

Marcos Augusto de Sá

**Efeitos do Hialuronato de Sódio e dos Nanotubos de
Carbono Funcionalizados com Hialuronato de Sódio no
Reparo Ósseo de Alvéolos Dentários de Ratos
Diabéticos**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

Fevereiro – 2011

Marcos Augusto de Sá

**Efeitos do Hialuronato de Sódio e dos Nanotubos de
Carbono Funcionalizados com Hialuronato de Sódio no
Reparo Ósseo de Alvéolos Dentários de Ratos
Diabéticos**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

Fevereiro – 2011

043

Sá, Marcos Augusto de.

Efeitos do hialuronato de sódio e dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos diabéticos. [manuscrito] / Marcos Augusto de Sá. – 2011.

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

Orientador: Anderson José Ferreira. Co-orientador: José Dias Corrêa Júnior.

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

1. Diabetes – Teses. 2. Hialuronato de sódio - Teses. 2. Nanotubos de carbono - Teses. 3. Reparo ósseo. 4. Alvéolo dental. 5. Biologia celular – Teses. I. Ferreira, Anderson José. II. Corrêa Júnior, José Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.3



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO 200/2011/03
DE entrada
MARCOS AUGUSTO DE SÁ 1º/2009
2009692920

Às **quatorze horas** do dia **28 de fevereiro de 2011** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Efeitos do hialuronato de sódio e dos nanotubos de carbono funcionalizados com hialuronato de sódio no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos diabéticos”**, requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Anderson José Ferreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra 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 do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADO
Dr. José Dias Corrêa Júnior	UFMG	APROVADO
Dr. Antônio Lúcio Teixeira Júnior	UFMG	APROVADO
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

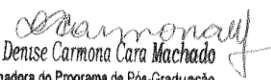
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato, pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2011.**

Dr. Anderson José Ferreira _____
(Orientador)

Dr. José Dias Corrêa Júnior _____
(Co-orientador)

Dr. Antônio Lúcio Teixeira Júnior _____

Dra. Walderez Ornelas Dutra _____


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

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

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

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

Contou com 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).

A Deus, que nos dá a chance de evoluir através do educandário da existência física e aos meus pais Guilherme Augusto de Sá e Lúcia Faria Oliveira de Sá, que com amor e compreensão, sempre me apoiaram ao longo dessa árdua caminhada.

“As lutas chegam e passam, as provações aparecem e desaparecem, as incompreensões se fazem nuvens e se dissipam, os desafios do mundo gritam e se calam... Tudo vai passando na Terra, mas o Senhor está imutável nos recessos de nosso espírito”.

Francisco Cândido Xavier

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;

Aos meus amados pais, Guilherme Augusto de Sá e Lúcia Faria Oliveira de Sá, que com amor e carinho, apoiam todos os meus projetos de vida;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, sua liderança, objetividade e planejamento impecável para execução das atividades foram fundamentais para o sucesso deste trabalho;

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

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

A Profa. Gerluzia Aparecida Borges Silva, seus conselhos contribuíram muito para a execução do trabalho e para minha formação;

Aos amigos Hermann Rodrigues e Flávio Mourão, que me incentivaram a ingressar na pós-graduação e me ajudaram ao longo desses dois anos;

Ao Dr. Renato de Melo Mendes, pelos ensinamentos e pelo apoio com os experimentos. Sua experiência é fundamental para o sucesso desta equipe;

A Vanessa Barbosa Andrade, pelo auxílio com os experimentos e por dar sequência à linha de pesquisa;

A Julliane Joviano, por também estar contribuindo com a sequência dos experimentos;

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, em especial às amigas Íria, Cristiane e Cynthia e ao amigo Fernando. Aos amigos Heder, Marcela, Fabrício e Luana;

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, em especial, aos colegas Luiz Henrique e Mônica;

A Sibebe Abreu, pelo carinho e compreensão com todos os alunos da Pós-graduação;

A CAPES, FAPEMIG E CNPq, o apoio financeiro destas instituições transforma projetos em ferramentas importantes para o desenvolvimento tecnológico brasileiro.

RESUMO

O diabetes mellitus altera o metabolismo ósseo levando à redução nas taxas de seu remodelamento. O hialuronato de sódio (HY) facilita a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. Já os nanotubos de carbono (NTC) atuam nos processos de reparo tecidual por servirem como sítio de nucleação para a deposição de matriz óssea e proliferação celular. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do HY e dos NTC funcionalizados com HY (NTC-HY) no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos com diabetes do tipo I após exodontia dos primeiros molares superiores. O diabetes foi induzido através da aplicação de uma dose única de 50mg/Kg de estreptozotocina na veia peniana. As exodontias foram realizadas, os alvéolos preenchidos com carbopol (veículo), HY ou NTC-HY e os animais divididos nos seguintes grupos: (i) normais controle; (ii) diabéticos controle; (iii) diabéticos tratados com HY (1%) e (iv) diabéticos tratados com NTC-HY (100 µg/mL). Os animais controle foram tratados com carbopol. Após sete e quatorze dias, os animais foram eutanasiados e as análises dos alvéolos foram realizadas através da quantificação do percentual de formação óssea e do número de núcleos celulares. Observou-se, quatorze dias após as exodontias, um percentual de trabéculas ósseas significativamente menor nos alvéolos de animais diabéticos controle em relação aos alvéolos de animais normais controle. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY ou com NTC-HY aumentou significativamente o percentual de trabéculas neoformadas em relação aos alvéolos dos animais diabéticos controle. Além disso, os alvéolos de animais diabéticos controle apresentaram um aumento significativo no número de núcleos celulares em relação aos animais normais controle. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY ou com NTC-HY reduziu significativamente o número de núcleos celulares em relação aos diabéticos controle. Assim, os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com HY ou NTC-HY foi capaz de acelerar o reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos diabéticos, sugerindo que estes biomateriais possuem potencial terapêutico em pacientes diabéticos.

Palavras chave: Hialuronato de sódio, Nanotubos de carbono, Diabetes mellitus, Reparo ósseo

ABSTRACT

Diabetes mellitus alters the bone metabolism leading to a reduction in the rate of its remodeling. Sodium hyaluronate (HY) facilitates cell migration, adhesion, proliferation and differentiation. Additionally, carbon nanotubes (CNT) is also thought to promote the tissue repair by serving as nucleation site for deposition of bone matrix and cell proliferation. The aim of this study was to evaluate the effects of HY and CNT functionalized with HY (CNT-HY) on the bone repair of tooth sockets of rats with type I diabetes after extraction of first molars. Diabetes was induced by a single injection of streptozotocin (50 mg/Kg) in the penile vein. The surgeries were performed, the sockets filled with carbopol (vehicle), HY or CNT-HY and the animals were divided into the following groups: (i) normal control, (ii) diabetic control, (iii) diabetic treated with HY (1%) and (iv) diabetic treated with CNT-HY (100 μ g/mL). Control animals were treated with carbopol. After seven and fourteen days, the rats were euthanized and the analysis of the sockets was performed by quantifying the percentage of bone formation and the number of cell nuclei. Fourteen days after the surgeries, the percentage of trabecular bone was markedly lower in sockets of diabetic control animals when compared with sockets of normal control animals. The treatment of sockets of diabetic animals with HY or CNT-HY significantly increased the deposition of bone trabeculae when compared with sockets of diabetic control animals. Moreover, the sockets of diabetic control animals showed a significantly increase in the number of cell nuclei in relation to normal control rats. The treatment of sockets of diabetic animals with HY or CNT-HY significantly reduced the number of cell nuclei when compared with diabetic control sockets. Thus, these results showed that the treatment with HY or CNT-HY accelerates the bone repair in tooth sockets of diabetic rats, suggesting that these biomaterials hold a potential therapeutic application in diabetic patients.

Keywords: sodium hyaluronate, Carbon Nanotubes, Diabetes mellitus, Bone repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da hialuronana contendo repetidas unidades dissacarídicas de N-acetilglicosamina e ácido D-glucorônico.....	4
Figura 2: Representação esquemática de (A) NTC de paredes simples e (B) NTC de paredes múltiplas.....	6
Figura 3: Procedimento de indução do diabetes mellitus através de administração endovenosa de estreptozotocina.	13
Figura 4: Procedimento cirúrgico de exodontia dos dentes primeiros molares superiores.....	15
Figura 5: Análise macromorfométrica da lesão pós-cirúrgica.....	17
Figura 6: Maxilas de rato dissecadas.	17
Figura 7: Divisão anatômica do alvéolo da raiz distal do primeiro molar superior em terços apical, médio e cervical	18
Figura 8: Glicemia capilar de jejum e variação do peso corporal dos animais expostos ao protocolo de sete dias	21
Figura 9: Glicemia capilar de jejum e variação do peso corporal dos animais expostos ao protocolo de quatorze dias	22
Figura 10: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de alvéolos de animais tratados com diferentes concentrações de HY sete dias após as exodontias	25
Figura 11: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de alvéolos de animais normais e diabéticos sete dias após as exodontias.	27
Figura 12: Análise de secções histológicas de alvéolos sete dias após as exodontias.....	28
Figura 13: Análise histológica de alvéolos sete dias após as exodontias	29
Figura 14: Análise macroscópica da epitelização das lesões cirúrgicas quatorze dias após as exodontias.....	32
Figura 15: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de alvéolos de animais normais e diabéticos quatorze dias após as exodontias..	33
Figura 16: Análise de secções histológicas de alvéolos quatorze dias após as exodontias.....	34

Figura 17: Análise histológica de alvéolos quatorze dias após as exodontias.	35
Figura 18: Efeitos de diferentes concentrações de HY no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos normais, sete dias após as exodontias.....	38
Figura 19: Efeitos do HY 1% e dos NTC-HY 100 µg/ml no reparo ósseo de alvéolos dentários sete dias após as exodontias.	41
Figura 20: Efeitos do HY e dos NTC-HY na epitelização da lesão externa pós-cirúrgica quatorze dias após a exodontia.	44
Figura 21: Efeitos do HY 1% e dos NTC-HY 100 µg/ml no reparo ósseo de alvéolos dentários quatorze dias após as exodontias..	45

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1: Grupos experimentais e os tratamentos administrados nos alvéolos.	14
Tabela 2: Percentual de trabéculas ósseas e número de núcleos celulares nos terços apical e médio dos animais controle (tratados com carbopol) e tratados com diferentes concentrações de HY.....	39
Tabela 3: Percentual de trabéculas ósseas e número de núcleos celulares nos terços apical e médio dos animais normais controle, diabéticos controle e tratados com HY ou NTC-HY, sete dias após as exodontias.	42
Tabela 4: Percentual de trabéculas ósseas e número de núcleos celulares nos terços apical e médio dos animais normais controle, diabéticos controle e tratados com HY ou NTC-HY, quatorze dias após as exodontias.	46
Quadro 1: Cálculo para determinar o percentual de trabéculas ósseas neoformadas nos terços apical e médio dos alvéolos distais.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais de glicosilação avançada
BMP-2	Proteína morfogenética do osso tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
GAGs	Glicosaminoglicanas
HA	Hialuronana
HY	Hialuronato de sódio (ácido hialurônico)
LP	Ligamento periodontal
MEC	Matriz extracelular
NTC	Nanotubos de carbono
NTC-HY	Nanotubos de carbono funcionalizados com Hialuronato de sódio
NTCPM	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
NTCPS	Nanotubos de carbono de paredes simples
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
RAGE	Receptores para produtos finais de glicosilação avançada
RANK	Receptor activator of NF-Kappa β
RANKL	Receptor activator of NF-Kappa β ligand
RHAMM	Receptores para mobilidade mediados por hialuronana
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Biologia do reparo alveolar	1
2. Hialuronana	3
3. Nanotubos de carbono.....	6
4. Diabetes Mellitus	7
II. JUSTIFICATIVA	10
III. OBJETIVOS	11
1. Objetivo geral.....	11
2. Objetivos específicos	11
IV. METODOLOGIA	12
1. Animais.....	12
2. Modelo experimental de indução do Diabetes Mellitus tipo I	12
3. Procedimentos cirúrgicos de exodontia.....	14
4. Análises histológica e morfométrica.....	16
5. Análise estatística	19
V. RESULTADOS.....	20
1. Glicemia capilar de jejum e peso corporal.....	20
2. Análise histológica	23
2.1 Efeitos de diferentes concentrações de HY	23
2.2 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo ósseo de animais diabéticos sete dias após as exodontias.....	26
2.3 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo ósseo de animais diabéticos quatorze dias após as exodontias	30
3. Análise morfométrica	36
3.1 Definição da concentração do HY	36
3.2 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo de alvéolos dentários de ratos diabéticos após sete dias da exodontia	39
3.3 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo de alvéolos dentários de ratos diabéticos após quatorze dias da exodontia	42
VI. DISCUSSÃO	47
VII. SUMÁRIO	53
VIII. CONCLUSÃO	54
IX. PERSPECTIVAS.....	55
X. REFERÊNCIAS.....	56

I. INTRODUÇÃO

1. Biologia do reparo alveolar

O processo de reparo ósseo pode ser dividido em fases sequenciais de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas, resultando em síntese de matriz extracelular (MEC), mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea (Sasaki & Watanabe, 1995; Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Lalani *et al.*, 2005). O reparo tecidual observado após uma exodontia inicia-se com a hemostasia, responsável por bloquear a perda de sangue através de vasos rompidos. A formação da rede de fibrina auxilia inicialmente o influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, característicos da resposta inflamatória aguda (Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Yugoshi *et al.*, 2002). Fibroblastos e células osteoprogenitoras oriundas do ligamento periodontal (LP) (Devlin & Sloan, 2002; Yugoshi *et al.*, 2002), da medula óssea (Shyng *et al.*, 1999; Devlin & Sloan, 2002) e do periósteo (Siqueira Jr. & Dantas, 2000; Rasubala *et al.*, 2004) são essenciais para a remodelação e formação óssea inicial em processos de reparo tecidual alveolar (Lekic *et al.*, 1997).

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

Análises histológicas do processo de reparo tecidual de alvéolos dentários de ratos demonstraram que, dois dias após as exodontias, o alvéolo encontra-se preenchido com coágulo sanguíneo (Kanyama *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008). Aos três dias de reparo, macrófagos, capilares neoformados e fibroblastos estão presentes em grande quantidade, sendo estes últimos, claramente visíveis no LP remanescente (Pinto *et al.*, 2001). Observa-se reabsorção do septo ósseo interradicular por osteoclastos, uma etapa importante no processo de reparo alveolar (Shyng *et al.*, 1999; Kurihashi *et al.*, 2002), e proliferação do epitélio da mucosa oral nas bordas da ferida cirúrgica, com invaginação em direção ao interior do alvéolo (Zied *et al.*, 2005). Após quatro dias de reparo tecidual, observa-se a migração de células endoteliais e fibroblastos para o tecido de granulação e a presença de osteoclastos e pré-osteoblastos na superfície do osso trabecular adjacente ao alvéolo (Kanyama *et al.*, 2003). Ainda é possível observar a presença de pequenas espículas ósseas após quatro a sete dias de reparo (Boeck *et al.*, 1999). Encerrada a primeira semana do processo de reparo alveolar, este se encontra preenchido com um tecido conjuntivo imaturo, rico em fibroblastos e exibindo pronunciada rede vascular (Pinto *et al.*, 2001; Yugoshi *et al.*, 2002; Kanyama *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008). A deposição de matriz óssea bem como a presença de grande quantidade de células com aspecto morfológico semelhante a osteoblastos é mais pronunciada aos sete dias no terço apical do alvéolo (Mendes *et al.*, 2008). O epitélio da mucosa gengival apresenta solução de continuidade com a presença de linfócitos e macrófagos no conjuntivo subjacente (Yugoshi *et al.*, 2002; Kanyama *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2008). Entretanto, alguns autores relatam que, nesta fase, o epitélio quase recobre o alvéolo (Pinto *et al.*, 2001) ou o oblitera completamente (Zied *et al.*, 2005). Além disso, observa-se diminuição do infiltrado inflamatório em relação aos períodos iniciais de reparo tecidual (Kurihashi *et al.*, 2002; Mendes *et al.*, 2008). Dez dias após a exodontia, o alvéolo exibe grande quantidade de trabéculas ósseas e, após quatorze dias de reparo tecidual, apresenta-se quase completamente preenchido por tecido ósseo que sofreu remodelação (Kanyama *et al.*, 2003) e maturação quase idêntica ao tecido ósseo pré-existente (Kurihashi *et al.*, 2002). Entretanto, alguns autores relatam que o alvéolo encontra-se, neste período, igualmente ocupado por tecido conjuntivo e

trabécula óssea (Teófilo *et al.*, 2001). Após quinze dias de reparo, observa-se a ferida recoberta com epitélio da mucosa gengival (Boeck *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2001) e os septos ósseos interradicular e interdental completamente remodelados (Zied *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2008). Ao final da terceira semana de reparo tecidual, o alvéolo encontra-se preenchido por uma espessa rede de trabéculas ósseas, circundando pequenos espaços medulares (Teófilo *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2008). O preenchimento do alvéolo com trabéculas ósseas bem definidas, vinte e quatro dias após a extração, praticamente define o estágio final do processo de reparo alveolar (Zied *et al.*, 2005).

2. Hialuronana

Hialuronana (HA) ou hialuronato de sódio (ácido hialurônico - HY) foi isolada inicialmente em 1934 (Meyer & Palmer, 1934) e teve sua estrutura primária descrita em 1955 (Linker *et al.*, 1955). É um polissacarídeo de alto peso molecular (10^4 - 10^7 Da) e composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido *D*-glucorônico e *N*-acetilglicosamina (Figura 1). A HA encontra-se amplamente distribuída na MEC de mamíferos (Agren *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1997; Juhlin, 1997; Moseley *et al.*, 2002; Prince, 2004; Aslan *et al.*, 2006; Dechert *et al.*, 2006; Deschrevel *et al.*, 2008; Kappler *et al.*, 2009; Rügheimer *et al.*, 2009).

A HA é capaz de influenciar o comportamento celular pela interação direta com receptores de superfície celular (Turley *et al.*, 1991; Dechert *et al.*, 2006), especialmente CD44 (Lesley *et al.*, 2000; Sugahara *et al.*, 2003; Lesley *et al.*, 2004) e receptores para mobilidade mediada por HA (RHAMM) (Toole, 1997; Savani *et al.*, 2001; Turley *et al.*, 2002; Nedvetzki *et al.*, 2004; Ghatak *et al.*, 2005) via ativação de proteínas quinases (Zhang *et al.*, 1998; Bourguignon *et al.*, 2002; Slevin *et al.*, 2002; Ghatak *et al.*, 2005). RHAMM, descrito inicialmente em 1992 (Hardwick *et al.*, 1992), é expresso em superfície celular, citoplasma, núcleo e citoesqueleto (Nedvetzki *et al.*, 2004). A transdução do sinal, após ligação à HA, acarreta rearranjos estruturais do citoesqueleto (Toole *et al.*, 2002; Bourguignon *et al.*, 2002). O bloqueio específico destes receptores indica que RHAMM regula a migração de células endoteliais, enquanto CD44

influencia a proliferação destas células (Savani *et al.*, 2001), fornecendo evidências do envolvimento de HA na angiogênese (Savani *et al.*, 2001; Slevin *et al.*, 2002; Giavaresi *et al.*, 2005). A interação entre CD44 e HA é implicada na adesão primária de leucócitos ao endotélio em sítios de inflamação (Lesley *et al.*, 2004). CD44 e RHAMM desempenham, também, papel crítico na migração e proliferação de células normais e tumorais (Annabi *et al.*, 2004; Nedvetzki *et al.*, 2004; Ghatak *et al.*, 2005).

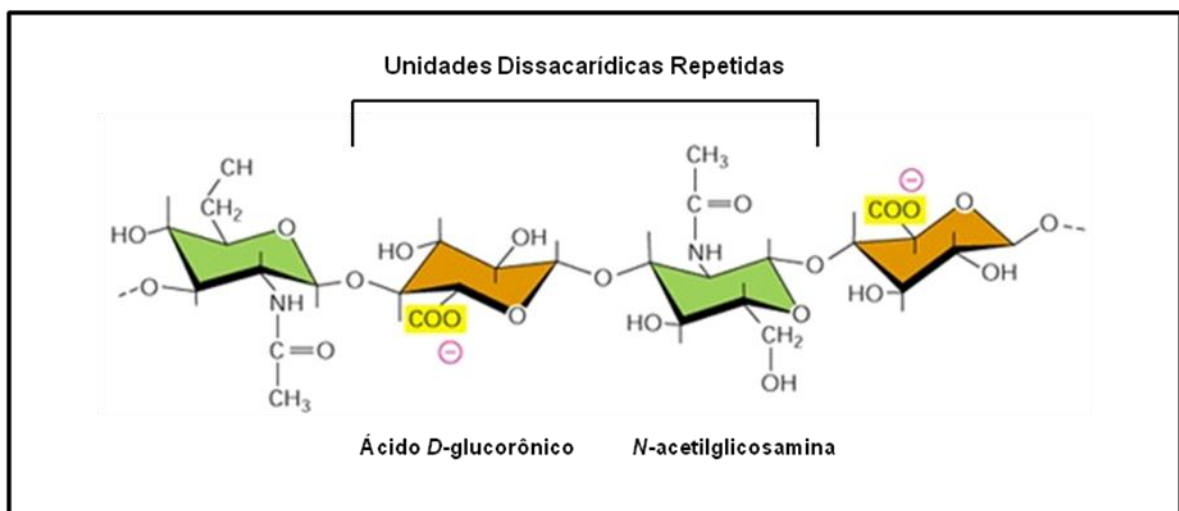


Figura 1: Estrutura da hialuronana contendo repetidas unidades dissacarídicas de N-acetilglicosamina e ácido D-glucorônico (Alberts *et al.*, 2004).

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

tópica de HA em feridas dérmicas, além da remoção de radicais livres, tem como benefícios a hidratação da ferida e o bloqueio do excesso de hialuronidase que possa estar presente (Dechert *et al.*, 2006). Como resultado da ação de hialuronidases e radicais livres, a HA de alto peso molecular é seccionada em fragmentos menores (Liu *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005). O tamanho da cadeia de HA influencia sua ligação aos receptores celulares, alterando a proliferação e migração celular (Lesley *et al.*, 2000; Slevin *et al.*, 2002; Sugahara *et al.*, 2003).

Durante os processos de reparo ósseo, a HA pode atuar na retenção de fatores de crescimento osteoindutores dentro do ambiente local, em virtude de suas propriedades físico-químicas (Sasaki & Watanabe, 1995), além de mediar a adesão de osteoclastos à superfície óssea (Prince, 2004) e acelerar a revascularização (Giavaresi *et al.*, 2005) e a formação óssea (Sasaki & Watanabe, 1995; Pilloni & Bernard, 1998). A inserção de grande quantidade de HA em áreas de injúria tecidual previne inicialmente a agregação celular, possibilitando intensa migração e divisão celular. A ação de hialuronidases liberadas por fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas, presentes na região de reparo, é responsável por regular os níveis de HA, permitindo a formação de pontes de ligação entre HA e seus receptores celulares, um mecanismo importante na agregação celular (Pilloni & Bernard, 1998). Desta forma, matrizes à base de HA podem ser potencialmente úteis para o reparo de defeitos teciduais ósseos acelerando a formação e deposição de matriz óssea (Pasquinelli *et al.*, 2008). Géis à base de HA têm sido utilizados em modelos de defeitos ósseos, isoladamente ou como carreadores para BMP-2 (Itoh *et al.*, 2001; Arosarena & Collins, 2005), matriz óssea desmineralizada (Colnot *et al.*, 2005), compósitos de hidroxiapatita (Bakos *et al.*, 1999) e enxertos ósseos (Giavaresi *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2006), além do tratamento de osteoartrite (Barbucci *et al.*, 2002).

3. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (NTC) são formas metaestáveis de carbono resultantes do enrolamento de um plano de átomos de carbono (Dresselhaus *et al.*, 1996; Ajayan, 1999). Estão divididos em duas categorias: NTC de paredes simples (NTCPS) com diâmetro variando entre 0,7 e 2,0nm (Figura 2A) e NTC de paredes múltiplas (NTCPM) que podem ter diâmetro acima de 100nm (Figura 2B) (MacDonald *et al.*, 2005; Smart *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Boccaccini *et al.*, 2006). A forte ligação covalente de seus átomos proporciona aos NTC alta resistência mecânica e, devido ao seu caráter metálico, alta condutividade térmica e elétrica. Além disso, a ausência de ligações pendentes dá a este material uma grande inércia química, fundamental para o seu uso em aplicações biotecnológicas e bioquímicas (Dresselhaus *et al.*, 1996). As suas extraordinárias propriedades físico-químicas despertaram grande interesse nos mais diversos ramos da ciência, permitindo supor uma variada gama de aplicações que vão desde o armazenamento de energia e hidrogênio até utilização em aplicações médicas (Terrones, 2004).

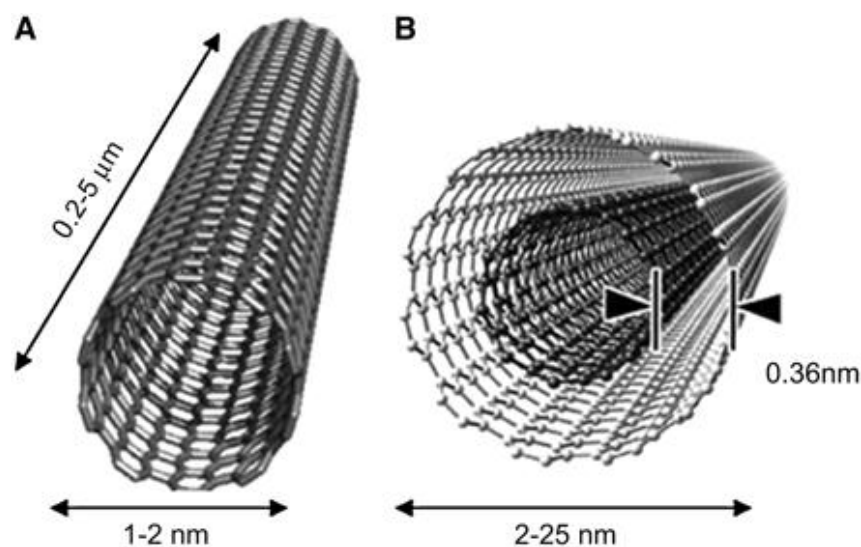


Figura 2: Representação esquemática de (A) NTC de paredes simples e (B) NTC de paredes múltiplas.

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. NTC podem, da mesma forma, 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, portanto, representam um enorme avanço tecnológico no campo da bioengenharia (Price *et al.*, 2004; Zanello *et al.*, 2006; Tutak *et al.*, 2009).

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

4. Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por uma hiperglicemia crônica, que leva a distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, devido a deficiências na secreção ou sensibilidade a insulina por destruição das células beta do pâncreas, resistência à ação da insulina periféricamente ou ambas as causas (OMS, 1999).

O diabetes mellitus é uma das principais causas de morbimortalidade em sociedades ocidentais (Rosa, 2008). São 4 milhões de mortes por ano relativas ao diabetes e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial total. Essa doença configura-se, atualmente, como uma

epidemia mundial e fatores como o envelhecimento da população, crescente urbanização, sedentarismo, dieta inadequada e obesidade são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) evidenciam que o número de portadores da doença em todo o mundo era de 177 milhões em 2000, com expectativa de alcançar 350 milhões de pessoas em 2025. No Brasil, eram cerca de 6 milhões de portadores da doença em 2006, número que deve alcançar os 10 milhões de pessoas em 2010 (Ministério da saúde, 2006).

O diabetes pode apresentar-se através de sintomas característicos como polidipsia, polifagia, poliúria e perda involuntária de peso. Outros sintomas como fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, balanopostite e infecções de repetição levam a suspeita clínica (Ministério da saúde, 2006). Complicações características dessa patologia a longo prazo são: retinopatia, neuropatia, nefropatia e maior risco para desenvolver cardiopatias, doenças vasculares periféricas e acidente vascular encefálico (OMS, 1999; Monti *et al.*, 2007).

É amplamente difundido na literatura que o diabetes mellitus altera o metabolismo ósseo, reduzindo de forma expressiva tanto a neoformação quanto a reabsorção óssea (Devlin *et al.*, 1996; Shyng *et al.*, 2001; Mishima *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2007), o que compromete e prolonga o processo de reparo tecidual ósseo. Também é quase consenso que o tratamento crônico de animais diabéticos com insulina reverte quase totalmente os efeitos da doença (Devlin *et al.*, 1996; Shyng *et al.*, 2001; Mishima *et al.*, 2002; Hamada *et al.*, 2007; Javed *et al.*, 2009; Retzepe *et al.*, 2010). Alguns mecanismos que podem explicar tal comprometimento são descritos na literatura (Devlin *et al.*, 1996; Hamada *et al.*, 2007; de Amorim *et al.*, 2008; Ogasawara *et al.*, 2008; Stolzing *et al.*, 2010). Por exemplo, Devlin *et al.* (1996), em estudo qualitativo e temporal do reparo ósseo em alvéolos dentários de animais diabéticos após exodontia de dentes molares maxilares, observaram que o diabetes não controlado pode prejudicar a formação do colágeno, retardando o reparo ósseo. Em defeitos ósseos fechados de fêmures, observou-se proliferação significativamente menor de condrócitos e expressão reduzida de colágeno II e X e OPN em animais diabéticos, o que atrasa de

forma importante o reparo de fraturas (Ogasawara, *et al.*, 2008). Também foram observadas relações do stress oxidativo com a redução dos parâmetros histomorfométricos de formação e reabsorção óssea em animais diabéticos (Hamada *et al.*, 2007). Outro mecanismo importante é o controle da osteoclastogênese que parece ser influenciada pelo diabetes mellitus. Foi demonstrada uma redução na expressão dos receptores que compõem o sistema RANK/RANKL/OPG, em animais diabéticos, comprometendo o reparo ósseo de fraturas de tíbia (de Amorim *et al.*, 2008). RANKL (*receptor activator of NF-Kappa β ligand*) é um receptor presente na superfície de osteoblastos, e a Osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel, associa-se a RANKL, impedindo sua ligação a RANK (*receptor activator of NF-Kappa β*), um receptor presente na superfície de monócitos, células precursoras dos osteoclastos. (Krakauer *et al.*, 1995; Wetzler *et al.*, 2000); de Amorim *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que células mesenquimais extraídas de animais diabéticos ou células diferenciadas cultivadas em meios com alto teor de glicose tem comprometidas as funções de diferenciação, proliferação ou mesmo de síntese dos fatores de crescimento, fundamentais para o processo de neoformação óssea (Inaba *et al.*, 1995; Stolzing *et al.*, 2010). A formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) e a interação com seus receptores (RAGE) parece contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio, comprometendo a diferenciação celular (Stolzing *et al.*, 2010).

O modelo experimental de indução do diabetes mellitus pela estreptozotocina é bem descrito e amplamente utilizado (Devlin *et al.*, 1996; Shyng *et al.*, 2001; Szkudelski, 2001; Mishima *et al.*, 2002; Hamada *et al.*, 2007). Essa droga acessa o interior da célula através do transportador de glicose, o GLUT 2, gerando alquilação do DNA (Szkudelski, 2001). A alquilação do DNA induz a ativação da poli ribosilação do ADP, processo que leva a depleção do NAD⁺ e do ATP celular (Szkudelski, 2001). O aumento da desfosforilação do ATP após tratamento com estreptozotocina fornece substrato para a enzima xantina oxidase, resultando na formação de radicais superóxido. Já o aumento da formação de óxido nítrico intracelular, devido à metabolização da estreptozotocina, inibe a atividade da enzima aconitase gerando danos ao DNA. Em síntese, a ação da estreptozotocina leva à morte por necrose das células β (Szkudelski, 2001).

II. JUSTIFICATIVA

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa vêm investigando há algum tempo os efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos, obtendo resultados significativos (Mendes et al., 2008; Mendes et al., 2010). Contudo, esses resultados foram obtidos em animais normais, sem evidências de comprometimento do processo de reparo ósseo. No presente trabalho, o reparo ósseo dos alvéolos pós-exodontia foi reproduzido em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, de modo a verificar se o tratamento dos alvéolos com HY ou NTC-HY também é efetivo em condições metabólicas adversas.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do HY e dos NTC funcionalizados com o HY (NTC-HY) no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos com diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina após exodontia dos primeiros molares superiores.

2. Objetivos específicos

- Determinar a melhor concentração de HY capaz de acelerar o reparo ósseo 7 dias após a exodontia dos primeiros molares superiores;
- Avaliar, através de análise macromorfolométrica, a área de lesão pós-cirúrgica 14 dias após a exodontia dos primeiros molares superiores de ratos diabéticos controle ou tratados com HY ou NTC-HY;
- Avaliar histomorfometricamente o percentual de trabéculas ósseas neoformadas nos alvéolos 7 e 14 dias após a exodontia dos primeiros molares superiores de ratos diabéticos controle ou tratados com HY ou NTC-HY;
- Avaliar histomorfometricamente o número de núcleos celulares presentes nos alvéolos 7 e 14 dias após a exodontia dos primeiros molares superiores de ratos diabéticos controle ou tratados com HY ou NTC-HY.

IV. METODOLOGIA

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (2 meses de idade) pesando entre 180 e 230g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Os animais foram acondicionados em biotério apropriado com controle de temperatura e luminosidade (7-19h). Os ratos tiveram acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório, exceto em três períodos: (i) antes dos procedimentos de indução do diabetes, (ii) antes da mensuração da glicemia, quando eles foram mantidos em jejum (≥ 8 h) e (iii) após a cirurgia de exodontia dos primeiros molares, quando os animais permaneceram por dois dias em dieta pastosa (ração moída). 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).

2. Modelo experimental de indução do Diabetes Mellitus tipo I

O diabetes mellitus tipo 1 foi induzido através de injeção endovenosa de estreptozotocina (50 mg/Kg de peso corporal) na veia peniana dos animais em jejum (≥ 8 h) (Frazan *et al.*, 1997). A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato (10 mmol/L, pH 4,5) no dia da indução. Para acesso à veia peniana, os animais foram anestesiados com uma associação de ketamina 10% e xilazina 2% (1:1, 0,1 mL/100 g de peso corporal, i.m.). Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e o pênis dos mesmos foi exposto manualmente. A veia peniana foi localizada na face ventral do corpo do pênis. Em seguida, a seringa contendo a droga diluída foi posicionada de modo que a agulha ficasse com o bisel para cima. Dessa forma, a agulha foi introduzida na veia e a droga administrada (Figura 3). Os animais do grupo controle (normais controle) foram submetidos ao mesmo procedimento, sendo injetado apenas tampão citrato em volume equivalente ao de estreptozotocina. A confirmação do diabetes foi realizada com a mensuração da glicemia capilar

de jejum (valor de referência: ≥ 126 mg/dL) doze dias após a indução. Outros sinais clínicos importantes, como poliúria e polidipsia, foram avaliados com o objetivo de auxiliar no diagnóstico do diabetes. Após a confirmação do diabetes, os animais foram divididos em 8 grupos: Grupo controle (animais não diabéticos) tratado com carbopol, diabéticos controle tratados com carbopol, diabéticos tratados com HY e diabéticos tratados com NTC-HY, com o tratamento durando 7 ou 14 dias após as exodontias dos primeiros molares (Tabela 1). O carbopol foi utilizado como controle por apresentar consistência semelhante à do HY. Em um estudo prévio, foi demonstrado que o carbopol não interfere no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos (Mendes *et al.*, 2008).

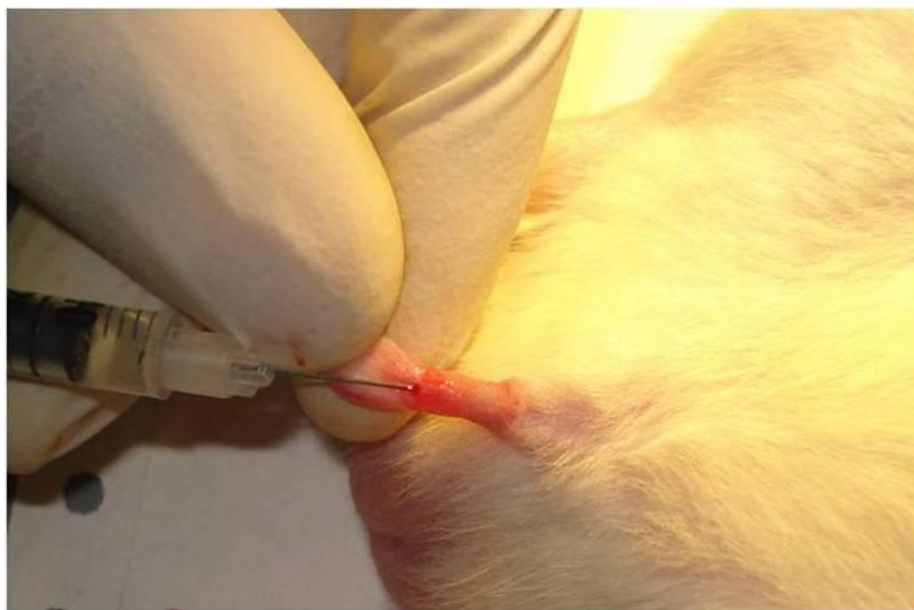


Figura 3: Procedimento de indução do diabetes mellitus através de administração endovenosa de estreptozotocina.

Tabela 1 Grupos experimentais e os tratamentos administrados nos alvéolos.

GRUPOS	TRATAMENTOS	SACRIFÍCIO
Normais Controle	Carbopol (veículo)	7 dias
Diabéticos Controle	Carbopol (veículo)	
Diabéticos – HY	HY 1%	
Diabéticos – NTC-HY	NTC-HY 100 µg/mL de Carbopol	
Normais Controle	Carbopol (veículo)	14 dias
Diabéticos Controle	Carbopol (veículo)	
Diabéticos – HY	HY 1%	
Diabéticos – NTC-HY	NTC-HY 100 µg/mL de Carbopol	

3. Procedimentos cirúrgicos de exodontia

As exodontias dos dentes primeiros molares foram realizadas 14 dias após o procedimento de indução do diabetes mellitus. Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados com uma associação de ketamina 10% e xilazina 2% (1:1, 0,1 mL/100 g de peso corporal, i.m.). Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a visualização do campo cirúrgico foi possível através do tracionamento da mandíbula e da língua superiormente (Figura 4A). Foram realizadas as exodontias dos dentes primeiros molares superiores utilizando-se um instrumento de Hollemback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação e remoção dos dentes (Figura 4B). Após confirmação da integridade dos dentes removidos, os alvéolos dos animais controle e diabéticos foram divididos aleatoriamente (através de sorteio prévio) e imediatamente tratados com carbopol 0,5% (veículo), HY 1% (NIKKOL, Galena, Brasil) ou NTC-HY (100 µg/mL). O gel de HY continha menos de 2 ppm de metais pesados e arsênio, 0% de proteína, 5,2 mg/mL de ácido glucorônico e 1% de ácido hialurônico (pH=6,1). O hialuronato de sódio, na concentração de 1%, apresenta-se na forma de gel devido à sua alta capacidade higroscópica.

Os processos de síntese e caracterização dos NTCPS, bem como a sua funcionalização com o HY, foram previamente descritos na literatura (Mendes *et al.*, 2010). O pó resultante desse processo (NTC-HY) foi diluído em carbopol para ser posteriormente administrado nos alvéolos. Foi injetado nos alvéolos, aproximadamente, 0,1 mL dos compostos citados acima com o auxílio de uma pequena agulha (26G). A concentração dos NTC-HY utilizada neste trabalho foi baseada na literatura (Mendes *et al.*, 2008, 2010). Para que os tratamentos administrados permanecessem o maior tempo possível na cavidade alveolar após a realização das exodontias, os animais foram posicionados em decúbito dorsal por aproximadamente 4 horas, período de duração da anestesia. Não foram realizados procedimentos de sutura das bordas palatina e vestibular da gengiva após a realização das cirurgias. Como já foi citado no tópico de caracterização dos animais experimentais, os ratos foram submetidos à dieta pastosa por 48 horas após as exodontias, com objetivo de reduzir a impactação de alimentos rígidos na área operada.

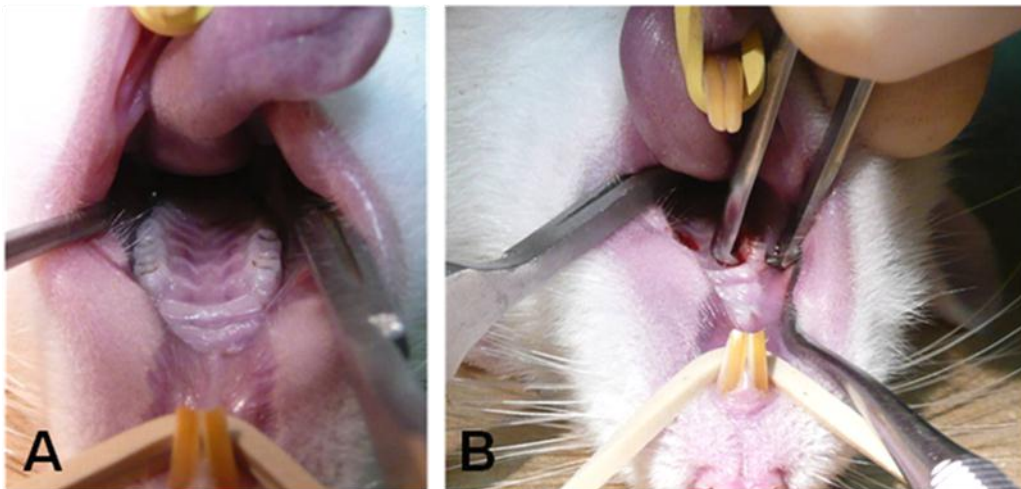


Figura 4: Procedimento cirúrgico de exodontia dos dentes primeiros molares superiores. Em **(A)** é possível observar o campo cirúrgico após o tracionamento superior da mandíbula e da língua. Centralmente observa-se o palato e mais lateralmente, em ambos os lados, os dentes molares, sendo o primeiro molar o mais anterior deles. Em **(B)** observa-se o posicionamento da pinça para luxação e remoção do primeiro molar.

4. Análises histológica e morfométrica

Sete e quatorze dias após as exodontias, os animais foram eutanasiados por decapitação, as maxilas foram dissecadas e imediatamente fixadas em formalina neutra tamponada 10% por 48h à temperatura ambiente. Após a fixação, as maxilas foram fotografadas para análise macromorfométrica da área de lesão pós-cirúrgica (Figura 5A). As peças foram posicionadas em um suporte com distância padronizada de 4 cm entre a mesa de suporte e a lente da câmera (Figura 5B). As fotos foram obtidas com o auxílio de uma câmera Sony DSC – H50. A análise macromorfométrica foi feita com o auxílio do programa KS300. A área de lesão pós-cirúrgica era delimitada manualmente pelo examinador e o programa calculava a área, com os valores sendo expressos em mm^2 . Em seguida, as maxilas foram desmineralizadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10% (pH entre 7,2 e 7,4) por cerca de 40 dias, divididas no plano sagital mediano para separar os alvéolos direitos e esquerdos, desidratadas através de soluções graduadas e crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina. Foram obtidos cortes seriados com espessura de 6 μm no plano sagital e, posteriormente, corados pelo Tricrômico de Masson para análises histológica e morfométrica. Os alvéolos das raízes distais (Figuras 6A e 6B) foram divididos anatomicamente em terços apical, médio e cervical (Figura 7). Foram obtidas 12 imagens (40X) de cada terço (apical e médio) de três cortes do mesmo alvéolo, obtidos de três lâminas diferentes, totalizando uma área de $6,4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ por terço. Esses alvéolos distais foram incluídos nas análises quando seus limites apresentavam-se bem definidos e não era detectada a presença de restos radiculares. O percentual de trabéculas ósseas neoformadas obtido em cada terço do alvéolo foi calculado dividindo a área trabecular presente nas doze imagens capturadas pela área total analisada (Quadro 1). Essa análise foi realizada com o auxílio do programa KS300. Com o auxílio desse mesmo programa, foi quantificado o número de núcleos celulares presente na área total dos terços apical e médio.

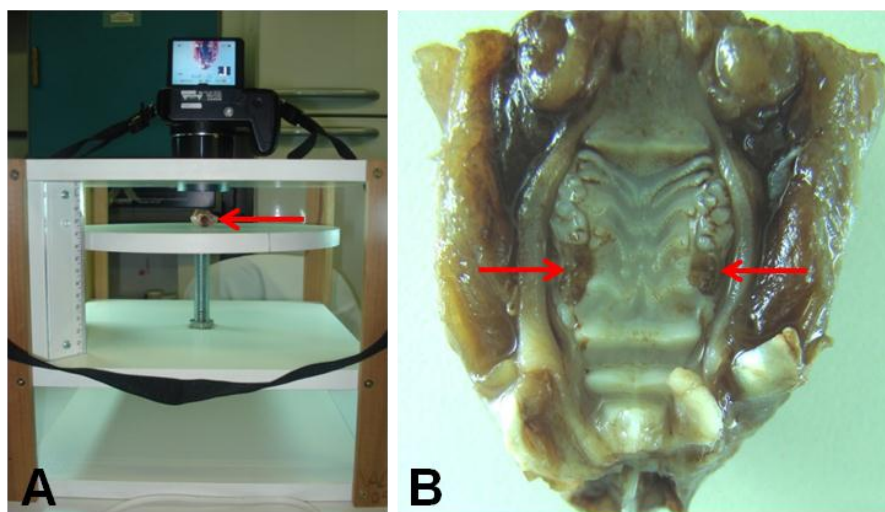


Figura 5: Análise macromorfológica da lesão pós-cirúrgica. Em **(A)** observa-se o suporte onde a maxila (destacada pela seta) é posicionada para a obtenção das fotos. Em **(B)** observa-se a maxila do animal, os segundos e terceiros molares e, anteriormente a eles, a área de lesão pós-cirúrgica, na região do primeiro molar (destacada pela seta vermelha).

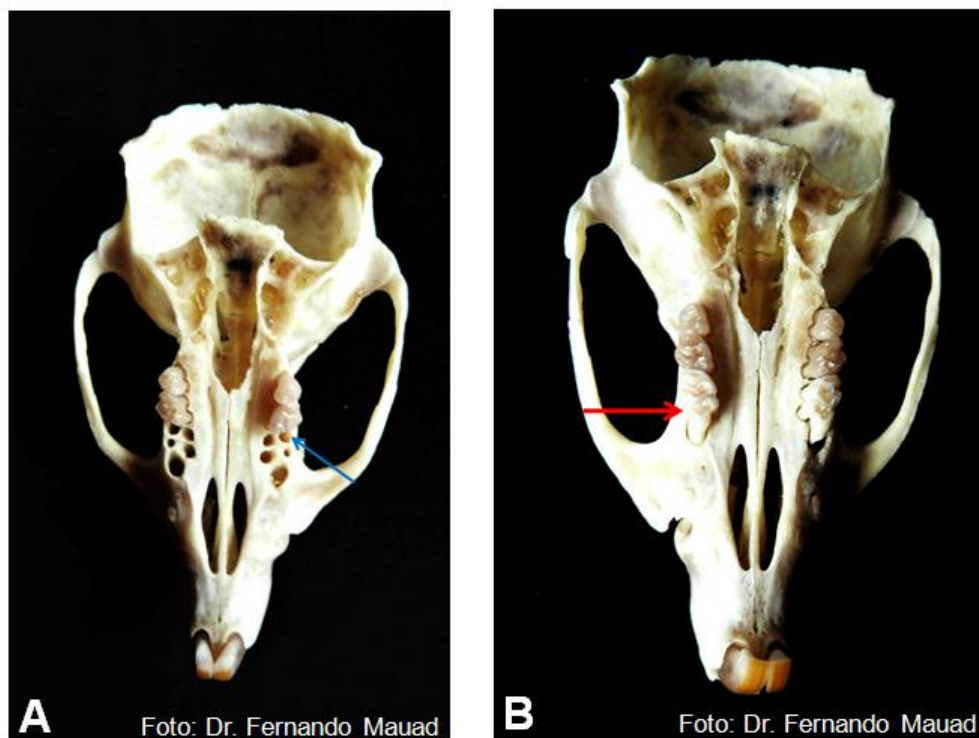


Figura 6: Maxilas de rato dissecadas. Em **(A)** observa-se, anteriormente ao segundo molar, todos os alvéolos das raízes do primeiro molar. São dois alvéolos distais, dois mediais e um

grande alvéolo mesial, mais anteriormente. A seta azul indica o alvéolo distal mais próximo da região vestibular, que é a região de interesse para o estudo. Em **(B)** observa-se o posicionamento do dente primeiro molar e suas raízes contidas nos alvéolos.

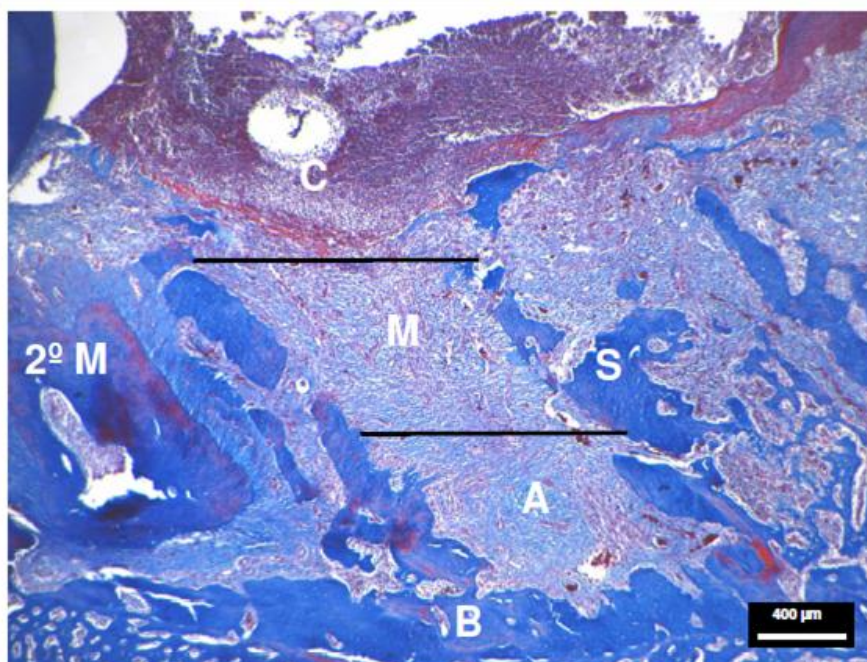


Figura 7: Divisão anatômica do alvéolo da raiz distal do primeiro molar superior em terços apical, médio e cervical. A: terço apical; M: terço médio; C: terço cervical; 2ºM: segundo molar; B: osso basal; S: septo ósseo. Barra = 400µm. Coloração pelo Tricrômico de Masson. Figura adaptada de Mendes *et al.*, 2008.

Quadro 1: Cálculo para determinar o percentual de trabéculas ósseas neoformadas nos terços apical e médio dos alvéolos distais.

$\frac{\text{Área de trabéculas (Imagem 1 + Imagem 2 + Imagem 3 + \dots + Imagem 12)}}{\text{Área Total Avaliada por Terço (6,4 x 10^5 \mu\text{m}^2)}}$
--

5. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm EPM. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes t de Student não pareado, One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls e Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

V. RESULTADOS

1. Glicemia capilar de jejum e peso corporal

Como era esperado, foi observado um aumento significativo nos valores de glicemia capilar de jejum nos animais diabéticos induzidos por estreptozotocina quando comparados aos animais controle (animais dos grupos de 7 dias: $254,1 \pm 37,57$ nos animais diabéticos vs. $81,00 \pm 4,90$ nos controles, Figura 8A; animais dos grupos de 14 dias: $275,2 \pm 34,32$ nos animais diabéticos vs. $81,00 \pm 8,19$ nos controles, Figura 9A). Entre os ratos dos grupos de 7 dias, os animais controle apresentaram um ganho progressivo de peso ao longo do período experimental, atingindo um valor médio de 300 g ao final da quarta semana. Já os grupos de animais diabéticos apresentaram um discreto ganho de peso ao longo do período experimental, atingindo um valor médio de 205 g ao final da quarta semana, valor esse significativamente menor quando comparado aos controles (Figura 8B). Os animais dos grupos de 14 dias apresentaram curvas de evolução de peso semelhantes àqueles animais dos grupos de 7 dias, ou seja, foi observado um ganho progressivo de peso nos animais controle ao longo do período experimental, que atingiu um valor médio de 348 g ao final da quinta semana e os grupos de ratos diabéticos apresentaram um discreto ganho de peso ao longo do experimento, alcançando um valor médio de 244 g ao final da quinta semana, valor esse significativamente menor quando comparado aos controles (Figura 9B). Esse conjunto de dados evidencia o sucesso do modelo experimental de indução do diabetes mellitus.

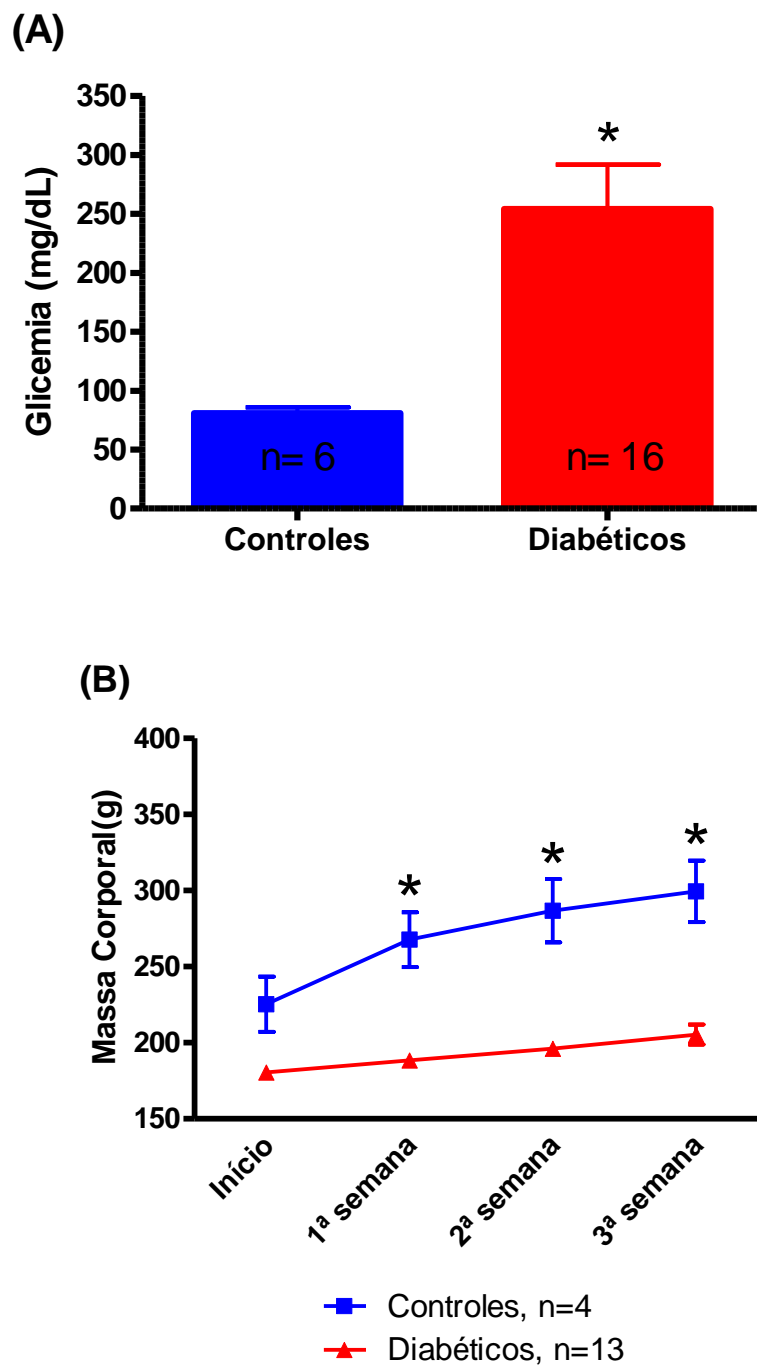


Figura 8: Glicemia capilar de jejum e variação do peso corporal dos animais expostos ao protocolo de sete dias. **(A)** Os valores glicêmicos dos animais diabéticos são significativamente maiores do que os dos animais controle. **(B)** A variação da massa corporal ao longo do tempo mostra um ganho de peso progressivo nos animais normais enquanto os diabéticos apresentam um ganho de peso inexpressivo, significativamente menor em relação aos animais não diabéticos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Em **(A)**, * $p < 0,05$ vs. controles e em **(B)**, * $p < 0,05$ vs. diabéticos. **(A)** Teste t de student não pareado; **(B)** Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

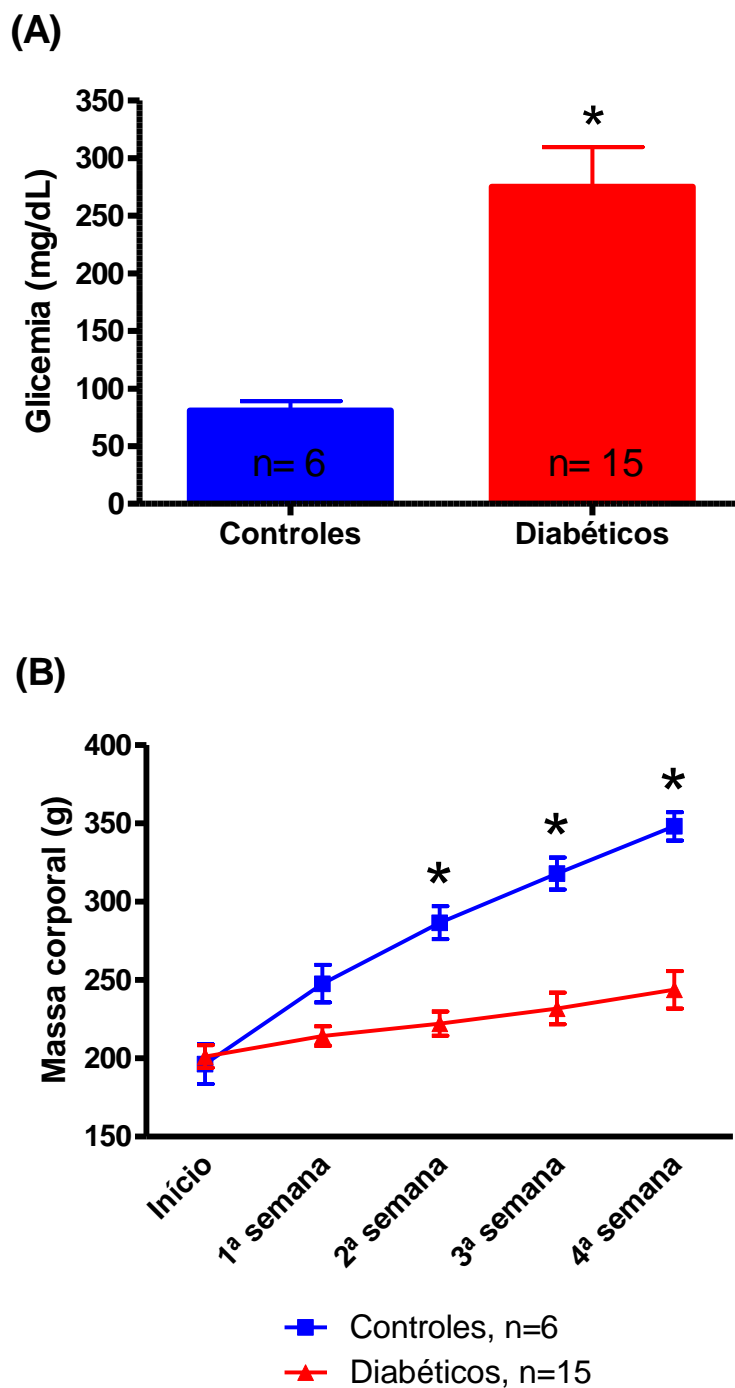
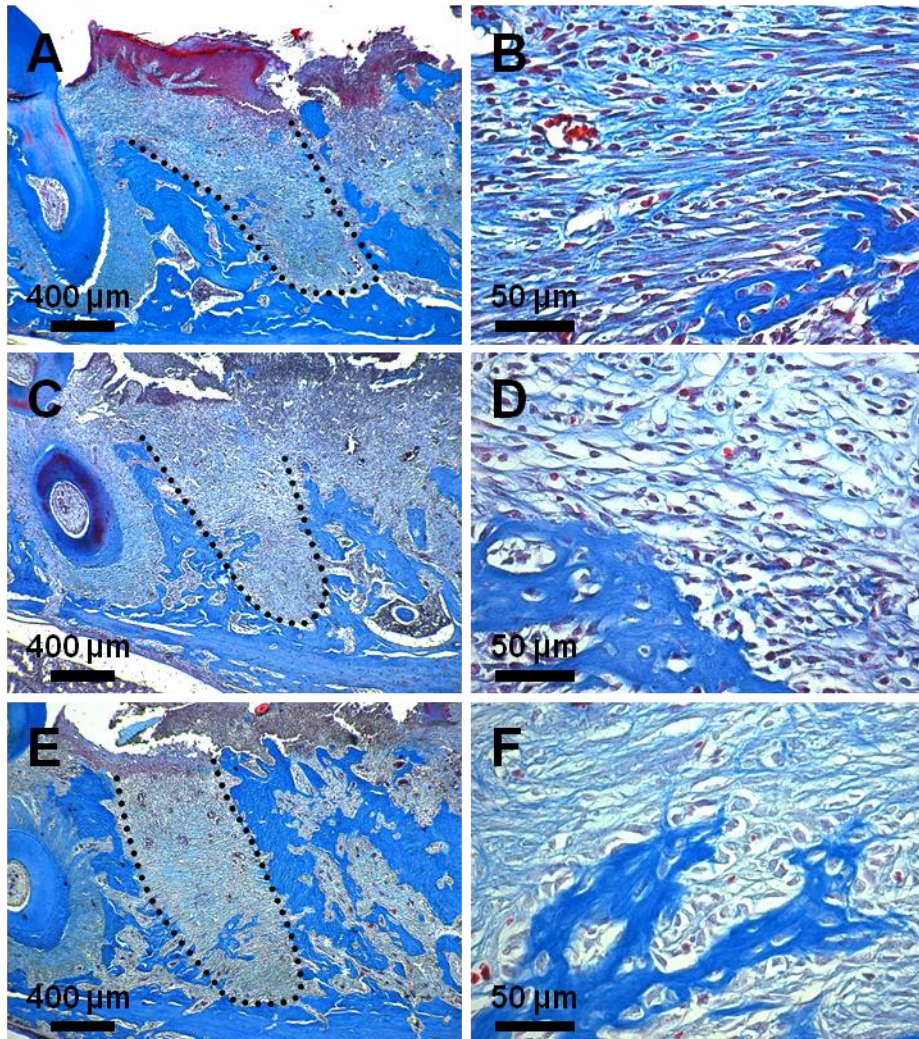


Figura 9: Glicemia capilar de jejum e variação do peso corporal dos animais expostos ao protocolo de quatorze dias. **(A)** Os valores glicêmicos dos animais diabéticos são significativamente maiores do que os dos animais controle. **(B)** A variação da massa corporal ao longo do tempo mostra um ganho de peso progressivo nos animais normais enquanto os diabéticos apresentam um ganho de peso inexpressivo, significativamente menor em relação aos animais não diabéticos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Em **(A)**, * $p < 0,05$ vs. controles e em **(B)**, * $p < 0,05$ vs. diabéticos. **(A)** teste t de student não pareado; **(B)** Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

2. Análise histológica

2.1 Efeitos de diferentes concentrações de HY

Sete dias após as exodontias, os alvéolos controle, tratados com carbopol, apresentavam-se preenchidos com um denso tecido conjuntivo. Observou-se a presença de vasos sanguíneos e numerosos núcleos celulares, além de poucas trabéculas neoformadas (Figura 10A e B). Alvéolos tratados com HY, nas concentrações de 0,25% e 0,5% apresentaram maior quantidade de vasos sanguíneos e menor quantidade de núcleos celulares em relação aos alvéolos controle. A redução do número de núcleos celulares foi mais evidente nos alvéolos tratados com a concentração de 0,25% (Figura 10C e D – HY 0,25% e Figura 10E e F – HY 0,5%). Com relação à neoformação de trabéculas ósseas, os alvéolos tratados com HY nas concentrações de 0,25% e 0,5% apresentaram um padrão de formação semelhante, com maior formação de trabéculas no interior dos alvéolos em relação aos controles, embora essa diferença não tenha sido expressiva (Figura 10C e D – HY 0,25% e Figura 10E e F – HY 0,5%). Análise histológica de alvéolos tratados com HY na concentração de 1% demonstrou deposição óssea marcante, principalmente no terço apical dos mesmos. Essas trabéculas mostraram-se muito mais numerosas, organizadas e espessas em relação ao padrão demonstrado nos alvéolos controle (Figura 10G e H). Além disso, os alvéolos tratados com HY 1% apresentaram uma quantidade de núcleos celulares em seu interior bem menor do que aquela apresentada pelos alvéolos controle, acompanhando de forma inversa, o padrão de neoformação óssea (Figura 10G e H). Alvéolos tratados com HY nas concentrações de 2% e 4% não apresentaram diferenças histológicas importantes quando comparados aos alvéolos controle. Nesses alvéolos, houve pouca deposição de trabéculas neoformadas e uma redução no número de núcleos celulares que não foi histologicamente importante (Figura 10I e J – HY 2% e K e L – HY 4%).



Continua na próxima página.

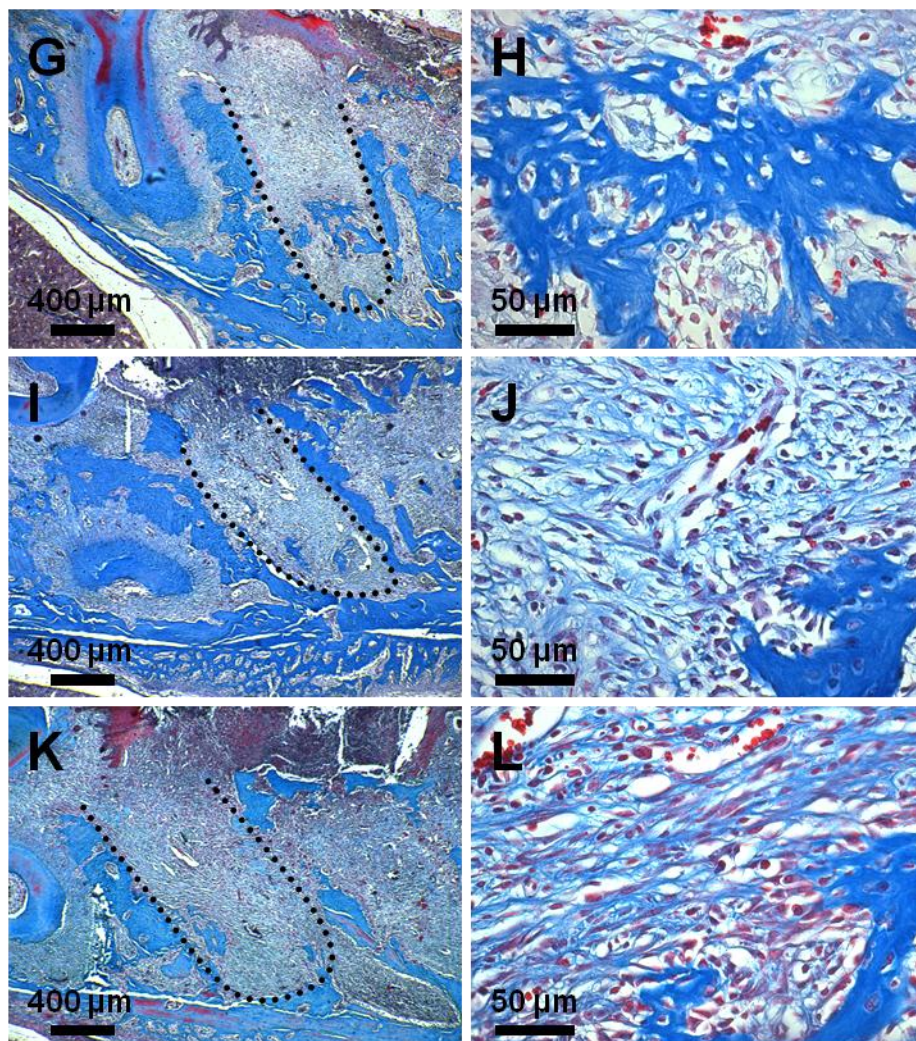


Figura 10: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de alvéolos de animais tratados com diferentes concentrações de HY sete dias após as exodontias. Alvéolos de animais normais controle (tratados com carbopol) - (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Alvéolos tratados com HY 0,25% - (C) baixa e (D) alta magnitude; Alvéolos tratados com HY 0,5% - (E) baixa e (F) alta magnitude; Alvéolos tratados com HY 1% - (G) baixa e (H) alta magnitude; Alvéolos tratados com HY 2% - (I) baixa e (J) alta magnitude; Alvéolos tratados com HY 4% - (K) baixa e (L) alta magnitude. Os alvéolos de animais normais controle exibiram uma pequena formação de trabéculas ósseas, o que também é observado nos alvéolos tratados HY 2% e 4%. Os alvéolos tratados com HY 0,25%, HY 0,5% e HY 1% foram capazes de aumentar progressivamente o número de trabéculas ósseas neoformadas, com destaque para a concentração de 1%, que induziu a uma expressiva neoformação óssea em relação a alvéolos controles.

2.2 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo ósseo de animais diabéticos sete dias após as exodontias

As análises histológicas de alvéolos dentários de animais normais e diabéticos tratados ou não com HY ou com NTC-HY demonstraram um padrão histológico semelhante. Os alvéolos de animais normais controle, como já foi descrito acima, apresentaram-se preenchidos com um denso tecido conjuntivo e exibiram neoformação óssea escassa, com trabéculas imaturas e localizadas principalmente no terço apical dos alvéolos, próximas ao osso basal (Figura 11A e B). Os alvéolos de animais diabéticos não tratados apresentaram padrão histológico semelhante (Figura 11C e D), com uma formação óssea um pouco menos pronunciada em relação aos animais normais controle. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY (Figura 11E e F) ou NTC-HY (Figura 11G e H) não alterou este padrão, sendo observadas trabéculas ósseas escassas no terço apical dos alvéolos. O número de núcleos celulares nos alvéolos de animais normais controle apresentou-se elevado, com essa população celular concentrando-se, principalmente, no terço médio desses alvéolos (Figura 12A). Os alvéolos de animais diabéticos controle apresentaram padrão histológico semelhante (Figura 12B) e o tratamento de animais diabéticos com HY ou NTC-HY também não alterou este padrão (Figura 12C e D).

Análises qualitativas dos alvéolos demonstraram, em todos os grupos, reabsorção óssea do septo interradicular por osteoclastos (Figura 13A), além da presença de células com aspecto morfológico de osteoblastos depositando matriz óssea no interior dos alvéolos (Figura 13B). Além disso, foi observada a presença de vasos sanguíneos no interior de alvéolos de animais normais e diabéticos (Figura 13C).

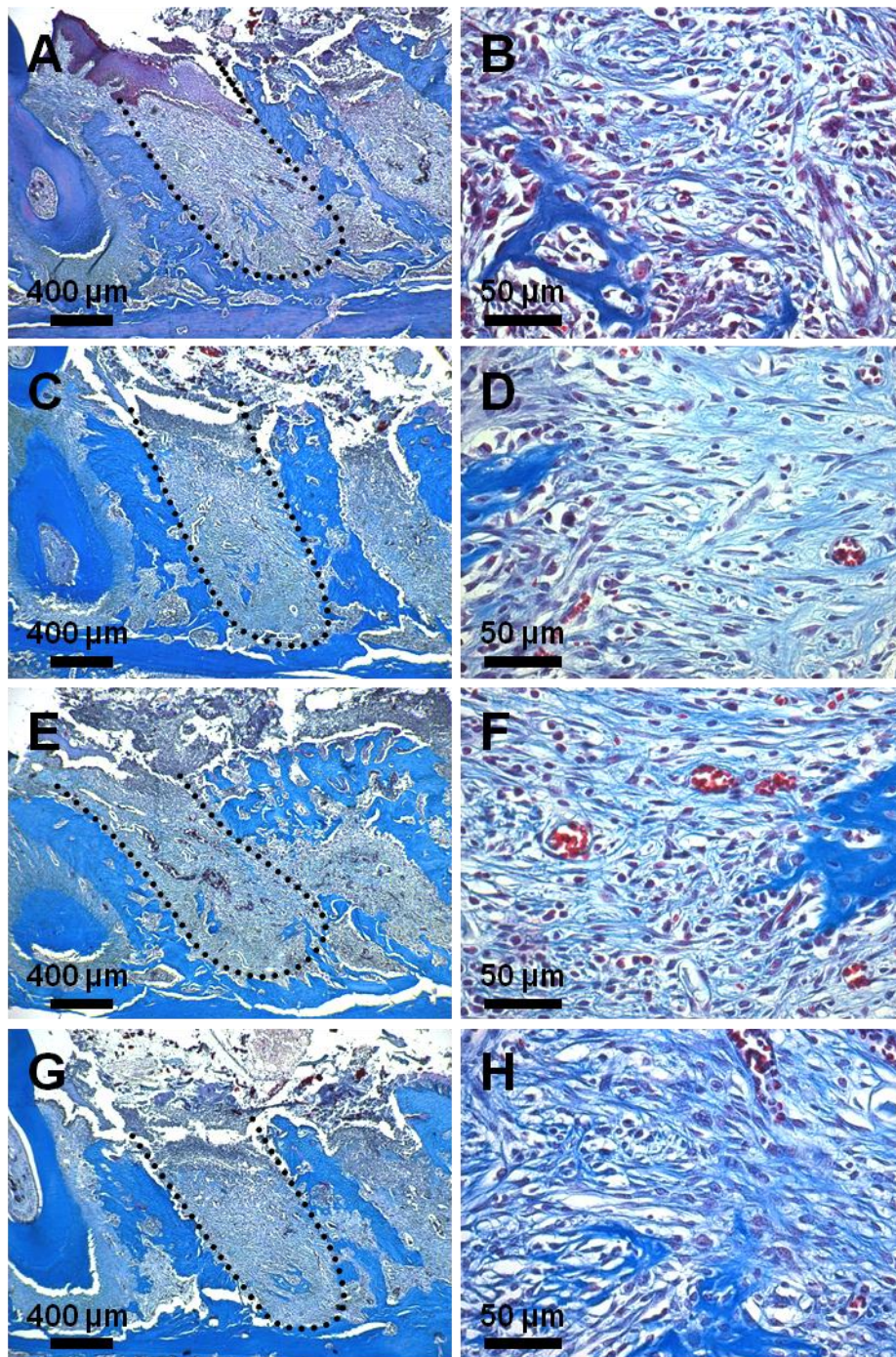


Figura 11: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de alvéolos de animais normais e diabéticos sete dias após as exodontias. Alvéolos de animais normais controle (tratados com carbopol) - **(A)** baixa magnitude e **(B)** alta magnitude; Alvéolos de animais diabéticos controle (tratados com carbopol) – **(C)** baixa e **(D)** alta magnitude; Alvéolos de animais diabéticos tratados com HY 1% – **(E)** baixa e **(F)** alta magnitude; Alvéolos tratados com NTC-HY 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – **(G)** baixa e **(H)** alta magnitude. Os alvéolos de animais normais controle exibiram uma pequena formação de trabéculas ósseas, o que também é observado nos alvéolos de animais diabéticos controle e o tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY ou NTC-HY não foi capaz de alterar este padrão.

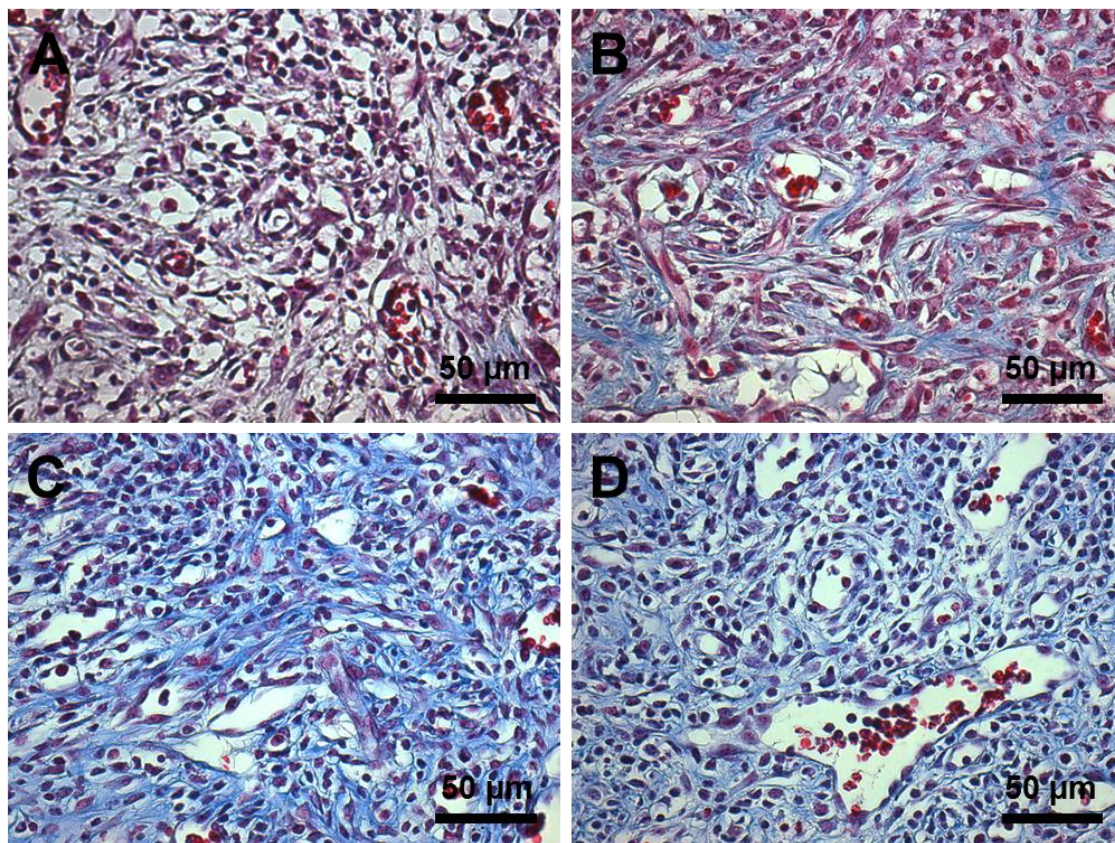


Figura 12: Análise de secções histológicas de alvéolos sete dias após as exodontias. Em **(A)** imagem representativa do número de núcleos celulares em alvéolos de animais normais controle, os quais apresentaram um número elevado de núcleos celulares. Os alvéolos de animais diabéticos controle **(B)**, também apresentaram um elevado número de núcleos celulares no interior dos alvéolos. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY **(C)** ou NTC-HY **(D)** não foi capaz de reduzir o número de núcleos celulares quando comparados aos grupos normal controle **(A)** e diabético controle **(B)**.

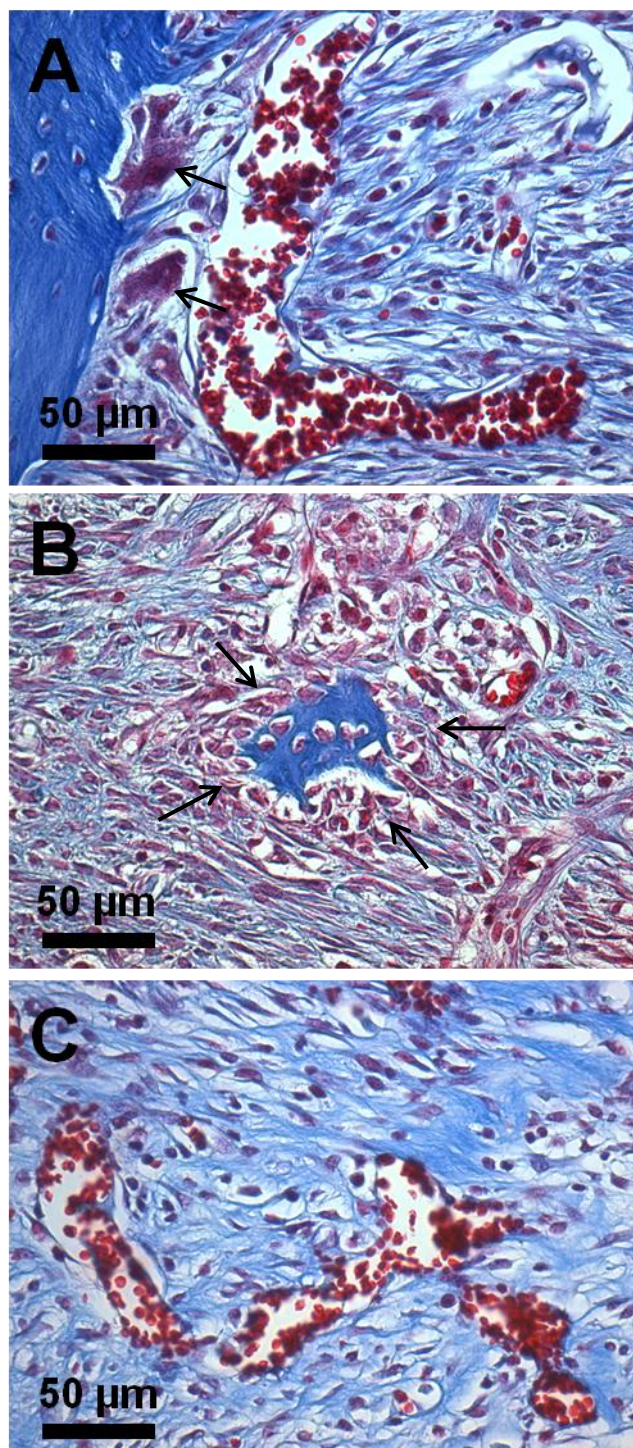


Figura 13: Análise histológica de alvéolos sete dias após as exodontias. **(A)** A reabsorção do septo interradicular por osteoclastos (indicados pelas setas) foi observada em todos os alvéolos (normais controle, diabéticos controle e diabéticos tratados com HY ou com NTC-HY). Em **(B)** células com aspecto morfológico de osteoblastos sintetizando matriz óssea no interior dos alvéolos, conforme indicado pelas setas, e em **(C)** presença de vasos sanguíneos neoformados no espaço medular dos alvéolos.

2.3 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo ósseo de animais diabéticos quatorze dias após as exodontias

Análises macroscópicas da epitelação das lesões cirúrgicas demonstraram uma epitelação bem mais pronunciada e acelerada em animais normais controle (Figura 14A), quando comparados aos diabéticos controle (Figura 14B). O tratamento de animais diabéticos com HY (Figura 14C – lado direito) ou NTC-HY (Figura 14D – lado direito) foi capaz de acelerar a epitelação da lesão cirúrgica quando comparado aos animais diabéticos controle, com destaque para os animais tratados com NTC-HY. O efeito de epitelação pode ser observado através do fechamento das bordas da lesão e consequente redução da área da mesma.

Microscopicamente, observou-se que os alvéolos de animais normais controle apresentavam-se tomados por uma grande trama de trabéculas ósseas maduras, espessas e bem organizadas, sendo observado espaço medular restrito no interior destes alvéolos (Figura 15A e B). Por outro lado, os alvéolos de animais diabéticos controle demonstravam severa redução da neoformação óssea em seu interior, sendo observadas trabéculas imaturas, que se concentravam preferencialmente no terço apical destes alvéolos, próximas aos septos interdental e interradicular (Figura 15C e D). O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY (Figura 15E e F) ou NTC-HY (Figura 15G e H) foi capaz de acelerar de forma contundente o reparo ósseo, sendo observada no interior destes alvéolos a presença de grande quantidade de trabéculas ósseas, maduras, espessas e bem organizadas. Essa neoformação óssea em alvéolos tratados ocorreu preferencialmente no terço apical dos mesmos, embora ambos os tratamentos tenham induzido uma formação óssea considerável também no terço médio dos alvéolos, principalmente o tratamento com NTC-HY.

Os alvéolos de animais diabéticos controle exibiram uma grande população celular em seu interior (Figura 16B), principalmente no terço médio dos mesmos, quando comparados com os alvéolos de animais normais controle (Figura 16A). O tratamento dos alvéolos com HY ou NTC-HY reduziu de forma significativa o número de núcleos celulares no interior dos mesmos (Figura 16C e D), demonstrando um padrão histológico semelhante aos de alvéolos de animais normais controle. Essas análises histológicas sugerem que

o processo de reparo tecidual encontra-se mais atrasado em animais diabéticos não tratados e que o tratamento com HY ou NTC-HY é capaz de acelerar de forma expressiva esse processo. Corroborando com as primeiras observações histológicas descritas acima, foi observado que alvéolos de animais diabéticos controle apresentavam pronunciada rede de vasos neoformados em seu interior (Figura 17B), sugerindo atraso importante no processo de reparo tecidual, uma vez que os animais normais controle e os diabéticos tratados com HY ou NTC-HY apresentaram, quatorze dias após as exodontias, uma menor quantidade de vasos sanguíneos e espaço medular restrito no interior dos alvéolos, decorrente da pronunciada neoformação óssea neste local (Figura 17C). Contudo estas foram observações histológicas, de caráter qualitativo, uma vez que não foi realizada quantificação de vasos sanguíneos no interior dos alvéolos. Além disso, também foi observada de forma qualitativa, em todos os alvéolos, reabsorção importante do septo interradicular por osteoclastos (Figura 17A).

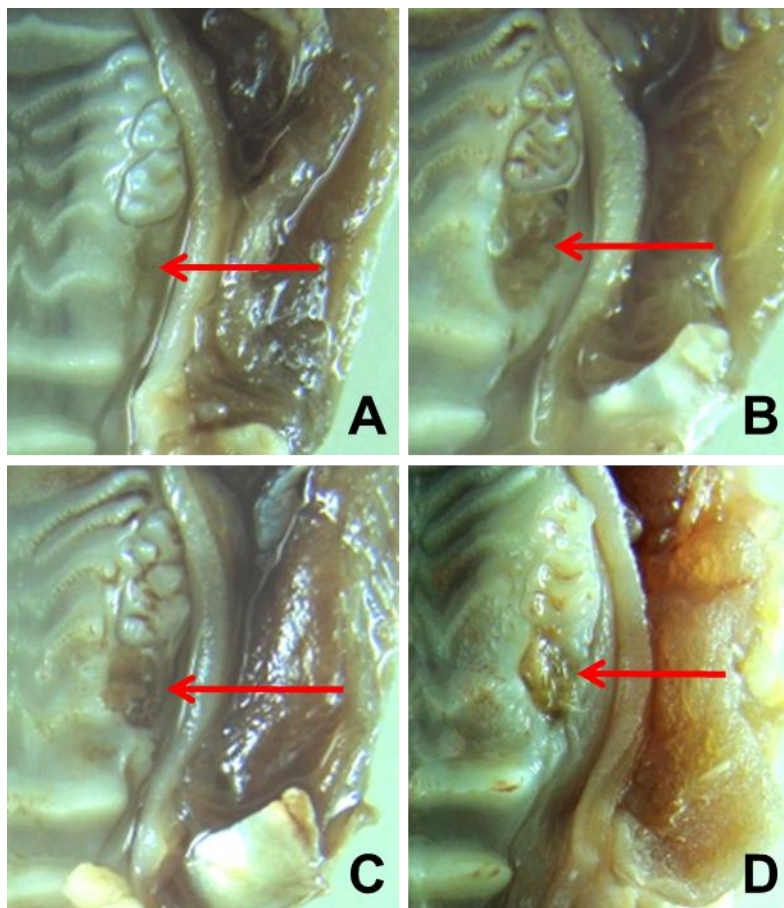


Figura 14: Análise macroscópica da epiteliação das lesões cirúrgicas quatorze dias após as exodontias. Observou-se uma epiteliação reduzida nos animais diabéticos controle (**B**) quando comparados com os animais normais controle (**A**). Os tratamentos com HY 1% (**C**) e NTC-HY (100 µg/mL) (**D**) aceleraram a epiteliação das lesões pós-cirúrgicas, com destaque para o tratamento com NTC-HY. As setas estão destacando as áreas de lesão.

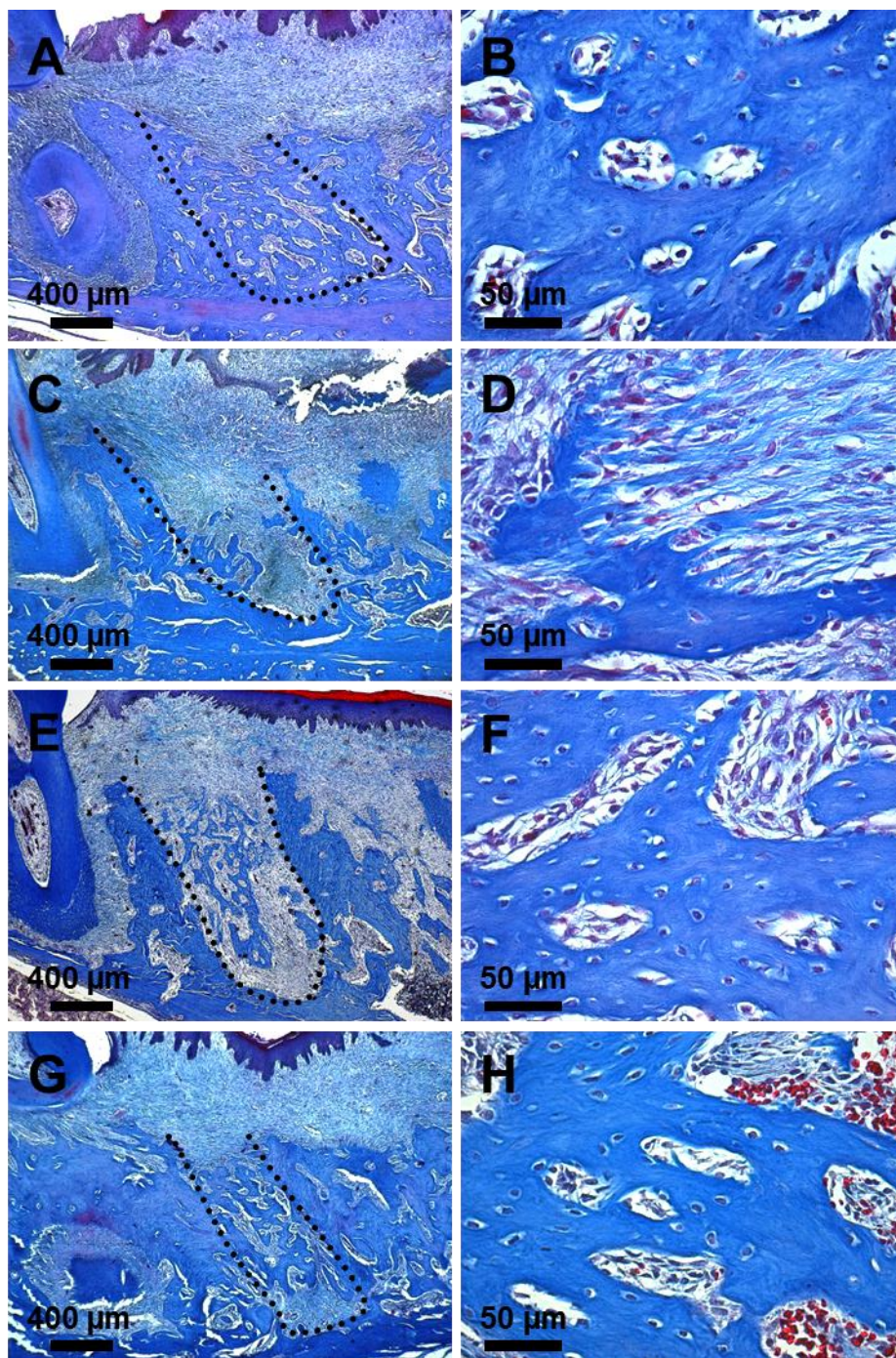


Figura 15: Fotomicrografias representativas de seções histológicas de alvéolos de animais normais e diabéticos quatorze dias após as exodontias. Alvéolos de animais normais controle (tratados com carbopol) - (A) baixa magnitude e (B) alta magnitude; Alvéolos de animais diabéticos controle (tratados com carbopol) - (C) baixa e (D) alta magnitude; Alvéolos de animais diabéticos tratados com HY 1% - (E) baixa e (F) alta magnitude; Alvéolos tratados com NTC-HY 100 μg/mL - (G) baixa e (H) alta magnitude. Os alvéolos de animais diabéticos controle apresentaram uma formação de trabéculas ósseas significativamente menor em relação aos alvéolos dos animais normais controle e os tratamentos dos alvéolos de animais diabéticos com HY ou NTC-HY aumentou de forma significativa a neof ormation óssea quando comparados aos alvéolos de animais diabéticos controle.

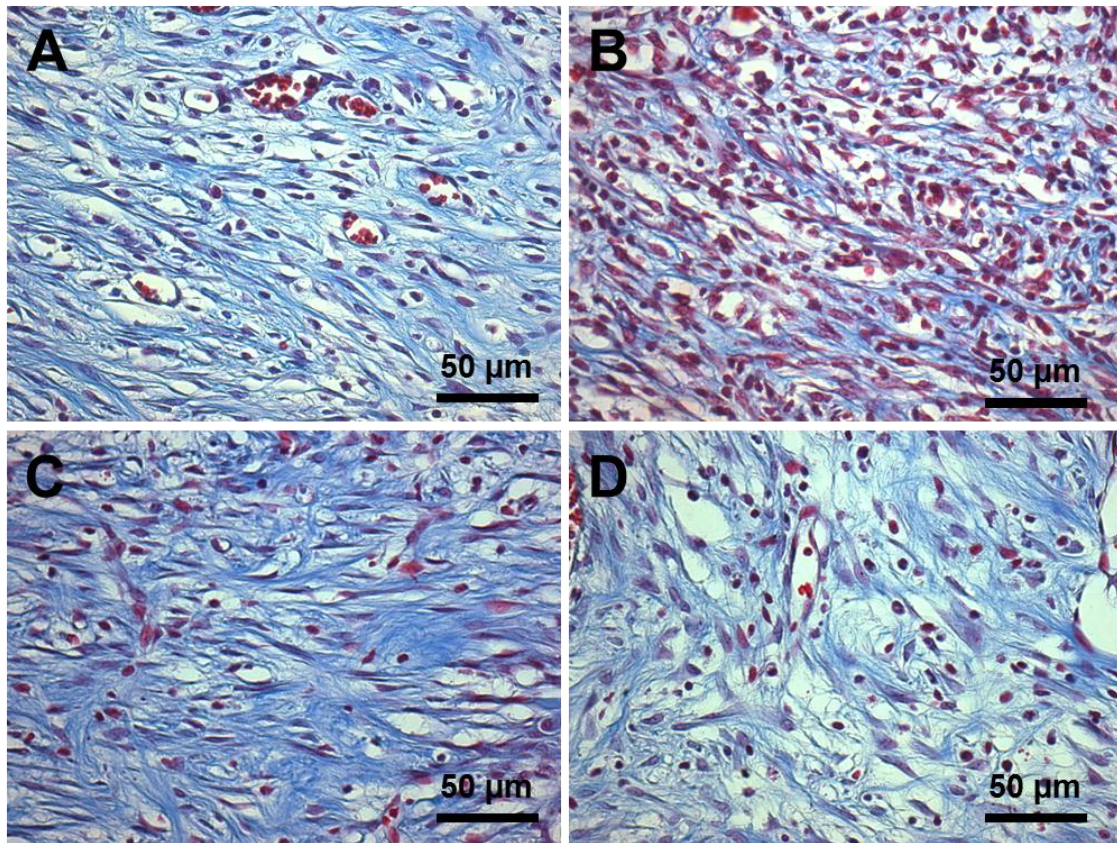


Figura 16: Análise de seções histológicas de alvéolos quatorze dias após as exodontias. Em **(B)** imagem representativa de alvéolos de animais diabéticos controle, os quais apresentavam um número de núcleos celulares muito elevado em relação aos alvéolos dos animais normais controle **(A)**. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY **(C)** ou NTC-HY **(D)** foi capaz de reduzir significativamente o número de núcleos celulares, sendo que esses animais apresentavam um padrão histológico semelhante aos animais normais controle **(A)**.

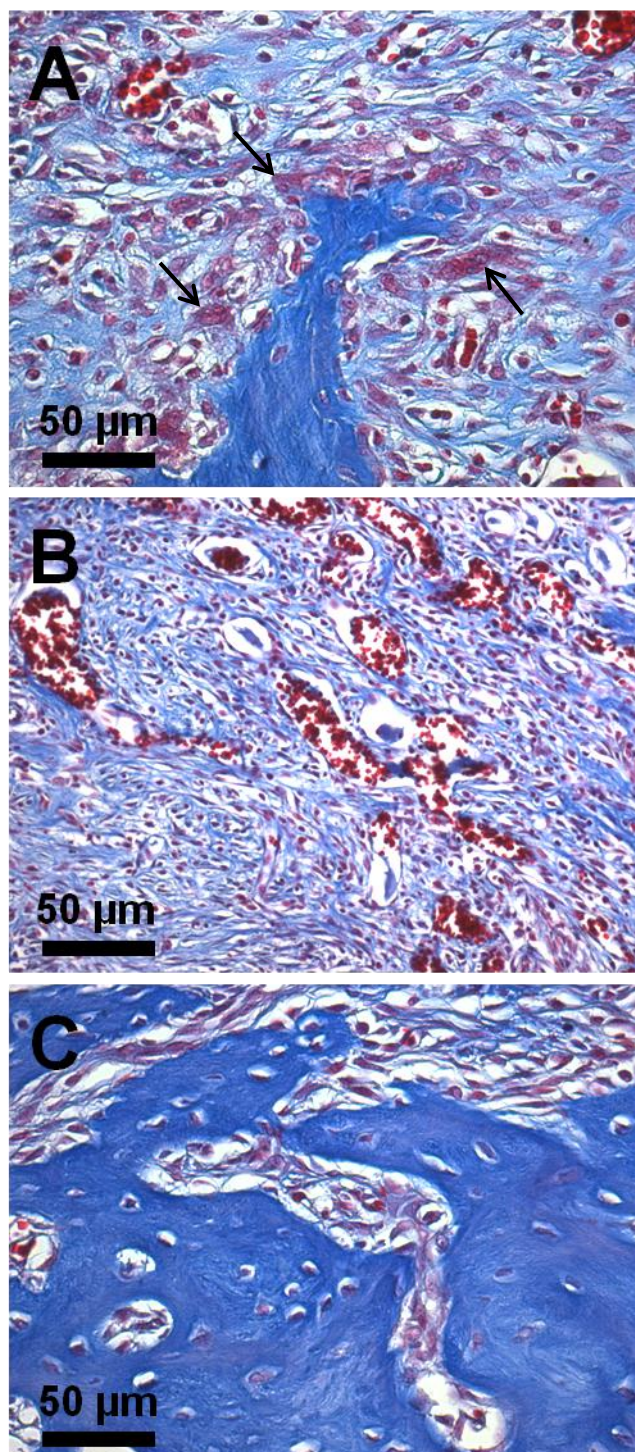


Figura 17: Análise histológica de alvéolos quatorze dias após as exodontias. **(A)** A reabsorção do septo interradicular por osteoclastos, indicados pelas setas, foi observada em todos os alvéolos (normais controle e diabéticos controle e tratados com HY ou NTC-HY) e apresenta-se bem pronunciada nesta cronologia. Em **(B)** é ilustrada a cavidade alveolar de um animal diabético controle, onde foi observada pouca formação óssea e pronunciada rede vascular, sugerindo um atraso no processo de reparo tecidual. Em **(C)** – diabético tratado com NTC-HY) estão representadas em conjunto as cavidades alveolares de animais normais controles e dos diabéticos tratados com HY ou NTC-HY, onde foi observada expressiva neoformação óssea e espaço medular reduzido.

3. Análise morfométrica

3.1 Definição da concentração do HY

Previamente à execução dos experimentos com os animais diabéticos, foi realizado em animais normais uma avaliação dos efeitos de diferentes concentrações do HY (0,25%, 0,5%, 1%, 2% e 4%) no reparo ósseo de alvéolos dentários 7 dias após as exodontias. Foi observado um percentual médio de neoformação de trabéculas ósseas de $6,15 \pm 1,96\%$ nos alvéolos tratados com carbopol (controle) e os tratamentos com as concentrações de 0,25% ($9,74 \pm 1,90\%$), 0,5% ($9,60 \pm 3,26\%$) e 1% ($15,21 \pm 2,00\%$) de HY foram capazes de aumentar progressivamente a formação de novas trabéculas nos alvéolos. Contudo, apenas os alvéolos tratados com a concentração de 1% apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação àqueles tratados com carbopol. Os alvéolos tratados com as concentrações de 2% ($6,72 \pm 1,78\%$) e 4% ($8,31 \pm 1,49\%$) de HY apresentaram valores semelhantes de formação de novas trabéculas ósseas quando comparado aos alvéolos controle (Figura 18A). Em relação ao número de núcleos celulares, o valor médio nos alvéolos controle foi de $8.243 \pm 0,58$ núcleos e o tratamento com as diferentes concentrações de HY foi capaz de reduzir o número de núcleos celulares no interior dos alvéolos, com destaque para as concentrações de 0,25% ($5.943 \pm 0,31$ núcleos) e 1% ($5.671 \pm 0,38$ núcleos), que apresentaram redução estatisticamente significativa em relação aos alvéolos controles (Figura 18B). Ao analisar o terço apical dos alvéolos, foi observado um percentual médio de neoformação de trabéculas ósseas de $8,21 \pm 2,99\%$ nos alvéolos tratados com carbopol e os tratamentos com as concentrações de 0,25% ($12,53 \pm 3,18\%$) e 0,5% ($12,85 \pm 3,42\%$) de HY aumentaram discretamente a neoformação óssea em relação aos alvéolos controles. Já a concentração de 1% de HY ($21,07 \pm 2,90\%$) foi capaz de aumentar significativamente a formação óssea no terço apical dos alvéolos. Em relação ao número de núcleos celulares, o valor médio nos alvéolos controles foi de $8.130 \pm 0,47$ núcleos, e o tratamento com as diferentes concentrações de HY reduziu o número de núcleos no interior dos alvéolos, com destaque para a concentração de 1% ($5.530 \pm 0,50$ núcleos), que apresentou valores estatisticamente menores que àqueles observados nos alvéolos controles (Tabela 2). Na análise

do terço médio, observou-se um percentual médio de trabéculas neoformadas de $4,10 \pm 2,11\%$ nos alvéolos controle e os tratamentos com as diferentes concentrações de HY não foram capazes de aumentar de forma significativa a formação óssea no interior dos alvéolos. Contudo, é importante destacar que os alvéolos tratados com HY na concentração de 1%, apresentaram uma maior média de neoformação óssea em comparação aos demais grupos também no terço médio, embora os valores não sejam diferentes estatisticamente. O valor médio de núcleos celulares no terço médio de alvéolos controles foi de $8.390 \pm 0,82$ núcleos e os tratamentos com as referidas concentrações de HY reduziram o número de núcleos no interior dos alvéolos, com destaque para as concentrações de 0,25 % ($5.843 \pm 0,32$ núcleos) e 1% ($5.800 \pm 0,42$ núcleos). No entanto, não existiram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 2).

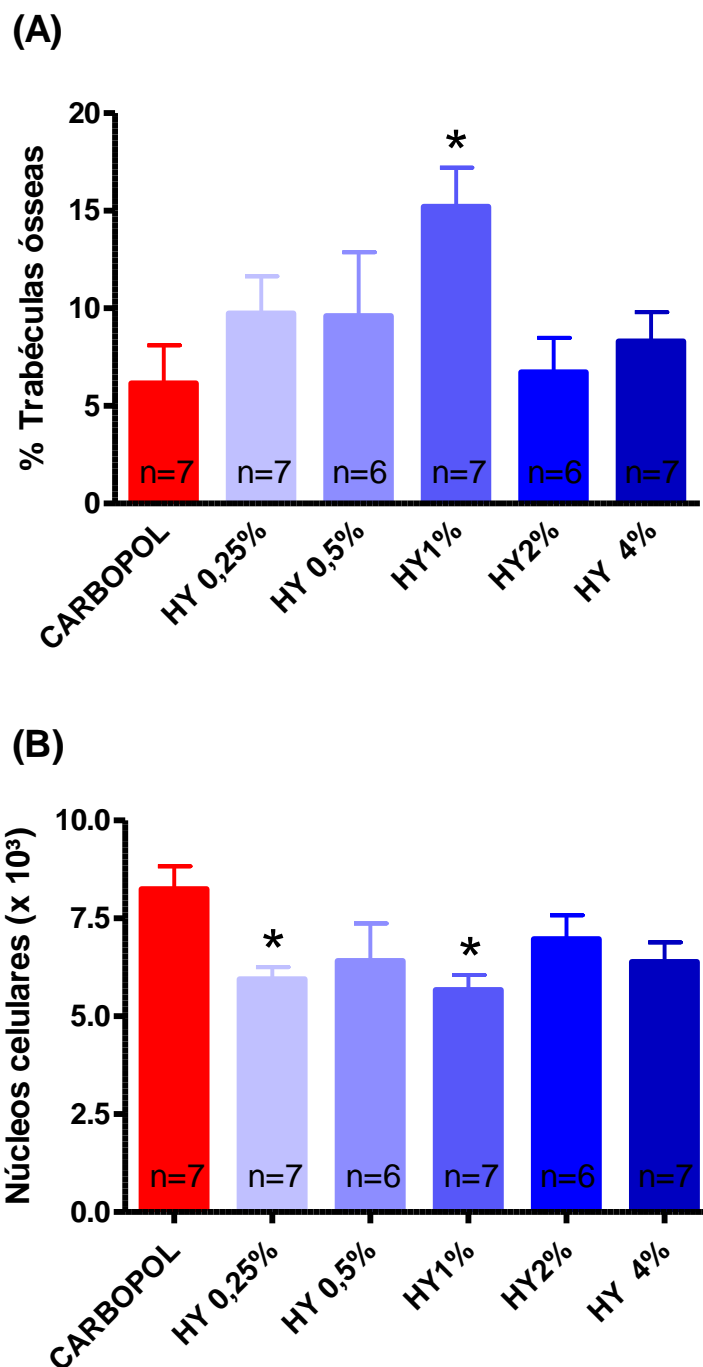


Figura 18: Efeitos de diferentes concentrações de HY no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos normais, sete dias após as exodontias. **(A)** Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. **(B)** Número de núcleos celulares. Os tratamentos com as concentrações de 0,25%, 0,5% e 1% foram capazes de aumentar progressivamente o número de trabéculas neoformadas quando comparado aos alvéolos controle. Os tratamentos também foram capazes de reduzir o número de núcleos celulares no interior dos alvéolos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. Carbopol. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Tabela 2: Percentual de trabéculas ósseas e número de núcleos celulares nos terços apical e médio dos animais controle (tratados com carbopol) e tratados com diferentes concentrações de HY.

	Terço Apical		Terço Médio	
	Trabéculas (%)	Núcleos Celulares ($\times 10^3$)	Trabéculas (%)	Núcleos Celulares ($\times 10^3$)
Carbopol	8,21 \pm 2,99	8,13 \pm 0,47	4,10 \pm 2,11	8,39 \pm 0,82
HY 0,25%	12,53 \pm 3,18	6,06 \pm 0,38	6,95 \pm 2,23	5,84 \pm 0,32
HY 0,5%	12,85 \pm 3,42	6,21 \pm 0,86	6,85 \pm 3,09	6,64 \pm 1,03
HY 1%	21,07 \pm 2,90 *	5,53 \pm 0,50 #	9,35 \pm 4,86	5,80 \pm 0,42
HY 2%	9,15 \pm 2,01	6,65 \pm 0,81	4,29 \pm 2,22	7,25 \pm 0,49
HY 4%	10,08 \pm 1,93	6,54 \pm 0,45	6,55 \pm 1,91	6,30 \pm 0,57

Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. carbopol, HY 2% e HY 4%, # $p < 0,05$ vs. Carbopol.

3.2 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo de alvéolos dentários de ratos diabéticos após sete dias da exodontia

Após 7 dias da extração dentária, não foram observadas diferenças significativas entre os alvéolos de animais normais controle e diabéticos controle, ambos tratados com carbopol, na neoformação de trabéculas ósseas (5,97 \pm 2,34% em normais controle vs. 3,24 \pm 0,86% em diabéticos controle, Figura 19A) e no número de núcleos celulares (7.633 \pm 0,75 núcleos em normais controle vs. 7.133 \pm 0,28 núcleos em diabéticos controle, Figura 19B). O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY ou com NTC-HY não foi capaz de alterar a formação de trabéculas (1,64 \pm 0,55% em diabéticos tratados com HY e 5,02 \pm 3,01% em diabéticos tratados com NTC-HY, Figura 19A) e o número de núcleos celulares (7.217 \pm 0,43 núcleos em diabéticos tratados com HY e 7.550 \pm 0,41 núcleos em diabéticos tratados com NTC-HY, Figura 19B) em relação aos alvéolos de animais diabéticos controle 7 dias após as exodontias dos primeiros molares. Ao analisar o terço apical dos alvéolos, os animais normais controle apresentaram um percentual médio de 8,81 \pm 3,48% de neoformação de trabéculas ósseas no interior dos alvéolos. Os

animais diabéticos controle apresentaram uma discreta redução na formação óssea ($5,87 \pm 1,48\%$) quando comparado com os animais normais. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY ($2,72 \pm 0,94\%$) ou NTC-HY ($3,99 \pm 1,63\%$) não foi capaz de aumentar os parâmetros de formação óssea no terço apical. O número médio de núcleos celulares no terço apical dos alvéolos de animais controle foi $7.733 \pm 0,75$ núcleos e os animais diabéticos controle ($7.350 \pm 0,35$ núcleos) ou tratados com HY ($7.717 \pm 0,45$ núcleos) ou com NTC-HY ($7.825 \pm 0,27$ núcleos) apresentaram valores semelhantes (Tabela 3). No terço médio dos alvéolos, o percentual médio de neoformação óssea nos animais normais controle foi de $3,12 \pm 2,22\%$ e os animais diabéticos controle ($0,62 \pm 0,40\%$) ou tratados com HY ($0,55 \pm 0,34\%$) apresentaram valores bem reduzidos de formação óssea nessa região do alvéolo. Já os animais diabéticos tratados com NTC-HY apresentaram um discreto aumento ($6,06 \pm 4,60\%$) da formação óssea nessa região, superando inclusive os valores de formação apresentados pelos animais normais controle. O número médio de núcleos celulares nos alvéolos de animais normais controle foi $7.517 \pm 0,80$ núcleos e os animais diabéticos controle ($6.917 \pm 0,20$ núcleos) ou tratados com HY ($6.733 \pm 0,39$ núcleos) ou com NTC-HY ($7.225 \pm 0,66$ núcleos) apresentaram valores semelhantes (Tabela 3).

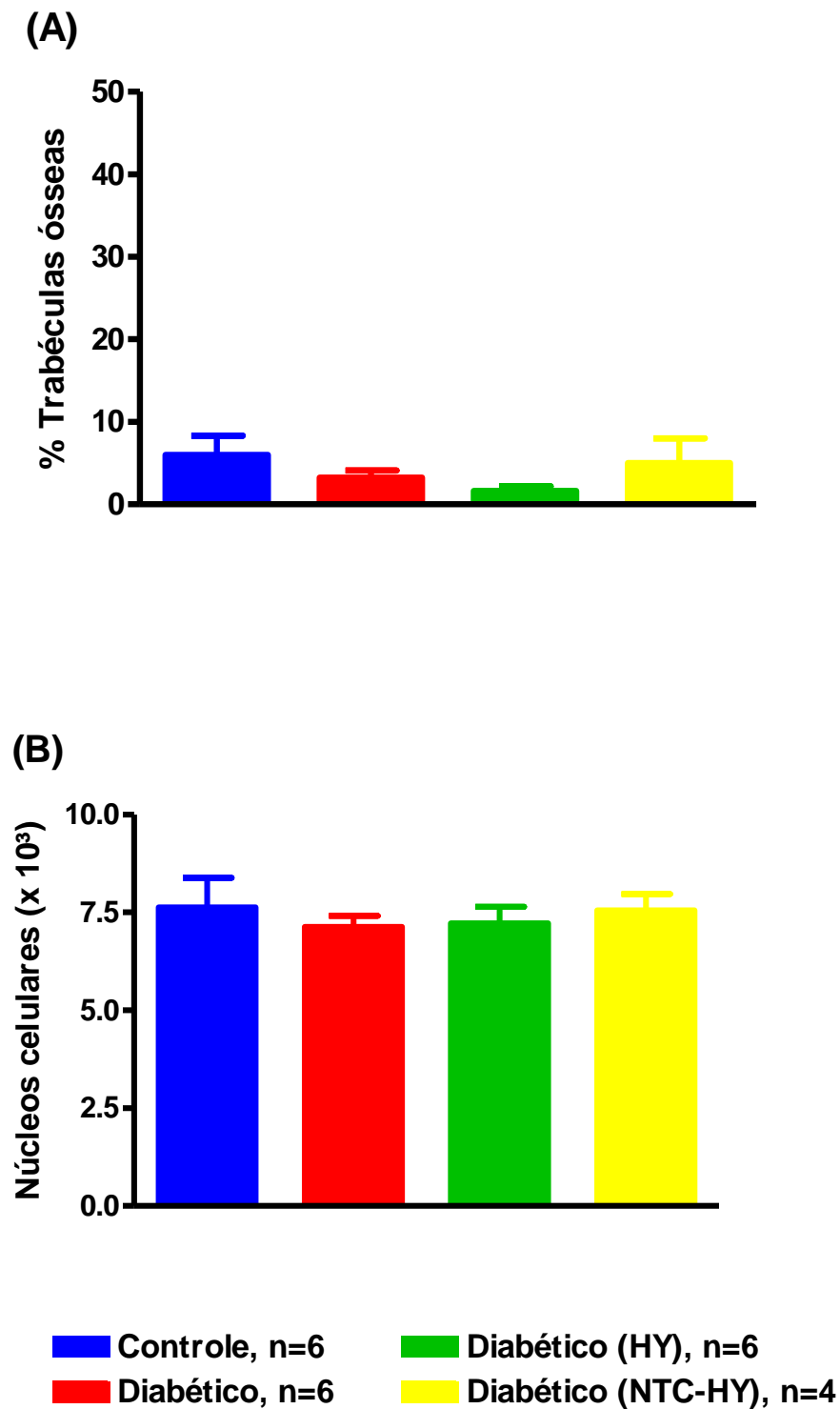


Figura 19: Efeitos do HY 1% e dos NTC-HY 100 µg/ml no reparo ósseo de alvéolos dentários sete dias após as exodontias. (A) Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. (B) Número de núcleos celulares. O diabetes mellitus provoca uma discreta redução na formação de trabéculas em relação aos controles normais e os tratamentos propostos não foram capazes de aumentar esse parâmetro. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Tabela 3: Percentual de trabéculas ósseas e número de núcleos celulares nos terços apical e médio dos animais normais controle, diabéticos controle e tratados com HY ou NTC-HY, sete dias após as exodontias.

	Terço Apical		Terço Médio	
	Trabéculas (%)	Núcleos Celulares ($\times 10^3$)	Trabéculas (%)	Núcleos Celulares ($\times 10^3$)
Normal Controle	8,81 \pm 3,48	7,73 \pm 0,75	3,12 \pm 2,22	7,51 \pm 0,80
Diabético Controle	5,87 \pm 1,48	7,35 \pm 0,35	0,62 \pm 0,40	6,91 \pm 0,20
Diabético tratado (HY)	2,72 \pm 0,94	7,71 \pm 0,45	0,55 \pm 0,34	6,73 \pm 0,39
Diabético tratado (NTC-HY)	3,99 \pm 1,63	7,82 \pm 0,27	6,06 \pm 4,60	7,22 \pm 0,66

Os dados estão expressos como média \pm E.P.M.

3.3 Efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo de alvéolos dentários de ratos diabéticos após quatorze dias da exodontia

A análise macroscópica da área de lesão externa pós-cirúrgica demonstrou uma grande diferença, estatisticamente significativa, entre a epitelação nos animais normais controle e diabéticos controle ($0,79 \pm 0,40$ mm² nos animais normais controle vs. $6,49 \pm 0,62$ mm² nos animais diabéticos controle, Figura 20) 14 dias após as exodontias. Apenas o tratamento de ratos diabéticos com NTC-HY foi capaz de acelerar de forma significativa a epitelação das áreas de lesão ($2,63 \pm 0,94$ mm²) em relação aos ratos diabéticos controle. Apesar do tratamento de ratos diabéticos com HY ($4,00 \pm 1,24$ mm²) também ter estimulado a aceleração da epitelação, este efeito não alcançou diferença estatística (Figura 20).

Microscopicamente, foram observadas diferenças significativas entre os alvéolos de animais normais controle e diabéticos controle na neoformação de trabéculas ósseas ($41,92 \pm 6,34$ % em normais controle vs. $11,16 \pm 5,10$ % em diabéticos controle, Figura 21A) e no número de núcleos celulares ($5.033 \pm 0,46$ núcleos em normais controle vs. $7.540 \pm 0,78$ núcleos em diabéticos controle, Figura 21B) 14 dias após as exodontias. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY ou com NTC-HY acelerou de forma significativa a

formação de trabéculas ($29,43 \pm 3,29$ % em diabéticos tratados com HY e $36,90 \pm 3,07$ % em diabéticos tratados com NTC-HY, Figura 21A) e reduziu também significativamente o número de núcleos celulares ($5.740 \pm 0,42$ núcleos em diabéticos tratados com HY e $5.460 \pm 0,33$ núcleos em diabéticos tratados com NTC-HY, Figura 21B) em relação aos alvéolos de animais diabéticos controle 14 dias após as exodontias. Ao analisar isoladamente o terço apical dos alvéolos, observou-se uma diferença significativa no percentual de trabéculas ósseas entre os alvéolos de animais normais controle e diabéticos controle ($40,60 \pm 4,86$ % em normais controle vs. $16,56 \pm 7,19$ % em diabéticos controle) e no número de núcleos celulares ($5.000 \pm 0,44$ núcleos em normais controle vs. $7.580 \pm 0,75$ núcleos em diabéticos controle). O tratamento de animais diabéticos com HY ou NTC-HY acelerou de forma significativa a neoformação de trabéculas ósseas ($34,89 \pm 5,33$ % em diabéticos tratados com HY e $38,20 \pm 1,13$ % em diabéticos tratados com NTC-HY) e reduziu também significativamente o número de núcleos celulares ($5.320 \pm 0,53$ núcleos em diabéticos tratados com HY e $5.440 \pm 0,26$ núcleos em diabéticos tratados com NTC-HY) (Tabela 4). Já no terço médio, também se observou uma diferença significativa no percentual de neoformação óssea entre os alvéolos de animais normais controle e diabéticos controle ($43,25 \pm 8,38$ % em animais normais controle vs. $5,76 \pm 3,45$ % em diabéticos controle) e no número de núcleos celulares ($5.033 \pm 0,54$ núcleos em animais normais controle vs. $7.520 \pm 0,88$ núcleos em animais diabéticos controle). O tratamento de animais diabéticos com HY ou NTC-HY foi capaz de aumentar a formação de trabéculas ósseas ($23,96 \pm 4,32$ % em diabéticos tratados com HY e $35,59 \pm 6,30$ % em diabéticos tratados com NTC-HY), sendo que apenas o tratamento com NTC-HY foi capaz de aumentar significativamente esse parâmetro em relação aos animais diabéticos controle. Além disso, o tratamento de animais diabéticos com HY ou NTC-HY foi capaz de reduzir o número de núcleos celulares ($6.220 \pm 0,52$ núcleos em diabéticos tratados com HY e $5.480 \pm 0,45$ núcleos em diabéticos tratados com NTC-HY), embora esses valores não tenham apresentado diferença estatística em relação aos diabéticos controle (Tabela 4).

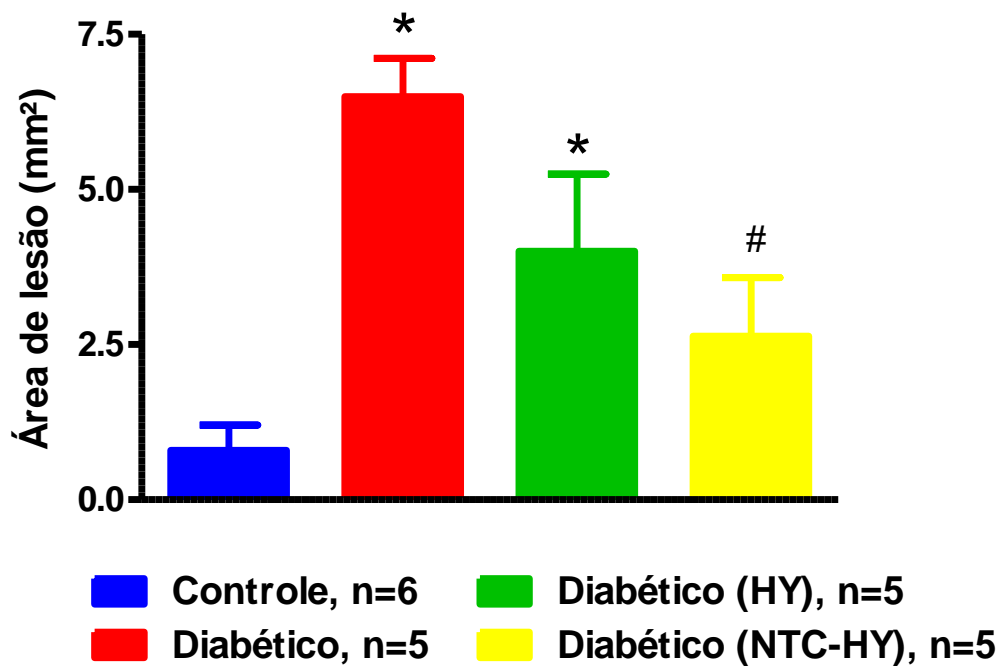


Figura 20: Efeitos do HY e dos NTC-HY na epitelação da lesão externa pós-cirúrgica quatorze dias após a exodontia. A epitelação mostrou-se significativamente reduzida nos animais diabéticos controle quando comparados com os animais normais controle. Os tratamentos de alvéolos de animais diabéticos com HY ou com NTC-HY foram capazes de acelerar a epitelação das lesões, sendo que apenas o grupo tratado com NTC-HY apresentou redução significativa quando comparado ao grupo diabético controle. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. Normais controle; # $p < 0,05$ vs. Diabéticos controle. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

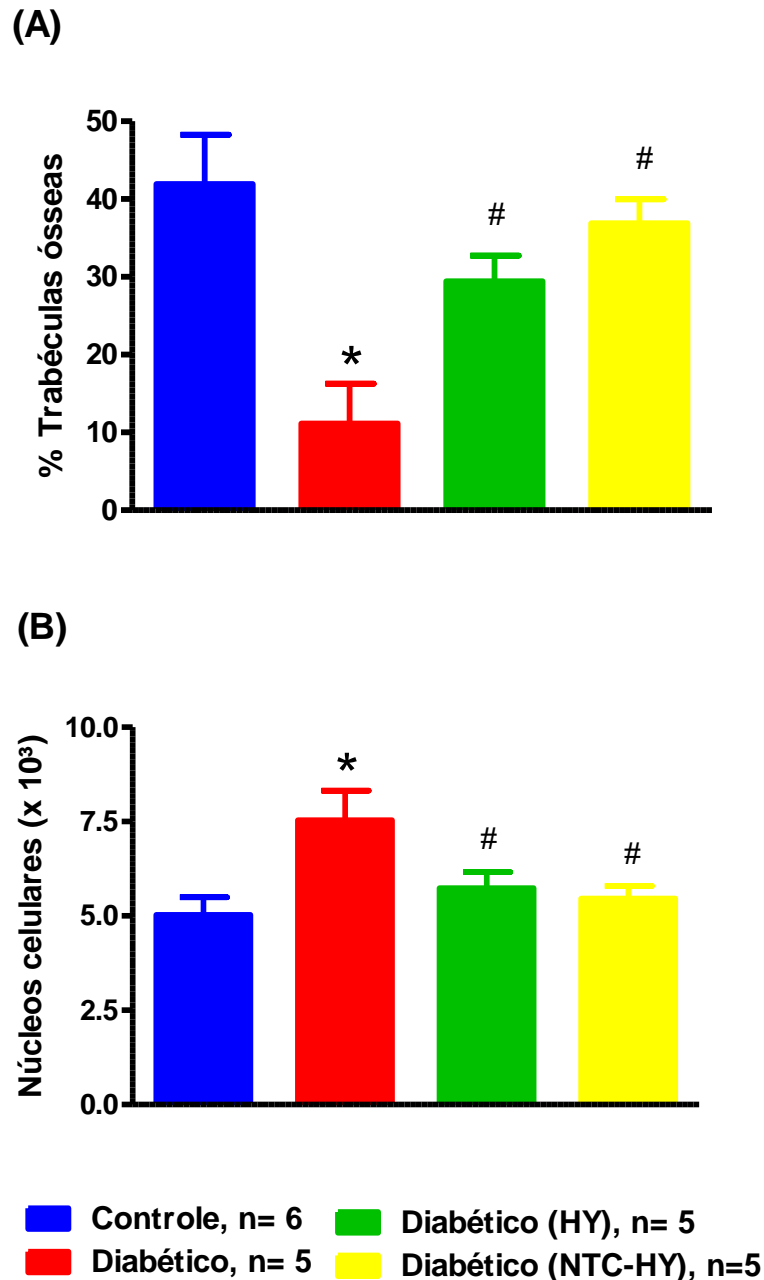


Figura 21: Efeitos do HY 1% e dos NTC-HY 100 $\mu\text{g/ml}$ no reparo ósseo de alvéolos dentários quatorze dias após as exodontias. **(A)** Quantificação do percentual de trabéculas ósseas. **(B)** Número de núcleos celulares. O diabetes mellitus causou uma redução significativa na formação de trabéculas em relação aos animais normais controle e os tratamentos propostos aumentaram significativamente a neoformação de trabéculas no interior dos alvéolos de ratos diabéticos. Em relação ao número de núcleos celulares, os animais diabéticos apresentaram uma contagem significativamente maior em relação aos normais controle e os tratamentos foram capazes de reduzir também de forma significativa essa contagem, atingindo valores semelhantes aqueles apresentados pelos animais normais controle. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. Normais controle; # $p < 0,05$ vs. Diabéticos controle. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Tabela 4: Percentual de trabéculas ósseas e número de núcleos celulares nos terços apical e médio dos animais normais controle, diabéticos controle e tratados com HY ou NTC-HY, quatorze dias após as exodontias.

	Terço Apical		Terço Médio	
	Trabéculas (%)	Núcleos Celulares ($\times 10^3$)	Trabéculas (%)	Núcleos Celulares ($\times 10^3$)
Normal Controle	40,60 \pm 4,86 *	5,00 \pm 0,44 *	43,25 \pm 8,38 *	5,03 \pm 0,54 *
Diabético Controle	16,56 \pm 7,19	7,58 \pm 0,75	5,76 \pm 3,45	7,52 \pm 0,88
Diabético tratado (HY)	34,89 \pm 5,33 *	5,32 \pm 0,53 *	23,96 \pm 4,32	6,22 \pm 0,52
Diabético tratado (NTC-HY)	38,20 \pm 1,13 *	5,44 \pm 0,26 *	35,59 \pm 6,30 *	5,48 \pm 0,45

Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. Diabéticos controle.

VI. DISCUSSÃO

Nosso grupo de pesquisa vem estudando há algum tempo os efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos, obtendo resultados expressivos (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010). Contudo, esses resultados foram obtidos em animais normais. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Está bem estabelecido na literatura que o diabetes mellitus altera significativamente o metabolismo ósseo, comprometendo a formação e a reabsorção óssea (Devlin *et al.*, 1996; Shyng *et al.*, 2001; Mishima *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2007). Essas observações são importantes uma vez que após a perda de um dente, o osso alveolar na área edêntula é reabsorvido de forma progressiva e irreversível (Bodic *et al.*, 2005). Os efeitos deletérios do diabetes mellitus podem agravar ainda mais o comprometimento do osso alveolar, dificultando e prolongando procedimentos de reabilitação protética. Dessa forma, nossos resultados obtidos com o uso do HY/NTC-HY em alvéolos de ratos diabéticos ampliam as perspectivas da aplicabilidade destes biomateriais em Odontologia, pois estamos incluindo em suas indicações uma situação (diabetes) onde há uma dificuldade no reparo ósseo.

Neste estudo, foi utilizado o modelo de indução química do diabetes mellitus através do uso da estreptozotocina. O sucesso do modelo experimental foi confirmado através dos altos valores de glicemia observados e da evolução de peso pouco expressiva nos grupos de animais diabéticos. Estes dados corroboram com a literatura, que relata o aumento significativo dos valores glicêmicos e uma tendência de manutenção ou perda de peso em animais diabéticos (Mishima *et al.*, 2002; Hamada *et al.*, 2007).

Demonstramos de forma inédita o efeito de várias concentrações de HY (0,25%, 0,5%, 1%, 2% e 4%) no reparo ósseo de alvéolos dentários de ratos normais, sete dias após as exodontias. As concentrações de 0,25%, 0,5% e 1% foram capazes de aumentar a neoformação de trabéculas ósseas no interior dos alvéolos tratados, sendo a concentração de 1% a única a apresentar diferença significativa em relação aos alvéolos controle, tratados

com carbopol. As concentrações de 2% e 4% induziram uma discreta alteração na neoformação óssea, apresentando valores semelhantes àqueles apresentados nos alvéolos controle. Estes resultados corroboram com estudos prévios realizados em nosso laboratório, onde a utilização do HY na concentração de 1% foi efetivo em acelerar a neoformação óssea em alvéolos dentários de animais normais (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010). No entanto, nesses trabalhos não foi investigada a influência de outras concentrações de HY no reparo ósseo. Em relação ao número de núcleos celulares, todas as concentrações de HY foram capazes de reduzir a população celular no interior dos alvéolos tratados, quando comparados aos alvéolos controles, com destaque para as concentrações de 0,25% e 1%. A eficácia da concentração de 1% na redução do número de núcleos foi descrita previamente e corrobora com nossos dados (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010). Estes resultados evidenciam que o reparo tecidual encontra-se mais acelerado nos alvéolos tratados, em comparação aos controles. A redução das concentrações de HY para valores abaixo de 1% tornaram o gel mais fluido, o que pode ter dificultado a permanência do mesmo no interior dos alvéolos após as exodontias. De forma inversa, o aumento das concentrações de HY para valores acima de 1% tornaram o gel bem mais viscoso, o que pode ter comprometido o preenchimento correto dos alvéolos com os géis após as exodontias. Os géis mais viscosos (2% e 4%) também podem ter funcionado como uma barreira mecânica, prejudicando os processos de migração, proliferação e diferenciação celular, comprometendo assim, o processo de reparo tecidual. Portanto, após a análise destes dados, podemos concluir que o HY na concentração de 1% foi o mais efetivo para promover a aceleração do reparo ósseo no modelo de alvéolos dentários de ratos.

Os resultados referentes ao efeito do HY e dos NTC-HY no reparo tecidual de animais diabéticos sete dias após as exodontias demonstram que o diabetes mellitus foi capaz de inibir a neoformação óssea, sendo observados resultados distintos daqueles obtidos nos animais normais (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010). Conforme descrito previamente na literatura, os animais normais (não diabéticos) cujos alvéolos não são tratados com HY ou NTC-HY apresentam discreta neoformação óssea no interior dos alvéolos (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010). Análises histológicas desses

animais demonstraram que os alvéolos apresentam-se preenchidos por uma trama de tecido conjuntivo, exibindo poucas trabéculas ósseas, que se concentram mais frequentemente no terço apical desses alvéolos (Mendes et al., 2008; Mendes et al., 2010). Nossos resultados corroboram esses achados. Já nos animais diabéticos tratados com carbopol, foi observada uma discreta redução na neoformação óssea em comparação com os alvéolos de animais normais. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que relata um comprometimento no processo de remodelação óssea decorrente do diabetes mellitus em tecidos periodontais. Análises histomorfométricas da parede do alvéolo da raiz distal do primeiro molar mandibular revelaram uma redução significativa tanto na formação quanto na reabsorção óssea em animais diabéticos não controlados quando comparados com animais normais (Mishima et al., 2002). Análises histológicas de alvéolos dentários de animais diabéticos sete dias após exodontias de dentes molares maxilares demonstraram extensiva reabsorção dos septos alveolares, presença de infiltrado inflamatório ativo, crônico e denso, além de ausência de formação óssea intramembranosa evidente (Devlin et al., 1996). Nossos resultados também mostraram a presença de grande população celular no interior de alvéolos de animais diabéticos, assim como reabsorção óssea evidente dos septos alveolares, principalmente do septo interradicular. Entretanto, o tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY ou NTC-HY não foi capaz de acelerar a neoformação óssea e reduzir o número de células nessa região. Uma possível explicação para este resultado é que o período de sete dias foi muito curto para permitir o aparecimento de um nítido efeito do diabetes no reparo alveolar.

Após quatorze dias da realização das exodontias, observamos resultados significativos decorrentes do tratamento dos alvéolos com HY ou NTC-HY. Macroscopicamente, observou-se uma menor epitelização da lesão cirúrgica nos animais diabéticos controle em relação aos normais controle, ambos tratados com carbopol. Já os animais diabéticos tratados com HY ou NTC-HY exibiram uma epitelização da lesão cirúrgica mais acelerada em comparação com os animais diabéticos controle. Entretanto, apenas aqueles tratados com NTC-HY mostraram diferença estatisticamente significativa. Mendes, (2006) realizou uma avaliação qualitativa do grau de epitelização das regiões cirúrgicas e observou que o HY acelerou de forma significativa o reparo

tecidual vinte e um dias após as exodontias. Essa análise corrobora com nossos dados, mostrando um efeito positivo dos tratamentos, quando avaliado macroscopicamente.

As análises histomorfométricas dos alvéolos de animais normais e diabéticos quatorze dias após as exodontias demonstraram que o diabetes mellitus também reduz significativamente a neoformação óssea nessa cronologia. O grande aumento na neoformação óssea em animais normais não tratados entre a primeira (7 dias) e a segunda (14 dias) semana já foi previamente descrito (Mendes, 2006) e corrobora nossos achados. Quando comparamos os valores de neoformação óssea nos mesmos períodos para os animais diabéticos não tratados, observamos apenas uma discreta evolução na formação óssea. Estes dados histomorfométricos estão de acordo com achados histológicos de Devlin *et al.*, (1996), que dez dias após a exodontia de dentes molares de animais diabéticos observaram grande reabsorção da parede do alvéolo e uma redução severa na formação óssea intramembranosa no interior dos alvéolos. Os alvéolos de animais diabéticos tratados com HY ou NTC-HY apresentaram significativo aumento da neoformação óssea quando comparado com os alvéolos de animais diabéticos controle quatorze dias após as exodontias, atingindo valores bem próximos daqueles observados em animais normais. Este conjunto de dados demonstra que os tratamentos propostos foram capazes de acelerar de forma significativa o reparo tecidual ósseo em alvéolos dentários de animais diabéticos. Mendes, (2006) observou que, quatorze dias após as exodontias, alvéolos de animais normais tratados com HY apresentavam um padrão semelhante de neoformação óssea quando comparado a alvéolos controle no terço apical dos mesmos, mas no terço médio, alvéolos tratados com HY apresentavam um percentual significativamente maior de trabéculas quando comparados aos controles. Esses dados, quando comparados aos nossos, mostram que, mesmo sendo observado um efeito de aceleração da neoformação óssea em alvéolos de animais diabéticos tratados com HY ou NTC-HY, a doença ainda foi capaz de comprometer a formação óssea, uma vez que os animais normais controle ainda assim possuem uma média superior nessa região do alvéolo (terço médio). Com relação ao número de núcleos celulares, os animais normais controle apresentaram uma redução expressiva de núcleos no interior dos

alvéolos da primeira (7 dias) para a segunda (14 dias) semana após as exodontias, acompanhando o aumento no percentual de trabéculas neoformadas. Já os animais diabéticos controle apresentaram um discreto aumento do número de núcleos celulares observados na primeira semana, indicando um atraso no reparo tecidual alveolar. O tratamento dos animais diabéticos com HY ou NTC-HY foi capaz de reduzir significativamente o número de núcleos celulares, apresentando valores similares aos dos animais normais, evidenciando um papel importante dos tratamentos na aceleração do reparo tecidual em alvéolos dentários. Devlin *et al.*, 1996 observaram infiltrado inflamatório extenso 17 dias após a exodontia de dentes molares em alvéolos de animais diabéticos, o que vai de encontro com nossos achados.

Alguns mecanismos que explicam os efeitos deletérios do diabetes mellitus no metabolismo ósseo são descritos na literatura (Inaba *et al.*, 1995; Santana *et al.*, 2003; McCarthy *et al.*, 2004; Stolzing *et al.*, 2010). Foi demonstrado que osteoblastos mantidos em meio de cultura com alta concentração de glicose tem funções importantes, como a síntese de osteocalcina, inibidas, o que pode explicar em parte o desenvolvimento da osteopenia diabética (Inaba *et al.*, 1995). Também tem sido investigada a interação dos produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), que são proteínas modificadas quimicamente, na patogenia da osteopenia provocada pelo diabetes mellitus (McCarthy *et al.*, 2004; Stolzing *et al.*, 2010). Foi observado que células de medula óssea, extraídas a partir de fêmures e tíbias de animais diabéticos, foram menos confluentes e, tanto o número total de colônias quanto o tamanho das mesmas, além do número de células tronco mesenquimais comprometidas com a formação óssea, foram significativamente menores quando comparado com células provenientes de animais normais (Stolzing *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que o número de receptores para AGEs (RAGE) encontrava-se quase 90% mais expresso em células tronco mesenquimais provenientes de animais diabéticos quando comparado com as mesmas células extraídas de animais normais (Stolzing *et al.*, 2010). A interação AGE-RAGE estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem induzir apoptose (Stolzing *et al.*, 2010). Santana *et al.*, (2003) também observaram, em experimentos utilizando defeitos ósseos de calvárias, que a interação AGE-RAGE em osteoblastos inibe a função

osteoblástica e reduz os parâmetros de formação óssea. Também foi observado em estudos *in vitro* que a glicosilação de matrizes de colágeno tipo I reduz a capacidade de adesão de células osteoblásticas a essas matrizes devido ao comprometimento da interação de integrinas específicas com a matriz glicosilada (McCarthy et al., 2004). Em nosso estudo não investigamos quais mecanismos estariam envolvidos na redução da formação óssea no interior de alvéolos dentários de animais diabéticos, mas os mecanismos citados acima são importantes candidatos a serem analisados em experimentos futuros. Outra questão importante é elucidar os mecanismos de ação do HY e dos NTC-HY na aceleração do reparo ósseo de alvéolos dentários de animais normais e diabéticos.

Em síntese, demonstramos, de forma inédita, os efeitos de várias concentrações de HY no reparo ósseo de alvéolos dentários de animais normais e confirmamos que a concentração de 1% é a mais efetiva, corroborando com estudos prévios realizados em nosso laboratório (Mendes et al., 2008; Mendes et al., 2010). Mais importante, demonstramos a eficácia do HY e dos NTC-HY em acelerar o reparo tecidual ósseo em alvéolos dentários de animais diabéticos 14 dias após exodontias dos primeiros molares, comprovando o efeito positivo dos biomateriais avaliados também em condições metabólicas adversas.

VII. SUMÁRIO

1. O tratamento dos alvéolos de animais normais com diferentes concentrações de HY demonstrou ser a concentração de 1% a mais efetiva para promover a aceleração do reparo ósseo no modelo de alvéolos dentários de ratos;
2. Os tratamentos de alvéolos de animais diabéticos com HY ou com NTC-HY foram capazes de acelerar a epitelização da lesão cirúrgica quatorze dias após as exodontias, com destaque para os NTC-HY (100 µg/mL);
3. O tratamento dos alvéolos de animais diabéticos com HY 1% ou com NTC-HY (100 µg/mL) não foi capaz de acelerar o reparo ósseo de alvéolos dentários quando comparados a animais diabéticos não tratados, sete dias após as exodontias dos primeiros molares superiores;
4. NTC-HY (100µg/mL) e HY 1% foram capazes de acelerar de forma significativa o reparo ósseo em alvéolos dentários de animais diabéticos quatorze dias após as exodontias dos primeiros molares;
5. A funcionalização de NTC com HY permitiu o carreamento do HY, preservando os efeitos biológicos dessa molécula, confirmando estudos prévios.

VIII. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o HY e os NTC-HY aceleram de forma expressiva o reparo ósseo em alvéolos dentários de ratos diabéticos. Desta forma, estas formulações podem ser potencialmente úteis em terapias de reconstrução tecidual óssea, seja em condições normais ou em estados metabolicamente adversos.

IX. PERSPECTIVAS

1. Elucidar os mecanismos de ação pelos quais o HY e os NTC-HY são capazes de acelerar o reparo ósseo através de ensaios in vitro;
2. Avaliar, através de ensaios in vitro, a qualidade do osso neoformado;
3. Avaliar os efeitos do HY e dos NTC-HY no reparo de defeitos ósseos maiores;
4. Avaliar a toxicidade sistêmica dos NTC e dos NTC-HY através de análises histológicas e fisiológicas;
5. Avaliar os efeitos da radiação gama na esterilização do HY e dos NTC-HY;
6. Caracterizar o infiltrado inflamatório, destacando os diferentes tipos celulares e realizando a contagem diferencial destas células, com objetivo de avaliar quais são os possíveis tipos celulares que sofrem influência do tratamento com HY ou com NTC-HY durante o reparo tecidual dos alvéolos dentários.

X. REFERÊNCIAS

1. Abarrategi A, Gutiérrez MC, Moreno-Vicente C, Hortigüela MJ, Ramos V, López-Lacomba JL, Ferrer ML, del Monte F. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. *Biomaterials*, 29, 94-102, 2008.
2. Ágren UM, Tammi RH, Tammi MI. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radical Biology & Medicine*, 23, 996-1001, 1997.
3. Ajayan PM. Nanotubes from Carbon. *Chemical Reviews*, 99, 1787-99, 1999.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Trad. Veiga ABG. Porto Alegre: Artmed, 4.ed. 1463 p., 2004.
5. Annabi B, Thibeault S, Moumdjian R, Béliveau R. Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 21888-96, 2004.
6. Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngology: Head and Neck Surgery*, 132, 592-7, 2005.
7. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *Journal of Biomaterials Applications*, 20, 209-19, 2006.
8. Bakos D, Soldán M, Hernández-Fuentes I. Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite. *Biomaterials*, 20, 191-5, 1999.
9. Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, Giardino R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, 4503-13, 2002.
10. Bhattacharyya S, Guillot S, Dabboue H, Tranchant J-F, Salvetat J-P. Carbon Nanotubes as Structural Nanofibers for Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. *Biomacromolecules*, 9, 505-9, 2008.
11. Boccaccini AR, Cho J, Roether JA, Thomas BJC, Minay EJ, Shaffer MSP. Electrophoretic deposition of carbon nanotubes - review. *Carbon*, 44, 3149-60, 2006.
12. Bodic F, Hamel L, Lerouxel E, Baslé MF, Chappard D. Bone loss and teeth. *Join Bone Spine*, 72, 215-21, 2005.
13. Boeck EM, Pansani CA, Okamoto T, Goissis G, Boeck Neto RJ, Marcantonio Júnior E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais: estudo histopatológico em ratos. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 28, 83-96, 1999.
14. Bourguignon LYW, Singleton PA, Zhu H, Zhou B. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor β

receptor I in metastatic breast tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, p. 39703-12, 2002.

15. Chłopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon*, 44, 1106-11, 2006.

16. Colnot C, Romero DM, Huang S, Helms JA. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 435, 69-78, 2005.

17. Correa-Duarte MA, Wagner N, Rojas-Chapana J, Morsczeck C, Thie M, Giersig M. Fabrication and Biocompatibility of Carbon Nanotube-Based 3D Networks as Scaffolds for Cell Seeding and Growth. *Nano Letters*, 4, 2233-6, 2004.

18. David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent J-C, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol J-P. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16, 274-87, 2008.

19. de Amorim FPLG, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *Journal of Molecular Histology*, 39, 401-8, 2008.

20. Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 14, 252-8, 2006.

21. Deschrevel B, Tranchepain F, Vincent J-C. Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase. *Matrix Biology*, 27, 475-86, 2008.

22. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 54, 1087-1091, 1996.

23. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 31, 641-5, 2002.

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

25. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242, 27-33, 1997.

26. Frazan R, Ballejo G, Salgado MC, Moraes MF, Salgado HC. Heart variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension*, 30, 632-635, 1997.

27. Galvan-Garcia P, Keefer EW, Yang F, Zhang M, Fang S, Zakhidov AA, Baughman RH, Romero MI. Robust cell migration and neuronal growth on pristine carbon nanotube sheets and yarns. *Journal of Biomaterial Science*, 18, 1245-61, 2007.

28. Gerdin B, Hällgren R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 242, 49-55, 1997.
29. Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 8875-83, 2005.
30. Giavaresi G, Torricelli P, Fornasari PM, Giardino R, Barbucci R, Leone G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials*, 26, 3001-8, 2005.
31. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Giardino R, Facchini A. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff®-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*, 22, 2417-24, 2001.
32. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of diabetic osteopenia in streptozotocin-induced diabetic mice: A possible role of oxidative stress. *Bone*, 40, 1408-1414, 2007.
33. Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor. *The Journal of Cell Biology*, 117, 1343-50, 1992.
34. Inaba M, Terada M, Koyama H, Yoshida O, Ishimura E, Kawagishi T, Okuno Y, Nishizawa Y, Otani S, Morii H. Influence of high glucose on 1,25-Dihydroxyvitamin D₃- Induced effect on human osteoblast-like MG-63 Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10, 1050-56, 1995.
35. Itoh S, Matubara M, Kawauchi T, Nakamura H, Yukitake S, Ichinose S, Shinomiya K. Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12, 575-81, 2001.
36. Javed F, Romanos GE. Impact of diabetes mellitus and glycemic control on the osseointegration of dental implants: A systematic literature review. *Journal of Periodontology*, 80, 1719-30, 2009.
37. Juhlin L. Hyaluronan in skin. *Journal of Internal Medicine*, 242, 61-6, 1997.
38. Kanyama M, Kuboki T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, Kubota S, Nakanishi T, Takigawa M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of Oral Biology*, 48, 723-30, 2003.
39. Kappler J, Hegener O, Baader SL, Franken S, Gieselmann V, Häberlein H, Rauch U. Transport of a hyaluronan-binding protein in brain tissue. *Matrix Biology*, 28, 396-405, 2009.
40. Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*, 44, 775-82, 1995.

41. Kurihashi T, Iwata H, Nasu M. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after x-ray irradiation. *Odontology*, 90, 35-42, 2002.
42. Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ, Miller MJ, Johnston C, Montufar-Solis D. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 63, 1500-8, 2005.
43. Lekic P, Rubbino I, Krasnoshtein F, Cheifetz S, McCulloch CAG, Tenenbaum H. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *The Anatomical Record*, 247, 329-40, 1997.
44. Lesley J, Gál I, Mahoney DJ, Cordell MR, Rugg MS, Hyman R, Day AJ, Mikecz K. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 25745-54, 2004.
45. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 26967-75, 2000.
46. Linker A, Meyer K, Weissmann B. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. *The Journal of Biological Chemistry*, 213, 237-48, 1955.
47. Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, Toneguzzi S, Facchini A. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. *Biomaterials*, 23, 1043-51, 2002.
48. Liu L, Thompson AY, Heidarani MA, Poser JW, Spiro RC. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials*, 20, 1097-108, 1999.
49. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, Graves DT. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *Journal of Dental Research*, 85, 510-14, 2006.
50. MacDonald RA, Laurenzi BF, Viswanathan G, Ajayan PM, Stegemann JP. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *The Journal of Biomedical Materials Research*, 74A, 489-96, 2005.
51. Matsumoto K, Sato C, Naka Y, Kitazawa A, Whitby RLD, Shimizu N. Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 216-20, 2007.
52. McCarthy AD, Uemura T, Etcheverry SB, Cortizo AM. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *The International journal of biochemistry & Cell Biology*, 36, 840-48, 2004.
53. Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB, Ferreira AJ. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology*, 53, 1155-62, 2008.

54. Mendes RM, Silva GAB, Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences*, 87, 215-22, 2010.
55. Mendes RM. Efeito do hialuronato de sódio na cicatrização de alvéolos de ratos. Belo Horizonte: UFMG, 2006.
56. Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*, 107, 629-34, 1934.
57. Ministério da Saúde. *Diabetes mellitus*. Brasília: Ministério da Saúde, 7 p., 15 p., 2006.
58. Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. *Archives of Oral Biology*, 47, 843-849, 2002.
59. Monti MC, Lonsdale JT, Montomoli C, Montross R, Schlag E, Greenberg DA. Familial risk factors for microvascular complications and differential male-female risk in a large cohort of American families with type I diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92, 4650-55, 2007.
60. Moseley R, Leaver M, Walker M, Waddington RJ, Parsons D, Chen WYJ, Embery G. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF[®]-11p75, AQUACEL[®] and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. *Biomaterials*, 23, 2255-64, 2002.
61. Nedvetzki S, Gonen E, Assayag N, Reich R, Willians RO, Thurmond RL, Huang J, Neudecker BA, Wang F, Turley EA, Naor D. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 18081-6, 2004.
62. Ogasawara A, Nakajima A, Nakajima F, Goto K, Yamazaki M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*, 43, 832-39, 2008.
63. Organização Mundial da Saúde. Definição, diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e suas complicações. Parte 1: Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus. *Departamento de vigilância de doenças não transmissíveis de Genebra*, 1999.
64. Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C, Raimondo S, Penna C, Geuna S, Pagliaro P, Freyrie A, Stella A, Caldarera C M, Muscari C. Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. *Journal of Anatomy*, 213, 520-30, 2008.

65. Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. *Cell and Tissue Research*, 294, 323-33, 1998.
66. Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats – a histological study. *Brazilian Dental Journal*, 12, 3-9, 2001.
67. Price RL, Haberstroh KM, Webster TJ. Improved osteoblast viability in the presence of smaller nanometer dimensioned carbon fibres. *Nanotechnology*, 15, 892-900, 2004.
68. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BCM Musculoskeletal Disorders*, 5, 12, 2004.
69. Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AAS, Nagata K, Lijima T, Ohishi A. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42, 315-22, 2004.
70. Retzepe M, Donos N. The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clinical Oral Implants Research*, 21, 673-81, 2010.
71. Rosa R, Schmidt M. Diabetes mellitus: magnitude das hospitalizações na rede pública do Brasil, 1999-2001. *Epidemiologia e serviços de saúde: Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*, Brasília, 17, 123-153, 2008.
72. Rügheimer L, Olerud J, Johnsson C, Takahashi T, Shimizu K, Hansell P. Hyaluronan synthases and hyaluronidases in the kidney during changes in hydration status. *Matrix Biology*, 28, 390-5, 2009.
73. Santana RB, Xu L, Chase HB, Amar S, Graves DT, Trackman PC. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in Type 1 diabetes. *Diabetes*, 52, 1502-10, 2003.
74. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, 16, 9-15, 1995.
75. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, Delisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 36770-8, 2001.
76. Shyng YC, Devlin H, Riccardi D, Sloan P. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Archives of Oral Biology*, 44, 751-7, 1999.
77. Shyng YC, Devlin H, Sloan P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 30, 70-74, 2001.
78. Silva EE, Colleta HHMD, Ferlauto AS, Moreira RL, Resende RR, Oliveira S, Kitten GT, Lacerda RG, Ladeira LO. Nanostructured 3-d collagen/nanotube

biocomposites for future bone regeneration scaffolds. *Nano Research*, 2, 462-73, 2009.

79. Siqueira Jr. JF, Dantas CJS. *Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 238 p., 2000.

80. Sitharaman B, Shi X, Walboomers XF, Liao H, Cuijpers V, Wilson LJ, Mikos AG, Jansen JA. In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone*, 43, 362-70, 2008.

81. Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 41046-59, 2002.

82. Smart SK, Cassady AI, Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*, 44, 1034-47, 2006.

83. Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. Diabetes induced changes in mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*, 191, 453-65, 2010.

84. Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 32259-65, 2003.

85. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50, 537-46, 2001.

86. Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, Heldin P. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 24195-204, 2005.

87. Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Archives of Oral Biology*, 46, 375-79, 2001.

88. Terrones M. Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and other emerging applications. *International Materials Reviews*, 49, 325-77, 2004.

89. Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease – minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 4593-96, 2002.

90. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Journal of Internal Medicine*, 242, 35-40, 1997.

91. Turley EA, Austen L, Vandeligt K, Clary C. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of Ras-transformed cells. *The Journal of Cell Biology*, 112, 1041-7, 1991.

92. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of hyaluronan receptors – minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 4589-92, 2002.
93. Tutak W, Park KH, Vasilov A, Starovoytov V, Fanchini G, Cai S-Q, Partridge NC, Sesti F, Chhowalla M. Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks. *Nanotechnology*, 20, 255101, 2009.
94. Wetzler C, Kampfer H, Stallmeyer B, Pfeilschiffer J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *The Journal of investigative dermatology*, 115, 245-53, 2000.
95. Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Brazilian Dental Journal*, 13, 92-6, 2002.
96. Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone Cell Proliferation on Carbon Nanotubes. *Nano Letters*, 6, 562-7, 2006.
97. Zhang S, Chang MCY, Zylka D, Turley S, Harrison R, Turley EA. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 11342-8, 1998.
98. Zhao B, Hu H, Mandal SK, Haddon RC. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chemistry of Materials*, 17, 3235-41, 2005.
99. Zied IC, Milanezi LA, Okamoto T, Okamoto R. Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. *Revista Odontológica de Araçatuba*, 26, 9-13, 2005.