as regiões de energia das bandas D e G. Sabe-se que a banda D está centrada a 1350 cm⁻¹ e é relacionada à presença de carbono amorfo e defeitos estruturais nos NTCs (Zhou *et al.*, 2001; Jorio *et al.*, 2003; Arepalli *et al.*, 2004), enquanto a banda G é originada no modo tangencial E_{2g} do grafite tanto em NTCs de paredes simples quanto de paredes

múltiplas. A intensidade relativa entre as bandas D e G é um indicativo da presença de carbono amorfo e/ou defeitos nos NTCs. As análises de caracterização das amostras foram realizadas em parceria com o professor Rodrigo Rezende do Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1.3. Funcionalização de NTCs com HY

NTCPMs carboxilados (0,5 mg/mL) e HY (0,5 mg/mL) foram misturados em uma cuba ultrasônica. Essa mistura foi lavada com água deionizada repetidamente e filtrada com filtro Millipore para eliminar o excesso de NTCPMs e HY. O material retido sobre o filtro permaneceu em estufa para secagem e, em seguida, foi armazenado para ser utilizado nos protocolos experimentais. No dia de cada procedimento cirúrgico de perfuração das tibias, NTCPMs e NTCPMs-HY sob a forma de pó foram misturados com um gel inerte, o carbopol, e armazenados na geladeira até o momento de sua utilização.

4.2 Indução da osteoporose

Os estudos *in vivo* foram conduzidos em ratas Wistar fêmeas (n=170, 3 meses de idade) (quadro 1), pesando entre 200 e 250 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Esse projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e está documentado com protocolo nº 161/2015 (documento em anexo). Os animais foram mantidos em biotério adequado, com temperatura e luminosidade controladas, acondicionados em gaiolas plásticas e com acesso livre de água e ração.

O modelo de osteoporose utilizado foi o modelo o qual a doença é induzida por meio da ovariectomia. Inicialmente, os animais foram separados em dois grupos, um ovariectomizado (OVX) e um normal (sham). Eles foram anestesiados por meio de uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1 mL/100g) e cloridrato de quetamina 10% (0,1mL/100g) para a extirpação dos ovários. Os animais do grupo controle (sham) passaram pelas mesmas etapas cirúrgicas, com exceção da remoção dos ovários.

Após um período de três meses, as ratas foram submetidas ao procedimento de perfuração da tíbia, visto ser o tempo suficiente para provocar perda de massa e mineral ósseo em função da deficiência de estrógeno (Ocarino *et al* .,2007; Cunha *et al.*, 2008).

Quadro 1: Número de animais utilizados em cada técnica.

	Análise histomorfométrica e micro -CT			PCR quantitativo	Espectroscopia de Raman		
	7 dias	14 dias	21 dias		7 dias	14 dias	21 dias
Sham - Coágulo	n=6	n=6	n=6	n=4	n=4	n=4	n=4
OVX - Coágulo	n=6	n=6	n=6	n=4	n=4	n=4	n=4
OVX - HY 1%	n=6	n=6	n=6	n=4	n=4	n=4	n=4
OVX - NTCPMs	n=6	n=6	n=6	n=4	n=4	n=4	n=4
OVX - NTCPMs-HY	n=6	n=6	n=6	n=4	n=4	n=4	n=4
TOTAL	30	30	30	20	20	20	20
	170						

4.3 Procedimento cirúrgico para a perfuração da tibia

Para a realização da cirurgia de perfuração da tibia, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1 mL/100g) e cloridrato de quetamina 10% (0,1 mL/100g), sendo feita uma incisão na região anterior da pata esquerda, afastamento da musculatura, seguido pela perfuração da tibia com uma broca piloto de 1,6 mm, com irrigação constante (NaCl 0,9%). O defeito ósseo foi realizado no terço médio das tibias, ao longo do eixo látero-lateral, sendo perfuradas ambas as corticais. Os animais foram subdivididos nos seguintes grupos experimentais (Quadro 2): (i) Sham (animais pseudo-ovariectomizados), (ii) controle (animais OVX coágulo), (iii) HY 1% (animais OVX tratados com HY 1%), (iv) NTCPMs (animais OVX tratados com NTCPMs 100 µg/mL) e (v) NTCPM-HY (animais OVX tratados com NTCPMs-HY 100 µg/mL). Em seguida, foi realizada a sutura da musculatura e da pele e, ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose de benzilpenicilina/estreptomicina (0,84 mg/100g de peso corporal) e uma dose de flunixinina meglumina (0,22 mg/100g de peso corporal), ambas via intramuscular. Após 7, 14 e 21 dias, os animais foram eutanaziados por decapitação, os úteros foram retirados e pesados e as tibias foram imersas em formalina neutra tamponada (FNT) 10% à temperatura ambiente por 48 h para análises histológica e morfométrica ou imersas em álcool 70% para análises de espectroscopia de Raman e Micro CT ou processadas para extração do RNA.

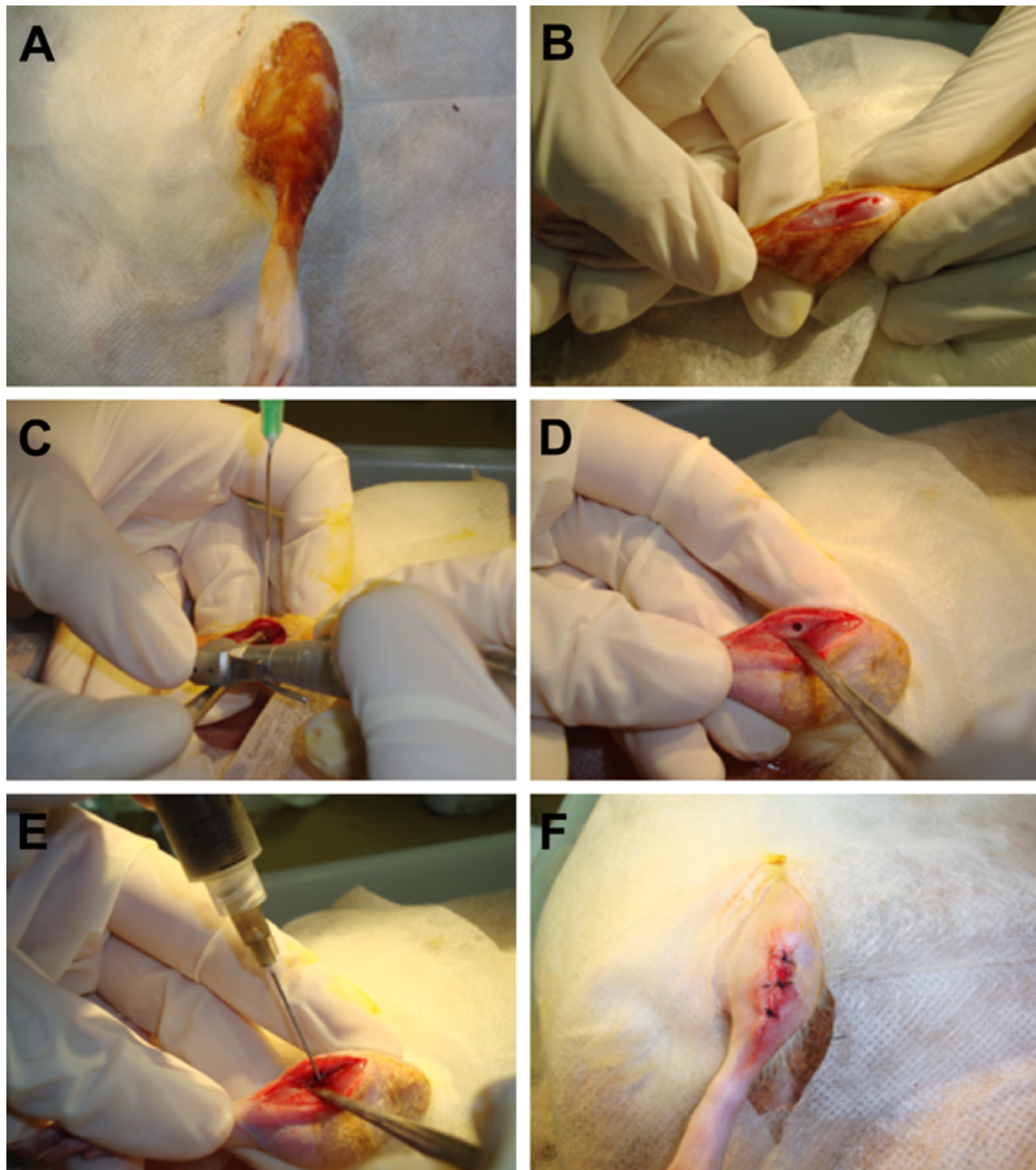


Figura 4: Procedimento cirúrgico de perfuração das tíbias. Em (A) é possível observar a tricotomia e anti-sepsia da pata esquerda do animal, seguida pela incisão (B). Após o afastamento da musculatura, uma perfuração com uma broca de 1,6 mm sob constante irrigação (C) é realizada no osso (D). Em (E) observa-se a aplicação dos tratamentos, seguida pela sutura da pele (F).

Quadro 2: Grupos experimentais.

GRUPO	TRATAMENTO
I	Sham - Coágulo
II	OVX - Coágulo
III	OVX - HY 1%
IV	OVX - NTCPMs
V	OVX - NTCPMs-HY

4.4 Processamento histológico

Tíbias fixadas em FNT 10% 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 h. 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 6 µm de espessura no plano sagital que foram montados em lâminas histológicas previamente silanizadas com silano 2%. As lâminas de cada amostra foram armazenadas para processamento em Tricrômico de Masson. 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 24x50 mm foram montadas sobre os cortes utilizando-se Entellan como agente de união.

4.5 Análise histológica e morfométrica

Foram obtidas 20 imagens dos 4 cortes de cada defeito (n=6 animais por grupo), 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 na imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e obtenção da área em μm^2 . Foram excluídas as amostras que apresentaram inclusão e/ou coloração inadequadas e ausência de integridade dos cortes histológicos. As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG sob a supervisão do professor Marcelo Caliari.

Fórmula para determinar o percentual de trabéculas ósseas neoformadas nas tíbias

$$\frac{\text{Área de trabéculas (Imagem 1 + Imagem 2 + Imagem 3 ++ Imagem 20)}}{\text{Área total avaliada (10,66 x 10⁵ μm²)}}$$

4.6 Microtomografia computadorizada

Os ensaios de micro-CT foram realizados no Laboratório de Materiais Cerâmicos do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – UFMG sob a supervisão do professor Wander Vasconcelos. Foi utilizado equipamento compacto modelo SkyScan 1174 (Bruker micro-CT, Bélgica). Após as cirurgias de perfuração, as amostras de tíbias (n=6 animais por grupo no tempo de 7 dias; n=2 animais por grupo no tempo de 14 e 21 dias) foram imersas em solução de álcool 70% para armazenamento, como mencionado anteriormente. No dia do procedimento, as amostras foram secas para remoção do líquido superficial e colocadas diretamente no porta-amostras fornecido pelo fabricante, devidamente fixadas de modo a não se movimentarem durante o escaneamento. Foram utilizados para o escaneamento uma tensão de 50 kV, corrente de 800 mA e 40 W de potência da fonte de raios x. Foi utilizada uma resolução espacial de 8,05 μm de tamanho de pixel e filtro de alumínio de 0,5 mm. O escaneamento foi realizado em 180 °, com projeções sendo obtidas a cada 0,7 °, sendo 3 frames para cada passo de rotação. As projeções de imagens foram reconstruídas em fatias 2D utilizando-se o *software* NRecon (v.1.6.9.18, Skyscan, Bruker micro-CT, Bélgica) e, posteriormente, as análises tridimensionais foram realizadas utilizando o *software* CTan (v.1.15.4.0, Bruker micro-CT, Bélgica).

Para análise da estrutura tridimensional das amostras de 7 dias, as fatias

reconstruídas foram inicialmente binarizadas utilizando o *software* CTAn e a região do defeito ósseo foi definida e selecionada como a região de interesse (ROI – *Region of Interest*) nas seções transversais de cada amostra para posterior análise morfométrica. O *software* CTAn foi utilizado para realizar a análise morfométrica. Os seguintes parâmetros foram avaliados: densidade mineral óssea (quantidade de mineral existente na área da regeneração do defeito ósseo), percentual de volume ósseo (razão entre o volume ósseo trabecular pelo volume total do defeito), espessura trabecular (espessura média das trabéculas), separação trabecular (espaço médio entre as trabéculas) e número trabecular (número de trabéculas por unidade de comprimento).

Para obtenção dos valores de densidade mineral óssea, foi realizada a calibração do equipamento utilizando-se *phantoms* [$0,25 \text{ g/cm}^3$ e $0,75 \text{ g/cm}^3$, com 4 mm de diâmetro, aplicável a ossos de ratos (Bruker micro-CT, Bélgica)] que foram escaneados e reconstruídos utilizando-se os mesmos parâmetros das amostras de tíbia. A densidade foi calibrada no *software* CTAn para posterior obtenção do resultado de densidade mineral óssea das amostras. Os resultados foram expressos em valores percentuais dos parâmetros avaliados.

4.7 PCR quantitativo

A análise quantitativa por PCR avaliou a expressão de genes relacionados ao reparo ósseo. O RNA total (n=4 animais por grupo) foi isolado do defeito ósseo usando 500 μL de Trizol® gelado. Em seguida, foram adicionados 100 μL de clorofórmio e o microtubo permaneceu em repouso por 3min à temperatura ambiente. Logo depois, os tubos foram centrifugados a 12000 $\times\text{g}$ por 15min a 4°C. Ao término da centrifugação foram formadas 3 fases. A fase mais inferior é formada por restos de

células e contaminantes, a porção central é composta por DNA e a fase superior é que contém o mRNA (RNA mensageiro) extraído. A porção superior foi então transferida para um novo tubo microtubo de 1,5mL e adicionado 250µL de isopropanol gelado para precipitar o mRNA permanecendo em repouso por 15min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000×g por 15min a 4°C. O precipitado formado foi então lavado 2 vezes com álcool 75% gelado e centrifugado 12000 x g por 3min a 4°C. O volume foi descartado e o precipitado seco em ambiente. A concentração do RNA foi determinada espectrofotometricamente. A integridade do RNA foi avaliada com um gel de agarose 1% em TBE (Tris/Borato/EDTA) por 1h a 70V. A conversão do mRNA em cDNA foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. O kit utilizado foi First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas®). Primeiramente, 2µg de mRNA foi tratada com DNase para que seja degradada qualquer contaminação, para tanto a enzima permaneceu ativa por 20min a 25°C e em seguida, foi inativa por temperatura, 10min a 65°C. Em seguida o mix preparado com os reagentes fornecidos pelo kit (tampão 5x, dNTP, OligoDT, Mulv, RNAout) foram adicionados. A ciclagem utilizada no experimento foi de 10min a 25°C para anelamento do oligoDT, 1 hora a 42°C para a síntese do cDNA, e por fim, 10min a 70°C para a inativação da enzima. As amplificações de PCR foram realizadas em StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). As reações foram executadas em uma mistura com 15µL de volume final contendo tampão 1× SYBR Green Master Mix qPCR (Thermo®) e a quantidade determinada de cada primer (quadro 3). O protocolo da PCR foi feito a 5 min de desnaturação a 95°C e 50 ciclos a 1min para anelamento e alongação a 60°C, e 10s de desnaturação a 95°C. A fluorescência foi detectada ao final de cada fase de extensão. Para excluir a contaminação de produtos inespecíficos da PCR tais como os dímeros de primer, a análise da curva de dissociação foi aplicada a todos os produtos

ao final da ciclagem. As análises foram realizadas pelo programa DataAssist v3.01 fornecido pela Applied Biosystems®. A quantificação relativa da expressão dos genes foi feita usando o método $2^{-\Delta \Delta CT}$, como descrito anteriormente (Livak e Schmittgen, 2001). Esta técnica foi executada no Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, sob a supervisão do professor Rodrigo R. Resende.

Quadro 3: Sequência de primers usados para PCR em tempo real.

Fator cresciemtno derivado de plaquetas B (PDGF-B)	Fwd	5'-TGACCCGAGCACATTCTGGA-3'
	Rev	5'-GTCTTGCACCTCGGCGATTACG-3'
Proteínas morfogenéticas do osso 2 (BMP-2)	Fwd	5'-GGAAAACCTCCCGACGCTTCT-3'
	Rev	5'-CCTGCATTTGTTCCCGAAAA-3'
Proteínas morfogenéticas do osso 4 (BMP-4)	Fwd	5'-TTATGAGGTTATGAAGCCCCCA-3'
	Rev	5'-GCTCACATCGAAAGTTTCCCAC-3'
Proteínas morfogenéticas do osso6 (BMP-6)	Fwd	5'-CCTTGGTCCACCTTATGAATCC-3'
	Rev	5'-GACATTGGAGTTGTCGTCGAA-3'
	Rev	5'-TCGGCCCTCATCTCCACATCATTG-3'
GAPDH	Fwd	5'-GTATTGGGCGCCTGGTCACC-3'
	Rev	5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3'

Fwd: foward; Rev: reverse.

4.8 Espectroscopia de Raman

A análise das amostras (n=4 animais por grupo) por espectroscopia de Raman foi realizada no Laboratório de Difração e Espectroscopia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) no estado do Rio de Janeiro, sob a supervisão do Dr. Erlon Henrique Martins Ferreira. Tíbias imersas em álcool 70% foram utilizadas para essas análises. Os ensaios foram realizados em um espectrômetro Horiba Jobin-Yvon que opera no modo micro Raman e na configuração de retroespalhamento. Como fonte de excitação foi utilizado um laser de estado sólido de Ti:safira sintonizado em 785 nm (1,58 eV). A calibração do espectrômetro foi realizada usando como referência uma amostra de ciclohexano. O espectrógrafo dispersou a luz Raman espalhada da amostra e um sensor refrigerado em nitrogênio líquido detectou o sinal Raman. Para cada amostra foram coletados 5 espectros em 3 pontos diferentes de cada amostra usando uma lente de 10x (NA 0,25). O diâmetro do feixe foi de aproximadamente 4 μm e a potência do laser foi de aproximadamente 10 mW na amostra. Os espectros foram coletados no intervalo de 200 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} e tratados para remoção da linha base. A estimativa da linha base foi feita pela minimização de uma função custo não quadrática com os seguintes parâmetros: ordem 7, limite 0,001 e função quadrática truncada assimétrica. O valor médio das intensidades de 2 bandas características foi medido: fosfato (cerca de 903-991 cm^{-1}) e matriz colágeno amida I (cerca de 1390-1470 cm^{-1}).

4.9 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de

comparação múltipla de Newman-Keuls com o auxílio do programa GraphPad Prism

5. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos NTCPMs e dos NTCPMs funcionalizados com HY

Antes de testar os biocompósitos *in vivo*, foi feita a caracterização das amostras utilizando MET e espectroscopia de Raman. Análises de MET revelaram que os NTCPMs apresentaram-se dispostos em feixes formando redes tridimensionais (Fig. 5A) e cada nanotubo apresentou um diâmetro de aproximadamente 15 nm (Fig. 5B). Em relação à análise por espectroscopia de Raman, observamos poucos defeitos estruturais nos NTCPMs e uma quantidade muito pequena de carbono amorfo (Fig. 5C). Esses resultados indicam que os NTCs obtidos pelo método de deposição por vapor químico são de paredes múltiplas e possuem boa qualidade.

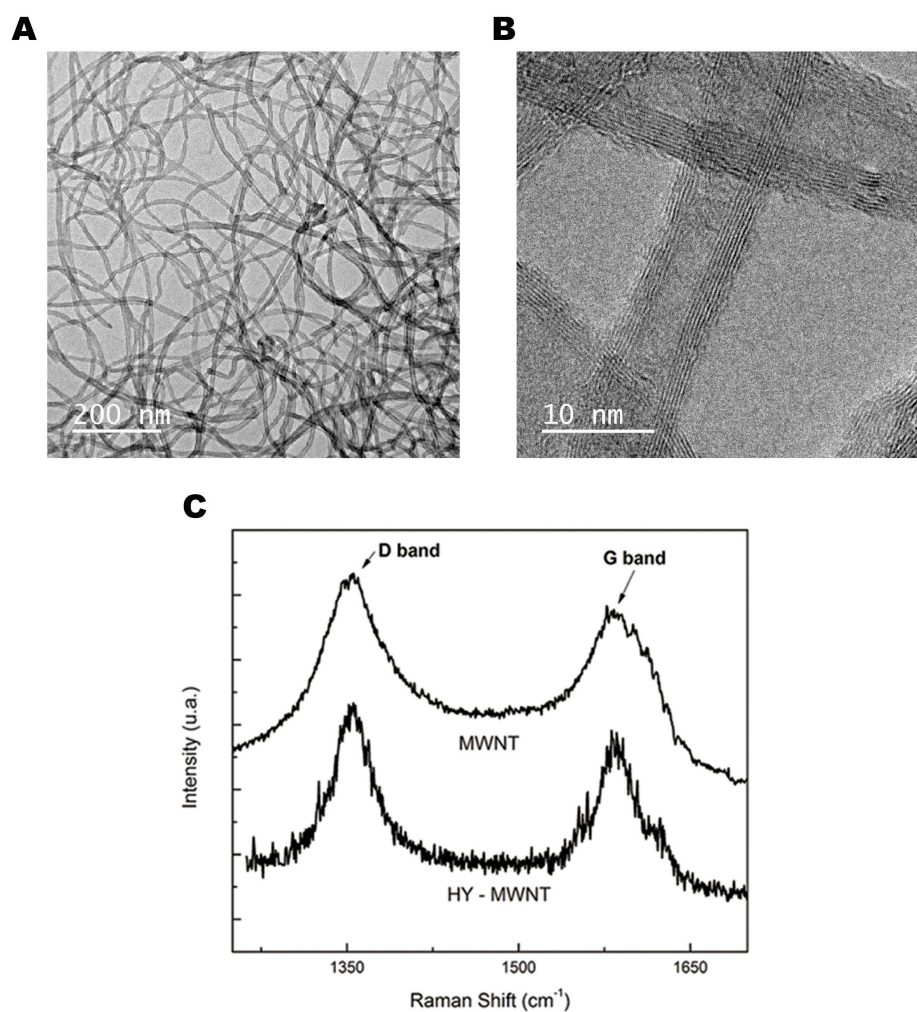


Figura 5: Caracterização dos NTCPMs. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando um aglomerado de NTCPMs (A) e um único NTCPM (B) com diâmetro de aproximadamente 15 nm. Espectroscopia de Raman dos NTCPMs-COOH e NTCPMs-HY (C).

5.2 Peso do útero

A análise do peso do útero demonstrou uma redução nos valores desse parâmetro nos animais OVX ($131,90 \pm 17,52$ mg) em relação aos animais sham ($588,5 \pm 46,90$ mg), confirmando a eficiência do procedimento cirúrgico de ovariectomia (Fig. 6).

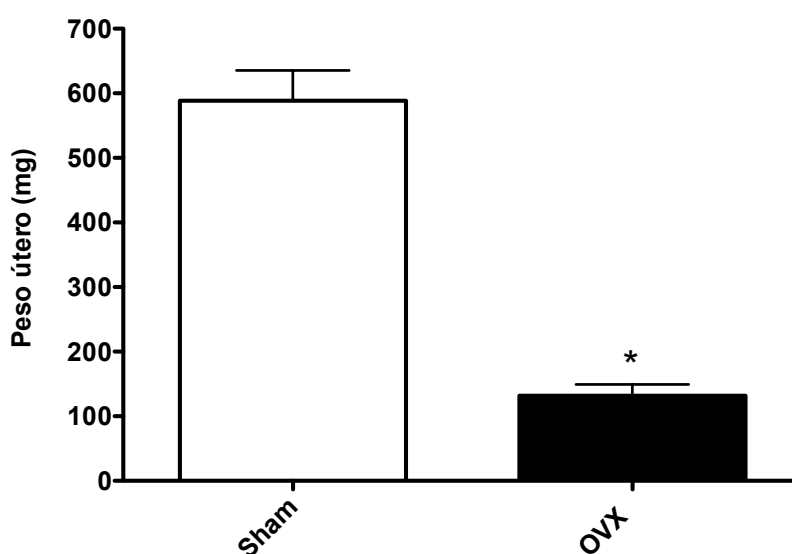


Figura 6: Peso do útero de animais sham e ovariectomizados (OVX). Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs sham (teste t de Student).

5.3 Análises histológicas e morfométricas

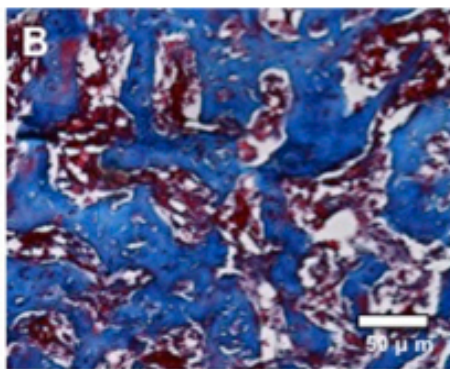
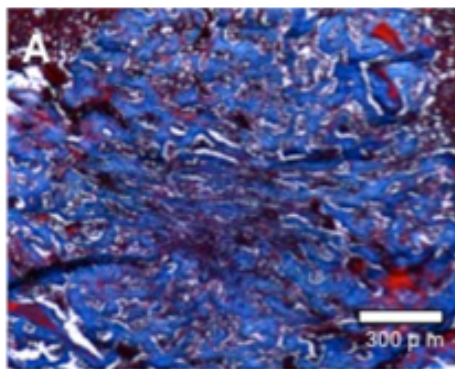
5.3.1 Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 7 dias após o procedimento cirúrgico

Sete dias após as cirurgias tíbias sham (Figs. 7A e 7B) apresentaram grande neoformação óssea com trabéculas maduras e organizadas. Já as tíbias OVX - coágulo apresentaram na região central do defeito uma grande quantidade de infiltrado inflamatório e na periferia, neoformação óssea escassa com trabéculas imaturas e desorganizadas (Figs. 7C e 7D). As tíbias das ratas OVX tratadas com HY (Figs. 7E e

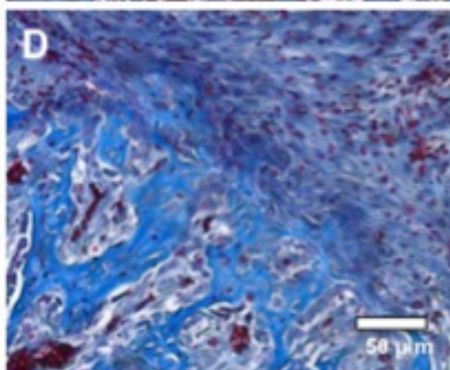
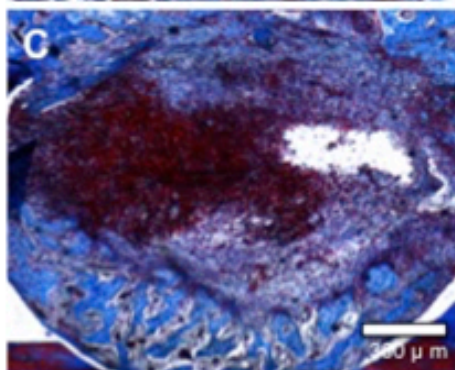
7F), NTCPMs (Figs. 7G e 7H) e NTCPMs-HY (Figs. 7I e 7J) apresentaram um aumento no número de trabéculas neoformadas, que estavam mais organizadas e espessas em relação às OVX - coágulo.

Os resultados da análise morfométrica referente ao percentual de trabéculas ósseas após um período de 7 dias estão na Fig. 7K. As tíbias OVX - coágulo ($10,82 \pm 0,99$ %) apresentaram uma redução no percentual de trabéculas ósseas em relação às tíbias sham coágulo ($29,38 \pm 3,44$ %). Além disso, todas as tíbias OVX tratadas ($26,61 \pm 1,72$ % - HY; $27,77 \pm 3,55$ % - NTCPMs; $27,71 \pm 5,69$ % - NTCPMs-HY) mostraram um aumento na quantidade de trabéculas ósseas em relação às tíbias OVX - coágulo. As tíbias sham - coágulo e todas as tíbias OVX tratadas foram estatisticamente equivalentes entre si na formação do osso trabecular.

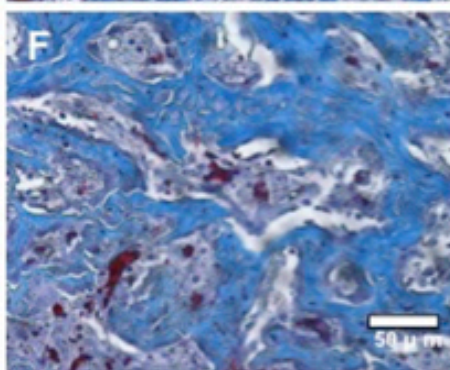
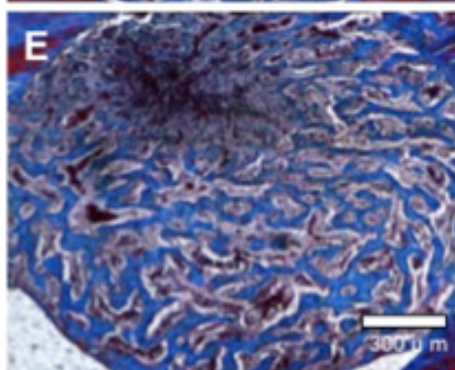
Sham



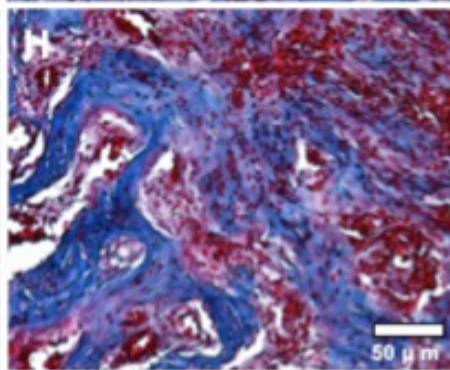
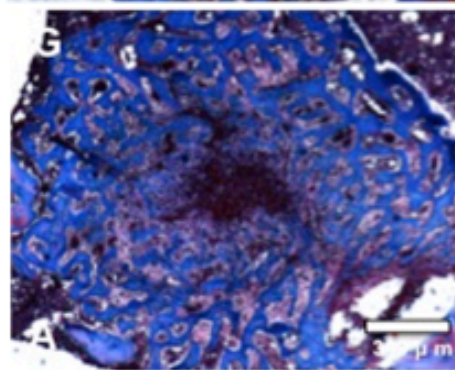
OVX Coágulo



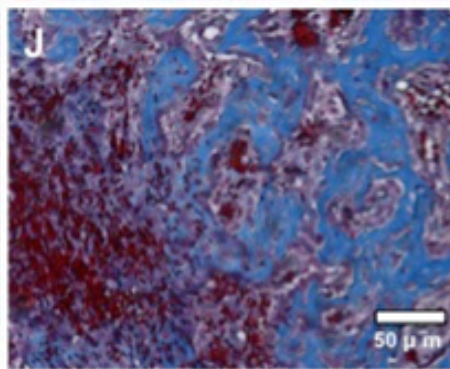
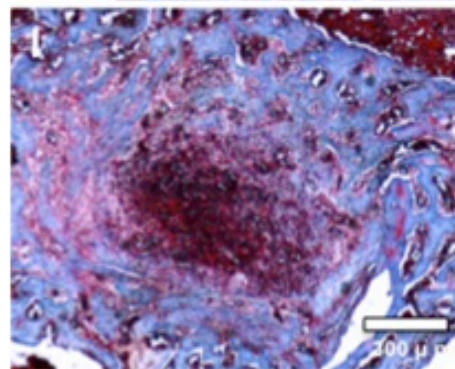
OVX HY



OVX NTCPMs



OVX NTCPMs-HY



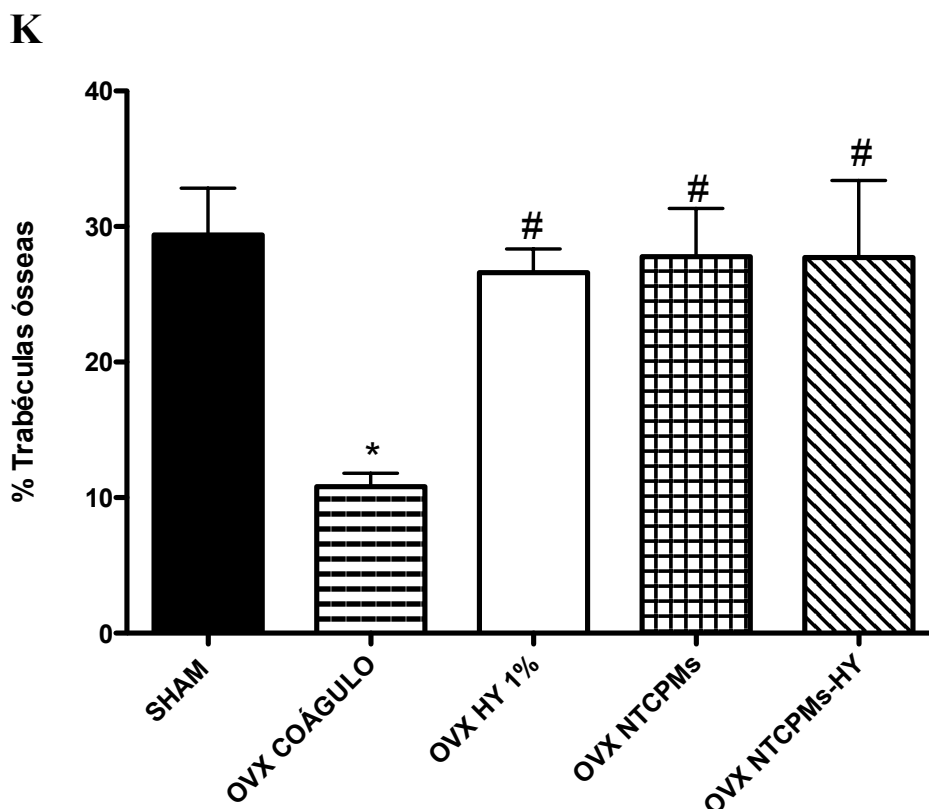
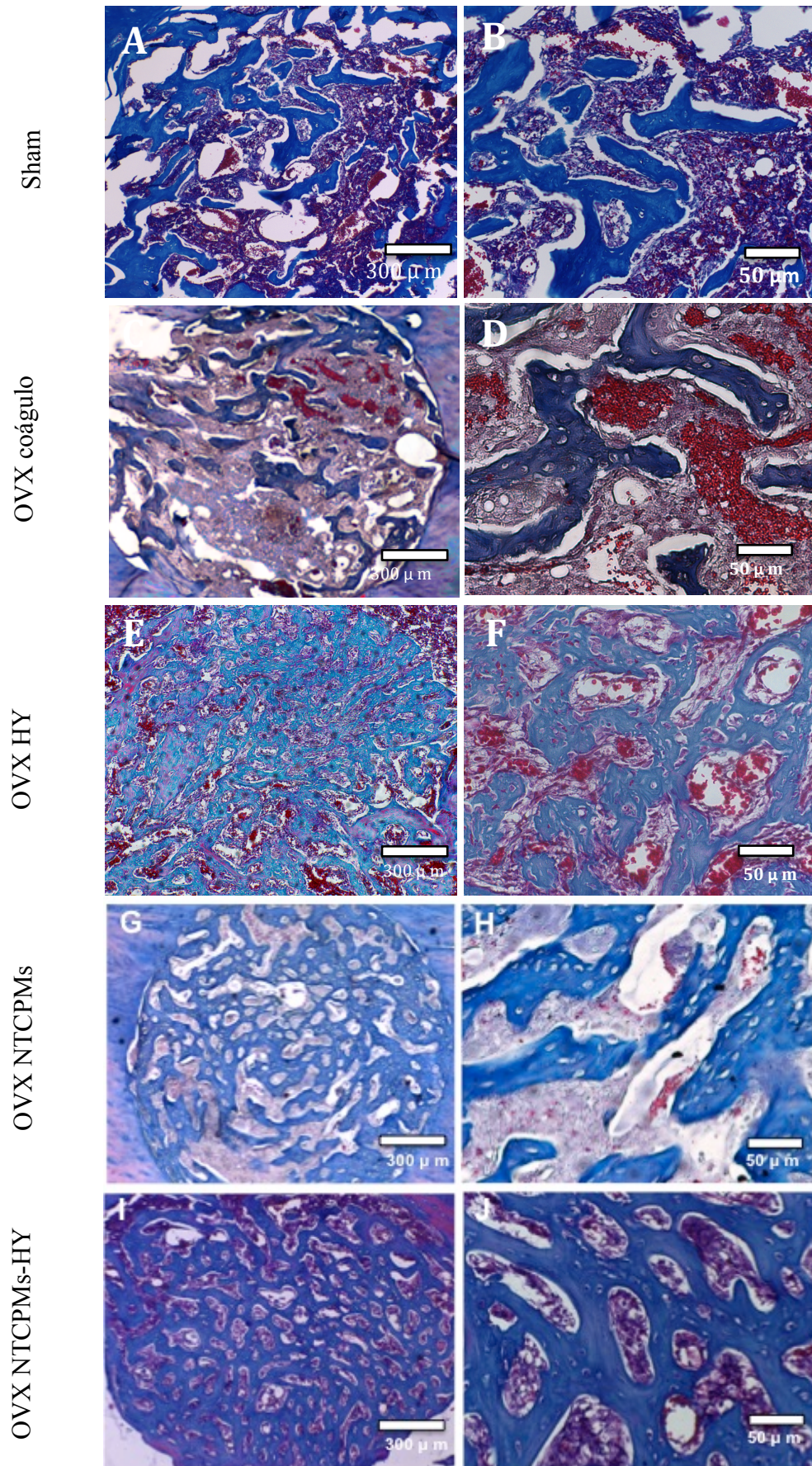


Figura 7: Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 7 dias após o procedimento cirúrgico. Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias 7 dias após as cirurgias. Tíbias sham (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias OVX coágulo - (C) baixa e (D) alta magnitude; Tíbias tratadas com HY (E) baixa e (F) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPMs (G) baixa e (H) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPMs-HY (I) baixa e (J) alta magnitude. (K) Percentual de trabéculas ósseas 7 dias após a realização do defeito ósseo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs sham, # $p < 0,05$ vs OVX - coágulo. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.3.2 Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 14 dias após o procedimento cirúrgico

Após um período de 14 dias, foi observado que as tíbias sham apresentaram trabéculas ósseas maduras, espessas e bem organizadas (Figs. 8A e 8B). Já as tíbias OVX - coágulo (8C e 8D) apresentaram uma quantidade reduzida de trabéculas ósseas em relação às tíbias sham. De uma forma geral, as tíbias OVX tratadas com HY (Figs. 8E e 8F), NTCPMs (Figs. 8G e 8H) e NTCPMs-HY (Figs. 8I e 8J) apresentaram boa formação de trabéculas ósseas, sendo observado um melhor preenchimento da região do defeito em relação às tíbias OVX- coágulo.

A análise morfométrica (Fig. 8K) demonstrou valores estatisticamente equivalentes no percentual de trabéculas ósseas em tíbias sham ($36,56 \pm 7,61$ %) e OVX tratadas com HY ($35,24 \pm 9,68$ %), NTCPMs ($40,58 \pm 4,71$ %) e NTCPMs-HY ($40,69 \pm 5,67$ %). Apesar da redução no percentual de trabéculas ósseas no grupo OVX - coágulo ($18,51 \pm 6,20$ %), não houve diferença estatística em relação ao grupo sham.



K

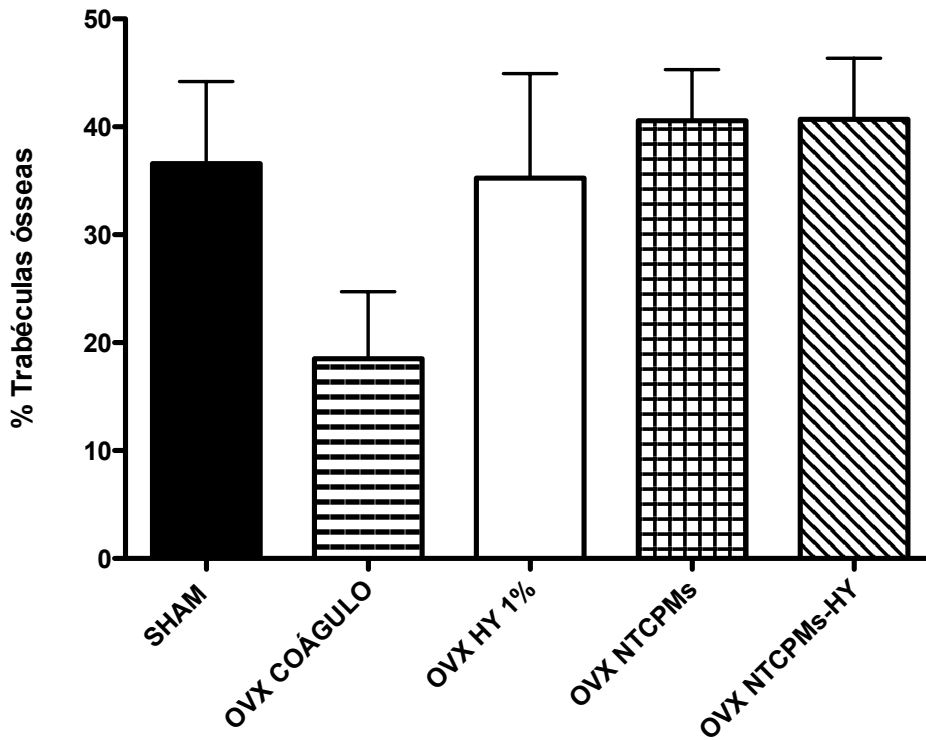
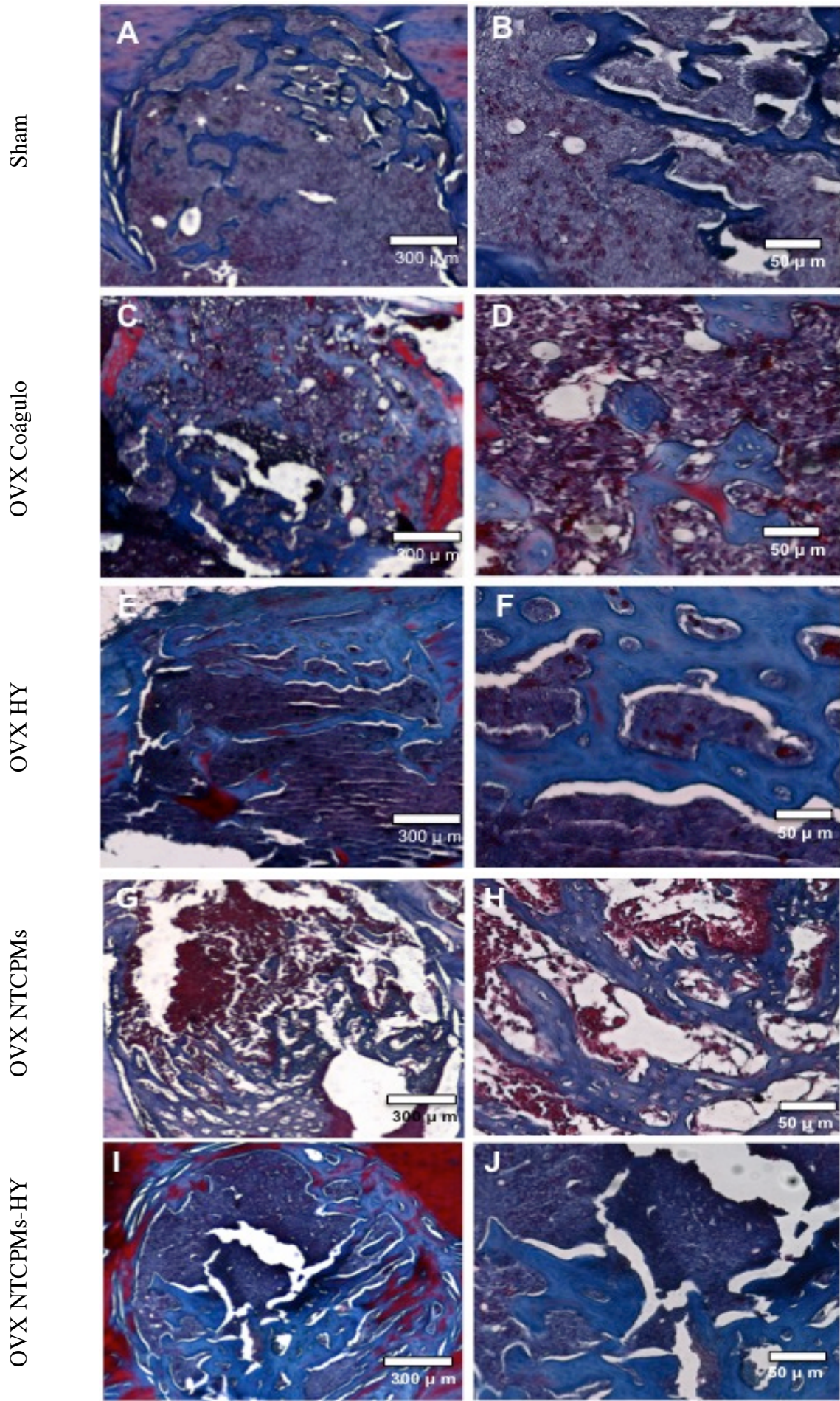


Figura 8: Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 14 dias após o procedimento cirúrgico. Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias 14 dias após as cirurgias. Tíbias sham (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias OVX - coágulo (C) baixa e (D) alta magnitude; Tíbias tratadas com HY (E) baixa e (F) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPMs (G) baixa e (H) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPMs-HY (I) baixa e (J) alta magnitude. (K) Percentual de trabéculas ósseas 14 dias após a realização do defeito ósseo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M.

5.3.3 Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 21 dias após o procedimento cirúrgico

Após um período de 21 dias, foi observado que as tíbias sham apresentaram uma redução na quantidade de trabéculas ósseas e um aumento expressivo na quantidade de espaços inter-trabeculares (Figs. 9A e 9B), assim como as tíbias OVX tratadas com HY (Figs. 9E e 9F), NTCPMs (Figs. 9G e 9H) e NTCPMs-HY (Figs. 9I e 9J). As tíbias OVX - coágulo (Figs. 9C e 9D) também apresentaram uma redução na quantidade de trabéculas ósseas e uma quantidade razoável de espaços inter-trabeculares. O aumento na quantidade de espaços inter-trabeculares em todos os grupos sugere que o osso recém-formado já estava em processo de reabsorção e o canal medular já estava começando a ser preenchido pela medula óssea.

A análise morfométrica (Fig. 9K) demonstrou após 21 dias um percentual de trabéculas semelhante em tíbias sham ($24,72 \pm 7,99$ %), OVX - coágulo ($24,74 \pm 5,66$ %), HY ($28,58 \pm 7,14$ %), NTCPMs ($27,31 \pm 17,87$ %) e NTCPMs-HY ($25,40 \pm 8,43$ %).



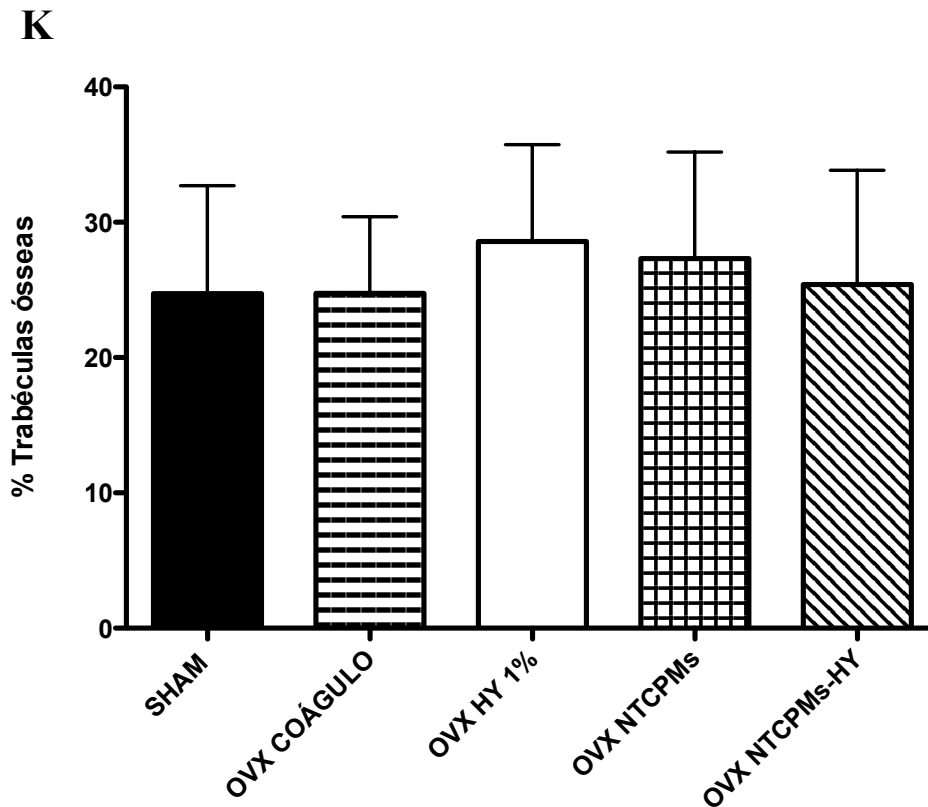


Figura 9: Efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tíbias de ratas OVX 21 dias após o procedimento cirúrgico. Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias 21 dias após as cirurgias. Tíbias sham (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Tíbias OVX - coágulo (C) baixa e (D) alta magnitude; Tíbias tratadas com HY (E) baixa e (F) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPMs (G) baixa e (H) alta magnitude; Tíbias tratadas com NTCPMs-HY (I) baixa e (J) alta magnitude. (K) Percentual de trabéculas ósseas 21 dias após a realização do defeito ósseo. Os dados estão expressos como média ± E.P.M.

5.4 Microtomografia computadorizada

5.4.1 Análise da reconstrução 2D

Para confirmar os dados da avaliação morfométrica, realizamos análises de μ CT.

Após 7 dias, tíbias OVX – coágulo apresentaram uma redução na quantidade de trabéculas ósseas em relação às tíbias sham. Por outro lado, observamos uma maior quantidade de trabéculas ósseas em tíbias OVX tratadas com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY em relação às tíbias OVX - coágulo, embora essa neorformação óssea tenha sido menos intensa do que a neorformação nos animais sham.

Diferentemente das tíbias OVX - coágulo, após um período de 14 dias foi observado que as tíbias sham apresentaram uma grande quantidade de trabéculas ósseas fechando as extremidades do defeito ósseo. As tíbias tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY apresentaram padrão de neorformação óssea semelhante às tíbias sham.

Além disso, a análise das imagens demonstra que após 21 dias as tíbias sham e tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY continuaram apresentando uma maior neorformação óssea em relação às tíbias OVX - coágulo, sugerindo que o processo de reparo ósseo encontrava-se mais atrasado em animais OVX - coágulo e que os tratamentos com HY, NTCPM e NTCPM-HY foram capazes de acelerar de forma expressiva esse processo, apresentando resultados semelhantes aos animais sham. Neste período já podemos observar as corticais bem unidas em tíbias sham e OVX tratadas (Fig. 10).

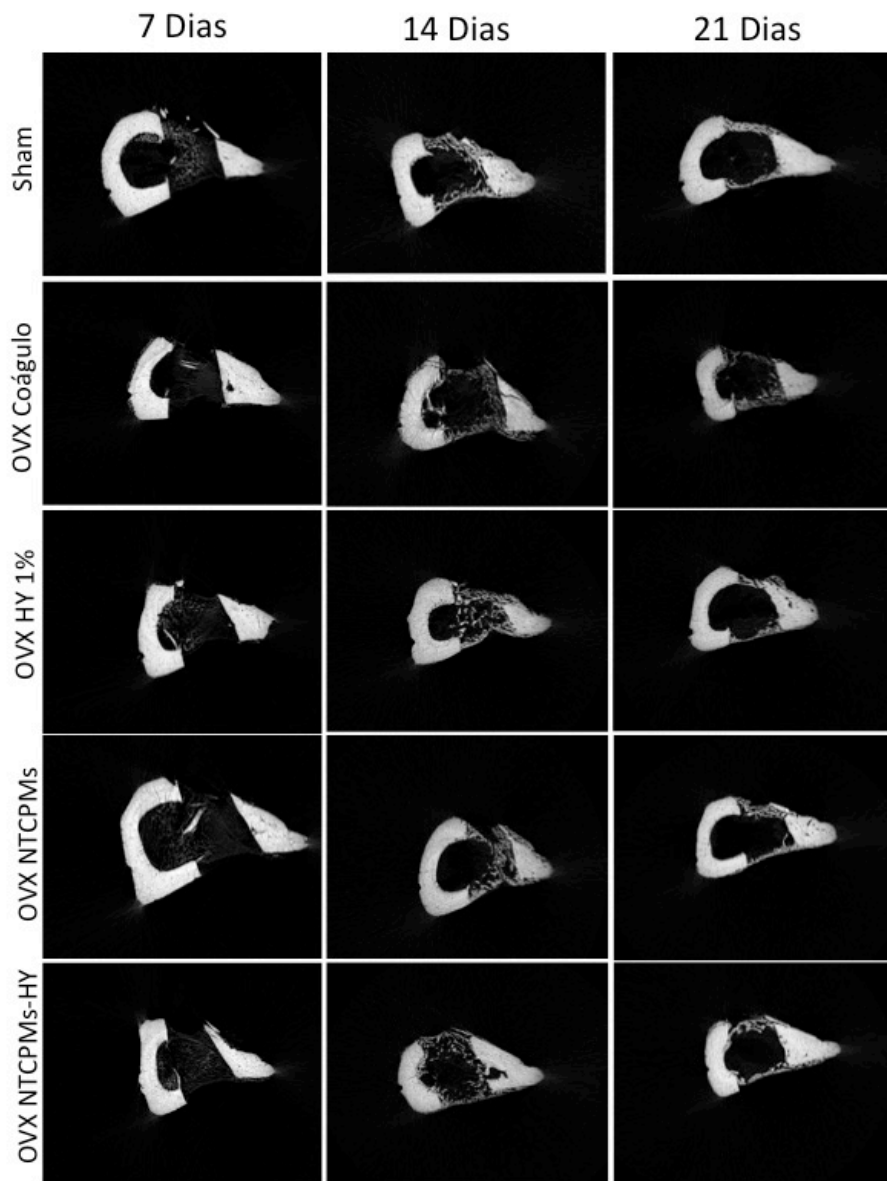


Figura 10: Reconstrução 2D de tíbias submetidas a defeitos ósseos e tratamentos por 7, 14 e 21 dias com diferentes biocompósitos. Tíbias sham; Tíbias OVX - coágulo; Tíbias OVX tratadas com HY; Tíbias OVX tratadas com NTCPM; e Tíbias OVX tratadas com NTCPM-HY.

5.4.2 Análise da reconstrução 3D

As imagens da reconstrução 3D (Fig. 11) permitiram avaliar estruturalmente e arquitetonicamente o processo de reparo ósseo. Conforme evidenciado nas imagens, após um período de 7 dias, as tibiás sham e OVX tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY apresentaram melhor preenchimento da região do defeito ósseo quando comparadas às tibiás OVX - coágulo, que apresentaram a região central do defeito bem aparente, sem a presença de trabéculas ósseas.

Após 14 dias, todas as tibiás apresentaram a região do defeito preenchida por trabéculas ósseas neoformadas, sendo que nos grupos sham e NTCPMs-HY não foi possível visualizar a região do defeito ósseo, o que sugere uma aceleração do processo de reparo ósseo.

No período de 21 dias não foi possível observar nenhuma diferença entre tibiás sham, OVX - coágulo ou tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY.

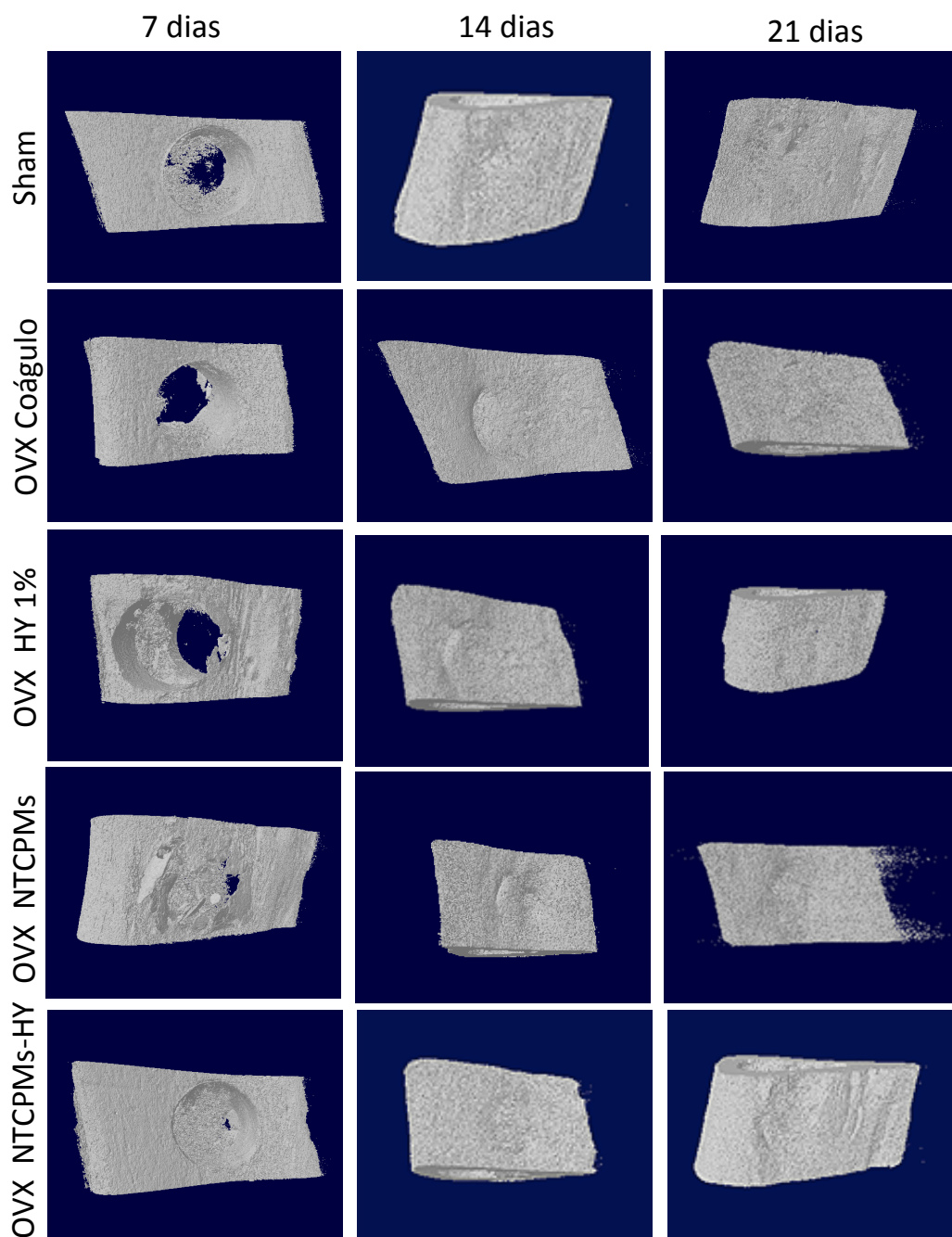


Figura 11: Reconstrução 3D de tíbias submetidas a defeitos ósseos e tratamentos por 7, 14 e 21 dias com diferentes biocompósitos. Tíbias sham; Tíbias OVX - coágulo; Tíbias OVX tratadas com HY; Tíbias OVX tratadas com NTCPMs; e Tíbias OVX tratadas com NTCPMs-HY.

5.4.3 Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT

A densidade mineral óssea foi menor nas tíbias OVX - coágulo ($0,32 \pm 0,06$ g/mm³) quando comparada às tíbias sham ($0,51 \pm 0,05$ g/mm³). Além disso, tíbias tratadas com HY ($0,53 \pm 0,02$ g/mm³), NTCPMs ($0,52 \pm 0,05$ g/mm³) e NTCPMs-HY ($0,51 \pm 0,02$ g/mm³) apresentaram valores de densidade mineral óssea maiores que as tíbias OVX - coágulo ($0,32 \pm 0,06$ g/mm³). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os tratamentos (Fig. 12A).

A análise do volume ósseo (Fig. 12B) demonstrou uma redução no percentual de trabéculas em tíbias OVX - coágulo ($18,27 \pm 4,47$ %) em relação às tíbias sham ($32,63 \pm 2,37$ %). Já tíbias OVX tratadas com HY, NTCPMs ou NTCPMs-HY ($37,75 \pm 6,57$ % - HY; $35,26 \pm 3,28$ % - NTCPMs; $39,60 \pm 5,51$ % - NTCPMs-HY) apresentaram valores semelhantes às tíbias sham e um aumento no percentual de volume ósseo em relação às tíbias OVX - coágulo.

Quando avaliamos a espessura trabecular (Fig. 12C), a separação trabecular (Fig. 12D) e o número trabecular (Fig. 12E), não observamos diferenças estatísticas entre os grupos.

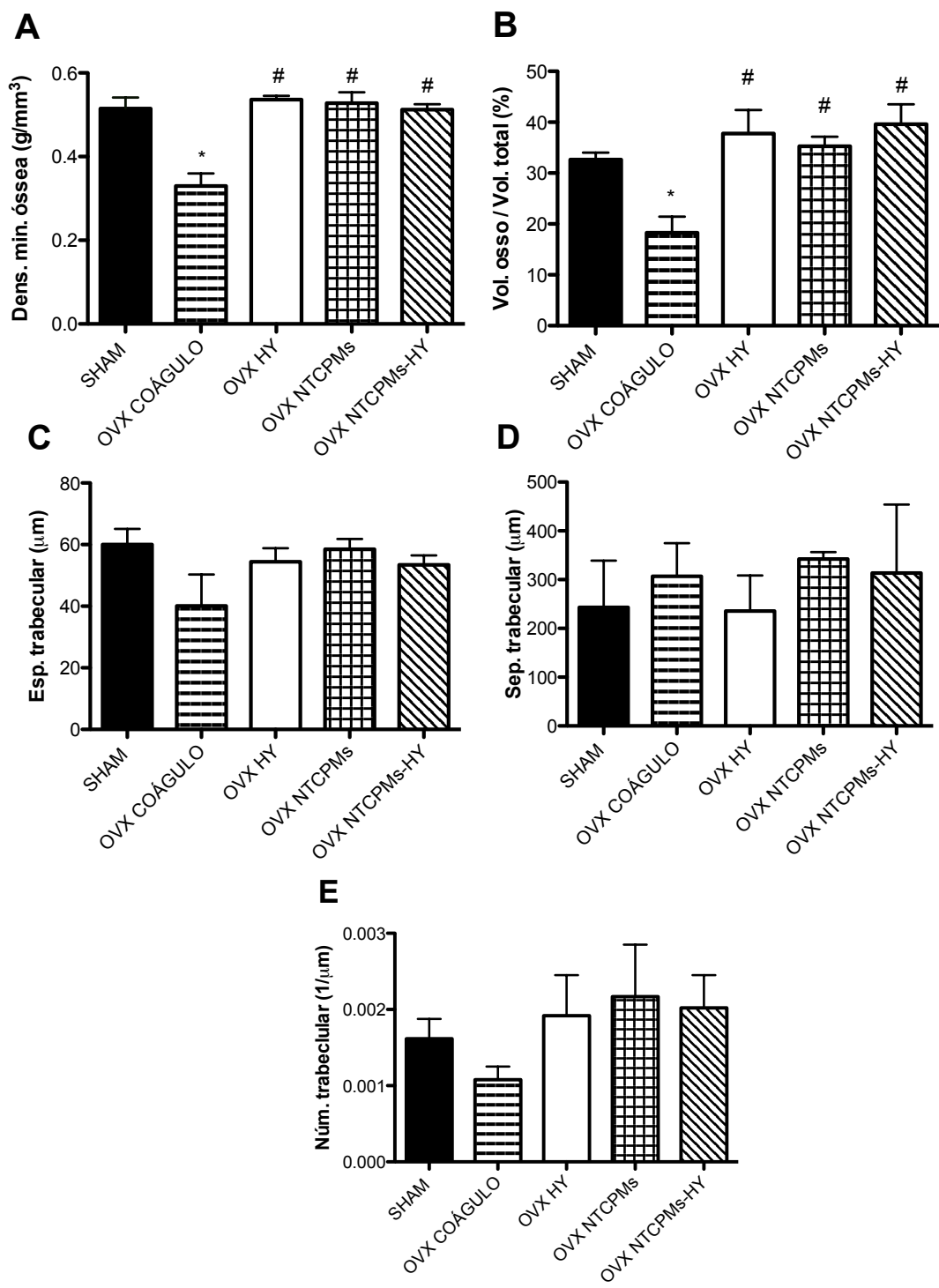


Figura 12: Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT do reparo ósseo após o período de 7 dias. (A) Densidade mineral óssea; (B) Volume ósseo/volume total; (C) Espessura trabecular; (D) Separação trabecular; (E) Número trabecular. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. *p<0,05 vs sham, #p<0,05 vs OVX coágulo. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.5 Expressão de BMPs e fatores de crescimento

A expressão de genes relacionados ao reparo ósseo são fatores que podem estar associados aos efeitos benéficos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no processo de reparo. Para avaliar essa possibilidade, analisamos a expressão de alguns membros da família TGF 7 dias após o procedimento cirúrgico. Tíbias OVX – HY apresentaram um aumento na expressão de BMPs 2 e 6, assim como TGF- β 1 e PDGF-B em relação às tíbias OVX coágulo. Tíbias OVX tratadas com NTCPMs apresentaram um aumento significativo na expressão de BMPs 2, 4 e 6 em relação às tíbias OVX coágulo. Quando avaliamos a expressão de BMPs 2, 4 e 6, TGF- β 1 e PDGF-B, tíbias OVX – NTCPMs-HY apresentaram um aumento na expressão de todos esses fatores em relação às tíbias OVX coágulo. (Fig. 13).

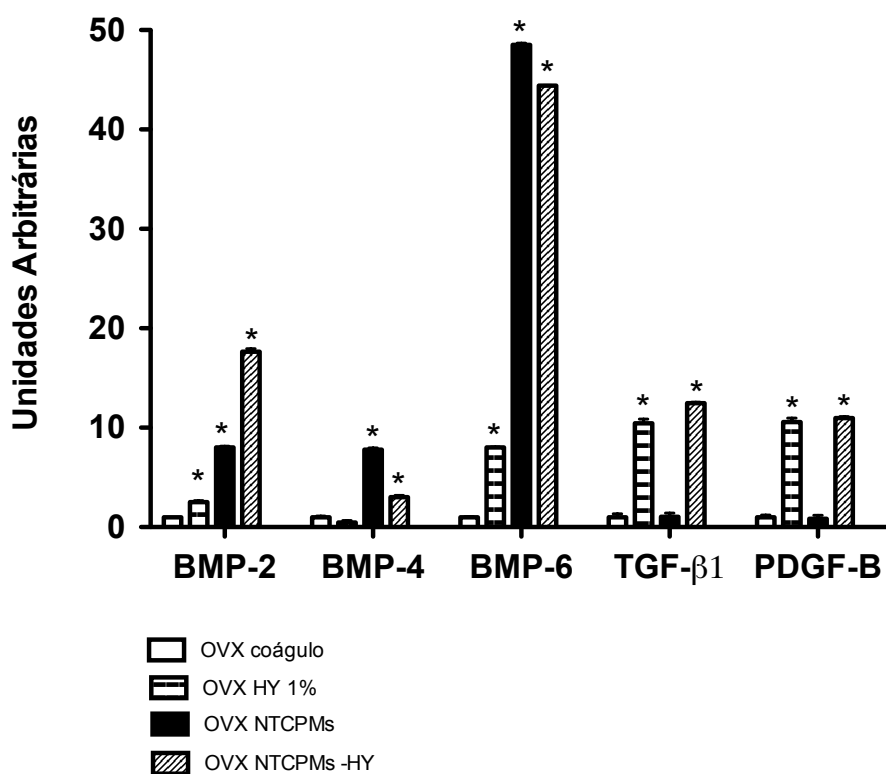


Figura 13: Expressão de RNA mensageiro de BMP-2, BMP-4, BMP-6, TGF- β 1 e PDGF-B em tíbias OVX tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY. * $P < 0.05$ vs. OVX coágulo. One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

5.6 Espectroscopia de Raman

5.6.1 Análise qualitativa

Avaliamos a qualidade do osso neoformado por meio de análises da intensidade de picos do Raman (960 cm^{-1} e 1450 cm^{-1}). A análise dos dados referente ao teor de hidroxiapatita mostrou que, após um período de 7 dias, houve uma redução nos animais OVX – coágulo em relação aos animais sham, e um aumento nos animais tratados com HY (Fig. 14A), NTCPMs (Fig. 14B) e NTCPMs-HY (Fig. 14C) em relação aos animais OVX – coágulo. Quando comparados com os animais sham, os animais OVX tratados com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY apresentaram valores reduzidos.

Com relação ao colágeno, observamos um aumento do seu teor nos animais OVX – coágulo em relação aos animais sham. Todos os animais OVX tratados apresentaram uma redução na quantidade de colágeno em relação aos animais OVX – coágulo. Tíbias tratadas com HY mostraram valores superiores às tíbias sham, enquanto tíbias tratadas com NTCPMs apresentaram valores inferiores às tíbias sham. No tratamento com NTCPMs-HY não foi observada nenhuma diferença em relação aos animais sham.

Quando comparamos todos os grupos (Fig. 14D), observamos que tíbias HY apresentaram valores de hidroxiapatita e colágeno superiores em relação às tíbias NTCPMs-HY e NTCPMs e tíbias NTCPMs-HY apresentavam valores superiores às tíbias NTCPMs.

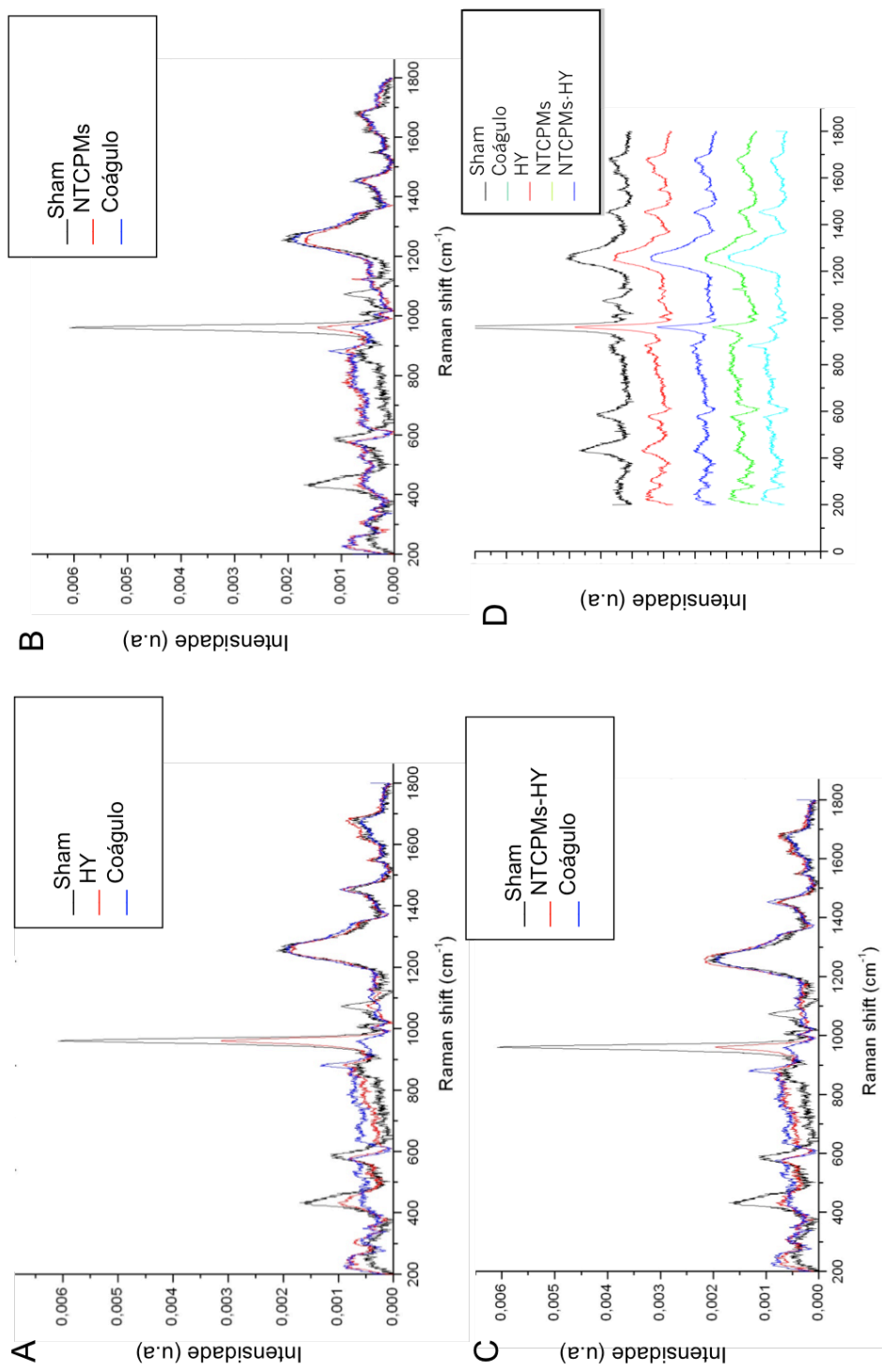


Figura 14: Espectroscopia de Raman 7 dias após o procedimento cirúrgico em tíbias OVX tratadas com HY (A), NTCPMs (B) e NTCPMs-HY (C). Representação de todos os tratamentos juntos (D).

Após um período de 14 dias, foi observado uma redução no teor de hidroxiapatita e colágeno em tíbias OVX - coágulo em relação aos animais sham e um aumento no teor de hidroxiapatita e colágeno em animais tratados com HY (Fig. 15A), NTCPMs (Fig. 15B) e NTCPMs-HY (Fig. 15C) em relação aos animais OVX - coágulo.

Quando comparamos todos os tratamentos, observamos um aumento no teor de hidroxiapatita em todos os grupos, sendo que as tíbias tratadas com HY e NTCPMs-HY apresentaram valores mais próximos dos animais sham, enquanto tíbias tratadas com NTCPMs apresentaram valores mais próximos dos animais OVX - coágulo. Para o teor de colágeno, a diferença entre os tratamentos foi bem discreta (Fig. 15D).

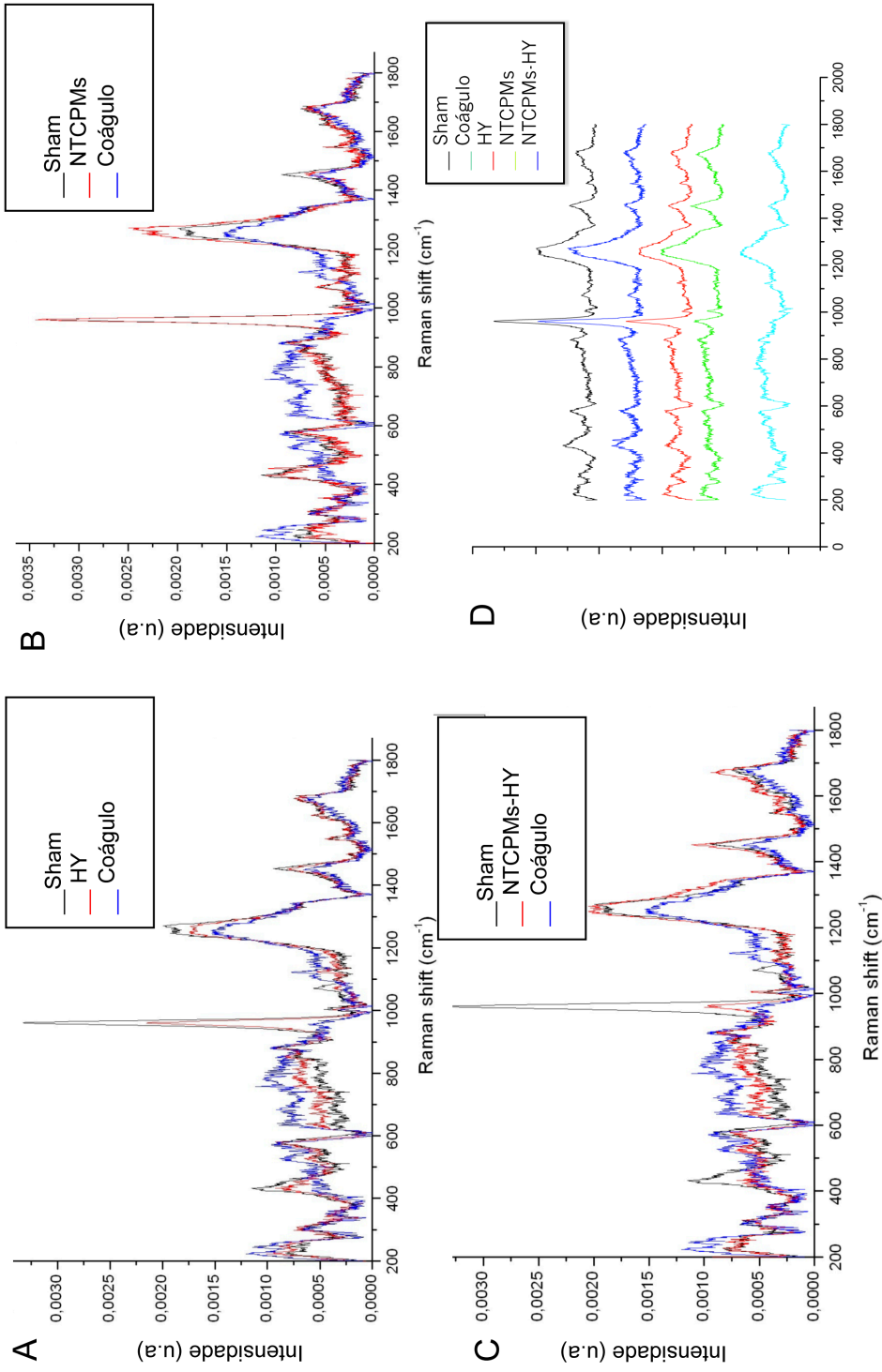


Figura 15: Espectroscopia de Raman 14 dias após o procedimento cirúrgico em tíbias OVX tratadas com HY (A), NTCPMs (B) e NTCPMs-HY (C). Representação de todos os tratamentos juntos (D).

Após 21 dias, as tíbias tratadas com HY (Fig. 16A), NTCPMs (Fig. 16B) e NTCPMs-HY (Fig. 16C) apresentaram valores de hidroxiapatita maiores que as tíbias sham e OVX - coágulo.

Com relação ao colágeno, observamos um aumento em todos os grupos comparado com os animais OVX - coágulo e valores semelhantes ao dos animais sham.

Quando todos os tratamentos foram comparados, as tíbias tratadas com NTCPMs-HY apresentaram valores maiores para a intensidade de hidroxiapatita e para o teor de colágeno, entretanto a diferença entre os tratamentos foi bem discreta (Fig. 16D).

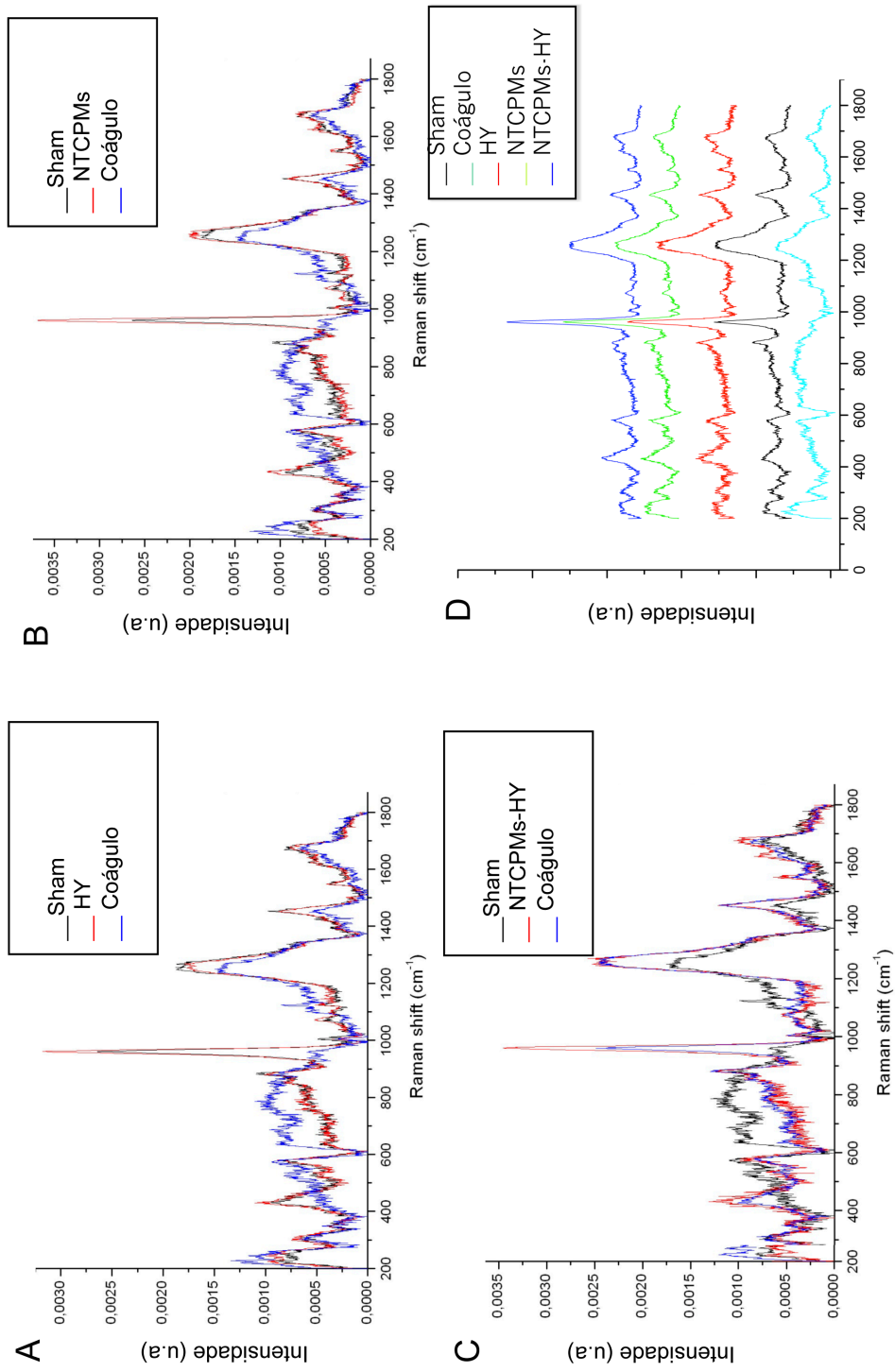


Figura 16: Espectroscopia de Raman 21 dias após o procedimento cirúrgico em tíbias OVX tratadas com HY (A), NTCPMs (B) e NTCPMs-HY (C). Representação de todos os tratamentos juntos (D).

5.6.2 Análise quantitativa

5.6.2.1 Área do pico 950 cm⁻¹ - Hidroxiapatita

O valor da área do pico Raman - 950 cm⁻¹ foi avaliada quantitativamente 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico de perfuração da tibia. Após um período de 7 dias, observamos que tibias OVX tratadas com HY (53,51 ± 7,59%) apresentaram uma maior área do pico 950 cm⁻¹ em relação às tibias OVX - coágulo (11,81 ± 3,75%). Tibias sham (26,09 ± 5,44%), NTCPMs (25,97 ± 2,76%) e NTCPMs-HY (36,08 ± 11,15%) apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si (Fig. 17A).

Após um período de 14 dias, as áreas do pico referente ao teor de hidroxiapatita não apresentaram diferenças significativas entre os grupos sham (24,06 ± 4,19%), OVX - coágulo (20,13 ± 4,22%), HY (26,15 ± 6,42%), NTCPMs (24,46 ± 2,87%) e NTCPMs-HY (29,28 ± 0,28%) (Fig. 17B). Resultado semelhante foi observado após um período de 21 dias (25,61 ± 6,07% - Sham; 18,15 ± 5,25% - OVX - coágulo; 22,51 ± 2,66% - HY; 26,84 ± 8,09% - NTCPMs; 29,35 ± 6,02% - NTCPMs-HY) (Fig. 17C).

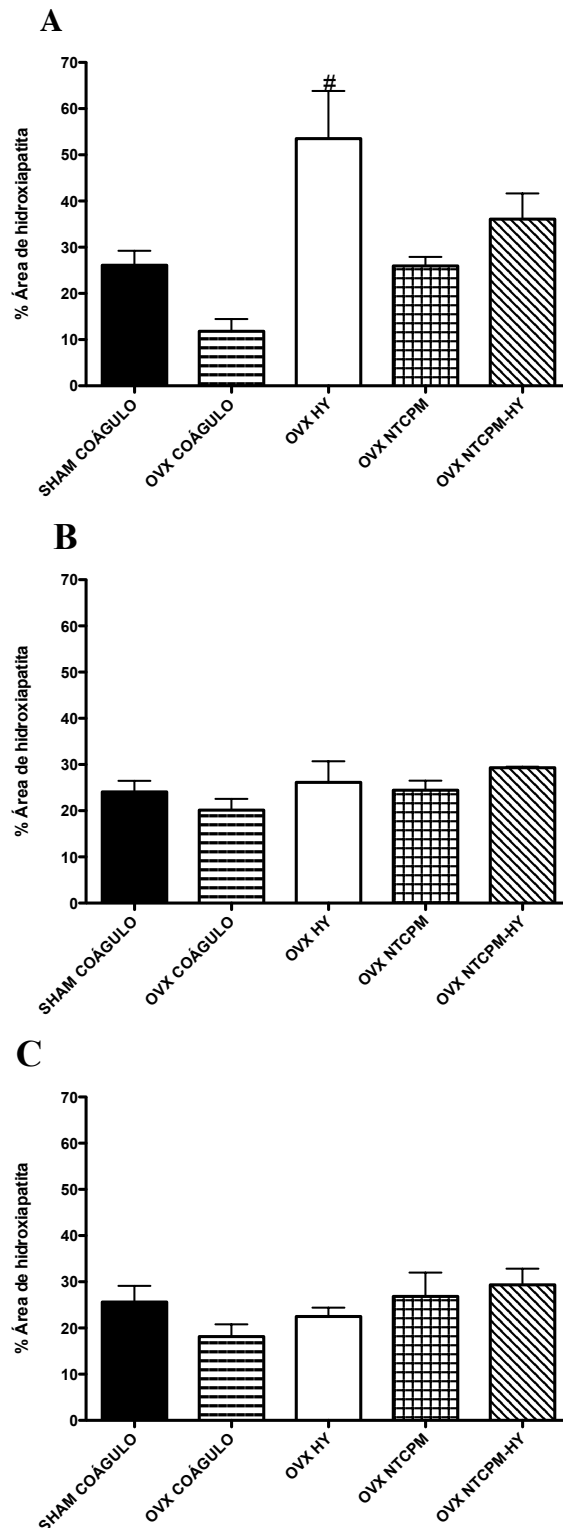


Figura 17: Percentual de área do pico Raman 950 cm^{-1} 7, 14 e 21 dias após a realização do defeito ósseo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. $\#p < 0,05$ vs OVX – coágulo. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

5.6.2.2 Área do pico 1450 cm⁻¹- Colágeno

O valor da área do pico Raman referente ao colágeno - 1450 cm⁻¹ também foi avaliada quantitativamente após um período de 7, 14 e 21 dias. Sete dias após o procedimento cirúrgico de perfuração da tibia, observamos um percentual de colágeno semelhante em tibias sham (18,57 ± 4,6%), OVX - coágulo (15,48 ± 3,62%), e OVX tratadas com HY (10,26 ± 1,73%), NTCPMs (10,54 ± 11,58%) e NTCPMs-HY (13,94 ± 0,30%) (Fig. 18A).

O mesmo padrão foi observado após um período de 14 dias (24,54 ± 3,96% - Sham; 15,20 ± 2,29% - OVX - coágulo; 23,37 ± 14,26% - HY; 26,81 ± 1,08% - NTCPMs; 16,39 ± 3,76% - NTCPMs-HY) (Fig. 18B) e 21 dias (20,28 ± 1,77% - Sham; 18,62 ± 8,90 %- OVX - coágulo; 18,92 ± 1,12% - HY; 21,43 ± 6,24% - NTCPMs; 18,57 ± 3,64 % - NTCPMs-HY) (Fig. 18C), onde nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

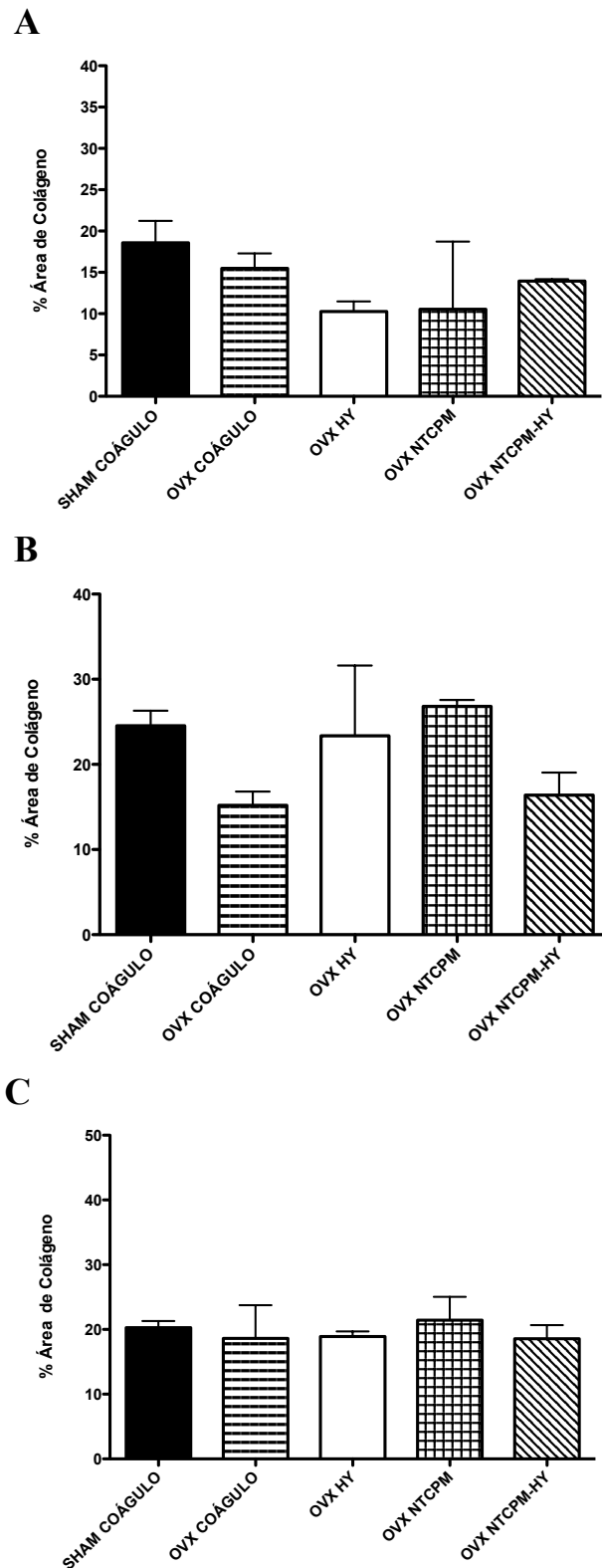


Figura 18: Percentual de área do pico Raman 1450 cm^{-1} 7, 14 e 21 dias após a realização do defeito ósseo. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

6. DISCUSSÃO

O tecido ósseo está continuamente sob processo de remodelação, que é importante para a manutenção da sua homeostase e para a reparação de microtraumas. Porém, em algumas patologias, como a osteoporose, o reparo ósseo pode ocorrer de forma mais lenta. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do HY, NTCPMs e NTCPMs-HY no reparo ósseo de tibiás de ratas ovariectomizadas. Este modelo tem sido frequentemente utilizado, uma vez que a deficiência dos hormônios sexuais é um dos principais fatores envolvidos na gênese da osteoporose (Ishida *et al.*, 1996; Compston, 2001; Manolagas *et al.*, 2013).

Inicialmente foi feita a caracterização dos biocompósitos utilizados no estudo utilizando a MET e espectroscopia de Raman. Os resultados observados foram compatíveis com estudos anteriores (MacDonald *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2016), ou seja, os NTCPMs apresentaram-se em massas aglomeradas e sem defeitos em sua estrutura, além de estarem imobilizados com o HY formando um novo material.

Análises histológicas demonstraram que, após um período de 7 dias, tibiás tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY apresentaram uma aceleração no processo de reparo e uma maior organização tecidual. Os animais OVX - coágulo possuíam uma extensa área de tecido de granulação e uma grande quantidade de espaços inter-trabeculares. Esses resultados estão de acordo com Melo *et al.* (2005) que demonstraram uma grande quantidade de espaços inter-trabeculares na região do defeito e um tecido conjuntivo bem vascularizado e rico em fibroblastos 10 dias após a realização do defeito ósseo. Morfometricamente, a comparação entre os grupos tratados e o grupo osteoporótico coágulo demonstrou que as tibiás tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY apresentaram maior deposição de trabéculas ósseas 7 dias

após a realização do procedimento cirúrgico, confirmando um reparo mais acelerado em relação às tíbias OVX-coágulo. Diversos estudos utilizaram o HY e os NTCs-HY em alvéolos dentários ou tíbias de ratos normais ou diabéticos e evidenciaram um aumento significativo na deposição de trabéculas ósseas (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2016). Os resultados do presente estudo corroboram com esses dados, uma vez que o HY e os NTCs-HY foram capazes de aumentar o percentual de trabéculas ósseas. Além disso, de acordo com os nossos achados, Usui *et al.* (2008) demonstraram que NTCPMs apresentam uma alta compatibilidade com o tecido ósseo, além de serem capazes de acelerar a neoformação óssea em tíbias de camundongos normais.

Após um período de 14 dias, as tíbias OVX tratadas com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY apresentaram toda a região do defeito preenchida por trabéculas ósseas maduras e bem organizadas. Nas tíbias OVX-coágulo ainda era possível observar uma quantidade considerável de tecido de granulação, porém as trabéculas já se apresentavam com uma maior organização e mais maduras. Vinte e um dias após a realização do defeito ósseo, observamos em todos os grupos uma redução na quantidade de trabéculas ósseas e um aumento na quantidade de espaços intertrabeculares. Em conjunto, esses resultados corroboram com os achados de Sasaki & Watanabe (1995) e Melo *et al.* (2005), que observaram cavidades medulares completamente ocupadas por tecido ósseo recém formado após um período de 14 dias e formação completa da medula após 30 dias. Além disso, Andrade *et al.* (2016), observaram após um período de 14 dias, um aumento na quantidade de espaços intertrabeculares em animais tratados com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY.

Atualmente a análise de micro-CT tem sido utilizada para quantificar a estrutura óssea e a microestrutura de biomateriais (Guldborg *et al.*, 2008; Bouxsein *et*

al., 2010). Consequentemente, muitas investigações tem empregado a micro-CT para avaliar a formação da matriz mineralizada sobre diferentes tipos de biomateriais *in vitro* e *in vivo* (Oliveira *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2007; Bakker *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Quando avaliamos as imagens da micro-CT nos grupos tratados com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY, observamos uma formação de tecido mineralizado mais acentuada em relação ao grupo dos animais OVX-coágulo. Esse incremento na neoformação óssea começou a ser percebida após um período de 7 dias, sendo que após 21 dias já começamos a observar que as bordas do defeito estavam unidas e preenchidas pelo osso neoformado. O aumento no percentual de trabéculas ósseas em animais OVX tratados com HY, NTCPMs e NTCPMs-HY evidencia que os tratamentos foram capazes de acelerar o processo de reparo ósseo, corroborando com os achados histo-morfométricos do nosso estudo. Outro parâmetro importante que foi avaliado pela micro-CT foi a densidade mineral óssea, cujo aumento nos animais tratados sugere uma melhora na microarquitetura do tecido ósseo.

O reparo ósseo é um processo que envolve a migração, proliferação, diferenciação e ativação de vários tipos celulares (Filvaroff *et al.*, 2003; Tsiroidis *et al.*, 2007). Diversos estudos tem demonstrado um atraso no reparo de ossos osteoporóticos de humanos e camundongos, devido a diferenças de diversos fatores, entre eles os BMPs (Bostrom *et al.*, 1998, Namkung-Matthai *et al.*, 2001). A maioria das BMPs participam do processo de diferenciação osteoblástica, mas a BMP-2 e a BMP-6 podem não só induzir a diferenciação osteogênica, como também promover a osteogênese em estágios precoces do reparo ósseo de ratos normais e osteoporóticos (Cheng *et al.*, 2003; Wong and Rabie, 2005; Schultze-Mosgau *et al.*, 2005; Taipaleenmaki *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2016). No presente trabalho, observamos um aumento na expressão de BMP-2 em tibias tratadas com NTCPMs, sugerindo uma

aceleração do processo de reparo ósseo. Corroborando com os nossos resultados, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que NTCs promovem um aumento na expressão de BMP-2, evidenciando a importância desse fator no processo de mineralização (Sá *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2016). O aumento da expressão de BMP-4 e BMP-6 em tíbias tratadas com NTCPMs-HY sugere que estes animais estavam em uma etapa ainda mais avançada do reparo ósseo, uma vez que esses fatores estão expressos na fase de reabsorção óssea (Sato *et al.*, 1999; Fischerauer *et al.*, 2012).

A espectroscopia de Raman foi utilizada para avaliar as características da estrutura molecular do reparo ósseo. Os resultados obtidos, no que se refere à comparação entre os grupos no tempo de 7 dias, demonstraram que a incorporação de HA e colágeno foi mais acentuada em tíbias tratadas com HY e menor em tíbias tratadas com NTCPMs. No período de 14 dias, observamos uma maior quantidade de HA em tíbias tratadas com NTCPMs-HY e uma maior quantidade de colágeno em tíbias tratadas com NTCPMs. Após 21 dias, o tratamento com NTCPMs-HY levou a um aumento no teor de HA e, em relação ao teor de colágeno, não foram observadas diferenças entre os grupos. Provavelmente, os valores de colágeno nesse último período se devem ao fato de haver pouca concentração de tecido não mineralizado nos defeitos nessa fase, onde praticamente toda a nova estrutura encontrava-se mineralizada. Os valores de HA aumentados em tíbias tratadas com NTCPMs-HY nos períodos de 14 e 21 dias podem sugerir um reparo ainda mais acelerado nesses animais.

Assim, os NTCs associados ou não ao HY são biomateriais promissores para a engenharia tecidual óssea, tendo em vista o reconhecimento da osteoporose como um problema de saúde pública que gera grandes repercussões sociais e econômicas

devido ao alto índice de fraturas.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

-o modelo experimental de ovariectomia é viável para estudos de osteoporose;

-os NTCs associados ao HY são :

- biomateriais capazes de acelerar o processo de reparo ósseo, que dentro do contexto da osteoporose pode auxiliar os pacientes portadores dessa doença silenciosa no restabelecimento das atividades de forma mais confortável e menos dispendiosa;
- capazes de formar um osso com uma qualidade melhor que aquele formado nos animais OVX-coágulo, e com características bem mais semelhantes ao osso dos animais sham.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarrategi A., Gutierrez MC, Moreno-Vicente C, et al. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials*. v. 29(1):94–102 p., 2008;

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;

Ajayan P. M. Nanotubes from Carbon. *Chem. Rev.* v. 99: 1787–1799 p., 1999;

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Trad. Veiga ABG. Porto Alegre: Artmed, 4.ed. 1463 p., 2004 ;

Allori, A.C., Sailon, A.M., Warren, S.M. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. *Tissue Eng. Part. B Rev.*, v. 14(3): 275-83 p., 2008;

Alt V., Thormann U., Ray S., Zahner D., Durselen L., Lips K., El Khassawna T., Heiss C., Riedrich A., Schlewitz G., Ignatius A., Kampschulte M., von Dewitz H., Heinemann S., Schnettler R., Langheinrich A. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta Biomater.* v. 9(6), 7035-42 p., 2013;

Altman R.D., Manjoo A., Fierlinger A., Niazi F., Nicholls M. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord.* v. 26,316-321p., 2015;

Andrade V. B., Sá M. A., Mendes R. M., Martins-Júnior P. A., Silva G. A. B., Souza B. R., Caliari M. V., Ávila E. S., Ladeira L. O., Resende R. R., Ferreira A. J. Enhancement of bone healing by local administration of carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate in rat tibia. *Cells Tissues Organs*. 2016;

Arepalli S., Nikolaev P., Gorelik O., Hadjjev V. G., Holmes W., Files B.; Yowell L. Protocol for the evaluation of single-wall carbon nanotube material quality. *Carbon*. v. 42: 1783-91 p., 2004;

Arosarena, O. A., Collins, W. L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol.: Head Neck Surg.* 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. *J. Biomater. Appl.* v. 20: 209-219 p., 2006;

Bakker C. M. J., Altman A. R., Tseng W., Tribble M. B., Li C., Chandra A., Qin L., Liu X. S. μ CT-based, in vivo dynamic bone histomorphometry allows 3D evaluation of the early responses of bone resorption and formation to PTH and alendronate combination therapy. *Bone.* v. 73: 198–207 p., 2015;

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

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. *J. Biomed. Mater. Res.* v. 96: 75-82 p., 2010;

Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., Rodan, G. A. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press, 1398 p., 1996;

Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin. Sci.* v. 98: 217-240 p., 2000;

Blythe J. G., Buchsbaum H. J. Fracture healing in estrogen-treated and castrated rats. *Obstet. Gynecol.* v. 48 (3): 351-2 p., 1976;

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;

Bostrom M. P. G., Lane J. M., Berberian W. S., Missri A. A. E., Tomin E., Weiland A., Doty S. B., Glaser D., Rosen V. M. Immunolocalisation and expression of bone

- morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* v. 13: 357–67 p. 1995;
- Bouxsein M. L., Boyd S. K., Christiansen B. A., Guldberg R. E., Jepsen K. J., Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *JBMR* v. 25: 1468–1486 p., 2010;
- Byrd H. S., Spicer T.E., Cierney G. Management of open tibial fractures. *Plast. Reconst. Surg.* v. 76: 719-730 p., 1985;
- Cancian G., Tozzi G., Hussain A. A. B., Mori A., Roldo M. Carbon nanotubes play an important role in the spatial arrangement of calcium deposits in hydrogels for bone regeneration. *J. Mater. Sci.* v. 27: 126 p., 2016;
- Carreira, A. C., Alves G. G., Zambuzzi W.F., Sogayar M. C., Granjeiro J. M. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 561: 64-73 p., 2014;
- Cheng Q., Rutledge K., Jabbarzadeh E. Carbon Nanotube-Poly(lactide-co-glycolide) Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. *Ann Biomed Eng* (in press), 2013;
- Chiu K. M., Arnaud C. D., Ju J., Mayes D., Bacchetti P., Wutz S., Keller E. T. Correlation of estradiol, parathyroid hormone, interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor during the normal menstrual cycle. *Bone*. v.26 (1): 79-85 p., 2000;
- Cho T., Gerstenfeld L. C., Einhorn T. A., Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor Superfamily During Murine Fracture Healing *J. Bone Miner. Res.* v. 17(3): 513-20, 2002;
- Chow J. W., Lean J. M., Chambers T. J. 17 beta-estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinol.* v. 130(5): 3025-32 p., 1992;
- Colnot, C., Romero D. M., Huang S., Helms J. A. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v. 435: 69-78 p., 2005;
- Cortet B. Bone repair in osteoporotic bone: postmenopausal and cortisone-induced

- osteoporosis. *Osteoporos. Int.* v. 22: 2007–2010 p., 2011;
- Cunha, M. R., Santos J. R. A. R.; Goissis G., Genari, S. C. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* v. 19(3): 1341–8 p., 2008;
- Danowski J. S. Osteoporose: conceito, classificação e clínica. *Ars Cvrandi Clínica Médica* v. 29: 21-27 p., 1996;
- 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 Regen.* v.16: 274–287 p., 2008;
- Cancian G., Tozzi G., Hussain A. A. B., Mori A., Roldo M. Carbon nanotubes play an important role in the spatial arrangement of calcium deposits in hydrogels for bone regeneration. *J Mater Sci: Mater Med.* v. 27, 126 p., 2016;
- Costa P.M., Bourgoignon M., Wang J.T., Al-Jamal K.T. Functionalised carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery. *J Control Release.* v. 241:200-219p., 2016;
- Dechert, T. A., Ducale, A. E., Ward, S. I., Yager, D. R. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen.* v. 14: 252-58 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 Biol.* v. 27: 475-86 p., 2008;
- Dequeker J., Aerssens J., Luyten F.P. Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging. Clin. Exp. Res.* v. 15: 426-39 p., 2003;
- Devescovi V., Leonardi E., Ciapetti G., Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chi. Organi. Mov.* v. 92(3): 161-68 p., 2008;
- Devogelaer J. P., Broll H., Correa-Rotter R., Cumming D. C., Nogant De Deuchaisnes C., Guesens P., Hosking D., Jaeger P., Kaufman J. M., Leite M., Leon J., Liberman U., Menkes C. J., Meunier P. J., Reid I., Rodriguez J., Romanowicz A.,

Seeman E., Vermeulen A., Hirsch L. J., Lombardi A., Plezia K., Santora A. C., Yates A. J., Yuan W. Oral alendronate induces progressive increases in bone mass of the spine, hip, and total body over 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* v. 18:141- 50 p., 1996;

Dresselhaus M. S., Dresselhaus G., Eklund P. C. Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes. *Academic Press*, San Diego, 1996;

Eatemadi A, Daraee H, Karimkhanloo H, Kouhi M, Zarghami N, Akbarzadeh A, Abasi M, Hanifehpour Y, Joo SW. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications, *Nanoscale Res Lett*, 9:1 393 p., 2014;

Einhorn T. A., Gerstenfeld L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev. Rheumatol.* v.11 (1): 45-54 p., 2015;

Engström-Laurent A. Hyaluronan in joint disease. *J. Inter. Med.* v. 242: 57-60 p., 1997;

Fazzalari N. L. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos. Int.* v. 22: 2003–6 p., 2011;

Filvaroff E. H. VEGF and bone. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* v.3: 304-7 p., 2003;

Fischerauer E. E., Manninger M., Seles M., Janezic G., Pichler K., Ebner B., Weinberg A. M. BMP-6 and BMPR-1a are up-regulated in the growth plate of the fractured tibia. *J. Orthop. Res.* V. 31 (3) :357-63 p., 2012;

Frasca S., Norol F., Le Visage C., Collombet J.M., Letourneur D., Holy X., Sari Ali E. Calcium-phosphate ceramics and polysaccharide-based hydrogel scaffolds combined with mesenchymal stem cell differently support bone repair in rats. *J Mater Sci Mater Med.* v. 28(2),35p., 2017;

Fraser J. R. E., Laurent T. C., Laurent U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.*, 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. *J. Cell. Biochem.*, v. 88: 873-84 p., 2003;
- Geusens P. P. & van den Bergh J. P. Osteoporosis and osteoarthritis: shared mechanisms and epidemiology. *Curr Opin Rheumatol.* v. 28(2): 97-103 p., 2016;
- 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. *Biomater.* v. 26: 3001-8 p., 2005;
- Glowacki A. J., Gottardi R., Yoshizawa S., Cavalla F., Garlet G. P., Sfeir C., Little S. R. Strategies to direct the enrichment, expansion, and recruitment of regulatory cells for the treatment of disease. *Ann. Biomed. Eng.* v.3: 593–602 p., 2015;
- 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;
- Guldberg R. E., Duvall C.L., Peister A., Oest M.E., Lin A. S. P., Palmer A. W., Levenston M. E. 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. *Biomater.* v. 29: 3757-61 p., 2008;
- Guo T., Nikolaev P., Thess A., Cobert D. T., Smalley R. E. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chem. Phys. Lett.* v. 243: 49-54 p., 1995;
- Gupta A., Woods M. D., Illingworth K. D., Niemeier R., Schafer I., Cady C., Filip P., El-Amin S. F., 3rd. Single walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering. *J. Orthop. Res.*, v. 31: 1374-81p., 2013;
- Hao Y. J., Zhang G., Wang Y. S., Qin L., Hung W. Y., Leung K., Pei F. X. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone* v.41: 631–38 p., 2007;
- Hartgerink J. D., Beniash E., Stupp S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science* v. 294: 1684–88 p., 2008;
- Hillard, T. C., Stevenson J. C. Role of estrogen in the development of osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* v. 49: S55-S59 p., 1991;

Hsieh Y. D., Devlin H., McCord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch. Oral Biol.* v.40: 529-31 p., 1995;

Huang J., Wang X., Zhang T. L., Wang K. Alterations of ovariectomized rat bone and impact of non-collagenous proteins on mineralization. *Joint Bone Spine.* v. 76(2):176-183 p., 2009;

Huang H.M., Li X.L., Tu S. Q., Chen X. F., Lu C. C., Jiang L.H. Effects of Roughly Focused Extracorporeal Shock Waves Therapy on the Expressions of Bone Morphogenetic Protein-2 and Osteoprotegerin in Osteoporotic Fracture in Rats. *Chin Med J (Engl).* v. 129(21):2567-2575 p., 2016;

Huang H. M., Li X. L., Tu S. Q., Chen X. F., Lu C. C., Jiang L. H. Effects of Roughly Focused Extracorporeal Shock Waves Therapy on the Expressions of Bone Morphogenetic Protein-2 and Osteoprotegerin in Osteoporotic Fracture in Rats. *Chin Med J.* v.129 (21): 2567-75 p., 2016;

Hughes D. E., Boyce B. F. Apoptosis in bone physiology and disease. *Mol. Pathol.* v.50: 132-37 p., 1997;

Iijima S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.* v. 354: 56 p., 1991;

Irineu J. A. F., Marsi T. C. O., Santos T. G., Corat E. J., Marciano F. R., Lobo A. O. Efficient method to produce biomineralized nanohydroxyapatite/vertically aligned multiwalled carbon nanotube scaffolds. *Materials Letters* v. 79:166-69 p., 2012;

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. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 12: 575-81 p., 2001;

Johnell O., Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos. Int.* v. 16: S3-S7, 2005;

Jorio A., Pimenta M. A., Souza Filho A. G., Saito R., Dresselhaus G., Dresselhaus M. S. Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. *New J.*

of Phys. v.5: 139 p., 2003;

Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J. Intern. Med.*, v. 242: 61- 6 p., 1997;

Kalfas I. H. Principles of Bone Healing. *Neurosurg. Focus* v.10: 1-8p., 2001;

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 Biol.* v. 28: 396-405 p., 2009;

Khan S. S. Carbon Nanotube Based Nanocomposite Fibril for Cartilage Regeneration. Masters of Science in Biomedical Science. Thesis Drexel University, September 2002;

Kierszenbaum A. L. Tecidos Conjuntivos. In: Kierszenbaum A L, *Histologia e Biologia Celular*. 2° ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 133-144p., 2008;

Kim S. E., Yun Y. P., Han Y.K., Lee D. W., Ohe J.Y., Lee B.S., Song H.R., Park K., Choi B.J. Osteogenesis induction of periodontal ligament cells onto bone morphogenic protein-2 immobilized PCL fibers. *Carbohydr Polym.* v. 99, 700- 709 p., 2014;

Klein, P., Schell S. H., Streitparth F., Heller M., Kassi J. P., Kandziora F. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J. Orthop. Res.* v. 21(4): 662-9 p., 2003;

Knudson W., Chow G. G., Knudson C. B. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol* v. 21(1): 15–23p., 2002;

Kobayashi H., Terao T. Hyaluronic acid-specific regulation of cytokines by human uterine fibroblasts. *Am. J. Physiol.* v. 273: 1151–59 p., 1997;

Kolar P., Schmidt-Bleek K., Schell H., Gaber T., Toben D., Schmidmaier G., Perka C., Buttgerit F., Duda G. N. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. *Tissue Eng.*, v.16: 427-34 p., 2010;

Kroto H. W., Heath J. R., O'brien, S. C., Curl R. F., Smalley R. E., C60-buckyminsterfullerene. *Nature.* v. 318: 162-63 p., 1985;

Kumar V., Abbas A. K., Aster J. Robbins Basic Pathology. 8th ed. New York: Saunders Elsevier, 2007;

Kwon B., Youn B. S., Kwon B. S. Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand super families in lymphocytes *Curr. Opin. Immunol.*, v. 11: 340-45 p., 1991;

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. *J. Oral Maxillofac. Surg.* v. 63 (10): 1500-8 p., 2005;

Lapcik L., Smedt S. D., Demeester J., Chabreck P. Hyaluronan: preparation, structure, properties and applications. *Chem. Rev.* v.98(8): 2663–84 p., 1998;

Laurent C., Hellstrom S., Stenfors L. Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: an experimental study. *Am. J. Otolaryngol.* v. 7(3):181–186 p., 1986;

Li W. J., Tuli R., Huang X., Laquerriere P, Tuan R. S. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* v. 26: 5158-66 p., 2005;.

Liao C. Z., Li K., Wong H. M., Tong W. Y., Yeung K. W. K., Tjong S. C. Novel polypropylene biocomposites reinforced with carbon nanotubes and hydroxyapatite nanorods for bone replacements. *Mat Sci Eng C Mater Biol Appl* v. 33(3): 1380-88 p., 2012;

Lieberman J. R., Daluiski A., Einhorn T. A. The role of growth factors in the repair of bone. *J. Bone Joint. Surg.* v. 84A: 1032-1044 p., 2002;

Lill C. A., Hessel J., Schlegel U., Eckhardt C., Goldhahn J., Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J. Orthop. Res.* v. 21: 836-42 p., 2003;

Liu Y., Cao L., Rays S., Thormann U., Hillengass J., Delorme S., Schnettler R., Alt V., Bauerke T. Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during

- bone defect healing in a rat model. *Injury*. v. 44(7),923-9p., 2013;
- Linker A., Meyer K., Weissmann B.. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. *J. Biol. Chem.*, v. 213: 237-48 p., 1955;
- Macdonald R. A., Laurenzi B. F., Viswanathan G., Ajayan P. M., Stegemann J. P. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* v. 74A: 489-96 p., 2005;
- Maeda H., Nakano T., Tomokiyo A., Fujii S., Wada N., Monnouchi S., Hori K., Akamine A. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J. Endod.* v. 36: 4 647-52p., 2010;
- Malarkey E. B., Purpura V. Carbon Nanotubes in Neuroscience. *Acta Neurochir. Suppl.* v.106: 337-41 p., 2010;
- Manolagas S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, v.21: 115-37 p., 2000;
- Manolagas S. C., O'Brien C. A., Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* v. 9: 699-712 p., 2013;
- Martins-Júnior P. A., Alcântara C. E., Resende R. R., Ferreira A. J. Carbon nanotubes: directions and perspectives in oral regenerative medicine. *J. Dent. Res.* v.92: 575-83 p., 2013;
- Martins-Júnior P. A., Sá M. A., Reis A. C., Queiroz-Junior C. M., Caliarí M. V., Teixeira M. M., Ladeira L. O., Pinho V., Ferreira A. J.. Evaluation of carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate in the inflammatory processes for oral regenerative medicine applications. *Clin. Oral Investig.* v.20: 1607-16 p., 2016;
- Matsuda S. M., Monzon M. E., Conner G. E., Salathe M., Forteza R. M. Role of hyaluronan and reactive oxygen species in tissue kallikrein-mediated epidermal growth factor receptor activation in human airways. *J. Biol. Chem.* V279 (20): 21606-16 p., 2004;

Mattson M., Haddon R., Rao A. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J. Mol. Neurosci.* v. 14: 175–82 p., 2002;

Mendes R. M., 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: 215-22 p., 2010;

Mendes, R. M., 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. *Arch. Oral Biol.* v. 53: 1155-62 p., 2008;

Mills S. J., Cowin A. J., Kaur P., Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. *Cells* v. 2 :621–34p., 2013;

Moseley R., Leaver M., Walker M., Waddington R. J., Parsons D., Chen W. Y. J., Embery G. Comparison of the antioxidant properties of HY and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. *Biomater.* v. 23: 2255-64 p., 2002;

Namkung-Matthai H., Appleyard R., Jansen J., Hao Lin J., Maas- tricht S., Swain M., Mason R. S., Murrell G. A., Diwan A. D., Diamond T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* v. 28: 80–86 p., 2001;

Ocarino N. M., Maruba Y. A., Cardoso T. G. S., Guimaraes C. V., Silva A. E., Torres R. C., Serakides R. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly or indirectly submitted to mechanical impact. *J. Musculoskeletal. Neuronal. Interact.* v.7: 84-93 p., 2007;

Oliveira A. L., Malafaya P. B., Costa S. A., Sousa R. A., Reis R. L. Micro- computed tomography (micro-CT) as a potential tool to assess the effect of dynamic coating routes on the formation of biomimetic apatite layers on 3D-plotted biodegradable polymeric scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater Med.* v. 18: 211-23 p., 2007;

Pacifici R., Rifas L., McCracken R., Vered I., McMurtry C., Avioli L. V., Peck W. A. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* v. 86(7): 2398-402 p., 1989;

- Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner. Res.* v. 11(8): 1043-51 p. 1996;
- Phipps M. C., Xu Y., Bellis S. L. Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PLoS One.* V. 7 (7): e40831., 2012;
- Pilloni A., Bernard G. W. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. *Cell and Tissue Res.* v. 294: 323-33 p., 1998;
- Porter B. D., Lin, A. S., Peister A., Hutmacher D., Guldberg R.E. Noninvasive image analysis of 3D construct mineralization in a perfusion bioreactor. *Biomater.* v. 28: 2525-33 p., 2007;
- 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 Musculoskelet. Disord.* v. 5: 12 p., 2004;
- Reddi A. H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* v.83-A: S1-S6 p., 2001;
- Riesco M., Manzano F., Font P., Garcia A., Nolla J.M. Osteoporosis in psoriatic arthritis: an assessment of densitometry and fragility fractures. *Clin. Rheumatol.* v 32 (12): 1799-804 p., 2013;
- Robey P.G., Boskey A.L. The composition of bone, In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, American Society for Bone and Mineral Research, C.J.Rosen (ed.), 32-6 p., 2008;
- Roy B., Curtis M.E., Fears L.S., Nahashon S.N., Fentress H.M. Molecular Mechanisms of Obesity-Induced Osteoporosis and Muscle Atrophy. *Front Physiol.* v.7,439p., 2016;
- 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 Biol.* v. 28: 390-95 p., 2009;
- Sá M. A., Ribeiro H. J., Valverde T. M., Sousa B. R., Martins-Júnior P. A., Mendes R. M., Ladeira L. O., Resende R.R, Kitten G. Y., Ferreira A. J. Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.49(2) e4888., 2016;
- Sá M. A., Andrade V. B., Mendes R. M., Caliari M. V., Ladeira L. O., Silva E. E., Silva G. A. B., Corrêa-Júnior J. D., Ferreira A. J. Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral Disease.* v.19: 484–93 p., 2013;
- Saito N., Okada T., Horiuchi H., Murakami N., Takahashi J., Nawata M., Ota H., Nozaki K., Takaoka K. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat. Biotechnol.* v.19(4): 332–35p., 2001;
- Sasaki, T.; Watanabe, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, v. 16, 9-15 p., 1995;
- Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone.* v. 22: 591-603 p., 1998;
- Schmitz J. P., Schwartz Z., Hollinger J. O., Boyan B.D. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel).* v. 138: 185-92 p., 2009;
- Sato W., Matsushita T., Nakamura K. Acceleration of Increase in Bone Mineral Content by Low-Intensity Ultrasound Energy in Leg Lengthening. *J. Ultrasound Med.* v.18 (10): 699-702 p., 1999;
- 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: 459–66 p., 2008;
- Schultze-Mosgau S., Lehner B., Rödel F., Wehrhan F., Amann K., Kopp J., Thorwarth M., Nkenke E., Grabenbauer G. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor- β 1, and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of

- osteonecrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* v. 61: 1189–96 p., 2005;
- 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. *Arch. Oral Biol.* v. 44 (9): 751-57 p., 1999;
- Silva E. E., Della Colleta H. H. M., Ferlauto A. S., Moreira R. L., Resende R. R., Oliveira S., Kitten G. T., Lacerda R. G., Ladeira L. O. Nanostructured 3-D Collagen/Nanotube Biocomposites for Future Bone Regeneration Scaffolds *Nano Res* v.2: 462 – 73 p., 2009;
- Siqueira Jr., J. F., Dantas C. J. S. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, 238 p., 2000;
- Sitharaman B., Shi X., Walboomers X. F., Liao H., Cuijpers V., Wilson L. J., Mikos L. J., Jansen J. A. In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone* v. 43 (2): 362-70 p., 2008;
- Song N., Zhao Z., Ma X., Sun X., Ma J., Li F., Sun L., Lv J. Naringin promotes fracture healing through stimulation of angiogenesis by regulating the VEGF/VEGFR-2 signaling pathway in osteoporotic rats. *Chem Biol Interact.* v.261, 11-17p.,2017;
- Street J., Wang J. H., Power C. W. A., Redmond H. P. Multiple angiogenic cytokines protect against osteoblasts apoptosis. *Surgery forum*, v.1: 465-67 p., 2000;
- 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. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 59: 499-506 p., 2002;
- Tomkinson A., Reeve J., Shaw R.W. et al. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, v.82: 3128 – 35 p., 1997;
- Tomkinson, A., Gevers, E. F., Wit J. M., Reeve J., Noble B. S. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J. Bone Miner. Res.* v.13: 1243-50 p., 1998;

Tonelli F. M., Santos A. K., Gomes K. N., Lorencon E., Guatimosim S., Ladeira L. O., Resende R.R. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine*. v. 7: 4511-29 p., 2012;

Thormann U., El Khawassna T., Ray S., Duerselen L., Kampschulte M., Lips K., von Dewitz H., Heinemann S., Heiss C., Szalay G., Langheinrich A.C., Ignatius A., Schnettler R., Alt V. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury*. v.45(3),487-93p., 2014;

Tran P. A., Zhang L., Webster T. J. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v.6: 1097–1114 p., 2009;

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

Turley E. A., Noble P. W., Bourguignon L. Y. W. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* v. 277: 4589–4592 p., 2002;

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: 240-46 p., 2008;

van den Bergh J.P., van Geel T. A., Geusens P .P. Osteoporosis, frailty and fracture: implications for case finding and therapy. *Nat. Rev. Rheumatol.* v. 8: 163–72p., 2012;

Walsh W. R., Sherman P., Howlett C. R., Sonnabend D. H., Ehrlich M. G. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin. Orthop. Relat. Res.* v. 342: 218-27 p., 1997;

Wang W., Watari F., Omori M., Liao S., Zhu Y., Yokoyama A., Kimura H., Ohkubo A. Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* v. 82(1): 223–30 p., 2007;

Wiltfang J., Kloss F. R., Kessler P., Nkenke E., Schultze- Mosgau S., Zimmerman 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. *Clin. Oral Implants Res.* v. 15: 187-93 p., 2004;

Wong R. W. K., Rabie A. B. M.. Early healing pattern of statin- induced osteogenesis. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* v.43: 46–50p., 2005;

Wu Y., Addeb S., Doschak M. R. Using micro-CT derived bone microarchitecture to analyze bone stiffness – a case study on osteoporosis rat bone. *Endocrinol.* v.20: 80p., 2015;

Xu S. W., Wang J. W., Li W., Wang Y., Zhao G. F. Osteoporosis impairs fracture healing of tibia in a rat osteoporotic model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* v.84: 1205–09 p., 2004;

Xu X., Jha A. K., Harrington D. A., Farach-Carson M. C., Jia X. Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter.* v. 8(12): 3280-94p., 2012;

Yakobson B.I., Smalley R. E. Fullerene Nanotubes: C_{1,000,000} and Beyond. *Am. Scient.* v. 85(4): 324-37p., 1997;

Zanello L. P., Zhao B., HU H., Haddon R. C. Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes. *Nano Letters.* v. 6: 562-67 p., 2006;

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. *Chem. Mater.*, v. 17: 3235-41 p., 2005;

Zhou W., Ooi Y. H., Russo R., Papanek P., Luzzi D. E., Fischer J. E., Bronikowski M. J., Willis P. A., Smalley R. E. Structural characterization and diameter-dependent oxidative stability of single wall carbon nanotubes synthesized by the catalytic decomposition of CO *Chem Phys Lett*; 350: 6-14 (2001);

Zimmermann G., Henle P., Kußwetter M., Moghaddam A., Wentzensen A., Richter W., Weiss S. TGF- α 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* v. 36: 779 – 85 p., 2006.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UFMG

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 161 / 2015, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE BIOCOMPÓSITOS BASEADOS NO HY E NOS NTC NO REPARO ÓSSEO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE”, que tem como responsável Anderson José Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 18/08/2015. Este certificado expira-se em 18/08/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 161 / 2015, related to the Project entitled “VALUATION OF THE EFFECTS OF BIOCOMPOSITES BASED ON HY AND CNT ON BONE REPAIR IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOPOROSIS”, under the supervision of Anderson José Ferreira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 18/08/2015. This certificate expires in 18/08/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 18/08/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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