

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**Efeitos dos Nanotubos de Carbono Funcionalizados com
Hialuronato de Sódio no Comportamento de Cultura de
Osteoblastos Primários**

Marcos Augusto de Sá

Belo Horizonte – MG

Julho – 2015

Marcos Augusto de Sá

**Efeitos dos Nanotubos de Carbono Funcionalizados com
Hialuronato de Sódio no Comportamento de cultura de
Osteoblastos Primários**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Belo Horizonte – MG

Julho – 2015



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE

MARCOS AUGUSTO DE SÁ

139/2015
entrada
2º/2011
2011712380

Às **quatorze horas** do dia **28 de julho de 2015**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**EFEITOS DOS NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COM HIALURONATO DE SÓDIO NO COMPORTAMENTO DE CULTURA DE OSTEÓBLASTOS PRIMÁRIOS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Anderson José Ferreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADO
Dr. Peterson Antônio Dutra Oliveira	PUC Minas	APROVADO
Dr. Luiz Orlando Ladeira	UFMG	Aprovado
Dr. José Dias Corrêa Júnior	UFMG	APROVADO
Dr. Héder José Ribeiro	UFJF	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 28 de julho de 2015.**

Dr. Anderson José Ferreira (Orientador) _____

Dr. Peterson Antônio Dutra Oliveira _____

Dr. Luiz Orlando Ladeira _____

Dr. José Dias Corrêa Júnior _____

Dr. Héder José Ribeiro _____

Cristina Guatimozin

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

Profa. Cristina Guatimozin Fonseca
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB / UFMG

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca, vinculado ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia, vinculado ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB - UFMG;
- Laboratório de Nanomateriais, vinculado ao Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas - UFMG.

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 Guilherme Augusto de Sá e Lúcia Faria Oliveira de Sá (*in memoriam*) e a minha noiva Grazielle Cordeiro Aguiar, que com amor e compreensão, sempre me apoiaram ao longo dessa importante jornada profissional.

Agradecimentos

A Deus, por nos dar a oportunidade de evoluir através da existência física e das provações nela implícitas, com vistas a nossa edificação moral;

Ao meu amado pai Guilherme Augusto de Sá, meu grande exemplo de vida e que sempre apoiou e viabilizou todos os meus projetos pessoais e profissionais;

A minha amada e saudosa mãe Lúcia Faria Oliveira de Sá (*In memoriam*), exemplo de amor e dedicação à família, sei que esteve e sempre estará ao meu lado, me ajudando nas dificuldades e celebrando minhas conquistas;

A minha noiva Grazielle Cordeiro Aguiar, pelo companheirismo, amizade, paciência e amor devotados a mim durante essa jornada;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, por me receber em seu laboratório e confiar no meu trabalho. Durante esses anos aprendi lições valiosas que serão muito importantes para a construção da minha carreira como docente e pesquisador;

Ao Prof. José Dias Corrêa Júnior, que me recebeu como estagiário em seu laboratório e acreditou em meu potencial;

Ao Prof. Gregory Thomas Kitten e a colega Thalita Marcolan Valverde, pelos ensinamentos e auxílio com as extrações de osteoblastos primários;

Ao Prof. Rodrigo Ribeiro Resende e suas alunas Bruna Raphaela Sousa e Nicole de Cássia Oliveira Paiva, pelo auxílio com os experimentos de PCR e caracterização dos nanotubos de carbono;

Ao Prof. André Ricardo Massensini e ao amigo Dr. Flávio Afonso Gonçalves Mourão, pelos ensinamentos e pelo auxílio com a aquisição de imagens de fluorescência;

Ao Prof. Luiz Orlando Ladeira, por ceder as amostras de nanotubos de carbono utilizadas neste trabalho;

Ao Prof. Heder José Ribeiro, por todos os ensinamentos durante minhas etapas como estagiário e mestrando e pela valiosa colaboração no início deste trabalho;

Ao Dr. Renato de Melo Mendes, por todos os ensinamentos e por ter iniciado, juntamente com o Professor Anderson, as atividades dessa linha de pesquisa;

Aos amigos Paulo Antônio Martins Júnior, Vanessa Barbosa Andrade e Carlos Eduardo Pinto de Alcântara por todo o apoio durante esse período e por terem contribuído para a sequência da linha de pesquisa;

Ao amigo Hermann Alecsandro Rodrigues, por ter me incentivado a ingressar na pós-graduação e por todo o apoio ao longo desses seis anos;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Cardíaca, pela união e companheirismo nos momentos de trabalho e diversão;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, em especial às amigas Íria e Cristiane e ao amigo Fernando;

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, em especial, aos amigos Luiz Henrique e Mônica, que iniciaram essa caminhada comigo há seis anos atrás;

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, pelo grande trabalho desenvolvido ao longo desses anos, que culminou na elevação da nota do Programa junto à CAPES;

A todas as secretárias que trabalharam no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular ao longo desses seis anos, em especial à Rhuanna, pelo carinho e compreensão com todos os alunos da Pós-graduação;

A CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

“No trabalho, em que possas fazer o melhor para os outros, encontrarás a quitação do passado, as realizações do presente e os créditos do futuro. E é ainda por ele que conquistarás o respeito dos que te cercam, a riqueza da experiência, a láurea da cultura, o tesouro da simpatia, a solução para o tédio e o socorro a toda dificuldade.”

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do hialuronato de sódio (HY), dos nanotubos de carbono de paredes simples (NTCPS), dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) e suas funcionalizações com o HY (NTCPS-HY, NTCPM-HY) no comportamento de osteoblastos primários. Antes da realização dos experimentos *in vitro*, os biocompósitos foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia Raman e análise termogravimétrica. Osteoblastos primários foram obtidos a partir de calvária de ratos Wistar neonatos. Foram avaliadas a viabilidade celular utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e a dupla coloração com iodeto de propídio e Hoechst, a formação de nódulos mineralizados pela coloração de von Kossa e a expressão gênica de proteínas envolvidas na formação óssea. Análises de MET mostraram NTCPS dispostos em feixes formados por diferentes números de unidades individuais e NTCPM com paredes espessas formadas por várias camadas dispostas de forma concêntrica. Espectros Raman de NTCPS e NTCPS-HY apresentaram picos de baixa frequência, o que os difere dos NTCPM e NTCPM-HY. A análise termogravimétrica de amostras de NTCPS-HY e NTCPM-HY confirmou a funcionalização dos NTC com o HY. O tratamento com os biocompósitos em baixas concentrações não alterou a viabilidade celular de osteoblastos primários. Além disso, houve um aumento significativo na deposição de nódulos mineralizados em culturas de osteoblastos primários que foram tratadas com HY, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, por um aumento na expressão de mRNA de colágenos tipos I e III, osteocalcina e proteínas morfogenéticas ósseas 2 e 4. Assim, os nossos dados indicam que HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY são potencialmente úteis para o desenvolvimento de novas estratégias em engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: Osteoblastos; Nanotecnologia; Nanotubos de carbono; Hialuronato de sódio; Engenharia tecidual óssea

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of sodium hyaluronate (HY), single-walled carbon nanotubes (SWCNT), multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) and their functionalization with HY (HY-SWCNT and HY-MWCNT) on the behavior of primary osteoblasts. Before carrying out the *in vitro* experiments, the biocomposites were characterized by transmission electron microscopy (TEM), Raman spectroscopy and thermogravimetric analysis. Primary osteoblasts were obtained from calvarial bones of newborn Wistar rats. It was assessed cell viability using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2h-tetrazolium bromide (MTT) assay and the double staining with propidium iodide and Hoechst, formation of mineralized bone nodules by von Kossa staining and mRNA expression of proteins involved in bone formation. TEM analysis showed SWCNT as bundles formed by different numbers of single units and MWCNT with thick wall formed by several concentrically arranged layers. Raman spectra of SWCNT and HY-SWCNT revealed low frequency peaks, which differs from the MWCNT and HY-MWCNT. Thermogravimetric analysis of HY-SWCNT and HY-MWCNT samples confirmed the functionalization of carbon nanotubes with HY. Treatment with low concentrations of these biocomposites did not reduce the cell viability of primary osteoblasts. Furthermore, there was a significant increase in the deposition of mineralized bone nodules in primary osteoblast cultures that were treated with HY, HY-SWCNT, MWCNT and HY-MWCNT, which can be explained, at least in part, by increases in the mRNA expression of collagen types I and III, osteocalcin and bone morphogenetic proteins 2 and 4. Thus, our data indicated that HY, SWCNT, HY-SWCNT, MWCNT and HY-MWCNT are potentially useful for the development of new strategies for bone tissue engineering.

Key words: Osteoblasts, Nanotechnology; Carbon nanotubes; Sodium hyaluronate; Bone tissue engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de (A) NTC de paredes simples e (B) NTC de paredes múltiplas	16
Figura 2: Estrutura da HA contendo repetidas unidades dissacarídicas de N-acetilglicosamina e ácido D-glucorônico.	18
Figura 3: Microscopia óptica de contraste de fase de cultura de osteoblastos primários extraídos a partir de calvárias de ratos neonatos.....	27
Figura 4: MET dos NTCPS e NTCPM.....	34
Figura 5: Espectroscopia Raman dos NTC e dos NTC-HY.	36
Figura 6: Análises termogravimétricas de amostras do HY, NTCPS-HY e NTCPM-HY..	38
Figura 7: Ensaio de MTT.....	40
Figura 8: Ensaio de viabilidade por iodeto de propídio.	43
Figura 9: Coloração de von Kossa para análise das áreas de matriz mineralizada..	45
Figura 10: PCR em tempo real. Expressão de mRNA dos colágenos tipo I (A) e III (B), OCN (C), BMP-2 (D) e BMP-4 (E) após tratamento com NTCPS ou NTCPS-HY.....	47
Figura 11: PCR em tempo real. Expressão de mRNA dos colágenos tipo I (A) e III (B), OCN (C), BMP-2 (D) e BMP-4 (E) após tratamento com NTCPM ou NTCPM-HY....	49
Figura 12: PCR em tempo real. Expressão de mRNA dos colágenos tipo I (A) e III (B), OCN (C), BMP-2 (D) e BMP-4 (E) após tratamento com HY	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers usados para as análises de qRT-PCR.....	32
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

alfa-MEM – *alfa minimum essential medium*

BMP-2 – Proteína morfogenética do osso 2

BMP-4 – Proteína morfogenética do osso 4

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEBIO – Centro de Bioterismo da UFMG

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

HA – Hialuronana

HY – Hialuronato de sódio

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

MEC – Matriz extracelular

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

NTC – Nanotubos de carbono

NTCPM – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

NTCPM-HY – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com hialuronato de sódio

NTCPS – Nanotubos de carbono paredes simples

NTCPS-HY – Nanotubos de carbono de paredes simples funcionalizados com hialuronato de sódio

OPN – Osteopontina

OCN – Osteocalcina

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase chain reaction*

RBM – Modo de respiração radial

RHAMM – Receptores para mobilidade mediada por HA

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	14
1- Engenharia tecidual óssea e nanotecnologia	14
2- Nanotubos de carbono	15
3- Hialuronato de sódio	17
II. JUSTIFICATIVA	21
III. OBJETIVOS	22
1- Objetivo geral	22
2- Objetivos específicos	22
IV. METODOLOGIA	23
1- Síntese e carboxilação dos nanotubos de carbono	23
2- Funcionalização e caracterização dos nanotubos de carbono	23
3- Animais	24
4- Obtenção de cultura de osteoblastos primários	25
5- Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT.....	28
6- Análise da viabilidade celular por iodeto de propídio.....	28
7- Análise de mineralização pela técnica citoquímica de von Kossa	29
8- Análise da expressão de mRNA de indicadores do reparo ósseo por PCR em tempo real.....	30
9- Análise estatística.....	32
V. RESULTADOS	33
1- A caracterização comprovou a boa qualidade estrutural dos biocompósitos e a funcionalização não covalente entre os NTC de paredes simples ou múltiplas e o hialuronato de sódio.....	33
2- Ensaio de viabilidade por MTT demonstrou que os tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY não alteram a viabilidade celular de osteoblastos primários	39
3- Ensaio de viabilidade por iodeto de propídio confirmou resultados do ensaio de MTT e demonstrou que os tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY não alteram a viabilidade celular de osteoblastos primários.....	41
4- A coloração de von Kossa demonstrou que os tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY estimulam o aumento da formação de nódulos mineralizados	44
VI. DISCUSSÃO	52
X. REFERÊNCIAS	58
XI. ANEXOS	66

I. INTRODUÇÃO

1- Engenharia tecidual óssea e nanotecnologia

O desenvolvimento de novas estratégias e materiais para substituir ou regenerar o tecido ósseo perdido em situações de trauma, envelhecimento e doenças tem sido cada vez maior. Neste sentido, a engenharia tecidual óssea tem ganhado destaque na área da medicina regenerativa. Ela representa um campo interdisciplinar que depende de três fatores importantes: fonte celular, *scaffolds* ou arcabouços para as células e moléculas bioativas de indução (Pan *et al.*, 2012). Seu principal objetivo é substituir tecidos acometidos por doenças ou lesionados, promovendo a restauração ou o melhoramento das funções do tecido (Kaigler e Mooney, 2001).

Nas últimas décadas, grandes avanços na pesquisa de células-tronco, transplante tecidual e engenharia de materiais têm dado suporte para o desenvolvimento da engenharia tecidual e medicina regenerativa (Stout e Webster, 2012). Entretanto, alguns obstáculos foram encontrados na utilização da terapia básica com células-tronco, dentre os quais podemos destacar o potencial de transformação em células tumorais (Reya *et al.*, 2001; Guilak *et al.*, 2009), a liberação e manutenção dessas células no tecido alvo durante a terapia regenerativa e o controle da sua diferenciação. Considerando que estas questões não estão completamente elucidadas (Passier *et al.*, 2008; Stout e Webster, 2012), a utilização de semelhantes terapias fica comprometida.

Polímeros sintéticos biodegradáveis, que apresentam boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e promoção da atividade celular têm sido amplamente utilizados para fabricação de substitutos ósseos (Shi *et al.*, 2007). Entretanto, a aplicação de muitos materiais, como por exemplo o poli (ácido láctico-co-glicólico), tem sido limitada devido à sua baixa resistência mecânica, superfície hidrofóbica e ineficiente capacidade bioativa (Lee *et al.*, 2009). Mais recentemente, a engenharia tecidual ganhou uma grande aliada, a nanotecnologia. Diversos estudos tem sugerido a utilização de nanocompósitos e materiais nanoestruturais para superar tais limitações (Yoon *et al.*, 2009).

A estrutura e a função do tecido ósseo dependem de um arranjo formado por componentes celulares e não celulares em escala micro e nanométrica, que inclui

osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, incorporados em uma matriz extracelular (MEC) mineralizada composta, principalmente, por colágeno e proteínas não colágenas (Mann e Weiner, 1999; Taton, 2001). Considerando que um dos principais focos da engenharia tecidual óssea é criar um arcabouço artificial capaz de sustentar o crescimento e proliferação celular para substituir o tecido ósseo, torna-se fundamental a criação de um microambiente que mimetize a função deste tecido (Zanello *et al.*, 2006).

A nanotecnologia trabalha com materiais denominados nanomateriais, que possuem uma dimensão física entre 1-100 nm, para criar materiais que terão novas propriedades (Stout e Webster, 2012). Esta característica é muito importante, uma vez que a maioria dos componentes biológicos envolvem algum aspecto de nano-dimensionalidade. Uma categoria de nanomateriais que transformou a engenharia de tecidos e tem grande potencial para otimizar a utilização de células-tronco são os nanotubos de carbono (NTC) (Stout e Webster, 2012).

2- Nanotubos de carbono

Os NTC são formas metaestáveis de carbono resultantes do enrolamento de um plano de átomos de carbono (Dresselhaus *et al.*, 1996; Ajayan, 1999), demonstradas pela primeira vez no início da década de 90 (Iijima, 1991). Estão divididos em duas categorias: NTC de paredes simples (NTCPS) com diâmetro variando entre 0,7 e 2,0nm (Figura 1A) e NTC de paredes múltiplas (NTCPM) que podem ter diâmetro de até 100nm (Figura 1B) (MacDonald *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Boccaccini *et al.*, 2006; Smart *et al.*, 2006). A forte ligação covalente de seus átomos proporciona aos NTC alta resistência mecânica e, devido ao seu caráter metálico, alta condutividade térmica e elétrica. Além disso, a ausência de ligações pendentes dá a este material uma grande inércia química, fundamental para o seu uso em aplicações biotecnológicas e bioquímicas (Dresselhaus *et al.*, 1996). As suas propriedades físico-químicas despertaram grande interesse nos mais diversos ramos da ciência, permitindo considerar uma variada gama de aplicações que vão desde o armazenamento de energia e hidrogênio até a utilização em aplicações biomédicas (Terrones, 2004).

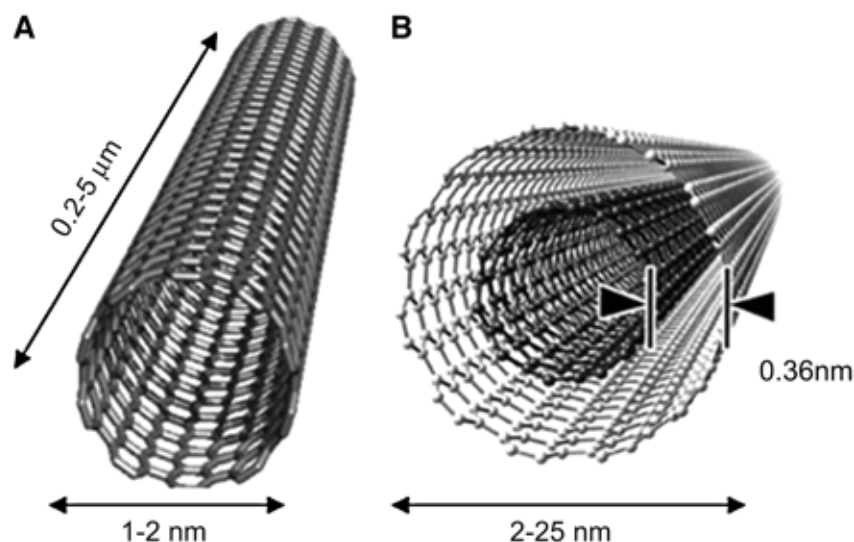


Figura 1: Representação esquemática de (A) NTC de paredes simples e (B) NTC de paredes múltiplas (Reilly, 2007).

No tecido ósseo, durante o processo de síntese de matriz óssea e organização de um sistema trabecular, as triplas hélices de colágeno formam, espontaneamente, feixes que atuam como um sítio de nucleação para a deposição de nanocristais de hidroxiapatita. De modo similar, a estrutura dos átomos de carbono confere aos NTC um plano tridimensional poroso, que também permite a eles controlar eventos de nucleação de cristais e crescimento do componente inorgânico (Zhao *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que NTC promovem a proliferação de osteoblastos e a formação óssea representando, portanto, um enorme avanço tecnológico no campo da bioengenharia (Price *et al.*, 2004; Zanello *et al.*, 2006; Tutak *et al.*, 2009).

Matrizes à base de NTC permitem boa adesão, espalhamento e proliferação celular (Correa-Duarte *et al.*, 2004; Chłopek *et al.*, 2006; Galvan-Garcia *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2007) e apresentam excelente biocompatibilidade (Chłopek *et al.*, 2006). Adicionalmente, a associação de NTC a outros polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, melhora as propriedades mecânicas destes polímeros (Abarrategi *et al.*, 2008; Bhattacharyya *et al.*, 2008; Sitharaman *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009), resultando em biocompósitos mais resistentes e com capacidade aumentada de nucleação e crescimento de cristais de hidroxiapatita (Silva *et al.*, 2009), bem como maior potencial osteoindutor (Sitharaman *et al.*, 2008), quando comparados à utilização dos polímeros de forma isolada. Portanto, a associação dos

NTC com polímeros pode permitir sua utilização como suporte para proliferação celular e reconstrução tecidual (MacDonald *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm mostrado que diferentes linhagens celulares podem proliferar em substratos a base de NTC (Hu *et al.*, 2004; Usui *et al.*, 2008). Em relação aos osteoblastos, que são as células responsáveis pela secreção e formação da matriz óssea, foi demonstrado que os NTC promovem a proliferação dessas células e, conseqüentemente, a formação óssea (Zanello *et al.*, 2006; Mattioli-Belmonte *et al.*, 2012; Hopley *et al.*, 2014). Devido às suas características físico-químicas intrínsecas como, por exemplo, sua porosidade, os NTC, quando incorporados à biopolímeros, resultam no aumento da adesão e proliferação celular (Cheng *et al.*, 2013). Além disso, os NTC, quando associados a polímeros como o HY, resultam em um material mais resistente e estável, preservando as ações biológicas do HY (Bhattacharyya *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010), o que é desejável para futuras aplicações em engenharia tecidual óssea.

3- Hialuronato de sódio

A hialuronana (HA) ou hialuronato de sódio (ácido hialurônico - HY) foi isolada inicialmente em 1934 por Meyer e Palmer e teve sua estrutura primária descrita em 1955 (Linker *et al.*, 1955). É um polissacarídeo de alto peso molecular (10^4 - 10^7 Da) e composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido *D*-glucorônico e *N*-acetilglicosamina (Figura 2). O HY encontra-se amplamente distribuída na MEC de mamíferos (Ågren *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).

O HY é capaz de influenciar o comportamento celular pela interação direta com receptores de superfície celular (Turley *et al.*, 1991; Dechert *et al.*, 2006), especialmente o receptor CD44 (Lesley *et al.*, 2000; Sugahara *et al.*, 2003; Lesley *et al.*, 2004) e receptores para mobilidade mediada por HA (RHAMM) (Toole, 1997; Savani *et al.*, 2001; Turley *et al.*, 2002; Nedvetzki *et al.*, 2004; Ghatak *et al.*, 2005) via ativação de proteínas quinases (Zhang *et al.*, 1998; Bourguignon *et al.*, 2002; Slevin *et al.*, 2002; Ghatak *et al.*, 2005).

RHAMM (descrito inicialmente por Hardwick *et al.*, 1992), juntamente com o CD44, pertence ao grupo das hialaderinas ou proteínas que se ligam ao HY, sendo

expresso na membrana celular (onde é denominado CD168), no citoplasma e também no núcleo (Nedvetzki *et al.*, 2004). A transdução do sinal, após ligação ao HY, acarreta rearranjos estruturais do citoesqueleto (Toole *et al.*, 2002; Bourguignon *et al.*, 2002). O bloqueio específico destes receptores indica que RHAMM regula a migração de células endoteliais, enquanto CD44 influencia a proliferação destas células (Savani *et al.*, 2001), fornecendo evidências do envolvimento do HY na angiogênese (Savani *et al.*, 2001; Slevin *et al.*, 2002; Giavaresi *et al.*, 2005). A interação entre CD44 e o HY implica na adesão primária de leucócitos ao endotélio em sítios de inflamação (Lesley *et al.*, 2004). Contudo, CD44 e RHAMM desempenham também um papel crítico na migração e proliferação de células saudáveis e tumorais (Annabi *et al.*, 2004; Nedvetzki *et al.*, 2004; Ghatak *et al.*, 2005).

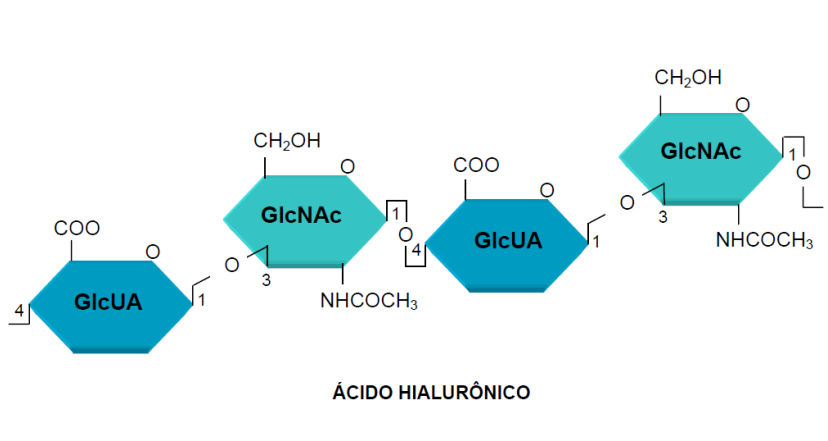


Figura 2: Estrutura da HA contendo repetidas unidades dissacarídicas de N-acetilglicosamina e ácido D-glucorônico (Rosa, 2008).

O HY desempenha um papel crucial no reparo tecidual durante a cicatrização de feridas e em processos inflamatórios por estimular a migração, adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, bem como por induzir sua diferenciação (Grigolo *et al.*, 2001; Lisignoli *et al.*, 2002; Toole *et al.*, 2002; Arosarena e Collins, 2005; Aslan *et al.*, 2006; Dechert *et al.*, 2006; David-Raoudi *et al.*, 2008; Pasquinelli *et al.*, 2008). Uma vez completa a formação tecidual, sua concentração é reduzida, sendo substituída por glicosaminoglicanas sulfatadas (Gerdin e Hällgren, 1997; Toole, 1997; Piloni e Bernard, 1998; Dechert *et al.*, 2006). O alto peso molecular do HY é um fator chave em sua habilidade de atuar como antioxidante por competir diretamente com sítios de ligação celulares e moleculares

para fixação de radicais livres (Moseley *et al.*, 2002). A aplicação tópica do HY em feridas dérmicas, além da remoção de radicais livres, tem como benefícios a hidratação da ferida e o bloqueio das hialuronidases (Dechert *et al.*, 2006). Como resultado da ação das hialuronidases e radicais livres, o HY de alto peso molecular é clivado em fragmentos menores (Liu *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005). O tamanho da molécula de HY influencia sua ligação aos receptores celulares, alterando parâmetros como proliferação e migração celular (Lesley *et al.*, 2000; Slevin *et al.*, 2002; Sugahara *et al.*, 2003).

Durante os processos de reparo ósseo, em virtude de suas propriedades físico-químicas, o HY pode atuar na retenção de fatores de crescimento osteoindutores dentro do ambiente local (Sasaki e Watanabe, 1995), além de mediar a adesão de osteoclastos à superfície óssea (Prince, 2004), acelerar a revascularização (Giavaresi *et al.*, 2005) e a formação óssea (Sasaki e Watanabe, 1995; Pilloni e Bernard, 1998). A inserção de grande quantidade de HY em áreas de lesão tecidual previne, inicialmente, a agregação celular, possibilitando intensa migração e divisão celular.

A ação de hialuronidases liberadas por fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas, presentes na região de reparo, é responsável por regular os níveis de HY, permitindo a formação de pontes de ligação entre HY e seus receptores celulares, um mecanismo importante na agregação celular (Pilloni e Bernard, 1998). Desta forma, matrizes à base de HY podem ser potencialmente úteis para o reparo de defeitos teciduais ósseos, acelerando a formação e deposição de matriz óssea (Pasquinelli *et al.*, 2008). Géis à base de HY têm sido utilizados em modelos de defeitos ósseos, isoladamente ou como carreadores para a proteína morfogenética do osso tipo 2 (BMP-2) (Itoh *et al.*, 2001; Arosarena e Collins, 2005), matriz óssea desmineralizada (Colnot *et al.*, 2005), compósitos de hidroxiapatita (Bakos *et al.*, 1999) e enxertos ósseos (Giavaresi *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2006), além do tratamento da osteoartrite (Barbucci *et al.*, 2002). Alvéolos dentários de ratos tratados com HY apresentaram um significativo aumento na formação de trabéculas ósseas quando comparados a alvéolos controle sete dias após a exodontia (Mendes *et al.*, 2008). Além disso, a expressão de moléculas indicadoras do reparo ósseo como osteopontina (OPN) e BMP-2 foi maior e mais precoce nos alvéolos tratados com HY. Contudo, a fraca estabilidade do HY em meios aquosos tem prejudicado o seu uso na reabilitação de pacientes, seja em Odontologia ou Medicina ortopédica.

Uma alternativa para resolver este problema pode ser a associação do HY a outros materiais, como os NTC.

II. JUSTIFICATIVA

Trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que o HY e os NTCPS funcionalizados (associados) com HY (NTCPS-HY) foram capazes de acelerar o reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos saudáveis (Mendes et al., 2008; Mendes et al., 2010), bem como restaurar o reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos diabéticos (Sá et al., 2013). Contudo, os mecanismos que regem estes efeitos sobre o reparo ósseo nos modelos acima descritos permanecem desconhecidos. Dessa forma, foi utilizado um modelo *in vitro* de cultura de osteoblastos primários extraídos a partir de calvárias de ratos neonatos para avaliar o comportamento dessa linhagem celular ao ser exposta aos biocompósitos acima citados. Além disso, a investigação da expressão gênica de proteínas da parte orgânica da matriz óssea (Colágenos I e III), bem como daquelas envolvidas no processo de formação e mineralização da matriz óssea [BMP-2, BMP-4 e osteocalcina (OCN)] em culturas de osteoblastos tratadas com NTC, HY ou NTC-HY fornecerá avanços importantes para a elucidação dos mecanismos de ação subjacentes aos efeitos desses biocompósitos.

III. OBJETIVOS

1- Objetivo geral

Avaliar os efeitos do HY, dos NTC e dos NTC-HY no comportamento de osteoblastos primários.

2- Objetivos específicos

- Realizar a caracterização morfológica e físico-química dos NTCPS e NTCPM funcionalizados ou não com o HY, através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia raman e termogravimetria;
- Avaliar a viabilidade celular, através dos ensaios de MTT e iodeto de propídio, de osteoblastos primários tratados com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM ou NTCPM-HY;
- Avaliar a formação de nódulos mineralizados em cultura de osteoblastos primários tratados com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM ou NTCPM-HY utilizando a coloração de von Kossa;
- Avaliar a expressão de mRNA para colágenos tipo I e III, OCN, BMP-2 e BMP-4, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, em osteoblastos primários tratados com HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM ou NTCPM-HY.

IV. METODOLOGIA

1- Síntese e carboxilação dos nanotubos de carbono

Os NTCPS foram sintetizados pelo método de descarga em arco utilizando cobalto e níquel como catalisadores em uma atmosfera de hélio e a uma pressão total de 500 Torr. Já os NTCPM foram sintetizados pelo método de deposição de vapor químico usando ferroceno e etileno como catalisadores a uma temperatura de 750°C (Trigueiro *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). Em seguida, os materiais foram purificados por uma seqüência de oxidação térmica e tratamentos ácidos. Os NTCPS e NTCPM purificados foram submetidos a refluxos em ácido nítrico (3 mol/L) em microondas por 15 minutos para adição covalente de grupos carboxílicos (COOH) às suas respectivas estruturas, processo este denominado carboxilação. Este processo tem como objetivo melhorar a solubilidade dos NTC em meios aquosos. Terminada a carboxilação, os NTCPS e NTCPM foram centrifugados a 7000 rpm e lavados repetidamente com água deionizada até a completa remoção do ácido nítrico. A solução final, contendo NTCPS ou NTCPM carboxilados foi mantida em uma estufa a 60°C por 12 horas para secagem (Mendes *et al.*, 2010).

2- Funcionalização e caracterização dos nanotubos de carbono

Para a associação com o HY, inicialmente foi obtida uma solução com NTCPS ou NTCPM carboxilados (0,5 mg/mL) e HY (0,5 mg/mL). Em seguida, esta solução foi mantida em sonicação até se tornar homogênea e, posteriormente, filtrada em filtro de 0,45 µm para remover o excesso de HY não associado aos NTC. O material que ficou sobre o filtro foi lavado várias vezes com água deionizada, transferido para um recipiente de vidro e colocado em estufa a 60°C para secar (Mendes *et al.*, 2010).

Após a secagem, os biocompósitos (NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY) foram criteriosamente caracterizados por três técnicas distintas: microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia Raman e termogravimetria. A MET foi realizada para verificar a morfologia, cristalinidade e a presença de possíveis impurezas e/ou defeitos na estrutura dos NTCPS e NTCPM. Para isso, os NTCPS ou NTCPM foram diluídos em água Milli-Q, tendo a concentração de 300 µg/mL.

Após o preparo das soluções de NTCPS ou NTCPM, cada uma delas foi gotejada em telas de cobre Holey carbon de 400 mesh (5 gotas). Após a secagem das telas, as mesmas foram armazenadas em estojos próprios e levadas para análise em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20-FEI 2006. Para a espectroscopia Raman, as amostras de NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM ou NTCPM-HY foram posicionadas sobre lâminas histológicas e a análise foi realizada com o auxílio de um laser de argônio, com comprimento de onda de 514 nm, acoplado a um espectrômetro (Jobin-Ivon, França). Foram analisadas, principalmente, a intensidade de dois picos nos espectros: a banda D (ou *disorder peak*), localizada a 1350 cm^{-1} , que está relacionada a presença de carbono amorfo e defeitos estruturais nos NTCPS ou NTCPM, e a banda G, originada no modo tangencial E_{2G} de estruturas de grafite e localizada a 1580 cm^{-1} , que também está ativa tanto nos NTCPS como nos NTCPM. A razão entre as bandas D e G está associada a qualidade estrutural dos NTC e baixos valores dessa razão significam boa qualidade dos NTC e baixa quantidade de defeitos e carbono amorfo (Jorio *et al.*, 2003). Finalmente, a funcionalização dos NTCPS ou NTCPM com HY foi confirmada por meio de análises termogravimétricas, que envolvem o monitoramento contínuo da massa de uma amostra em função da temperatura em uma atmosfera controlada, enquanto a amostra é progressivamente aquecida. Esta técnica apresenta uma curva de aquecimento que varia de 20 a 800°C , com um aumento de 5°C por minuto em uma atmosfera de ar seco. A massa das amostras avaliadas (HY liofilizado; NTCPS-HY ou NTCPM-HY em pó) variavam entre 1,5 e 3,0 mg e foram colocadas dentro de um recipiente de alumina apropriado para o equipamento.

Os NTCPS, NTCPM, NTCPS-HY e NTCPM-HY em pó foram divididos em várias alíquotas de 2 mg e mantidos em eppendorfs. Essas alíquotas foram esterilizadas por radiação gama, na dosagem de 2,5 Kgy e, posteriormente, usadas nos diversos experimentos. O HY 1%, obtido junto à BS pharma (Minas Gerais, Brasil), também foi esterilizado por radiação gama na dosagem de 250 gy. Os procedimentos de esterilização foram adaptados a partir de Barbucci *et al.* (2002).

3- Animais

Foram utilizados ratos Wistar neonatos (2 - 4 dias de idade) com peso variando entre 6 e 9 g provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG.

Os experimentos foram realizados em conformidade com as orientações para o uso humanitário de animais de laboratório e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo número 217/2009 – Anexo 1).

4- Obtenção de cultura de osteoblastos primários

Osteoblastos primários foram obtidos a partir de calvárias de ratos neonatos. Para isso, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica utilizando cloridrato de quetamina (6 mg/kg) e submetidos à assepsia com álcool iodado, especificamente, na região de interesse, a cabeça. Em seguida, a cabeça foi cortada com uma tesoura e a dissecação foi realizada com a remoção da pele e posterior retirada das calvárias. Estas passaram por 3 banhos em uma solução de *phosphate buffered saline* (PBS) (1X) tratado com gentamicina (Gibco, Carlsbad, CA, USA) (100 µg/mL), denominada solução 1. Ao longo da passagem por estes três banhos na solução 1, as calvárias foram higienizadas com lenços de papel sem fiapos Kimwipes (Kimberly-Clark, Roswell, GA, USA) devidamente esterilizados, com o objetivo de retirar o excesso de sangue e tecido fibroso, o que reduz a possibilidade de contaminação da cultura por outros tipos celulares, como fibroblastos e hemácias. Após passar por três banhos da solução 1, as calvárias passaram por mais três banhos da solução 2, composta por solução 1, meio *alfa Minimum Essential Medium* (alfa-MEM) (Gibco) e gentamicina (190 µg/mL). Durante estes banhos em solução 2, as calvárias foram dobradas ao meio em seu eixo longitudinal e a sutura sagital das mesmas foram cortadas com o objetivo de reduzir as chances de contaminação por fibroblastos, uma vez que as suturas são juntas fibrosas.

Uma vez divididas em duas partes, as calvárias passaram para a solução 3, composta por colagenase do tipo II (Gibco) diluída em tripsina 0,25% (Gibco) (1mg/mL), onde foram submetidas a três digestões. Na primeira digestão, que teve duração de 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, também com objetivo de prevenir contaminação da cultura por outros tipos celulares. A segunda digestão teve duração de 15 minutos e, após o seu término, o sobrenadante com as células em suspensão, foi reservado em um tubo falcon separado, sendo denominado amostra 1. No tubo que continha as calvárias, foi adicionado 1 mL de PBS (1X) e as calvárias foram picotadas com tesoura em vários fragmentos menores. Após esta etapa, o PBS, que também continha células em suspensão, foi cuidadosamente

aspirado e homogeneizado juntamente com a amostra 1. Os fragmentos de calvária foram submetidos a uma terceira digestão com duração de 25 minutos em solução 3. Enquanto a terceira digestão ocorria, a amostra 1 foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em meio alfa-MEM suplementado com soro fetal bovino (Gibco) a 10%, gentamicina (100 µg/mL), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (5 µg/mL) e beta glicerofosfato (Sigma-Aldrich) (2,16 mg/mL). Após esta etapa, a amostra 1 ficou reservada no gelo. Terminada a terceira digestão, a solução enzimática contendo células em suspensão foi retirada do contato com os fragmentos ósseos e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm, sendo o sobrenadante descartado, assim como na amostra 1, e o pellet ressuspensionado em meio alfa-MEM suplementado. Este tubo foi denominado amostra 2. Ao fim dessas etapas, as amostras contendo células em suspensão foram filtradas através de um *cell strainer* (BD biosciences, San Jose, CA, USA) com poros de 70 µm. Por fim, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer e posterior plaqueamento das mesmas em placas de 24 poços com uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço. O procedimento de extração de osteoblastos primários descrito acima foi adaptado a partir de Nanci *et al.* (1996) e de Oliveira *et al.* (2007). Os osteoblastos (Figura 3) foram mantidos em incubadora de CO₂ com temperatura (37°C), umidade (70%) e nível de CO₂ (5%) controlados. O meio alfa-MEM suplementado foi trocado de 2 em 2 dias e, quando as células atingiam uma confluência de 70 a 80%, os experimentos eram iniciados, com as células sendo tratadas com os diferentes biocompósitos (NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY), que foram diluídos no meio de cultura suplementado no início dos experimentos. A incubação das células com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY foi realizada a partir de uma solução estoque dos biocompósitos citados acima, na concentração de 2 mg/mL. A incubação das células com o HY foi realizada a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL, com exceção do experimento de viabilidade celular por MTT, onde a maior concentração da curva dose-resposta do HY foi exatamente 1 mg/mL.

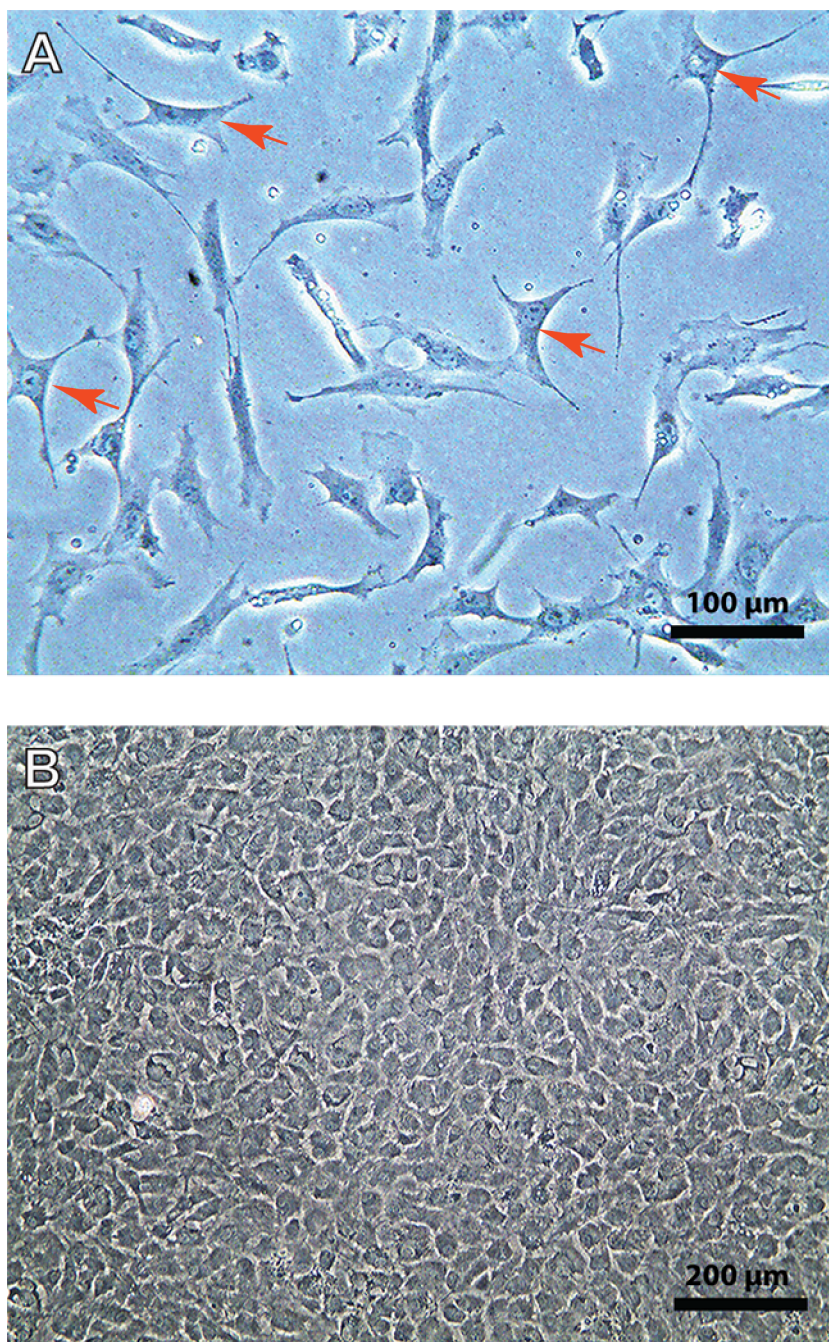


Figura 3: Microscopia óptica de contraste de fase de cultura de osteoblastos primários extraídos a partir de calvárias de ratos neonatos. Em (A), 48 horas após a extração, observa-se a morfologia estrelar dos osteoblastos (destacados pelas setas vermelhas) e seus prolongamentos, que apresentaram-se bem nítidos. Já em (B), quando as células atingiram a confluência total, as mesmas apresentaram uma morfologia mais poliédrica.

5- Análise da viabilidade celular pela técnica de MTT

Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, de converter o substrato [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] (MTT), solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de cristais de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Foram testadas cinco concentrações (10 pg/mL; 1 ng/mL; 100 ng/mL; 10 µg/mL e 1 mg/mL) para cada um dos tratamentos propostos (NTCPS; NTCPS-HY, NTCPM; NTCPM-HY e HY). Após o período de 48 horas de incubação com os diferentes tratamentos, os osteoblastos foram submetidos à lavagem rápida com PBS (1X) e, em seguida, foi adicionado MTT (Sigma-Aldrich) (500 µg/mL) diluído em alfa-MEM com as células sendo mantidas por 4 horas na incubadora de CO₂. Após este período, foi realizada lavagem com PBS (1X) e, na sequência, foi adicionada uma solução de isopropanol/ácido clorídrico para promover a dissolução dos cristais de formazan. Os cristais eluídos passam por agitação e o sobrenadante foi quantificado pela leitura dos valores de absorvância a 595 nm em leitor de ELISA. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Os procedimentos experimentais foram adaptados a partir de Tutak *et al.* (2009).

6- Análise da viabilidade celular por iodeto de propídio

Adicionalmente ao ensaio de MTT, foi realizada a marcação com iodeto de propídio e Hoechst. O iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) é um marcador fluorescente que se liga ao DNA de células não viáveis e o Hoechst 33342 (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) é um fluorocromo permeável capaz de se ligar ao DNA de células viáveis ou não viáveis. Possui um espectro de excitação/emissão de 350/461 nm emitindo fluorescência azul. Após a realização do ensaio de MTT, foi definido que os biocompósitos seriam utilizados na concentração de 100 ng/mL nos demais experimentos. O protocolo descrito em seguida foi adaptado a partir de Thuret *et al.* (2003). Para realizar as marcações, osteoblastos primários foram cultivados em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e incubados com os diferentes tratamentos (NTCPS; NTCPS-HY, NTCPM; NTCPM-HY e HY) por 48 horas. Ao final desse prazo, os marcadores fluorescentes foram

adicionados diretamente no meio de cultura de modo que ficassem com uma concentração final de 1 µg/mL para o hoechst e 250 ng/mL para o iodeto de propídio. O tempo de incubação foi de 15 minutos. Após o fim deste período, o meio foi retirado seguido de uma lavagem rápida com PBS (1X). As lamínulas com as células aderidas foram então retiradas do fundo da placa com uma pinça e montadas em lâminas histológicas polarizadas para documentação do experimento em microscópio de fluorescência (Axio Imager.M2 - Carl Zeiss) usando o *software* Axiovision 4.8 para a obtenção das imagens. O controle positivo do experimento foi realizado no dia da marcação utilizando a digitonina (Amend Drug and Chemicals Co., NY, USA). Diferentemente dos demais grupos, ao fim das 48 horas de incubação, a digitonina (50 µg/mL) foi adicionada no meio por 5 minutos, conforme protocolo previamente descrito por Kuznetsov *et al.* (2008). Ao final deste prazo, o meio com digitonina foi retirado, sendo adicionado 1 mL de meio contendo os marcadores fluorescentes (iodeto de propídeo e hoechst) nas concentrações e tempo já descritos. A aquisição das imagens foi feita imediatamente após a montagem das lâminas. O experimento foi feito em triplicata, sendo obtidas 5 fotos por poço, utilizando-se a objetiva de 20X. O tempo de exposição foi o mesmo para todas as imagens coletadas, sendo que, para cada campo, as imagens foram separadamente adquiridas para iodeto de propídeo e hoechst, usando-se filtros específicos compatíveis com o perfil de excitação-emissão de cada marcador fluorescente. As imagens foram posteriormente analisadas usando o *software* image-J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O *background* das imagens foi subtraído e a dupla marcação com iodeto de propídeo e Hoechst foi definida por colocalização - Image-J plugin (Costes *et al.*, 2004). As células foram definidas como partículas com diâmetro mínimo de 13 µm² para a realização da contagem. O número de osteoblastos duplamente marcados foi normalizado pelo número total de células, marcadas pelo hoechst, sendo os resultados expressos em valores percentuais.

7- Análise de mineralização pela técnica citoquímica de von Kossa

Esta técnica identifica, especificamente, os sítios onde o cálcio se liga e permite, portanto, avaliar o estágio de mineralização da matriz óssea em formação. Para a realização dos experimentos, osteoblastos primários foram cultivados em placas de 24 poços e incubados com os diferentes tratamentos (NTCPS; NTCPS-

HY, NTCPM; NTCPM-HY e HY), todos na concentração de 100 ng/mL, por 7 dias. Após o término desse período, o meio com os tratamentos foi retirado e as células passaram por lavagem rápida com PBS (1X) e posterior fixação com álcool 70% por 24 horas. Ao final do período de fixação, foi realizada lavagem em água corrente por 10 minutos seguida de lavagem rápida com água destilada. Foi adicionado então 1 mL de nitrato de prata a 5% por poço e a placa foi exposta a luz ultravioleta por 1 hora. Passada esta etapa, o nitrato de prata foi removido e as células foram lavadas abundantemente com água destilada. Após a lavagem, foi adicionado em cada poço 1 mL de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos. O tiosulfato de sódio foi removido e as células foram novamente lavadas com água destilada. O protocolo descrito acima foi adaptado a partir de Martins *et al.* (2014). Após a coloração, a placa foi levada ao microscópio invertido onde foram observadas e fotografadas para demonstração da presença de mineralização, indicada pela coloração negra ou marrom. Foram obtidas 10 imagens por poço e, em cada imagem, foi quantificada a área de mineralização, na cor negra, com o auxílio do *software* de análise de imagens Image-Pro Plus. Os resultados foram expressos em valores percentuais.

8- Análise da expressão de mRNA de indicadores do reparo ósseo por PCR em tempo real

Para a realização deste experimento, osteoblastos primários foram cultivados em placas de 24 poços e incubados com os diferentes tratamentos (NTCPS; NTCPS-HY, NTCPM; NTCPM-HY e HY), todos na concentração de 100 ng/mL, em quadruplicata por 3 ou 5 dias. Após o término desses períodos, o meio alfa-MEM com os tratamentos foi retirado e as células passaram por lavagem rápida com PBS (1X), tripsinizadas com uma solução de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) e ressuspensas em meio alfa-MEM suplementado com soro fetal bovino (Gibco) a 10%, gentamicina (100 µg/mL), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (5 µg/mL) e beta glicerofosfato (Sigma-Aldrich) (2,16 mg/mL) para inativação da tripsina. Em seguida, os eppendorfs com as células foram centrifugados a 800 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com PBS (1X). Após uma nova centrifugação a 800 g por 5 minutos, o PBS foi retirado, as células foram suspensas em 500 µL de Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) gelado e agitadas com uma micropipeta, visando a lise das mesmas. Logo após esta etapa, foram

adicionados 100 μ L de clorofórmio e os eppendorfs permaneceram em repouso por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, foram formadas 3 fases. A fase mais inferior é formada por restos celulares e contaminantes, a porção central é composta por DNA e a fase superior contém o RNA total extraído. A porção superior foi então transferida para novos eppendorfs com adição subsequente de 250 μ L de isopropanol gelado para precipitar o RNA, permanecendo em repouso por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4°C. O precipitado formado foi então lavado 2 vezes com álcool 75% gelado, seguido de uma segunda centrifugação a 12000 g por 3 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensionado em água livre de nucleases. A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria. A integridade do RNA foi avaliada com um gel de agarose 1% em Tris/Borato/EDTA por 1h a 70V.

A conversão do mRNA em cDNA (DNA complementar) foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. O kit utilizado foi *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo, Waltham, MA, USA). Primeiramente, 2 μ g de RNA total foram tratados com DNase para que fossem degradadas quaisquer contaminações. Para isso, a enzima permaneceu ativa por 20 minutos a 25°C. A inativação enzimática ocorreu por aumento de temperatura para 65°C por 10 minutos. Em seguida, o *mix* preparado com os reagentes fornecidos pelo kit foram adicionados (tampão 5X, dNTP, Oligo-dT, MuLV transcriptase reversa e RNAout). A ciclagem utilizada no experimento foi de 10 minutos a 25°C para anelamento do oligo-dT, 1 hora a 42°C para a síntese do cDNA e, por fim, 10 minutos 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 15 μ L no total contendo 1 μ L do produto da reação de cDNA, 1X *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo) e 800 nM de cada *primer* (Tabela 2). A ciclagem da PCR foi constituída por 5 minutos de desnaturação a 95°C, 45 ciclos de 1 minuto para anelamento e alongamento a 60°C e 10 segundos 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 cada *primer*, a análise da curva de dissociação foi aplicada a todos os produtos. A quantificação relativa da expressão dos genes alvo foi realizada usando o método

CT comparativo, conforme descrito previamente (Livak and Schmittgen, 2001). Alterações no número de cópias dos genes alvo equivalem a $2^{-\Delta \Delta CT}$.

Tabela 1: Sequência dos primers usados para as análises de qRT-PCR.

BMP-2	<i>Fwd</i>	5'-GGAAAACCTTCCCGACGCTTCT-3'
	<i>Rev</i>	5'-CCTGCATTTGTTCCCGAAAA-3'
BMP-4	<i>Fwd</i>	5'-TTATGAGGTTATGAAGCCCCCA-3'
	<i>Rev</i>	5'-GCTCACATCGAAAGTTTCCCAC-3'
OCN	<i>Fwd</i>	5'-CTGCATTCTGCCTCTCTGACCT-3'
	<i>Rev</i>	5'-GCCGGAGTCTATTCACCACCTT-3'
Colágeno tipo I	<i>Fwd</i>	5'-TTGACCCTAACCAAGGATGC-3'
	<i>Rev</i>	5'-CACCCCTTCTGCGTTGTATT-3'
Colágeno tipo III	<i>Fwd</i>	5'-AGAGGATGGCTGCACTAAACA-3'
	<i>Rev</i>	5'-TTGGTCACTTTCCTGGTTGAC-3'
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	<i>Fwd</i>	5'-GTATTGGGCGCCTGGTCACC-3'
	<i>Rev</i>	5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3'

Fwd: forward; Rev: reverse.

9- Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. Previamente à realização dos testes estatísticos, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, que demonstrou uma distribuição normal dos dados. Na sequência, foram utilizados os testes One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls ou Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

V. RESULTADOS

1- A caracterização comprovou a boa qualidade estrutural dos biocompósitos e a funcionalização não covalente entre os NTC de paredes simples ou múltiplas e o hialuronato de sódio

A MET dos NTCPS demonstrou, em menor aumento (Figura 4A), vários feixes de NTCPS, formando redes tridimensionais. Em maior aumento, observou-se a sobreposição de feixes de NTCPS, sendo que o mais central deles foi destacado pelas setas pretas (Figura 4B). Nesse feixe um dos tubos foi destacado, onde podemos ver um único plano de átomos de carbono compondo sua parede, caracterizando-o como NTCPS (Figura 4B). As imagens dos NTCPM demonstraram, em menor aumento (Figura 4C), tubos mais individualizados e com a parede bem mais espessa quando comparado aos NTCPS. Em detalhe, pode-se observar a luz dos tubos (Figura 4C). Em maior aumento (Figura 4D), podemos observar sobreposição dos tubos, sendo que as paredes de um deles encontram-se destacadas pelas setas pretas. Nota-se o enrolamento de vários planos de átomos de carbono dispostos concentricamente, caracterizando-os morfologicamente e estruturalmente como NTCPM (Figura 4D). Nenhuma alteração morfológica ou estrutural importante foi detectada.

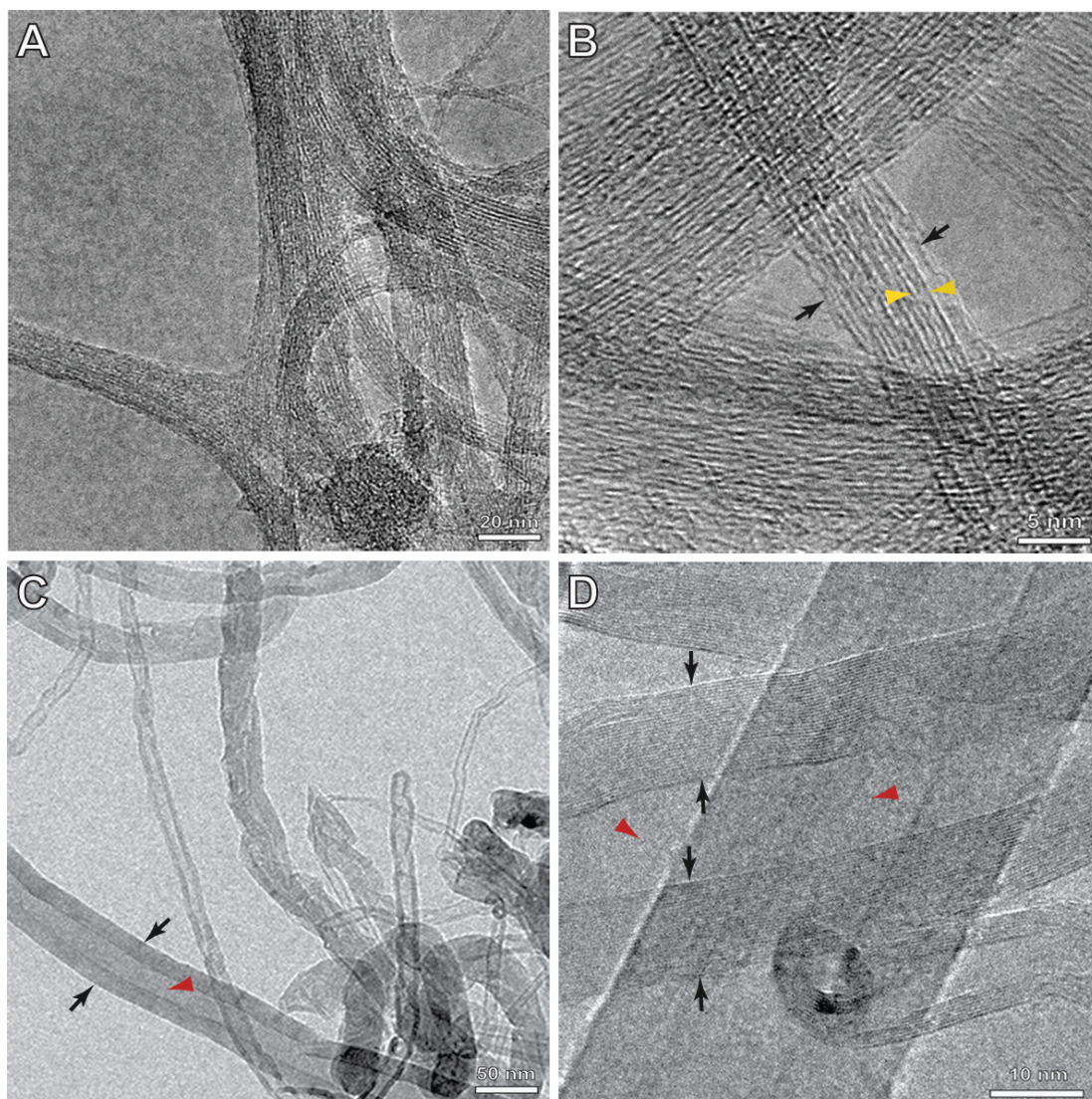


Figura 4: MET dos NTCPS e NTCPM. Os NTCPS, em menor aumento (A), estão dispostos em feixes formando redes tridimensionais. Em maior aumento (B), um feixe de NTCPS está delimitado em seu diâmetro horizontal pelas setas pretas e as cabeças de seta amarelas delimitam um tubo, sendo possível perceber apenas uma parede, o que o caracteriza como NTCPS. Em (C), observa-se, em menor aumento, um NTCPM destacado em seu diâmetro horizontal pelas setas pretas e a cabeça de seta vermelha mostra a luz do tubo. Em maior aumento (D), as setas pretas delimitam a parede de um NTCPM, onde podem ser visualizados vários planos de átomos de carbono dispostos concentricamente ao redor da luz do tubo, novamente destacado pelas cabeças de seta vermelhas. Observa-se ainda outro NTCPM passando abaixo do tubo destacado em (D).

Em relação à análise com espectroscopia Raman, considerando os espectros dos NTCPS e NTCPS-HY, a baixa intensidade relativa da banda D comparada com a banda G indicou que havia baixa quantidade de carbono amorfo e poucos defeitos estruturais nos NTCPS (Figura 5A). Além disso, o modo de respiração radial (RBM) em ambos os espectros demonstrou a presença de picos com espectro de baixa

energia (183 cm^{-1}), que são característicos dos NTCPS (Figura 5A). Em conjunto, estes resultados indicam que os NTCPS obtidos pelo método de descarga em arco apresentavam paredes simples. Já os espectros dos NTCPM e NTCPM-HY (Figura 5B) apresentaram as bandas D e G com intensidade semelhante, o que pode representar maior quantidade de defeitos na estrutura dos tubos. Esse resultado pode estar associado ao processo de carboxilação dos NTC, uma vez que a adição de grupos carboxílicos danifica a estrutura dos tubos, e à técnica usada para a síntese dos NTCPM (deposição de vapor químico). Contudo, esse resultado não comprometeu a utilização dos NTCPM ou NTCPM-HY para os experimentos de cultura celular. A ausência de maiores diferenças entre os espectros de NTCPS e NTCPS-HY ou NTCPM e NTCPM-HY indica que a interação entre os NTC e o HY foi não covalente (Figuras 5 A, 5B).

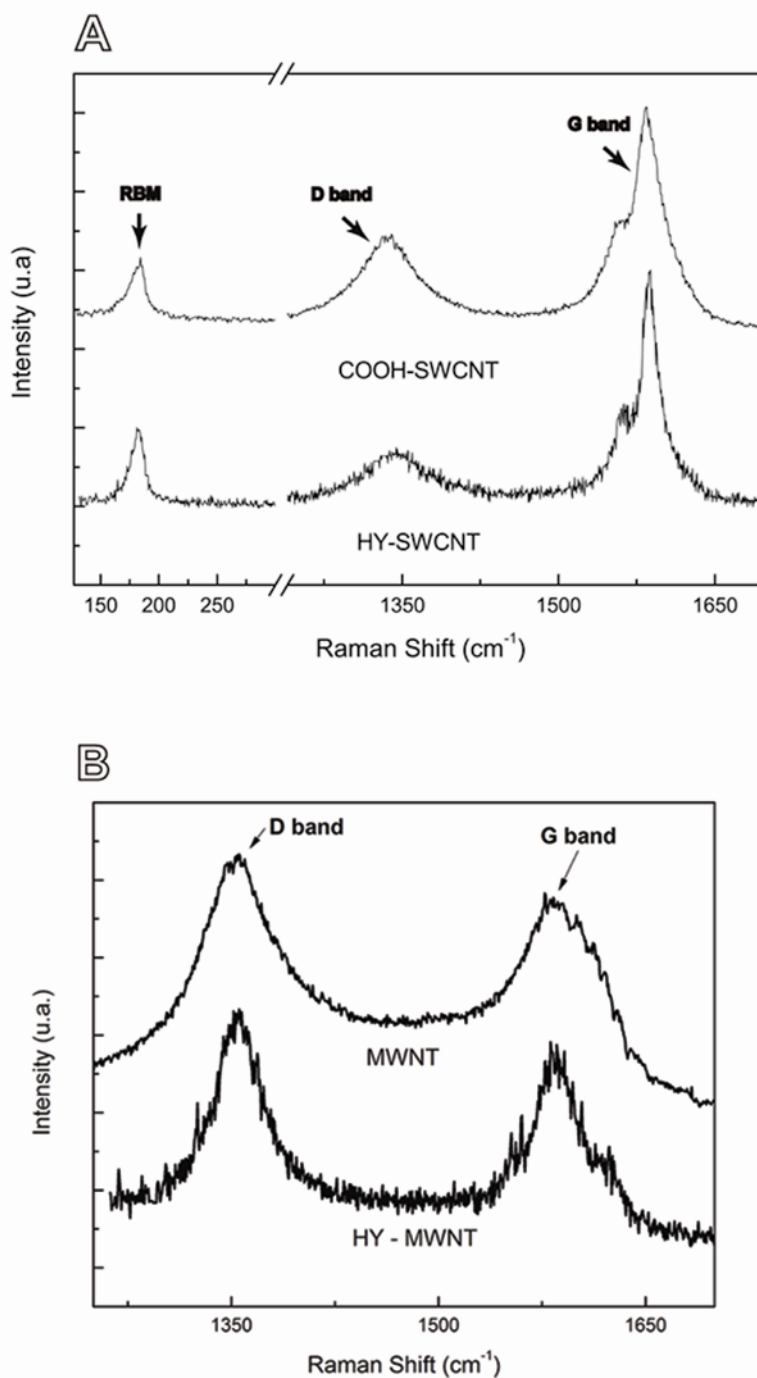


Figura 5: Espectroscopia Raman dos NTC e dos NTC-HY. Espectros dos NTCPS e NTCPS-HY apresentaram o RBM, o que caracteriza este tipo de NTC, e as bandas D e G, sendo a banda G mais intensa que a D (A). Portanto, o espectro indica que os NTCPS e NTCPS-HY possuem baixa quantidade de carbono amorfo e defeitos estruturais. Já nos espectros dos NTCPM e NTCPM-HY (B) observou-se que as bandas D e G possuíam intensidade semelhante, um indicativo de que essas amostras continham maior quantidade de defeitos estruturais.

Através da termogravimetria foi possível demonstrar a quantidade de HY que estava imobilizada nos NTC de paredes simples e múltiplas. Primeiramente,

realizou-se a decomposição térmica do HY. Esta análise demonstrou uma primeira perda de massa, em uma temperatura média de 44,53°C, que estava relacionada a queima de água que compõe o gel. A perda de massa que representa a queima do HY chegou a 61% e ocorreu em uma temperatura média de 220,58°C (Figura 6A). A decomposição térmica dos NTCPS-HY pode ser observada na Figura 6B. A primeira perda de massa começou acima dos 131°C e terminou próxima de 280°C. Essa perda de 13,18% aconteceu a uma temperatura média de 204,76°C e representa a massa de HY estabilizada nos NTCPS. A segunda queda de massa ocorreu em uma temperatura média de 374,66°C e corresponde a queima dos NTCPS. Cada variação de perda de massa corresponde a um tipo de degradação e na curva rosa do gráfico podemos observar outros pontos onde ocorrem perdas de massa, que podem representar impurezas. Essas impurezas podem ser resquícios de cobalto ou níquel ou metais pesados usados como catalisadores no processo de síntese dos NTCPS.

Na análise termogravimétrica da amostra de NTCPM-HY podemos perceber duas quedas bem evidentes no percentual de massa, sem outros pontos de perda, o que demonstra que essa amostra não apresentava impurezas (Figura 6C). Como os NTC são mais resistentes ao aumento de temperatura, a primeira queda de massa corresponde a queima do HY. A perda de 34,92% de HY começou aos 173°C e terminou aos 339°C. Para os NTCPM a perda de massa teve início aos 340°C e terminou aos 525°C. Em conjunto, esses dados demonstram o sucesso da funcionalização dos NTCPS e dos NTCPM com o HY e que os NTCPM podem estabilizar quase o triplo de HY em sua estrutura quando comparado aos NTCPS, o que já era esperado, tendo em vista a maior complexidade estrutural dos NTCPM, compostos por várias folhas de grafite enroladas concêntricamente.

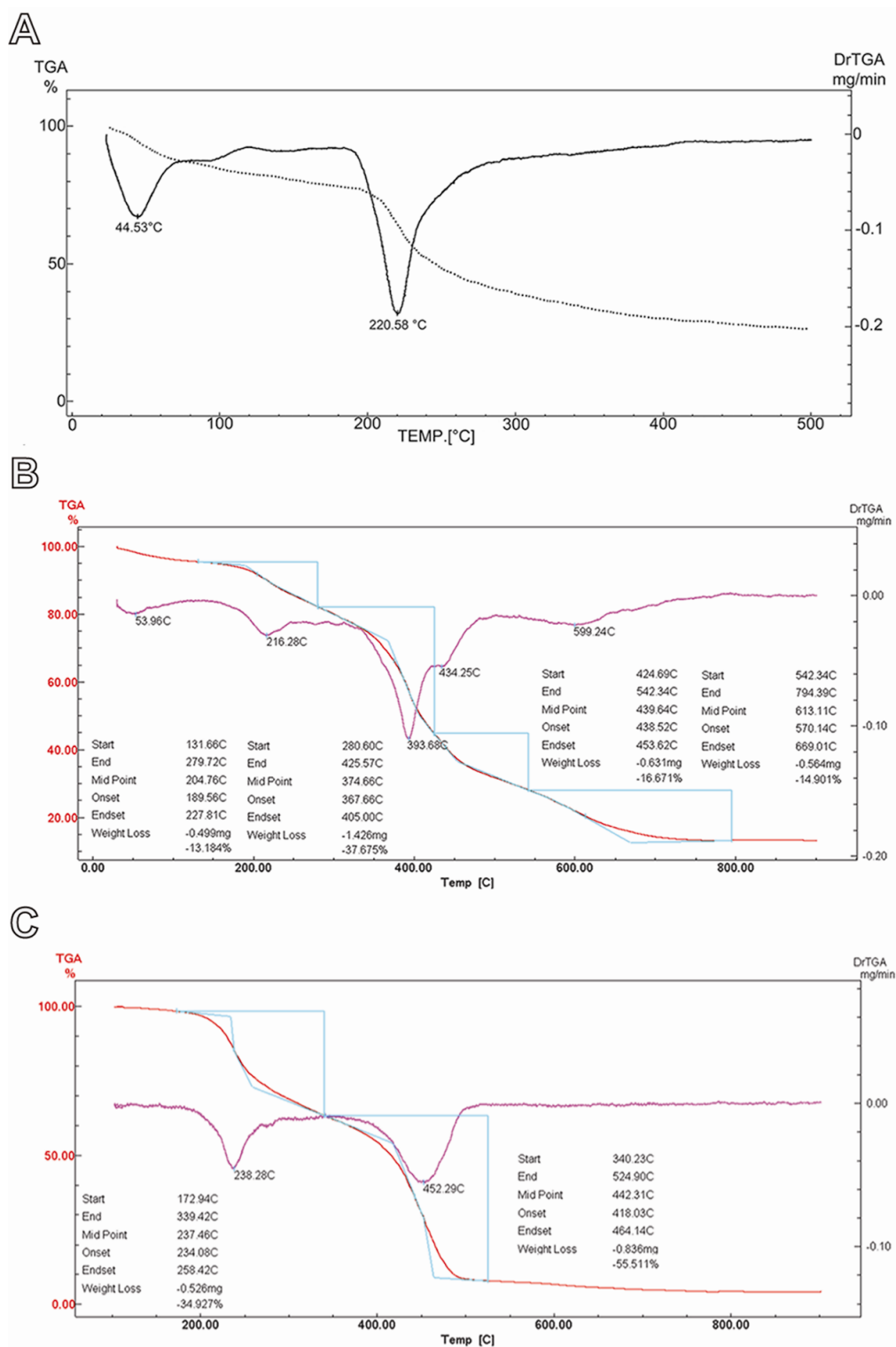


Figura 6: Análises termogravimétricas de amostras do HY, NTCPs-HY e NTCPM-HY. Em (A), duas perdas de massa foram observadas, com destaque para a segunda, de 61%, que corresponde à queima do HY. Em (B), quatro pontos de perda de massa foram visualizados, com destaque para a segunda e a terceira perdas de massa, que estão relacionadas, respectivamente, às queimas do HY e dos NTCPs. Em (C), os dois pontos de perda de massa relativos à queima do HY e dos NTCPM estão bem evidentes, não sendo observados sinais de impurezas na amostra.

2- Ensaio de viabilidade por MTT demonstrou que os tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY não alteram a viabilidade celular de osteoblastos primários

Foi realizado o ensaio de MTT para avaliar o efeito dos tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY na viabilidade dos osteoblastos após 48 horas de exposição. Para cada um dos tratamentos foram testadas cinco concentrações (10 pg/mL; 1 ng/mL; 100 ng/mL; 10 µg/mL e 1mg/mL).

Osteoblastos primários expostos à baixas concentrações (10 pg/mL; 1 ng/mL; 100 ng/mL; 10 µg/mL) de NTCPS (Figura 7A), NTCPS-HY (Figura 7B), NTCPM (Figura 7C), NTCPM-HY (Figura 7D) e HY (Figura 7E) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos valores de absorvância quando comparados a seus respectivos grupos controle. Esses resultados demonstraram que os biocompósitos propostos acima, em baixas concentrações, não interferem na viabilidade celular.

Os tratamentos com os biocompósitos NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY em alta concentração (1mg/mL) (Figura 7A-D) não alteraram de maneira significativa a viabilidade de osteoblastos primários em relação aos respectivos grupos controle e aos tratamentos em baixas concentrações. A exceção ocorreu quando foi avaliado o efeito do HY (Figura 7E) em alta concentração na viabilidade de osteoblastos após 48 horas. Foi observada significativa redução da viabilidade celular ($0,05 \pm 0,004$) de osteoblastos primários tratados com HY (1mg/mL) quando comparados com o grupo controle ($0,57 \pm 0,03$) e com as demais concentrações de HY (HY 10 pg/mL: $0,56 \pm 0,01$; HY 1 ng/mL: $0,57 \pm 0,04$; HY 100 ng/mL: $0,6 \pm 0,06$ e HY 10 µg/mL: $0,52 \pm 0,03$) (Figura 7E). Em conjunto, esses resultados demonstraram que a avaliação da viabilidade celular por MTT, em situações onde as células foram tratadas com NTC em altas concentrações, pode fornecer falsos resultados negativos. Diante disso, selecionamos uma concentração intermediária entre as cinco testadas (100 ng/mL) para avaliar a viabilidade celular através de outra técnica, bem como para os demais experimentos descritos abaixo.

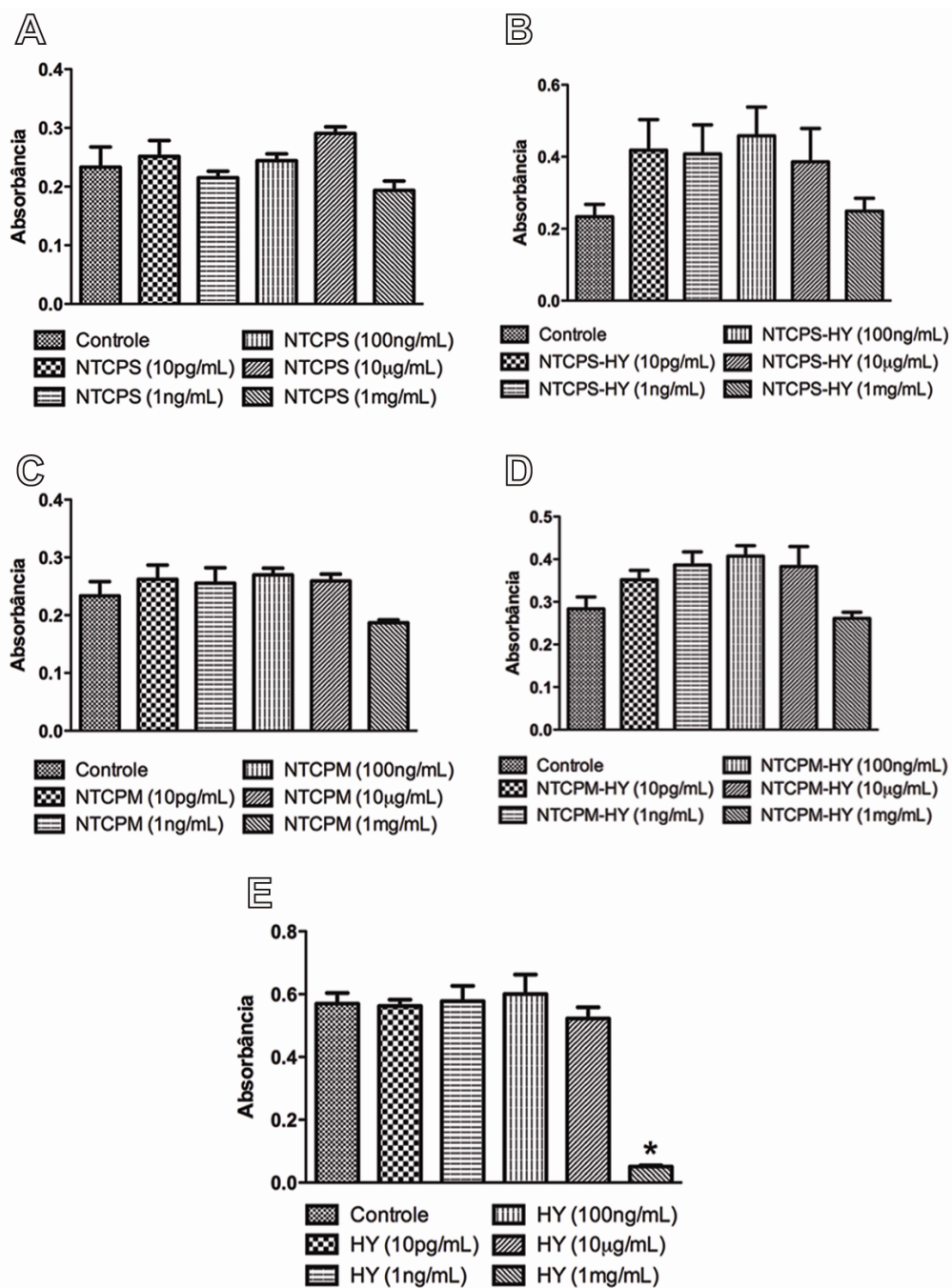
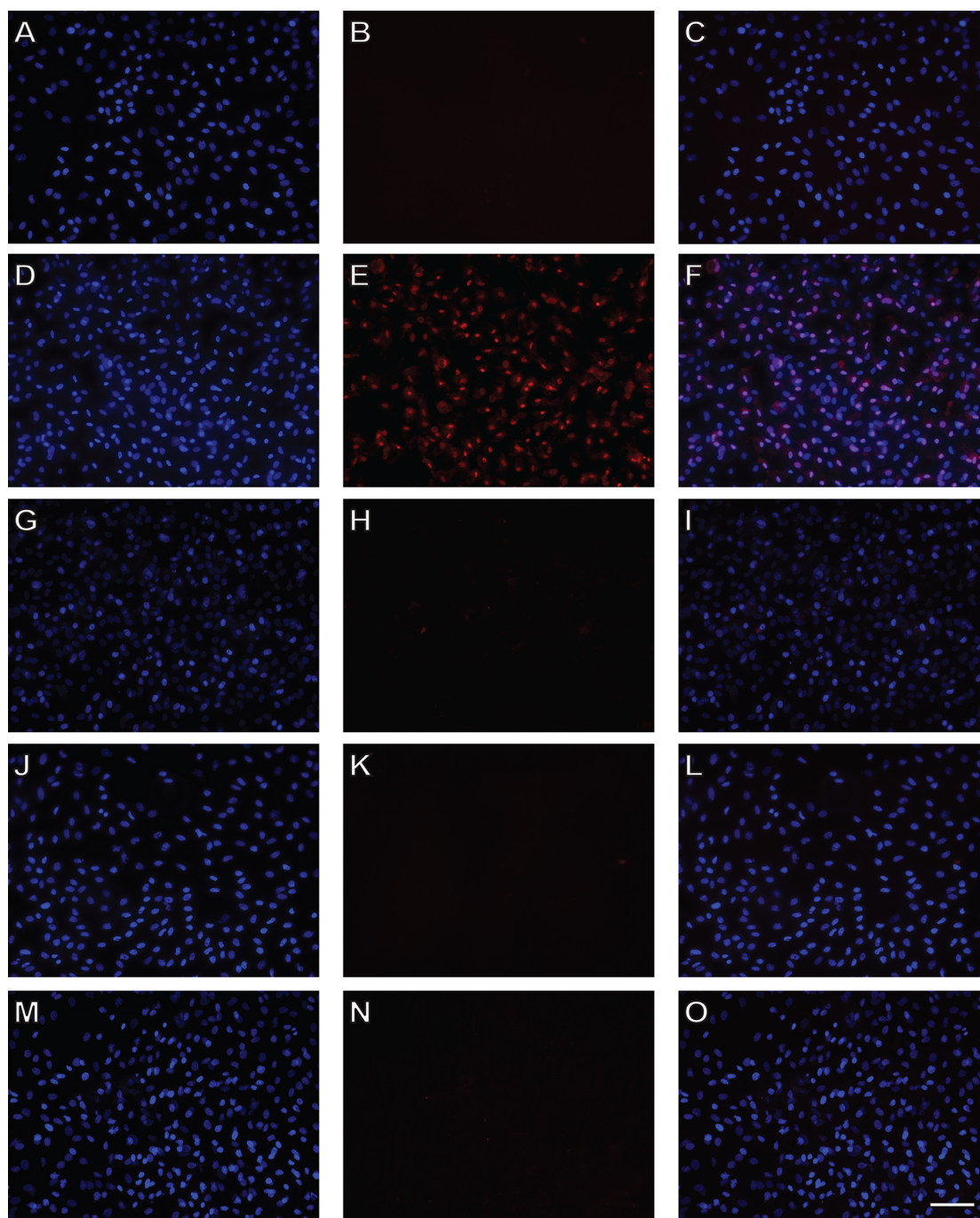


Figura 7: Ensaio de MTT. Demonstrou-se neste ensaio que os tratamentos com NTCPS (A), NTCPS-HY (B), NTCPM (C), NTCPM-HY (D) e HY (E) não alteram a viabilidade celular em baixas concentrações. Todos os tratamentos na concentração de 1mg/mL causaram morte celular, com destaque para o HY, que apresentou significativa redução da viabilidade em relação aos demais grupos. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls $*p < 0,05$ vs. controle e demais concentrações do HY (10 pg/mL; 1 ng/mL; 100 ng/mL e 10 µg/mL).

3- Ensaio de viabilidade por iodeto de propídio confirmou resultados do ensaio de MTT e demonstrou que os tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY não alteram a viabilidade celular de osteoblastos primários

Este experimento foi realizado para confirmar os resultados do MTT. As imagens do grupo controle (Figura 8A-C) mostraram que as células estavam viáveis. O grupo tratado com digitonina (Figura 8D-F), que foi o controle positivo do experimento, demonstra a eficácia da dupla marcação com iodeto de propídeo/Hoechst, onde mais da metade das células apresentaram marcação positiva para o iodeto de propídeo (Figura 8E) e, conseqüentemente, colocalização nuclear dos marcadores (Figura 8F), indicando que as células estavam inviáveis. Os tratamentos com HY (Figura 8G-I), NTCPS (Figura 8J-L), NTCPS-HY (Figura 8M-O), NTCPM (Figura 8P-R) e NTCPM-HY (Figura 8S-U) apresentaram poucas células colocalizadas, não havendo diferença em relação ao grupo controle, o que indica que a viabilidade celular dos osteoblastos não é afetada por nenhum dos biocompósitos testados.

A análise morfométrica das imagens comprova o que foi observado nas imagens. O grupo controle teve um percentual de morte celular de $0,2 \pm 0,14\%$ (Figura 8V). No grupo controle positivo do experimento, tratado com digitonina, houve morte de $60 \pm 2,96\%$, valor significativamente maior em relação ao grupo controle (Figura 8V). Os grupos tratados com HY ($0,27 \pm 0,15\%$), NTCPS ($0 \pm 0\%$), NTCPS-HY ($1,6 \pm 1,19\%$), NTCPM ($0,93 \pm 0,36\%$) e NTCPM-HY ($0,93 \pm 0,4\%$) apresentaram baixo número de células inviáveis, não havendo nenhuma diferença entre esses grupos e o grupo controle (Figura 8V). Os dados desse experimento, em conjunto, confirmam os resultados apresentados no ensaio de MTT, demonstrando que os diferentes tratamentos, na concentração de 100 ng/mL, não comprometem a viabilidade de osteoblastos primários.



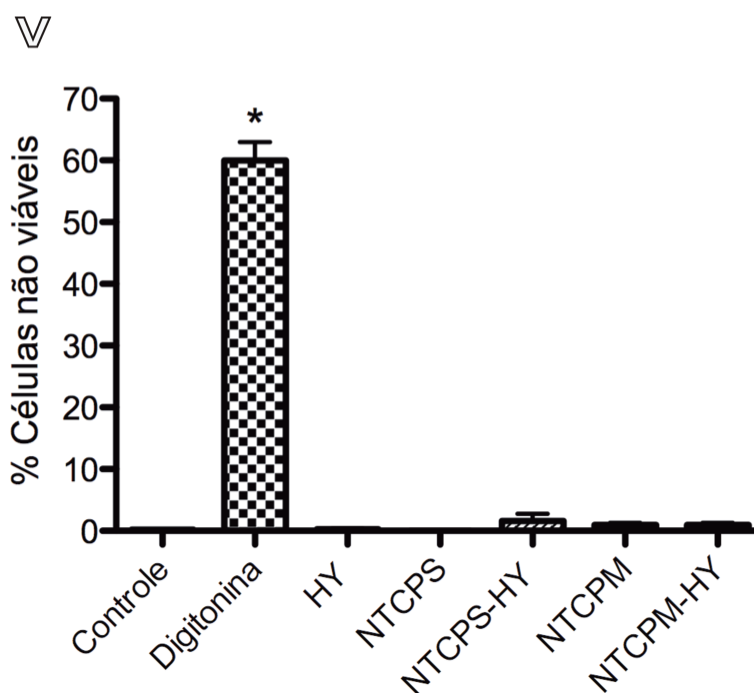
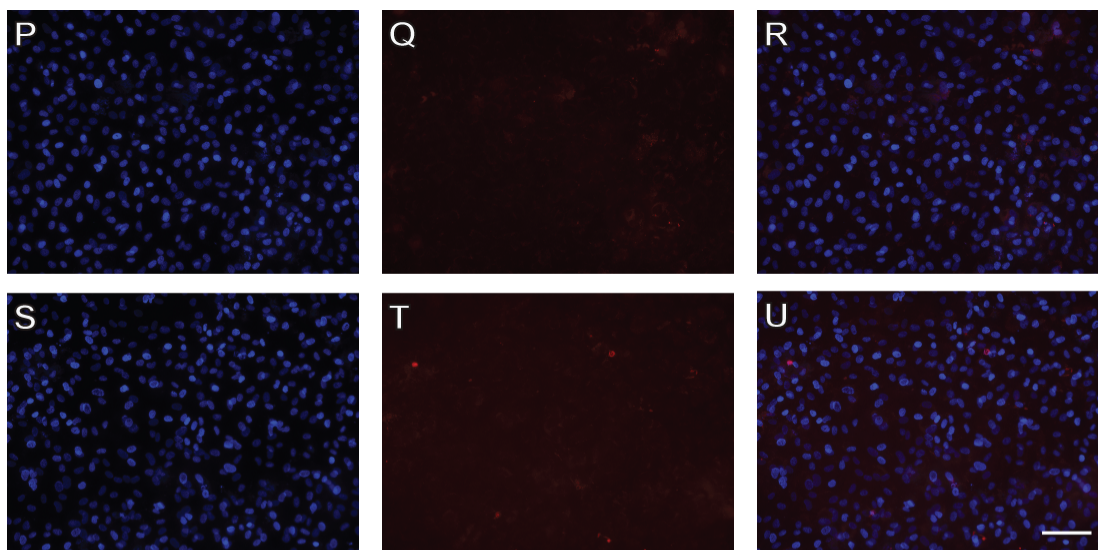


Figura 8: Ensaio de viabilidade por iodeto de propídio. A coluna de imagens da esquerda apresenta o número total de células marcadas pelo Hoechst, a coluna do meio apresenta as células com marcação positiva para o iodeto de propídio e a coluna da direita apresenta a sobreposição das imagens. No grupo controle (A-C) não é evidenciado células duplamente marcadas. O controle positivo (D-F), tratado com digitonina, mostrou um grande número de células duplamente marcadas, indicando a eficácia da marcação testada. Os tratamentos com HY (G-I), NTCPS (J-L), NTCPS-HY (M-O), NTCPM (P-R) e NTCPM-HY (S-U) não comprometeram a viabilidade celular, o que foi confirmado pela análise morfométrica das imagens (V). One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls $*p < 0,05$ vs. controle, HY, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY. Barra = 100 μm .

4- A coloração de von Kossa demonstrou que os tratamentos com NTCPs, NTCPs-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY estimulam o aumento da formação de nódulos mineralizados

Fotomicrografias de culturas de osteoblastos primários tratadas com NTCPs ou NTCPs-HY (Figura 9C, D) mostraram que ambos os tratamentos foram capazes de aumentar a área de mineralização em relação ao grupo controle (Figura 9A), mas principalmente nas células tratadas com NTCPs-HY podem ser visualizados nódulos maiores e mais organizados. A morfometria (Figura 9G) comprova as análises microscópicas, mas demonstra que apenas o tratamento com NTCPs-HY foi capaz de aumentar significativamente a área de mineralização em relação ao grupo controle (NTCPs-HY: $16,8 \pm 4,1\%$ vs controle: $4,2 \pm 1,5\%$).

A análise microscópica de osteoblastos tratados com NTCPM ou NTCPM-HY (Figura 9E, F) mostra resultados similares àqueles observados quando as células foram tratadas com NTCPs-HY, onde ambos os tratamentos aumentaram consideravelmente a deposição de matriz mineralizada, também sendo observados nódulos maiores e mais organizados quando comparados ao grupo controle (Figura 8A). A análise morfométrica (Figura 9G) mostra que tanto os NTCPM ($15,94 \pm 3,24$) quanto os NTCPM-HY ($14,9 \pm 2,78$) aumentaram significativamente a área de mineralização quando comparados ao grupo controle ($4,88 \pm 2,17$). Assim como os demais tratamentos descritos acima, o HY também foi capaz de aumentar de maneira significativa a área de mineralização (Figura 9B) em relação ao grupo controle (Figura 9A), o que foi confirmado pela análise morfométrica (HY: $15,93 \pm 0,33$ vs controle: $4,88 \pm 2,17$) (Figura 9G). Esses resultados demonstraram a capacidade dos biocompósitos de estimular osteoblastos de cultura primária a acelerar o processo de deposição e maturação da matriz óssea.

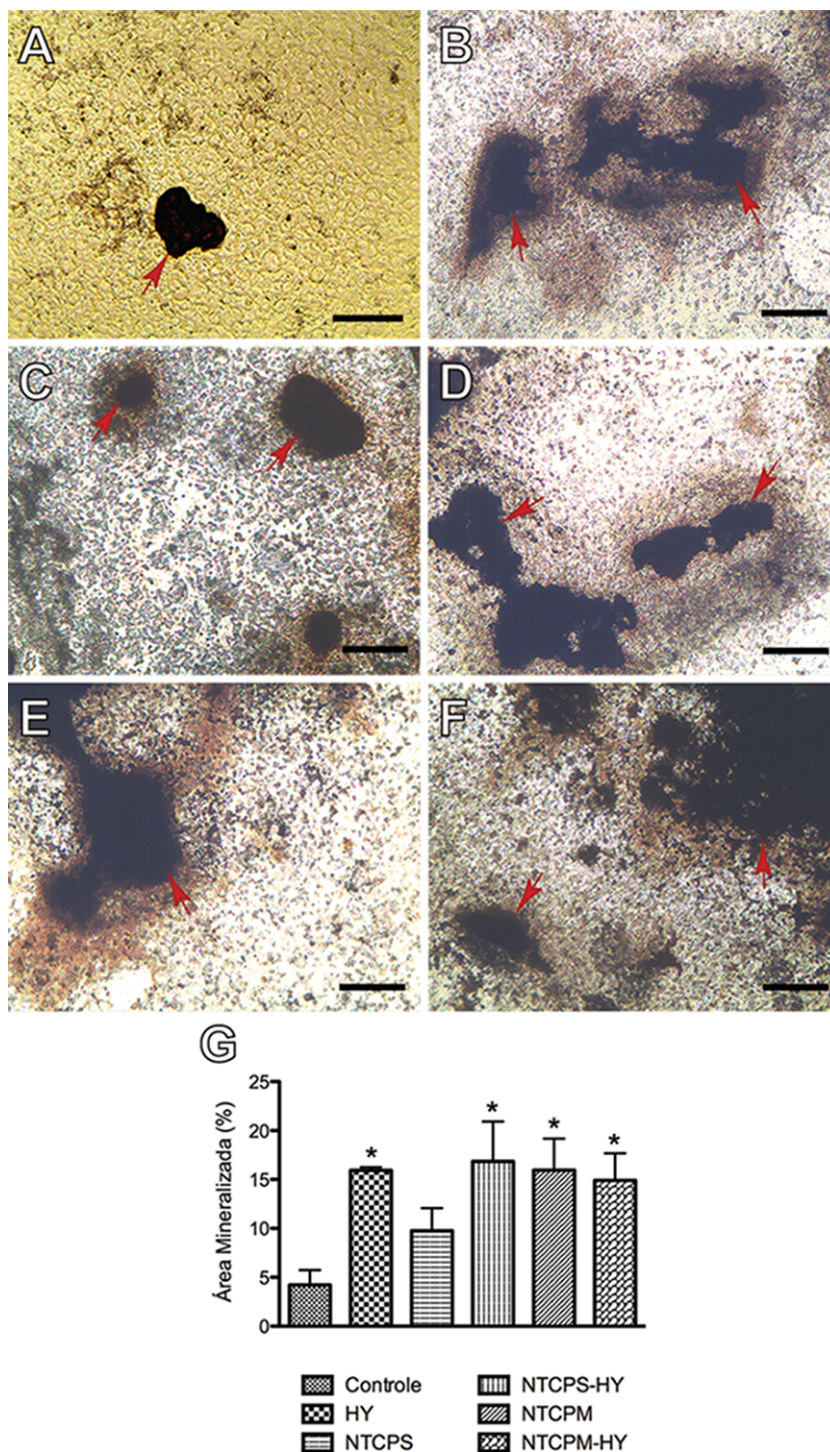


Figura 9: Coloração de von Kossa para análise das áreas de matriz mineralizada. As imagens demonstram que o HY (B), NTCPs (C), NTCPs-HY (D), NTCPM (E) e NTCPM-HY (F) aumentam a deposição de nódulos mineralizados, indicados pelas setas vermelhas, quando comparado com o controle (A). A análise morfométrica confirmou que todos os biocompósitos, exceto os NTCPs, aumentam significativamente a deposição de nódulos mineralizados quando comparado ao grupo controle. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls $*p < 0,05$ vs. controle. Barra = 100 μ m.

5- A PCR em tempo real demonstrou que os tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY estimularam osteoblastos primários a aumentarem a expressão de mRNA de proteínas importantes para o processo de formação óssea

O PCR em tempo real demonstrou que os tratamentos com NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY estimulam osteoblastos primários a aumentar a expressão de mRNA de proteínas envolvidas na formação óssea. Foram avaliadas a expressão de mRNA dos colágenos I e III, OCN, BMP-2 e BMP-4, proteínas envolvidas na formação e mineralização da matriz óssea após 3 e 5 dias de tratamento com os biocompósitos.

Os NTCPS e os NTCPS-HY foram capazes de aumentar significativamente a expressão do colágeno I após 3 dias de tratamento, com destaque para os NTCPS-HY que causaram um aumento significativo inclusive em relação aos NTCPS (Figura 10A). Após 5 dias de tratamento, a expressão de colágeno I nos grupos tratados com NTCPS ou NTCPS-HY retornou aos níveis basais, atingindo valores inferiores aos apresentados pelo grupo controle (Figura 10A). De maneira semelhante, a expressão do colágeno III foi significativamente maior após 3 dias de tratamento com NTCPS ou NTCPS-HY, com destaque para os NTCPS (Figura 10B). Após 5 dias de tratamento, a expressão de colágeno III retornou aos níveis basais nos grupos tratados, sendo que, no grupo tratado com NTCPS, essa redução foi significativamente maior em relação ao grupo controle (Figura 10B). A expressão de OCN foi significativamente maior apenas no grupo tratado com NTCPS após 3 dias de tratamento (Figura 10C). Após 5 dias de tratamento, a expressão de OCN aumentou significativamente nos poços tratados com NTCPS-HY, ao contrário do grupo tratado com NTCPS, onde a expressão de OCN voltou aos valores basais (Figura 10C). Já a expressão de BMP-2 (Figura 10D) e BMP-4 (Figura 10E) foi significativamente maior após 3 dias de tratamento com NTCPS ou NTCPS-HY, sendo que, após 5 dias, a expressão desses marcadores continuou maior nos grupos tratados, com destaque, em ambos os tempos, para o aumento observado no grupo tratado com NTCPS (Figura 10D, E).

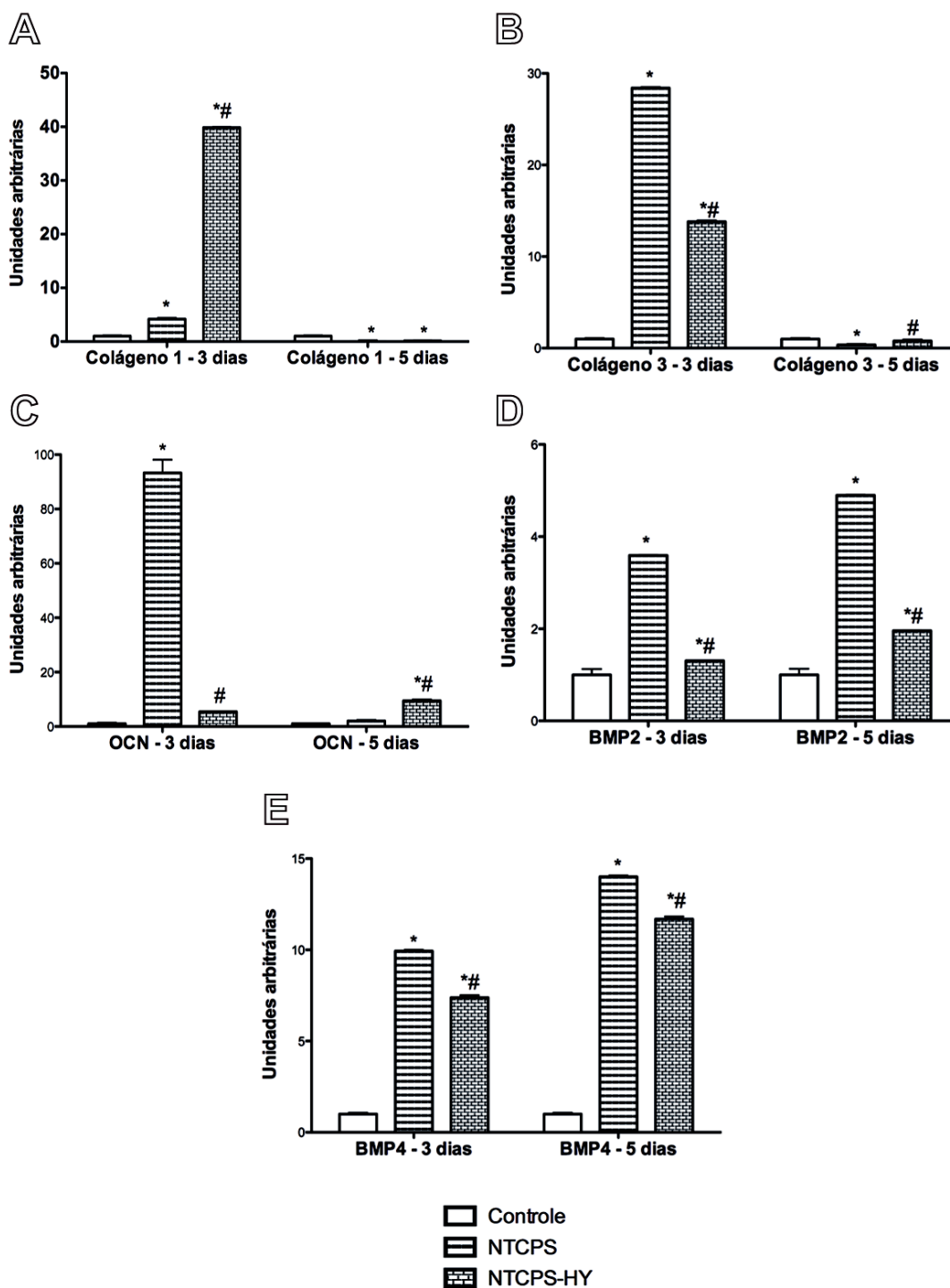


Figura 10: PCR em tempo real. Expressão de mRNA dos colágenos tipo I (A) e III (B), OCN (C), BMP-2 (D) e BMP-4 (E) após tratamento com NTCPS ou NTCPS-HY. De um modo geral, observa-se que os tratamentos com NTCPS ou NTCPS-HY aumentaram significativamente a expressão dos marcadores após 3 dias com retorno aos valores basais no quinto dia de tratamento, exceto para o BMP-2 e BMP-4, onde a expressão dos marcadores continuava maior. Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni * $p < 0,05$ vs. controle # $p < 0,05$ vs. NTCPS.

Os NTCPM e os NTCPM-HY também foram capazes de aumentar significativamente a expressão do colágeno I após 3 dias de tratamento, com grande destaque para o NTCPM, que apresentou aumento significativo inclusive em relação aos NTCPM-HY (Figura 11A). Após 5 dias de tratamento, a expressão de colágeno I nos grupos tratados com NTCPM ou NTCPM-HY retornou aos níveis basais, atingindo valores significativamente inferiores aos apresentados pelo grupo controle (Figura 11A). Da mesma forma, a expressão do colágeno III foi significativamente maior após 3 dias de tratamento com NTCPM ou NTCPM-HY, com destaque para os NTCPM (Figura 11B). Após 5 dias de tratamento, a expressão de colágeno III retornou aos níveis basais nos grupos tratados, sendo que, no grupo tratado com NTCPM, essa redução foi significativamente maior em relação ao grupo controle (Figura 11B). A expressão de OCN foi significativamente maior apenas no grupo tratado com NTCPM após 3 dias de tratamento (Figura 11C). Após 5 dias de tratamento, a expressão de OCN nos poços tratados com NTCPM caiu de maneira expressiva, mas se manteve estatisticamente maior em relação ao grupo controle (Figura 11C). De maneira inversa, o grupo tratado com NTCPM-HY, que não havia induzido aumento na expressão de OCN após 3 dias de tratamento, apresentou, após 5 dias de incubação, um significativo aumento quando comparado ao controle ou ao grupo tratado com NTCPM (Figura 11C). A expressão de BMP-2 (Figura 11D) foi significativamente maior após 3 dias de tratamento com NTCPM ou NTCPM-HY, sendo que, após 5 dias, a expressão desses marcadores continuou aumentada nos grupos tratados, com destaque, em ambos os tempos, para o aumento observado no grupo tratado com NTCPM (Figura 11D). Os tratamentos com NTCPM ou NTCPM-HY não alteraram a expressão de BMP-4 após 3 dias de tratamento, sendo que, após 5 dias de incubação, apenas os NTCPM foram capazes de aumentar significativamente a expressão deste marcador quando comparado ao grupo controle (Figura 11E).

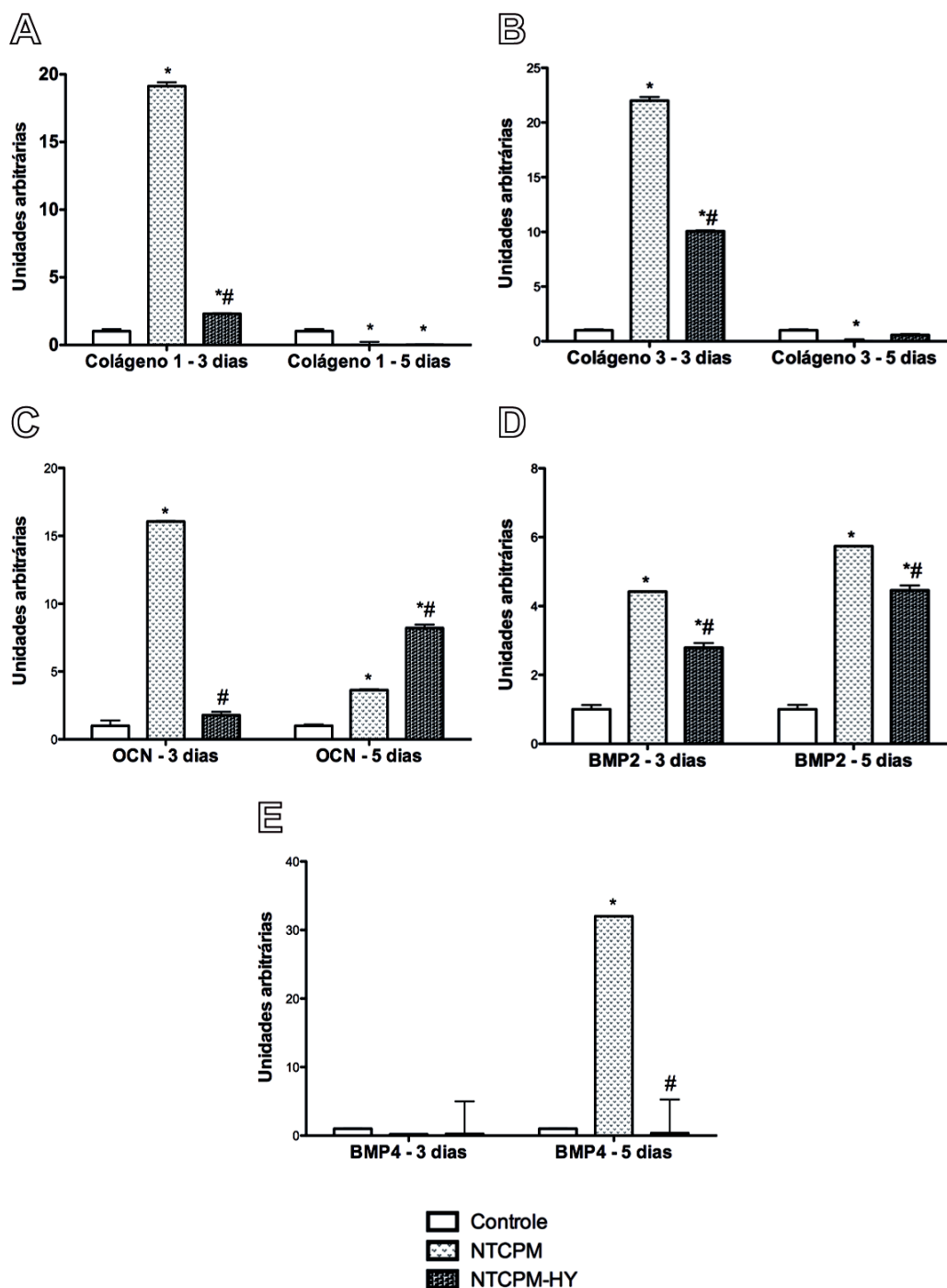


Figura 11: PCR em tempo real. Expressão de mRNA dos colágenos tipo I (A) e III (B), OCN (C), BMP-2 (D) e BMP-4 (E) após tratamento com NTCPM ou NTCPM-HY. Para os colágenos I e III, observa-se que os tratamentos com NTCPM ou NTCPM-HY aumentaram significativamente a expressão desses colágenos após 3 dias, com retorno aos valores basais no quinto dia de tratamento. O tratamento com NTCPM aumentou a expressão de OCN após 3 dias de exposição com posterior redução desses valores no quinto dia. Já os NTCPM-HY aumentaram significativamente a expressão de OCN após cinco dias de tratamento. A expressão do BMP-2 aumentou em ambos os grupos tratados após 3 e 5 dias de tratamento, ao passo que a expressão do BMP-4 só foi aumentada após 5 dias no grupo tratado com NTCPM. Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni * $p < 0,05$ vs. controle # $p < 0,05$ vs. NTCPM.

Com relação aos colágenos I e III, observou-se um significativo aumento na expressão desses marcadores no grupo tratado com HY após 3 dias de tratamento, com retorno aos valores basais no quinto dia (Figuras 12 A, 12 B). Com relação à expressão de colágeno III após 5 dias de incubação, o grupo tratado com HY manteve um valor significativamente maior em relação ao controle, apesar da significativa queda na expressão quando comparado ao valor observado após 3 dias (Figura 12B). O padrão de expressão da OCN foi semelhante ao dos colágenos, onde após 3 dias de tratamento com HY a expressão de OCN apresentou-se significativamente maior em relação ao controle, com retorno aos valores basais após cinco dias de tratamento (Figura 12C).

A expressão de BMP-2 apresentou-se significativamente maior no grupo tratado com HY em relação ao grupo controle após 3 dias de tratamento, não havendo nenhuma diferença após 5 dias (Figura 12D). Já a expressão do BMP-4 apresentou um padrão inverso, uma vez que, após 3 dias de tratamento, a expressão deste marcador no grupo tratado com HY foi significativamente menor em relação ao controle, havendo uma inversão deste padrão após 5 dias de incubação, com valores significativamente maiores no grupo tratado (Figura 12E).

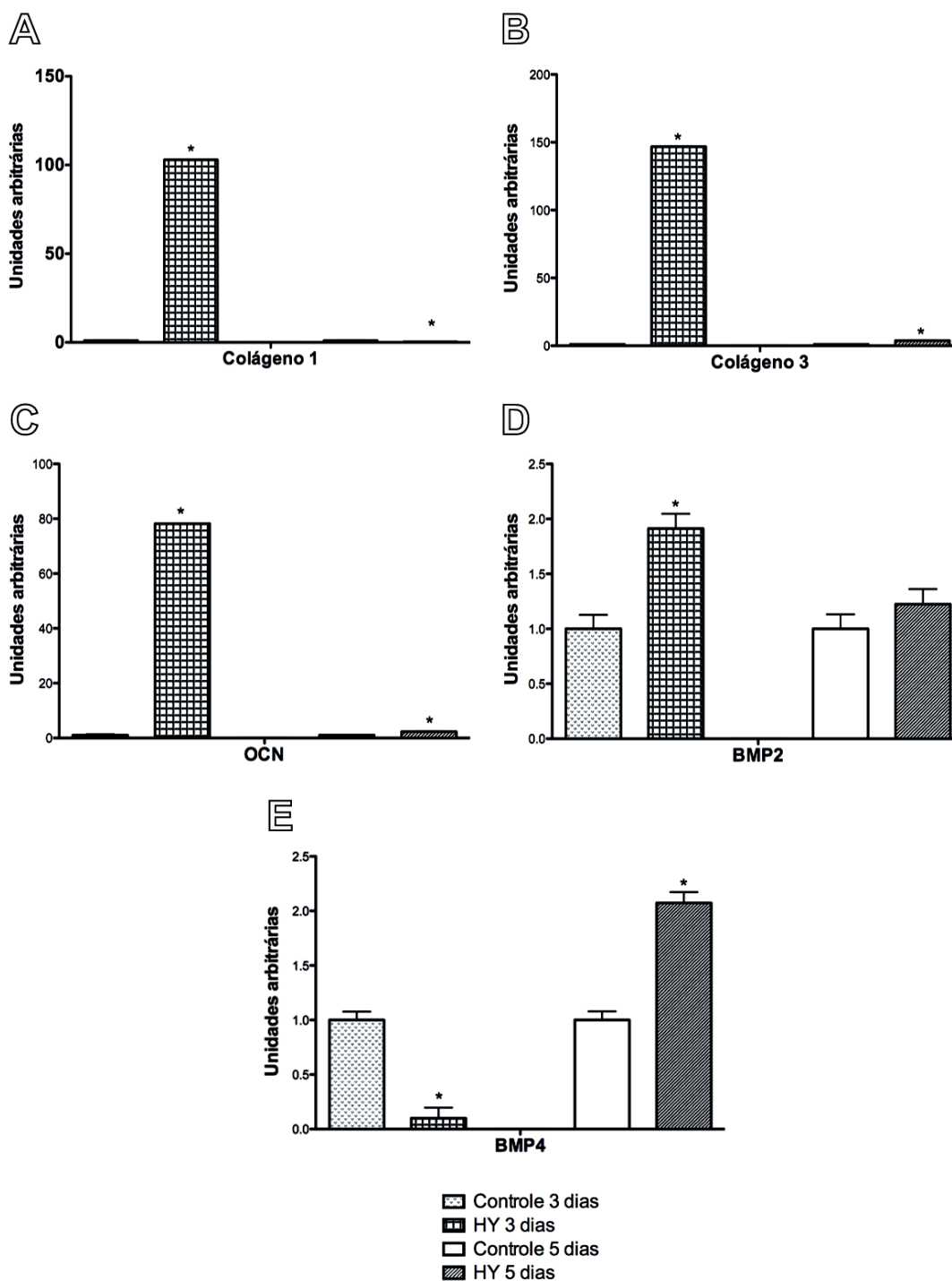


Figura 12: PCR em tempo real. Expressão de mRNA dos colágenos tipo I (A) e III (B), OCN (C), BMP-2 (D) e BMP-4 (E) após tratamento com HY. Para os colágenos I e III, observa-se que o tratamento com HY aumentou significativamente a expressão desses colágenos após 3 dias, com retorno aos valores basais no quinto dia de tratamento. O HY também aumentou a expressão de OCN após 3 dias de exposição com posterior redução desses valores no quinto dia. A expressão do BMP-2 também aumentou no grupo tratado com HY após 3 dias de tratamento. De maneira inversa, a expressão do BMP-4 foi reduzida no grupo tratado com HY após 3 dias, aumentando significativamente em relação ao controle após 5 dias de incubação. Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni $*p < 0,05$ vs. controle.

VI. DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que o HY e os NTCPS-HY são capazes de acelerar o reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos saudáveis e diabéticos (Mendes *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2013). Contudo, os mecanismos que induzem tais efeitos permanecem desconhecidos. Dessa forma, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar os efeitos do HY, dos NTC e dos NTC-HY no comportamento de osteoblastos primários.

Culturas de osteoblastos são amplamente utilizadas em estudos de engenharia tecidual óssea devido à grande importância dessa célula na síntese e mineralização da matriz óssea (Halvorsen *et al.*, 2001; Rawadi *et al.*, 2003; Venugopal *et al.*, 2008; Tonelli *et al.*, 2012). Portanto, observar o comportamento dessa linhagem celular em contato com os biocompósitos usados no presente estudo representa um grande avanço na tentativa de entender os mecanismos subjacentes aos efeitos já descritos na literatura.

Previamente a aplicação de qualquer nanomaterial em modelos *in vivo* ou *in vitro*, é extremamente importante caracterizá-los, objetivando estabelecer sua morfologia, integridade estrutural ou confirmar determinada associação entre nanomateriais e polímeros sintéticos ou naturais (Silva *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2010; Khalid *et al.*, 2015). Os NTCPS apresentaram sua parede composta pelo enrolamento de apenas um plano de átomos de carbono, formando um cilindro. Já os NTCPM apresentaram vários cilindros dispostos concêntricamente em torno de um região central que forma a luz do tubo. Ajayan (1999) demonstrou, através de imagens de MET de alta resolução, que os NTCPS podem ser encontrados dispostos em feixes ou isoladamente, com diâmetro de aproximadamente 1,2 nm. Trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório comprovam esses achados e demonstram NTCPS em feixes ou isoladamente com diâmetro de aproximadamente 1,25 nm (Mendes *et al.*, 2010). Ajayan (1999) e Maurin *et al.* (2001) apresentaram imagens de MET semelhantes as do presente trabalho, ilustrando os NTCPM em plano sagital e transversal com vários cilindros de carbono dispostos concêntricamente com diâmetro variando entre 15 a 25 nm e espaço de 0,34 nm entre os tubos que compõem sua parede. Em resumo, os resultados de MET demonstraram que os NTCPS e NTCPM apresentaram morfologia característica desses materiais sem a presença de defeitos estruturais importantes.

Para avaliar mais especificamente a qualidade dos NTCPS e NTCPM associados ou não ao HY, utilizamos a espectroscopia Raman, pois ela pode identificar subprodutos de carbono (carbono amorfo, grafite) e avaliar a possível presença de defeitos na estrutura dos tubos. Os espectros para NTCPS e NTCPS-HY demonstraram a presença do RBM e uma baixa razão de intensidade entre as bandas D e G. Estudo prévio (Mendes *et al.*, 2010), que também utilizou a espectroscopia Raman para caracterizar os NTCPS e NTCPS-HY, corroboram nossos achados, uma vez que os autores detectaram nos espectros dessas amostras o RBM associado a tubos de pequeno diâmetro (1-1,3 nm) e baixa razão de intensidade entre as bandas D e G, indicativos de que os nanotubos são de paredes simples e possuem boa qualidade estrutural. A análise dos NTCPM e NTCPM-HY revelaram ausência de picos de baixa frequência e intensidade semelhante entre as bandas D e G. Esses dados podem indicar uma maior razão de intensidade entre as bandas D e G e, portanto, maior quantidade de defeitos nessas amostras. Outros trabalhos também descreveram espectros Raman semelhantes aos observados no presente estudo (Maurin *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2006; Bokobza and Zhang, 2012), com bandas D e G exibindo intensidade semelhante. Contudo, apesar da influência de fatores como método e temperatura de síntese, além do processo de funcionalização dos NTC que aumentam o número de defeitos dos tubos, a análise do espectro Raman depende muito do número de paredes do tubo analisado e de qual região dessa amostra que está sendo sondada pelo laser, uma vez que maior concentração de defeitos ocorrem nas extremidades dessas estruturas (Antunes *et al.*, 2006). Essa hipótese é comprovada por Feng *et al.* (2008), que caracterizaram nanotubos de poucas paredes e observaram baixa razão de intensidade entre as bandas D e G, além de espectros de baixa frequência que geralmente caracterizam os NTCPS. Outro dado importante foi a ausência de maiores diferenças entre os espectros dos NTCPS e NTCPM quando comparados com as amostras associadas ao HY. Esse dado confirma uma associação não covalente entre os NTCPS ou NTCPM com HY e são corroborados por Mendes *et al.* (2010) que também não observaram alterações nos espectros Raman de NTCPS quando comparados aos NTCPS-HY.

A análise por termogravimetria foi utilizada para confirmar a funcionalização dos NTCPS ou NTCPM com o HY. Mais do que isso, essa técnica consegue determinar a quantidade de HY estabilizada nos NTCPS ou NTCPM. Os resultados

do presente trabalho demonstraram que a decomposição do HY ocorre a uma temperatura média de 221°C. Esse resultado corrobora os achados de Cui *et al*, (2014) que observaram a decomposição do HY a aproximadamente 224°C. As amostras de NTCPS-HY e NTCPM-HY apresentaram perda de massa em temperatura próxima a essa, sugerindo que o HY estava estabilizado nos NTCPS ou NTCPM.

A viabilidade celular foi investigada utilizando-se, inicialmente, a técnica de MTT. Esse ensaio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais de células viáveis de reduzir o MTT formando cristais de formazan. Os resultados do presente estudo mostraram que os NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY em baixas concentrações não comprometem a viabilidade celular de osteoblastos primários após 48 horas de incubação. Altas concentrações desses biocompósitos (1 mg/mL) reduziram a viabilidade celular causando a morte de células após 48 horas quando observado ao microscópio. Contudo, a leitura dos valores de absorbância dos poços tratados com NTC, funcionalizados ou não com o HY, na concentração de 1 mg/mL, demonstrou valores semelhantes ao do grupo controle, sugerindo um falso resultado negativo. Alguns autores investigaram vários testes de viabilidade e sugeriram que NTCPS podem interagir com o MTT impedindo a dissolução dos cristais de formazan (Wörle-Knirsch *et al.*, 2006; Monteiro-Riviere *et al.*, 2009). Qi *et al.* (2011) também destacaram a possibilidade de falsos resultados negativos ao se utilizar a técnica de MTT para avaliar a viabilidade celular em modelos que utilizam arcabouços porosos devido à forte capacidade de absorção de corantes desses materiais. Hipotetizamos que esse falso negativo tenha ocorrido devido à alta concentração dos NTC (1 mg/mL), uma vez que, ao final de 48 horas, apenas aglomerados de NTC eram visíveis nos poços tratados com essa concentração, não existindo células viáveis. Dessa forma, optou-se pela realização de outro ensaio de viabilidade celular, utilizando baixa concentração dos biocompósitos (100 ng/mL), para confirmar a ausência de toxicidade em culturas de osteoblastos primários.

A técnica de dupla marcação com iodeto de propídio e Hoechst foi utilizada para confirmar os resultados obtidos com o MTT. De fato, os biocompósitos testados (NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY), na concentração de 100 ng/mL, não comprometeram a viabilidade celular conforme demonstrado pelo ensaio de MTT. Pan *et al*, (2012) avaliou um compósito de policaprolactona e NTCPM e, para

investigar a viabilidade de células tronco mesenquimais sobre esse compósito, utilizou MTT e o ensaio live/dead, o qual é similar à dupla marcação utilizada no presente estudo, e não encontraram alterações na viabilidade celular, corroborando os nossos resultados.

O estágio de mineralização da matriz sintetizada pelos osteoblastos foi investigado neste trabalho através da técnica de von Kossa, que avalia especificamente regiões de deposição de cálcio. Os resultados mostraram que todos os biocompósitos (NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY), com exceção dos NTCPS, foram capazes de induzir significativo aumento da área de matriz óssea mineralizada após 7 dias de incubação. Esses resultados confirmam estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa em modelos *in vivo*, que demonstraram uma aceleração do processo de neoformação óssea em alvéolos dentários 7 dias após o tratamento dessa região com HY ou NTCPS-HY (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* utilizando os NTC isolados ou associados a outros polímeros também revelaram resultados promissores (Nayak *et al.*, 2010; Hirata *et al.*, 2011; Shimizu *et al.*, 2012). Células tronco mesenquimais humanas, cultivadas em meio osteogênico sobre filmes finos de polietilenoglicol associados com NTCPM, foram capazes de acelerar significativamente a deposição de cálcio investigada pela técnica de vermelho de alizarina (Nayak *et al.*, 2010). Hirata *et al.* (2011) cultivaram osteoblastos primários sobre um compósito de colágeno coberto com NTCPM e também observaram significativo aumento na deposição de cálcio após 7 dias de cultura. Em ensaio semelhante àquele realizado no presente estudo, Shimizu *et al.* (2012) avaliaram os efeitos dos NTCPM diluídos em meio de cultura osteogênico no comportamento de osteoblastos primários e observaram significativo aumento na deposição de cálcio após 21 e 42 dias de incubação com os tratamentos. O HY isoladamente também foi capaz de estimular culturas de osteoblastos primários a aumentar significativamente a área de matriz mineralizada (Huang *et al.*, 2003). Dessa forma, o próximo passo no nosso trabalho foi investigar se proteínas envolvidas no processo de formação óssea estariam contribuindo para estimular osteoblastos primários a aumentar da deposição de matriz mineralizada.

Assim, avaliamos a expressão gênica dos colágenos I e III, OCN, BPM-2 e BMP-4. De maneira geral, todos os biocompósitos testados foram capazes de aumentar mais precocemente (após 3 dias de incubação) a expressão gênica das proteínas testadas, em especial NTCPS, NTCPM e HY. Após 5 dias de incubação

com os biocompósitos, houve uma tendência de queda da expressão gênica dos colágenos I e III e as proteínas OCN, BMP-2 e BMP-4 mantiveram sua expressão aumentada. Esses dados sugerem que os tratamentos propostos provocaram uma estimulação precoce da expressão gênica das proteínas testadas. Outros trabalhos anteriores demonstraram a capacidade dos NTC ou do HY, associados ou não com outros polímeros, de estimular o aumento da expressão gênica de proteínas envolvidas na formação da matriz óssea (Huang *et al.*, 2003; Nayak *et al.*, 2010; Hirata *et al.*, 2011; Shimizu *et al.*, 2012). Huang *et al.* (2003) observaram significativo aumento na expressão gênica de OCN em culturas de osteoblastos primários tratadas com HY. Outro estudo investigou os efeitos dos NTCPM no comportamento de osteoblastos primários e observaram significativo aumento na expressão gênica de OCN após 5 dias (Shimizu *et al.*, 2012), resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho onde a expressão de OCN em culturas de osteoblastos tratadas com NTCPM ou NTCPM-HY também apresentaram significativo aumento após 5 dias de incubação.

Em resumo, nossos resultados mostram que os biocompósitos testados (NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY) em baixas concentrações não reduzem a viabilidade celular de osteoblastos primários e estimulam o aumento da expressão gênica de proteínas envolvidas na síntese e mineralização da matriz óssea. Além disso, observou-se que todos os biocompósitos avaliados, com exceção dos NTCPS, induziram significativo aumento da área de nódulos mineralizados corados pela técnica citoquímica de von Kossa. Esses dados fornecem avanços para o entendimento do efeito desses biocompósitos no processo de formação e reparo ósseo. Contudo, novos estudos devem ser realizados no sentido de compreender melhor o exato mecanismo pelo qual ocorre a interação das células com os NTC, HY ou NTC-HY.

VII. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que os NTCPS ou NTCPM possuem boa qualidade estrutural e a associação deles com o HY foi não covalente. Além disso, NTCPS, NTCPS-HY, NTCPM, NTCPM-HY e HY não comprometeram a viabilidade de culturas de osteoblastos primários e estimularam essas células a aumentar a deposição de nódulos mineralizados, o que pode ser parcialmente explicado pelo fato de os biocompósitos terem induzido o aumento da expressão gênica de proteínas envolvidas na síntese e mineralização da matriz óssea. Esses achados reforçam a hipótese de que esses biocompósitos podem ser potencialmente úteis para o desenvolvimento de novas estratégias em engenharia tecidual óssea.

X. REFERÊNCIAS

Abarrategi A, Gutiérrez MC, Moreno-Vicente C, Hortigüela MJ, Ramos V, López-Lacomba JL, et al. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials* 2008;29:94-102.

Ágren UM, Tammi RH, Tammi MI. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic Biol Med* 1997;23:996-1001.

Ajayan PM. Nanotubes from Carbon. *Chem Rev* 1999;99:1787-1799.

Annabi B, Thibeault S, Moumdjian R, Béliveau R. Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem* 2004;279:21888-21896.

Antunes EF, Lobo AO, Corat EJ, Trava-Airoldi VJ, Martin AA, Veríssimo C. Comparative study of first- and second-order Raman spectra of MWCNT at visible and infrared laser excitation. *Carbon* 2006;44:2202-2211.

Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132:592-597.

Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl* 2006;20: 209-219.

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

Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, et al. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 2002;23:4503-4513.

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

Boccaccini AR, Cho J, Roether JA, Thomas BJC, Minay EJ, Shaffer MSP. Electrophoretic deposition of carbon nanotubes - review. *Carbon* 2006;44: 3149-3160.

Bokobza L, Zhang J. Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites. *Express Polymer Letters* 2012;6:601-608.

Bourguignon LYW, Singleton PA, Zhu H, Zhou B. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor β receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem* 2002;277:39703-39712.

Cheng Q, Rutledge K, Jabbarzadeh E. Carbon Nanotube-Poly(lactide-co-glycolide) Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications. *Ann Biomed Eng* 2013;41:904-916.

Chłopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* 2006;44:1106-1111.

Colnot C, Romero DM, Huang S, Helms JA. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:69-78.

Correa-Duarte MA, Wagner N, Rojas-Chapana J, Morscizek C, Thie M, Giersig M. Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Lett* 2004;4: 2233-2236.

Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J* 2004;86:3993-4003.

Cui N, Qian J, Zhao N, Wang H. Functional hyaluronic acid hydrogels prepared by a novel method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014;45:573-577.

David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent J-C, Bogdanowicz P, Boumediene K, et al. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen* 2008;16:274-287.

Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen* 2006;14:252-258.

de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of *in vitro* osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80: 554-564.

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

Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Eklund PC. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. Academic Press, San Diego, 1996

Feng Y, Zhang H, Hou Y, McNicholas TP, Yuan D, Yang S, et al. Room Temperature Purification of Few-Walled Carbon Nanotubes with High Yield. *ACS Nano* 2008;2:1634-1638.

Fraser JE, Laurent TC, Laurent UG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997;242:27-33.

Galvan-Garcia P, Keefer EW, Yang F, Zhang M, Fang S, Zakhidov AA, Baughman RH, Romero MI. Robust cell migration and neuronal growth on pristine carbon nanotube sheets and yarns. *J Biomater Sci* 2007;18:1245-1261.

Gerdin B, Hällgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med* 1997;242:49-55.

Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005;280:8875-8883.

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

Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff[®]-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials* 2001;22: 2417-2424.

Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 2009;5:17-26.

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2001;7:729-741.

Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, et al. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor. *J Cell Biol* 1992;117:1343-1350.

Hirata E, Uo M, Takita H, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A. Multiwalled carbon nanotube-coating of 3D collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Carbon* 2011; 49: 3284-3291.

Hopley EL, Salmasi S, Kalaskar DM, Seifalian AM. Carbon nanotubes leading the way forward in new generation 3D tissue engineering. *Biotechnol Adv* 2014;S0734-9750(14)00091-3. [Epub ahead of print]

Hu H, Ni Y, Montana V, Haddon RC, Parpura V. Chemically Functionalized Carbon Nanotubes as Substrates for Neuronal Growth. *Nano Lett* 2004;4:507-511.

Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JCY, et al. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in a rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A* 2003;66:880-884.

Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991;354:56–58.

Itoh S, Matubara M, Kawauchi T, Nakamura H, Yukitake S, Ichinose S, et al. Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:575-581.

Jorio A, Pimenta MA, Souza AG, Saito R., Dresselhaus G, Dresselhaus M S. Characterizing carbon nanotube samples with resonance Raman scattering. *New Journal of Physics*, 5, 139, 2003.

Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J Intern Med* 1997;242:61-66.

Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001;65:456-462.

Kappler J, Hegener O, Baader SL, Franken S, Gieselmann V, Häberlein H, et al. Transport of a hyaluronan-binding protein in brain tissue. *Matrix Biol* 2009;28:396-405.

Khalid P, Hussain MA, Rekha PD, Arun AB. Carbon nanotube-reinforced hydroxyapatite composite and their interaction with human osteoblast in vitro. *Hum Exp Toxicol* 2015;34:548-556.

Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965-976.

Lee HJ, Yoon OJ, Kim DH, Jang YM, Kim HW, Lee WB, et al. Neurite Outgrowth on Nanocomposite Scaffolds Synthesized from PLGA and Carboxylated Carbon Nanotubes. *Adv Eng Mater* 2009;11:B261-B266.

Lesley J, Gál I, Mahoney DJ, Cordell MR, Rugg MS, Hyman R, et al. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J Biol Chem* 2004;279:25745-25754.

Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem* 2000;275:26967-26975.

Linker A, Meyer K, Weissmann B. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. *J Biol Chem* 1955;213:237-248.

Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Toneguzzi S, Facchini A. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. *Biomaterials* 2002;23:1043-1051.

Liu L, Thompson AY, Heidarman MA, Poser JW, Spiro RC. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 1999;20:1097-1108.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.

MacDonald RA, Laurenzi BF, Viswanathan G, Ajayan PM, Stegemann JP. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:489-496.

Mann S, Weiner S. Biomineralization: structural questions at all length scales. *J Struct Biol* 1999;126:179-181.

Martins TMM, de Paula ACC, Gomes DA, Goes AM. Alkaline phosphatase expression/activity and multilineage differentiation potential are the differences

between fibroblasts and orbital fat-derived stem cells – A study in animal serum-free culture conditions. *Stem Cell Rev* 2014;10:697-711.

Matsumoto K, Sato C, Naka Y, Kitazawa A, Whitby RLD, Shimizu N. Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes. *J Biosci Bioeng* 2007;103:216-220.

Mattioli-Belmonte M, Vozzi G, Whulanza Y, Seggiani M, Fantauzzi V, Orsini G, et al. Tuning polycaprolactone–carbon nanotube composites for bone tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2012 32:152-159.

Maurin G, Stepanek I, Bernier P, Colomer JF, Nagy JB, Henn F. Segmented and opened multi-walled carbon nanotubes. *Carbon* 2001;39:1273-1278.

Mendes RM, Silva GA, Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sci* 2010;87:215-222.

Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Caliari MV, Almeida AP, Alves JB, Ferreira AJ. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol* 2008;53:1155-1162.

Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Zhang LW. Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;234: 222-235.

Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 1934;107:629-634.

Moseley R, Leaver M, Walker M, Waddington RJ, Parsons D, Chen WYJ, et al. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF[®]-11p75, AQUACEL[®] and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. *Biomaterials* 2002;23:2255-2264.

Murphy H, Papakonstantinou P, Okpalugo TIT. Raman study of multiwalled carbon nanotubes functionalized with oxygen groups. *J Vac Sci Technol B* 2006;24:715-720.

Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 1996;33:214-231.

Nayak TR, Jian L, Phua LC, Ho HK, Ren Y, Pastorin G. Thin Films of Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes as Suitable Scaffold Materials for Stem Cells Proliferation and Bone Formation. *ACS Nano* 2010;4:7717-7725.

Nedvetzki S, Gonen E, Assayag N, Reich R, Willians RO, Thurmond RL, et al. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18081-18086.

Pan L, Pei X, He R, Wan Q, Wang J. Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;93:226-234.

Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C, et al. Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. *J Anat* 2008;213:520-530.

Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* 2008;453:322-329.

Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. *Cell Tissue Res* 1998;294:323-333.

Price RL, Haberstroh KM, Webster TJ. Improved osteoblast viability in the presence of smaller nanometer dimensioned carbon fibres. *Nanotechnology* 2004;15:892-900.

Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BCM Musculoskelet Disord* 2004;5:12.

Qi R, Shen M, Cao X, Guo R, Tian X, Yu J, et al. Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials. *Analyst* 2011;136:2897-2903.

Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003;18:1842-1853.

Reilly RM. Carbon Nanotubes: Potential Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine. *J Nucl Med* 2007;48:1039-1042.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111.

Rosa, C. S. Estudo do ácido hialurônico proveniente da crista de frango: extração, purificação, caracterização e atividade antioxidante. 2008. 106p. Tese de doutorado (Centro de Ciências Agrárias) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

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* 2009;28:390-395.

Sá MA, Andrade VB, Mendes RM, Caliari MV, Ladeira LO, Silva EE, et al. Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral Dis* 2013;19:484-493.

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

Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, Delisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:36770-36778.

Shi X, Sitharaman B, Pham QP, Liang F, Wu K, Edward Billups W, et al. Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2007 28:4078-4090.

Shimizu M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Nakamura H, Kawahara I, Narita N, et al. Carbon nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. *Adv Mater* 2012;24:2176-2185.

Silva EE, Colleta HD, Ferlauto AS, Moreira RL, Resende RR, Oliveira S, et al. Nanostructured 3-d collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds. *Nano Res* 2009;2:462-473.

Sitharaman B, Shi X, Walboomers XF, Liao H, Cuijpers V, Wilson LJ, et al. In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone* 2008;43:362-370.

Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem* 2002;277:41046-41059.

Smart SK, Cassady AI, Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* 2006;44:1034-1047.

Stout DA, Webster TJ. Carbon nanotubes for stem cell control. *Materials Today* 2012;15:312-318.

Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem* 2003;278:32259-32265.

Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, et al. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *J Biol Chem* 2005;280:24195-24204.

Taton TA. Nanotechnology. Boning up on biology. *Nature* 2001;412:491-492.

Terrones M. Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and other emerging applications. *International Materials Reviews* 2004;49: 325-377.

Thuret G, Chiquet C, Herrag S, Dumollard JM, Boudard D, Bednarz J, et al. Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *Br J Ophthalmol* 2003;87:346-352.

Tonelli FM, Santos AK, Gomes KN, Lorençon E, Guatimosim S, Ladeira LO, et al. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2012;7:4511-4529.

Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease – minireview. *J Biol Chem* 2002;277:4593-4596.

Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med* 1997;242:35-40.

Trigueiro JP, Silva GG, Lavall RL, Furtado, CA, Oliveira S, Ferlauto AS, et al. Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM and SEM methods. *J Nanosci Nanotechnol* 2007;7:3477-3486.

Turley EA, Austen L, Vandeligt K, Clary C. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of Ras-transformed cells. *J Cell Biol* 1991;112:1041-1047.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors – minireview. *J Biol Chem* 2002;277:4589-4592.

Tutak W, Park KH, Vasilov A, Starovoytov V, Fanchini G, Cai S-Q, et al. Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks. *Nanotechnology* 2009;20:255101.

Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Nakamura K, et al. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. *Small* 2008 4:240-246.

Venugopal J, Low S, Choon AT, Kumar TSS, Ramakrishna S. Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers. *J Mater Sci* 2008;19:2039-2046.

Wörle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Lett* 2006; 6: 1261-1268.

Yoon OJ, Kim HW, Kim DJ, Lee HJ, Yun JY, Noh YH, et al. Nanocomposites of Electrospun Poly[(D,L-lactic)-co-(glycolic acid)] and Plasma-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes for Biomedical Applications. *Plasma Processes and Polymers* 2009;6:101-109.

Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett* 2006 6:562-567.

Zhang S, Chang MCY, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *J Biol Chem* 1998;273:11342-11348.

Zhao B, Hu H, Mandal SK, Haddon RC. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chem Mater* 2005;17:3235-3241.

XI. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA).

O presente trabalho resultou nas seguintes produções:

- Anexo 2: Artigo 1

Sá MA, Andrade VB, Mendes RM, Caliari MV, Ladeira LO, Silva EE, Silva GAB, Corrêa-Júnior JD, Ferreira AJ. Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral Dis* 2013; 19:484-493.

- Anexo 3: Artigo 2

Sá MA, Ribeiro HJ, Valverde TM, Sousa BR, Martins-Júnior PA, Mendes RM, Ladeira LO, Resende RR, Kitten GT, Ferreira AJ. Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization.

O primeiro artigo, publicado em 2013 no periódico *Oral Diseases*, contém uma parte dos dados de caracterização dos NTCPS, NTCPS-HY e HY, material este usado em grande parte dos experimentos descritos neste trabalho.

O segundo artigo, que contém a maior parte dos dados da Tese de Doutorado foi submetido no periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* e aceito com considerações textuais a serem respondidas.



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

CERTIFICADO

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

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

CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 22 de Março de 2010.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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