

TATIANE CRISTINE SILVA DE ALMEIDA

Avaliação dos Parâmetros Funcionais e Estruturais Renais de Ratos Tratados com Biocompósitos Baseados em Nanotubos de Carbono

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte – MG

Fevereiro – 2013

Tatiane Cristine Silva de Almeida

Avaliação dos Parâmetros Funcionais e Estruturais Renais de Ratos Tratados com Biocompósitos Baseados em Nanotubos de Carbono

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte - MG

Fevereiro - 2013

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Fisiologia Renal do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Protozoos do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear;
- Laboratório de Biofotônica do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;

Contou com o auxílio das seguintes Agências de fomento:

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

Dedico este trabalho a Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos e por me proporcionar essa vitória.
Aos meus pais Doraci e Elza (*in memoriam*), ao Márcio.

Pelo carinho e pelas palavras ditas nas horas certas.

“Sempre me parece estranho que todos aqueles que estudam seriamente esta ciência acabam tomados de uma espécie de paixão pela mesma”.

Em verdade, o que proporciona o máximo prazer não é o conhecimento e sim a aprendizagem, não é a posse, mas a aquisição; não é a presença, mas o ato de atingir a meta,”

Carl Friedrich Gau

AGRADECIMENTOS

À Deus por me abençoar todos os dias e ser o responsável por essa vitória;

Ao meu pai que, da sua maneira é um dos responsáveis pela minha coragem em começar do zero;

À minha amada mãe, que mesmo não estando aqui em corpo físico, esteve comigo todos os dias em espírito, me guiando e zelando por mim em todos os momentos;

Ao Márcio, por todo o incentivo, carinho e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, por ter me recebido em seu laboratório e acreditar em mim depositando confiança e disponibilidade para me orientar;

À Prof^a.Cida por abrir as portas do seu laboratório e por não poupar esforços em me ajudar;

Ao Prof. Gustavo pela ajuda na padronização do teste de microalbuminúria;

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

A todos do Laboratório de Irradiação Gama, por esterilizar meu material;

Ao Prof. Ary, pelos testes de esterilidade;

A toda minha família, em especial à Charlene pelo carinho, amizade e por sempre acreditar em mim;

As amigas: Priscila, Jú e Thalita por estarem comigo nas horas boas e ruins;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Cardíaca, pela ajuda e amizade em especial a Pati, Marildinha e ao Heder pela paciência.

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

À Diana pela dedicação ao curso de Pós-graduação;

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro;

RESUMO

Estudos toxicológicos envolvendo possíveis efeitos de biocompósitos baseados ou não em nanotubos de carbono (NTC) nos sistemas biológicos são cruciais para estabelecer a segurança desses materiais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar possíveis danos na função e estrutura renais de ratos tratados com biocompósitos baseados em NTC administrados no alvéolo dentário. Amostras dos biomateriais [hialuronato de sódio (HY), NTC de paredes simples (NTCPS), NTCPS associados a HY (NTCPS-HY), NTC de paredes múltiplas (NTCPM) e NTCPM associados a HY (NTCPM-HY)] foram irradiados por radiação Gama nas dosagens de 100gy a 30kgy com a finalidade de definir o melhor esquema de esterilização, o qual foi estabelecido através de testes microbiológicos. Em seguida, os biomateriais esterilizados foram avaliados estruturalmente por microscopia eletrônica de varredura e funcionalmente através de seu efeito no reparo ósseo de alvéolos dentários. Para avaliarmos a função e estrutura renais, os biocompósitos foram administrados nos alvéolos dentários (HY 1% e NTC 100µg/mL em 0,1mL) e, após 7 dias, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas para coleta de urina e medida da ingestão hídrica e volume urinário. Em seguida, os animais foram eutanaziados e amostras de sangue e tecidos (rim e maxila) foram coletadas. Com o objetivo de evidenciar algum efeito tóxico desses biocompósitos, o protocolo foi repetido injetado intraperitonealmente concentrações maiores (0,75 mg/kg) dos biomateriais. Os resultados demonstraram que as doses de 250gy e de 2,5kgy foram suficientes para esterilizar o HY e os biocompósitos baseados nos NTC, respectivamente, sem causar alterações significativas na estrutura e na atividade biológica desses biomateriais. A análise da função renal mostrou um aumento significativo na concentração de creatinina plasmática nos grupos HY, NTCPS-HY e NTCPM-HY com conseqüente aumento no ritmo de filtração glomerular. Avaliando a fração de excreção de água livre, observamos um aumento significativo no grupo NTCPS. Além disso, as dosagens de microalbuminúria revelaram uma diminuição significativa desse parâmetro no grupo NTCPM-HY em relação aos grupos controle e NTCPM. Histologicamente, não foram observadas alterações significativas na morfologia glomerular. Em relação ao protocolo de administração intraperitoneal dos biomateriais, resultados

similares foram observados. Dessa forma, podemos concluir que os biocompósitos quando utilizados no alvéolo dentário nas dosagens propostas não foram capazes de induzir dano funcional ou estrutural renal. Assim, estes resultados ampliam as perspectivas da aplicabilidade dos NTC, pois os mesmos não demonstraram sinais de toxicidade.

Palavras chave: Biocompósitos, Hialuronato de Sódio, Nanotubos de carbono, Radiação Gama, Função Renal, Toxicidade.

ABSTRACT

Toxicological studies involving possible effects of biocomposites based or not on carbon nanotubes (CNT) in biological systems are crucial to establish the safety of these materials. The objective of this present study was to evaluate potential damage in the function and structure of kidneys of rats whose tooth sockets were treated or not with biocomposites based on CNT. Samples of sodium hyaluronate (HY), single-walled CNT (SWCNT), SWCNT associated with HY (SWCNT-HY), multi-walled CNT (MWCNT) and MWCNT associated with HY (MWCNT-HY) were irradiated with doses of Gamma radiation from 100gy to 30kgy in order to define the optimal regimen of sterilization, which was established based on microbiological tests. Then, sterilized biomaterials were evaluated structurally by scanning electron microscopy and functionally through their effects on bone repair of tooth sockets. To assess the renal function and structure, the biocomposites were administered into tooth sockets (1% HY and 100µg/mL CNT in 0.1mL) and after 7 days, the animals were placed in metabolic cages for urine collection and to measure the water intake and urine volume. Afterward, the rats were euthanized and blood and tissues (kidney and jaw) samples were collected. To evidence any potential toxic effects of these biocomposites, this protocol was repeated injecting the biomaterials intraperitoneally at higher concentration (0.75 mg/kg). The results demonstrated that doses of 250gy and 2,5kgy were sufficient to sterilize the HY and biocomposites based on CNT, respectively, without causing significant changes in their structure and biological activity. Analysis of renal function showed a significant increase in the concentration of plasma creatinine in the HY, SWCNT-HY and MWCNT-HY groups with consequent increases in the glomerular filtration rate. Regarding the free water excretion fraction, we observed a significant increase in the SWCNT group. Furthermore, microalbuminuria analysis revealed a significant decrease in this parameter in the MWCNT-HY group compared with control and MWCNT groups. Histologically, there were no significant changes in the glomerular structure. Concerning the intraperitoneal administration of these biomaterials, similar results were observed. We concluded that, when these biocomposites were used in tooth sockets at the proposed dosages, they were not able to induce

functional or structural renal damage. Therefore, these results expand the perspectives of CNT applicability, as they showed no signs of toxicity.

Keywords: Biocomposites, Sodium hyaluronate, Carbon nanotubes, Gamma radiation, Renal function, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de sinalização do HY.....	20
Figura 2: Representação esquemática de (A) NTC de paredes simples e (B) NTC de paredes múltiplas.	22
Figura 3: Estrutura anatômica renal.....	26
Figura 4: Posição das mesas de radiação.....	31
Figura 5: Procedimento cirúrgico de exodontia dos dentes primeiros molares superiores.....	35
Figura 6: Medida do diâmetro da cápsula de Bowman (A) e do diâmetro do tufo glomerular (B).....	44
Figura 7: Divisão anatômica do alvéolo da raiz distal do primeiro molar superior em terços apical, médio e cervical.....	44
Figura 8: Elétrons-micrografias de varredura de biocompósitos de NTC associados ou não com HY.....	53
Figura 9: Elétrons-micrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY.....	54
Figura10: Elétrons-micrografias de biocompósitos de NTC associados ou não comHY.....	55
Figura 11: Elétrons-micrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY.....	56
Figura 12 Elétrons-micrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY.....	57

Figura 13: Elétrons-micrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY.....	58
Figura 14: Elétrons-micrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY.....	59
Figura15: Elétrons-micrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY.....	60
Figura 16: Porcentagem de trabéculas ósseas presentes em alvéolos dentários sete dias após as exodontias em ratos tratados com biocompósitos esterilizados por radiação Gama.....	61
Figura 17: Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (A) ou IP (B) na ingestão hídrica e volume urinário.....	62
Figura 18: Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (A) ou IP (B) na creatinina plasmática e no ritmo de filtração glomerular (RFG).	64
Figura19: Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (A) ou IP(B) na fração de excreção de água.....	67
Figura 20: Efeito da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (Figura A) ou IP (Figura B) em ratos sobre a fração de excreção de sódio e potássio.....	72
Figura 21: Efeito da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (Figura A) ou IP (Figura B) em ratos sobre <i>clearance</i> osmolar e de água livre.....	73
Figura 22: Efeito da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (Figura A) ou IP (FiguraB) em ratos sobre a microalbuminúria.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do HY testado em meio BHI.....	47
Tabela 2: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do HY testado em meio SAB.	48
Tabela 3: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPS testado em meio BHI.....	48
Tabela 4: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPS testado em meio SAB.....	48
Tabela 5: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPS-HY testado em meio BHI.....	49
Tabela 6: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPS-HY testado em meio SAB.....	49
Tabela 7: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM testado em meio BHI.....	50
Tabela 8: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM testado em meio SAB.....	50
Tabela 9: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM-HY testado em meio BHI.....	50
Tabela 10: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM-HY testado em meio SAB.....	51
Tabela 11: Análise microbiológica dos biomateriais após serem esterilizados por irradiação Gama.....	51

Tabela 12: Efeitos dos biomateriais administrados em alvéolos dentários nas concentrações de sódio e de potássio plasmáticos e urinários e nas osmolalidades plasmáticas e urinárias..... 69

Tabela 13: Efeitos dos biomateriais administrados intraperitonealmente nas concentrações de sódio e de potássio plasmáticos e urinários e nas osmolalidades plasmáticas e urinárias..... 79

Tabela 14: Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo no diâmetro da cápsula de Bowman, tufo glomerular e espaço de Bowman 77

Tabela 15: Efeitos da administração IP dos biocompósitos no diâmetro da cápsula de Bowman, tufo glomerular e espaço de Bowman..... 77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Grupos experimentais e tratamentos administrativos	34
Quadro 2: Sumário da dosagem de creatinina.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI: Brain Heart Infusion Agar

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEBIO: Centro de Bioterismo

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

CDTN: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

EPM: Erro padrão da média

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

FNT: Formalina neutra tamponada

GAGs: Glicosaminoglicanas

HY: Hialuronato de sódio (ácido hialurônico)

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ICEX: Instituto de Ciências Exatas

IP: Intraperitoneal

LIG: Laboratório de Irradiação Gama

MEC: Matriz extracelular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

NTC: Nanotubos de carbono

NTCPM: NTC de paredes simples

NTCPS: NTC de paredes simples

NTCPS-HY: NTCPS associados com hialuronato de sódio

NTCPM: NTC de paredes múltiplas

NTCPM-HY: NTCPM associados com hialuronato de sódio

NTC-COOH: NTC carboxilados

RFG: Ritmo de filtração glomerular

SAB: Saboraand

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
I. INTRODUÇÃO	19
1. Hialuronato de sódio.....	19
2. Nanotubos de carbono.....	21
3. Associação de nanotubos de carbono com biomoléculas.....	21
4. Toxicidade dos nanotubos de carbono.....	24
5. Função renal.....	25
II. JUSTIFICATIVA	27
III. OBJETIVOS	28
1. Objetivo geral	28
2. Objetivos específicos.....	28
IV. METODOLOGIA	29
1. Hialuronato de sódio	29
2. Síntese e caracterização dos nanotubos de carbono associados ou não com hialuronato de sódio.....	29
3. Esterilização por Radiação Gama	30
4. Análise em Cultura Microbiológica	31
5. Avaliação do Processo de Esterilização por Radiação Gama	32
6. Procedimentos Cirúrgicos	34
7. Protocolo Experimental.....	35
8. Análise Estatística	46
V. RESULTADOS	47
1. Esterilização por Radiação Gama	47
1.1. Plaqueamento em Meios de Cultura.....	47
1.2. Avaliação Estrutural do Biomaterial Esterilizado	52
1.3. Avaliação Funcional dos Biocompósitos Esterilizados por Radiação Gama	61
2. Efeitos da Administração dos Biocompósitos no Alvéolo Dentário e IP na	

Função Renal.....	62
2.1.1. Ingestão Hídrica e Volume Urinário.....	62
2.1.2. Creatinina Plasmática e Ritmo de Filtração Glomerular.....	64
2.1.4. Fração de Excreção de Água Livre.....	66
2.1.5. Concentrações de Sódio e Potássio e Osmolalidade.....	68
2.1.6. Fração de Excreção de Sódio e Potássio.....	70
2.1.7. Clearance Osmolar e Clearance de Água Livre.....	73
2.1.8. Microalbuminúria	75
3. Análise Morfométrica	77
VI. DISCUSSÃO.....	78
VII. SUMÁRIO.....	83
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

INTRODUÇÃO

1. Hialuronato de Sódio

O hialuronato de sódio (HY), também chamado de hialurona ou ácido hialurônico (Aslan *et al.*, 2006) foi descrito pela primeira vez no humor vítreo de olhos bovino (Krause *et al.*, 2001). Sua estrutura química é composta por glicosaminoglicanos não sulfatados (GAG's). Este biopolímero é um polissacarídeo linear formado por unidades alternadas de ácido *N*-acetilglicosamina e ácido *D*-glucorônico ligadas entre si através de moléculas alternadas de β -1,4 e β -1,3 por ligações glicosídicas (Garg *et al.*, 2004).

Ele é descrito como um componente essencial da matriz extracelular (MEC) de mamíferos (Xu Xian *et al.*, 2012,) onde desempenha um papel importante numa variedade de processos biológicos. A primeira vez que o HY foi sintetizado *in vitro* foi em 1964 (Schiller *et al.*, 1964). Devido ao seu alto peso molecular, na maioria dos tecidos juntamente com outras macromoléculas, contribuem para a estabilidade mecânica da MEC (Laurent *et al.*, 1992). Possui propriedades visco-elásticas (Volp *et al.*, 2009) e, juntamente com sua biocompatibilidade, faz com que ele tenha um grande potencial na área biomédica e industrial (Brown & Jones, 2005).

O HY está presente em todos os tecidos e fluidos biológicos (Kogan *et al.*, 2007), dentre eles podemos citar a pele, onde encontramos 50% do HY do organismo de um vertebrado (Nusgens, 2010). Além disso, também podemos citar: fluidos das junções sinoviais, revestimentos dos tendões (Engström-Laurent., 1997; Fraser *et al.*, 1997) e olhos (Moseley *et al.*, 2002). Exerce também um importante papel biológico na manutenção viscoelástica dos tecidos conjuntivos e na hidratação dos tecidos.

O HY através de sua ligação com receptores da membrana celular, como o CD44 (Figura 1), regula vários processos celulares como: mitose, migração, desenvolvimento de tumores, cicatrização e inflamação (Levdokimova *et al.*, 2008).

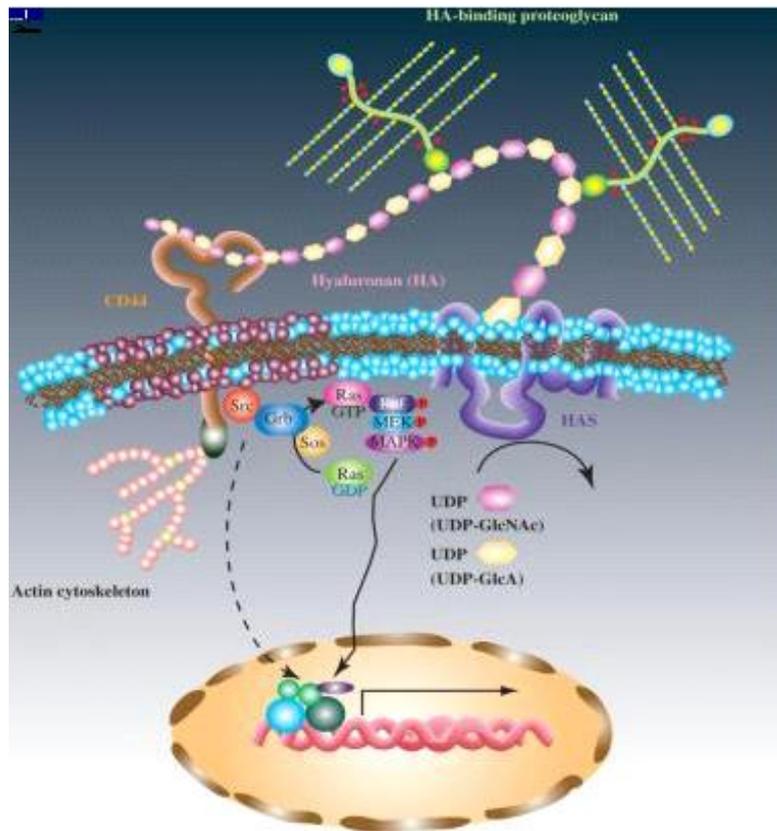


Figura 1: Mecanismo de sinalização do HY (Xu Xian *et al.*, 2012).

O seu uso clínico é descrito há mais de 30 anos (Burdick & Prestwich, 2011), sendo utilizado como marcador para diagnóstico para várias doenças como: câncer, artrite e patologias hepáticas (Volpi *et al.*, 2009). Também podemos citar várias outras aplicações do HY na clínica, como, exemplo, reposição do líquido sinovial através de injeções intra-articulares em pacientes com artrite, cirurgias oftalmológicas e odontológicas e regeneração de tecidos moles (Kogan *et al.*, 2007).

O HY ao longo das últimas décadas vem sendo alvo de muitos estudos, principalmente na área de engenharia de tecido artificiais, por ser biocompatível, biodegradável, biotivo, não imunogênico e não trombogênico (Laurent *et al.*, 1998). Para expandir e melhorar as aplicações médicas do HY, vários biomateriais derivados do HY são preparados por modificação química e *cross-linking*. Dentre estes, podemos citar a associação de nanotubos de carbono (NTC) com o HY (NTC-HY) resultando em uma melhoria das

propriedades mecânicas e um tempo de permanência prolongada do HY no local da aplicação, prolongando assim a ação de suas propriedades biológicas (Balaz *et al.*, 1991). Mendes e colaboradores em 2010 observaram que defeitos ósseos de alvéolos de ratos normais administrados com o biomaterial composto por NTC associado ao HY apresentaram uma maior neoformação óssea e um reduzido número de núcleos celulares. Em outro estudo recente realizado em ratos diabéticos, os resultados obtidos por Sá e colaboradores (2012) corroboraram com os resultados de Mendes *et al.*, 2010. Com isso, cada vez mais aumenta o interesse pelo HY e pelos NTC-HY para aplicações biológicas.

2. Nanotubos de carbono

O carbono está entre os elementos mais importantes da natureza. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que existiam apenas duas formas alotrópicas de carbono elementar: diamante e grafite. Entretanto, em 1985, pesquisadores demonstraram a existência dos fulerenos (Kroto *et al.*, 1985) e em 1991, Sumio Iijima observou, através de microscopia eletrônica, a existência dos NTC, um dos primeiros produtos industriais da nanotecnologia (Iijima, 1991). Os NTC podem ser caracterizados como nanoestruturas cilíndricas com diâmetro na ordem de poucos nanômetros e comprimento da ordem de micrômetros, levando a grandes razões comprimento/diâmetro (Baughman, 2002).

Em relação a sua estrutura, podem apresentar-se em dois tipos: os NTC de parede simples (NTCPS), que podem ser considerados como uma única folha de grafeno enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico (Iijima & Ichihashi 1993), e os NTC de paredes múltiplas (NTCPM), que compreendem vários nanotubos concêntricos (Iijima, 1991) (Figura 2).

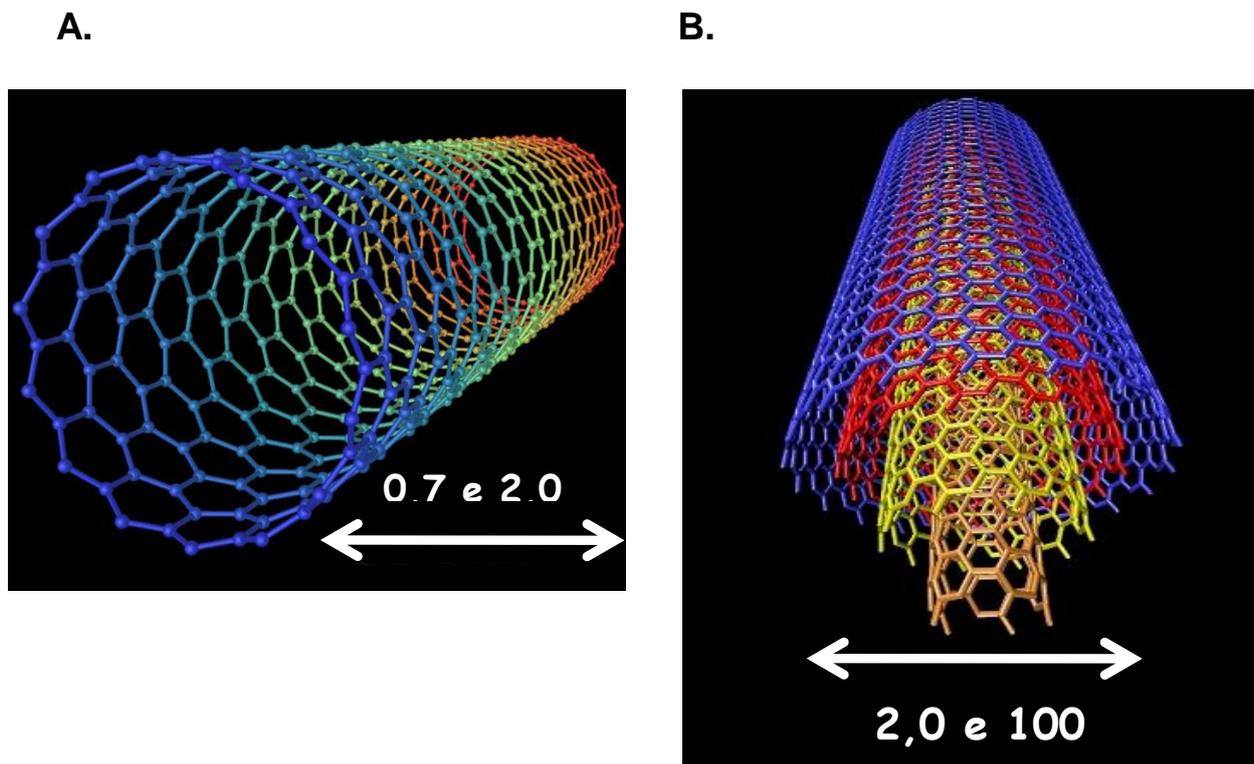


Figura 2: Representação esquemática de NTCPS (A) e NTCPM (B).

Desde a sua descoberta em 1991, os NTC têm atraído grande interesse de diferentes áreas biomédicas e biotecnológicas devido as suas propriedades térmicas, elétricas e mecânicas (Malarkey & Purpura, 2010). Devido a suas propriedades, diversos estudos estão sendo realizados na área biológica demonstrando a vasta utilidade dos NTC, como, por exemplo, substrato para crescimento de neurônios, crescimento ósseo, encapsulamento de enzimas, vesículas para entrega de DNA em células vivas, como estruturas e suportes para serem usados na distribuição controlada de drogas, para enxerto ósseo, implantes dentários e atividades bactericidas (Mattson *et al.*, 2000; Hartgerink *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2001; Koltover *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2012; Gladwin *et al.*, 2012; Xiuping Wang *et al.*, 2012).

Essas características e propriedades geram uma grande preocupação em relação à toxicidade destes materiais para os organismos vivos. O pequeno tamanho dos NTC, propriedade que os tornam especiais para diferentes áreas tecnológicas, também pode ser responsável pelo aparecimento de um novo padrão de toxicidade, onde ainda não se conhece as reais consequências da

exposição ao mesmo. Assim, surge a necessidade da avaliação tóxica frente à exposição direta aos NTC ou a substâncias que contenham o mesmo. Desta forma, é de extrema relevância conhecer sua biocompatibilidade quando em contato com tecidos e suas funcionalidades biológicas (Ying Liu *et al.*, 2012).

3. Associação de Nanotubos de Carbono com Biomoléculas

O processo de associação (funcionalização) dos NTC consiste em adicionar moléculas em sua superfície, como, por exemplo, oligonucleótidos, biomoléculas e polímeros, aumentando a sua capacidade de dispersão e assim, diminuindo a sua citotoxicidade. Assim, esse processo pode aumentar as possibilidades de aplicações biomédicas dos NTC (Zheng M *et al.*, 2003; Liao X *et al.*, 2012).

A associação dos NTC com biomoléculas vem despertando bastante interesse dos pesquisadores, pois a mesma pode melhorar a sua solubilidade e biocompatibilidade alterando o modo de interação com a célula, o que reduz consideravelmente seus efeitos tóxicos (Sk Z Ali *et al.*, 2012). Podemos citar, como exemplo, os resultados obtidos por Liu e colaboradores em 2008. Estes autores demonstraram que após injetarem de forma intravenosa NTCPs associados em camundongos, os mesmos foram lentamente excretados, principalmente através da via biliar, sem apresentar efeitos colaterais aparentes para os animais (Liu *et al.*, 2008).

Os métodos de associação podem ser divididos em dois grandes grupos: (i) não covalente (sistemas que interagem fracamente com os NTC) e (ii) covalente (sistemas que interagem fortemente com os NTC gerando modificações drásticas nas suas propriedades) (Islam *et al.*, 2003; Shvartzman *et al.*, 2004).

As associações podem ocorrer através de suas paredes, pontas ou por encapsulamento. Átomos ou moléculas podem ser adsorvidos ou ligados aos NTC alterando suas propriedades originais e, aumentando assim, a sua utilização na nanotecnologia.

Durante muito tempo, o uso dos NTC em aplicações biológicas foi impossibilitado devido a sua insolubilidade em água, pois essa característica é essencial para permitir o seu contato com as células vivas (Elena *et al.*, 2005).

O processo de associação dos NTC através da ligação dos mesmos com moléculas orgânicas permitiu que os NTC pudessem solubilizar em água e possibilitar a sua interação com moléculas orgânicas biológicas (Fu *et al.*, 2002) ou com outros grupos químicos como fármacos ou moléculas tóxicas (Kong *et al.*, 2000).

4. Toxicidade dos Nanotubos de Carbono

Os NTC podem ser classificados como partículas devido às suas dimensões na escala nanométrica e, portanto, efeitos toxicológicos inesperados podem ser induzidos com o contato com sistemas biológicos (Lacerda *et al.*, 2006).

Pouco ainda se sabe a respeito da toxicidade dos NTC em células de mamíferos. As conclusões de vários trabalhos são divergentes quanto à possível toxicidade dos NTC, mostrando que a forma como os NTC são administrados (inalação, injeção intravenosa ou oral), sua associação com outras moléculas, quantidade, tempo de exposição, número de camadas, forma e comprimento podem influenciar na sua toxicidade (Liu *et al.*, 2012). Assim, suas propriedades tóxicas vêm sendo alvo de vários estudos e, devido ao grande número de potenciais aplicações biológicas, a sua avaliação toxicológica torna-se cada vez mais importante para definir a sua biocompatibilidade e os possíveis riscos da exposição aos NTC (Lacerda *et al.*, 2006). Um dos primeiros estudos relacionados à citotoxicidade dos NTC foi realizado por Shedova *et al.* (2003) que investigaram os efeitos de NTCPS não refinados nos queratinócitos de epiderme humana. Os resultados demonstraram um acelerado estresse oxidativo, perda de viabilidade celular e alterações morfológicas e estruturais nas células. Assim, toxicidade dos NTC já vem sendo amplamente avaliada por diversos grupos de pesquisa em diversas áreas, onde estão sendo realizados tanto estudos *in vitro* como *in vivo*. De acordo com Lam *et al.* (2004), os NTC têm efeitos tóxicos *in vivo* e Cui *et al.* (2005) relataram efeitos tóxicos *in vitro*. Entretanto, é importante ressaltar que esses resultados não são um consenso. Por exemplo, estudos administrando NTC funcionalizados têm demonstrado que essa toxicidade é amenizada ou não é observada (Liu, 2008).

Como possíveis danos biológicos já observados com o uso dos NTC podemos citar: estresse oxidativo, respostas inflamatórias, diferenciação celular maligna, mutações cromossômicas, formação de granulomas e fibrose intersticial (Liu *et al.*, 2012). Xinghua Shi e colaboradores (2011) atribuíram essas possíveis propriedades tóxicas dos NTC ao fato das células serem “enganadas” pelos NTC devido a sua escala nanométrica. Os NTC quando tentam atravessar a membrana celular, acabam danificando a mesma. A resposta da célula é acionar o sistema de defesa do organismo, que irá iniciar uma reação inflamatória para proteger a região intoxicada.

Em síntese, as propriedades inovadoras e o aumento no número de estudos em relação às aplicações dos NTC incentivaram o desenvolvimento da indústria nanotecnológica, mas também geraram uma grande preocupação em relação à toxicidade destes materiais. Assim, estudos de toxicidade tornam-se essenciais para a avaliação da biocompatibilidade e dos possíveis riscos à exposição aos NTC.

5. Função Renal

O sistema renal exerce várias funções fisiológicas essenciais para a homeostase corporal incluindo a excreção de resíduos metabólicos, manutenção de fluidos e equilíbrio de eletrólitos (Kristen *et al.*, 2012). Os rins são órgãos dinâmicos que realizam a importante função de formação da urina por meio da ultra filtração nos glomérulos, da reabsorção tubular seletiva de água e solutos e da secreção tubular seletiva de solutos. Além disso, regula o equilíbrio ácido/base e produz vários hormônios, tais como, eritropoietina (estimula a produção de eritrócitos), renina (mantém as concentrações de sódio e, conseqüentemente, a pressão arterial) e na metabolização de vitamina D (Reilly *et al.*, 2007; Khairallah *et al.*, 2007).

Os rins recebem cerca de 20 a 25% do fluxo sanguíneo cardíaco e, conseqüentemente, todo fármaco ou substância química que atinja a circulação sistêmica atingirá os rins em grandes quantidades. Portanto, os rins são considerados alvos frequentes de toxicidade de muitos fármacos (Dekant *et al.*, 1996). Vários fatores estão envolvidos na maior susceptibilidade dos rins aos efeitos tóxicos dos fármacos, entretanto, o alto fluxo sanguíneo e a

concentração de alguns fármacos pelo mecanismo de reabsorção tubular são os mais importantes.

A saúde dos rins depende do bom funcionamento dos néfrons e seus componentes. Os néfrons são as unidades funcionais dos rins e estão organizados em três estruturas principais: um corpúsculo renal, um túbulo renal e um ducto coletor, localizados no córtex e na medula renal (Figura 3).

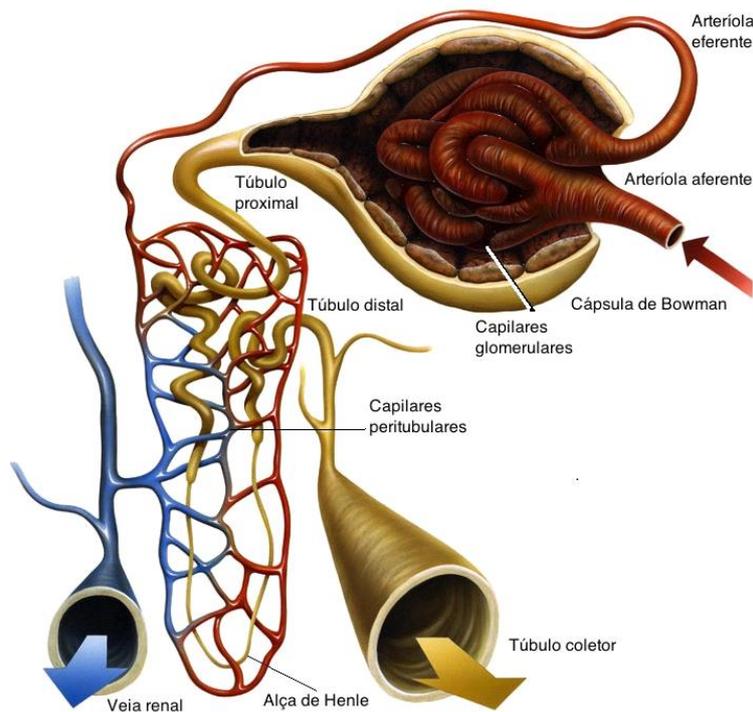


Figura3: Estrutura anatômica renal <http://www.medicinapratica.com.br/2010/03/24/saude-medicina-pratica/nefron-o-que-e/nefron/>, acesso em 14/01/13, às 10:30).

Alguns tipos de células constituintes dos néfrons tendem a terem danos maiores quando são expostos a substâncias tóxicas, podendo levar à uma degeneração do néfron (Wiggins, 2007). Dessa forma, o rim é um órgão alvo para estudos de toxicidade, onde alterações significativas nas funções normais podem ser comumente observadas após o tratamento com fármacos. Alguns parâmetros renais são observados para que se possa avaliar a toxicidade renal, alguns deles são: creatinina, osmolalidade, sódio, potássio sérico e urinário, bem como a avaliação morfológica do tecido renal.

II. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstramos que o HY acelera a cicatrização de alvéolos dentários de ratos após exodontia de primeiros molares superiores (Mendes *et al.*, 2008). Em trabalhos mais recentes, também realizados pelo nosso grupo de pesquisa, avaliamos os efeitos dos NTC associados com HY no reparo ósseo no mesmo modelo experimental utilizando animais normais e diabéticos. Observamos que os NTC-HY preservam as propriedades biológicas do HY no processo de reparo ósseo, além de melhorar as suas características físicas (Mendes *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram observados em tíbias (Barbosa, 2012). Assim, concluímos que esses biomateriais podem ser utilizados no reparo de defeitos ósseos. Entretanto, para que um novo biomaterial possa ser incorporado em aplicações biomédicas, torna-se necessário que sejam realizados estudos de citotoxicidade e de biocompatibilidade em meios biológicos. Dessa forma, como ainda não temos conhecimento se os NTC-HY podem causar algum dano renal aos animais, neste trabalho avaliamos os parâmetros funcionais e estruturais renais para detectarmos algum possível dano renal causado por esses biomateriais.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do HY e dos biocompósitos NTCPs, NTCPs-HY, NTCPM e NTCPM-HY na função e estrutura renais.

2. Objetivos Específicos

- Padronizar a esterilização por radiação Gama do HY, NTCPs, NTCPs-HY, NTCPM e NTCPM-HY.
- Avaliar estrutural e funcionalmente os biomateriais após passarem pelo processo de esterilização por radiação Gama.
- Avaliar os parâmetros de função renal (débito urinário, ingestão de água, ritmo de filtração glomerular, fração de excreção de sódio e de potássio, osmolalidade sérica e urinária, depuração de água livre e microalbuminúria) de ratos que receberam os biomateriais no alvéolo dentário ou intraperitonealmente.
- Avaliar histologicamente os rins de ratos que receberam os biomateriais no alvéolo dentário ou intraperitonealmente.

IV. METODOLOGIA

1. Hialuronato de Sódio

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

2. Síntese dos Nanotubos de Carbono Associados ou não com Hialuronato de Sódio

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

Para a associação com o HY, inicialmente foi obtida uma mistura homogênea da solução de NTC-COOH (0,5 mg/mL) e HY (0,5 mg/mL). Em seguida, esta solução foi levada ao ultrassom por 30 minutos e, posteriormente, lavada e filtrada em filtro de 0,45 µm para remover o HY não

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

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

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

3. Esterilização por Radiação Gama

O irradiador utilizado foi o GB-127 (MDS Nordion - Canadá). Ele pode irradiar vários tipos de produtos e é equipado com fonte de Cobalto-60 estocada a seco, com atividade máxima de 2.200 TBq ou 60.000 Curies (60.000 Ci). Sua geometria de exposição é panorâmica, ou seja, a fonte fica no centro e os produtos em volta. O sistema de exposição utiliza fonte de Cobalto 60 duplamente encapsulado em tubo de aço inoxidável e/ou Zircaloy. Durante a operação a fonte é elevada até a posição de irradiação e após o tempo de esterilização a fonte é colocada em sua posição de repouso. O irradiador fica instalado no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

As seguintes amostras dos biomateriais (i) ~0,1 mL do gel de HY, (ii) ~0,1 mL do gel de NTCPS, (iii) ~0,1 mL do gel de NTCPS-HY, (iv) ~0,1 mL do gel de NTCPM e (v) ~0,1 mL do gel de NTCPM-HY nas concentrações proposta no Quadro 1, foram acondicionadas em seringas plásticas e, em seguida, foram dispostas dentro da câmara de irradiação que é equipada com mesas giratórias utilizadas para acondicionar o material a ser irradiado. Essas mesas ao girarem permitem uma maior uniformidade da dosagem de radiação

no produto (Figura 4). Os biomateriais receberam as seguintes doses de radiação Gama: 100gy, 250gy, 500gy, 1Kgy, 2,5Kgy, 5Kgy, 10Kgy, 15Kgy, 20Kgy, 25Kgy e 30Kgy com a finalidade de se eliminar os microrganismos contaminantes presentes nos mesmos.



Figura 4- Posição das mesas de radiação. O tubo central contém a fonte de Cobalto-60.

4. Análise em Cultura Microbiológica

Logo após que passaram pelo processo de esterilização Gama, as amostras dos biomateriais e uma amostra controle (amostra que não passou pelo processo de esterilização) foram plaqueadas em triplicada em placas microbiológicas com os seguintes meios para cultura:

- **BHI (*Brain Heart Infusion Agar*):** por ser um meio muito rico em nutrientes, é usado para crescimento de fungos e bactérias.
- **SAB (*Saboraud*):** usado para o cultivo, isolamento e identificação de fungos patogênicos e leveduras.

Seguindo o plaqueamento, as placas foram armazenadas em uma estufa. Após dois dias, as placas de AGAR e BHI foram analisadas através da contagem de colônias que cresceram nessas placas. As placas de SAB foram avaliadas após uma semana de incubação.

5. Avaliação do Processo de Esterilização por Radiação Gama

Para confirmarmos a eficiência da esterilização por radiação Gama e padronizar a melhor dose a ser usada para cada biomaterial, realizamos um teste microbiológico. Primeiramente, esterilizamos ~0,1 mL de amostra de cada biomaterial em eppendorfs, reservando uma amostra de cada sem passar pelo processo de esterilização os quais foram nossos controles.

Em seguida, foi inoculado em cada amostra uma concentração de 10^7 de bacilos da bactéria da espécie *Bacillus clausii*. Essa bactéria é uma Gram Positiva aeróbica que cresce rapidamente em meio rico a temperaturas entre 15 e 50 °C (tempo de geração cerca de 20-20 minutos). Além disso, elas formam esporos que são difíceis de eliminar (Gian *et al.*, 2007). Por apresentarem essas características, bactérias dessa espécie são usadas como modelo indicador de esterilização.

Após a inoculação, esperou-se 12 horas para uma interação da bactéria com o biocompósito e, em seguida, as amostras, exceto os controles, passaram novamente pelo processo de esterilização por radiação Gama. Após isso, as amostras foram plaqueadas em meio BHI e AS e foram acondicionadas em estufa a uma temperatura de 37 °C, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem das possíveis colônias dessas bactérias.

6. Avaliação Estrutural do Biomaterial Esterilizado

Após passarem pela esterilização por radiação Gama utilizando a dose selecionada pelo teste microbiológico, amostras de todos os biomateriais foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas a um processo de liofilização. O material liofilizado foi colocado no dessecador sob vácuo durante 48 horas. O trabalho de montagem das amostras foi feito sob uma lupa cobrindo os suportes de alumínio com cola de prata e fixando as amostras ao suporte com cola branca. Uma pequena região entre cada amostra e o suporte foi preenchida por cola branca para fazer o ladeado. Após a montagem, as amostras foram colocadas novamente no dessecador sob vácuo até o momento da metalização.

O processo de metalização foi realizado através do metalizador Edwards Scancoat Six do Laboratório de Microanálises do Departamento de Física do ICEX/UFMG utilizando uma corrente de 40 mA por 60 segundos.

As observações foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM 950 (West Germany) do Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do ICB/UFMG. Em todas as amostras foram observadas a superfície externa sob diversos aumentos. As imagens digitais foram posteriormente ajustadas quanto à resolução (300 dpi), contraste, foco e escala de cinza (curva sigmóide) utilizando o programa Adobe Photoshop. As imagens de cada biomaterial foram comparadas entre si de acordo com suas características morfológicas com o objetivo de descrever possíveis alterações.

7. Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com idade média de três meses e peso variando entre 200 e 250g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Os animais foram mantidos em biotério apropriado, acondicionados em gaiolas plásticas, sob temperatura ambiente e controle de luz automático (7-19h). Os animais receberam ração para animais e água *ad libitum*. A realização deste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo número 38/2011.

Os animais foram divididos em doze grupos experimentais tratados com os diversos biomateriais, conforme o Quadro 1.

Quadro 1: Grupos experimentais e tratamentos administrados.

Grupos	Tratamento	
	Alvéolo	Administração intraperitoneal
Controle	Coágulo	Salina
HY	1mg/alvéolo	1mg/100g
NTCPS	100µg/mL	0,75mg/kg
NTCPS-HY	100µg/mL	0,75mg/kg
NTCPM	100µg/mL	0,75mg/kg
NTCPM-HY	100µg/mL	0,75mg/kg

6. Procedimentos Cirúrgicos

6.1. Primeiro Modelo Experimental

O primeiro modelo usado foi o de defeito ósseo em alvéolos dentários. (Figura 5) Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1mL/100g), utilizado como relaxante muscular, e cloridrato de ketamina 10% (0,1mL/100g), anestésico geral. Após imobilização dos animais, foram realizadas as exodontias dos dentes primeiros molares superiores utilizando-se um instrumento de Holleback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação e remoção dos dentes. Após confirmação da integridade dos dentes removidos e dos alvéolos, foram injetados os diferentes tratamentos de acordo com os grupos experimentais: ~0,1ml do gel de HY 1%, ~0,1mL do gel de NTCPS, ~0,1mL do gel de NTCPS-HY, ~0,1mL do gel de NTCPM e ~0,1 mL do gel de NTCPM-HY esterilizados. Os tratamentos foram realizados de modo que todo o alvéolo ficasse preenchido com o material. Nenhum material foi

injetado nos alvéolos controle, ou seja, eles foram naturalmente preenchidos com coágulo (alvéolos controle) (Quadro 1). Não foi realizado nenhum procedimento de sutura após a exodontia. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram posicionados nas gaiolas em decúbito lateral direito para evitar que o gel escorresse e foram submetidos a uma dieta pastosa por 48 horas após as exodontias, com objetivo de reduzir a impactação de alimentos rígidos na área operada.



Campo cirúrgico

Sindesmotomia

Luxação

Alvéolo após exodontia

Figura 5: Procedimento cirúrgico de exodontia dos dentes primeiros molares superiores.

6.2. Segundo Modelo Experimental

Como segundo modelo experimental foi utilizado a administração do biomaterial via intraperitoneal (IP). Uma concentração maior do que a usada no tratamento via defeito ósseo, foi usada, pois um efeito mais exacerbado do biomaterial deveria ser avaliado. Os biomateriais foram administrados em concentrações conforme citado no Quadro 1 e nos animais controle foram administrados salina em volume equivalente.

7. Protocolo Experimental

No quinto dia após as cirurgias ou da aplicação intraperitoneal dos tratamentos, os animais foram adaptados em gaiolas metabólicas individualmente por um período de 24 horas e, logo após esse período, o volume urinário (24 horas), ingestão hídrica (24 horas) foram quantificados e o peso corporal foi registrado. Amostras de urina e sangue foram coletadas. Após a eutanásia dos animais os rins, tíbias e as maxilas também foram coletadas.

7.1 Coletas de Materiais

7.1.1. Coleta de Urina

Amostras de urina foram coletadas durante 24 h. O volume foi medido em proveta graduada e a amostra foi centrifugada (3000 rpm, 5 min) para posterior processamento. Alíquotas de 1 a 2 mL foram congeladas a -20 °C até o momento dos ensaios.

7.1.2. Coleta de Sangue

A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca ao fim do protocolo experimental. Foi administrado via IP uma dose de heparina de 125 UI para cada quilograma de peso corporal. Em seguida, os animais foram anestesiados e posicionados em uma superfície plana, em decúbito lateral direito e uma agulha foi inserida em um ângulo de 10 a 30° acima do abdômen, lateralmente ao processo xifóide. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o plasma foi armazenado em eppendorff a -20 °C.

7.1.3. Coleta dos Rins

Após o término dos experimentos, os ratos foram perfundidos com solução salina até os rins expostos cirurgicamente tornarem-se limpos. Posteriormente, os rins foram rapidamente extraídos, pesados e fixados em solução Bouin 4% por 24 horas e, então, transferidos para uma solução de etanol 70% para análises histológicas.

7.1.4. Coleta das Maxilas

As maxilas foram removidas e imediatamente fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FNT) 10% à temperatura ambiente após o término dos experimentos. Após a fixação, as maxilas foram submetidas à imersão em água corrente para a remoção do excesso de fixador e neutralização do ácido fórmico através de quatro banhos de 15 minutos. Em seguida, foram desmineralizadas em solução de Planck Rychlo por um período de aproximadamente 48 horas para análises histológicas.

7.2 Procedimentos Analíticos

7.2.1. Dosagem de Creatinina

O RFG foi estimado por meio do *clearance* de creatinina. As dosagens de creatinina urinária e sérica foram realizadas com o kit fornecido pela Bioclin K016 (Quibasa, Brasil), conforme instruções do fornecedor. Este método consiste em uma reação colorimétrica entre a creatinina e o ácido pícrico, cujo produto é amarelo-avermelhado. Os meios de reação foram preparados de acordo com o quadro a seguir:

Quadro 2: Sumário da dosagem de creatinina.

Tubo	Amostra	Água	Reagente 1	Reagente 2	Reagente 3	Reagente 4
Branco	-----	100 µL	-----	200 µL	800 µL	40 µL
Padrão 3mg/dL	-----	-----	100 µL	200 µL	800 µL	-----
Padrão 1mg/dL	-----	-----	100 µL	200 µL	800 µL	-----
Padrão 0,5mg/dL	-----	-----	100 µL	200 µL	800 µL	-----
Urina diluída	100 µL	-----	-----	200 µL	800 µL	-----
Plasma	10 µL	-----	-----	200 µL	800 µL	40 µL

As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 37 °C, por 10 min. As absorvâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV - 160 A, Japão), em comprimento de onda de 510nm, acertando o zero com o branco. Essa absorvância foi utilizada para a determinação da concentração de creatinina nas amostras de urina. Para as amostras de plasma, esse primeiro valor de absorvância é denominado de A1. Após a leitura de A1, às amostras de plasma e ao branco foram adicionados 0,05 mL do reagente nº 4. Após a homogeneização, uma segunda leitura de absorvância das amostras de plasma (A2) foi feita também a 510 nm, acertando o zero com o branco.

As amostras de urina foram previamente diluídas 1:25 e não passaram pela etapa de acidificação, como o plasma. A concentração de creatinina, em mg/dL, foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = (A1-A2/\text{absorbância padrão}) \times 3$$

Como a reação segue a lei de Lambert-Beer, o fator de calibração pode ser usado.

Fator de calibração = concentração do padrão / absorbância do padrão

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = (A1-A2) \times \text{fator de calibração}$$

$$\text{RFG (mL/min)} = ([\text{Creatinina}] \text{ urina} \times \text{Fluxo urinário}) / [\text{Creatinina}] \text{ plasma}$$

A fração de excreção de água (FEH₂O) foi avaliada segundo a equação:

$$\text{FEH}_2\text{O (\%)} = \text{Fluxo urinário} / \text{RFG} \times 100$$

7.2.2. Microalbuminúria

A dosagem de microalbuminúria urinária foi feita por meio da ligação com anticorpos anti-albumina utilizando o kit Microalbuminúria K078 Bioclin (Quibasa S/A, Brasil) e de acordo com as instruções do fornecedor. Essa técnica baseia-se na aglutinação da albumina presente nas amostras de urina com as partículas de látex recobertas com anticorpos anti-albumina. A concentração de albumina na amostra é diretamente proporcional à aglutinação obtida, que é medida por turbidimetria. Antes de iniciar o ensaio, mapeou-se a distribuição das amostras, bem como da curva padrão e do branco, na placa de Elisa. Primeiramente, foi preparado o reagente de trabalho: 12,5 mL do R1 (tampão) + 1 mL do R2 (Antisoro). Em seguida foram feitas as diluições para construção da curva de calibração, onde se diluiu o calibrador com água deionizada de forma seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) para se obter 5 níveis de calibração. Foi utilizada água deionizada como sexto nível de calibrador (calibrador mais baixo – 0 mg/L). Plotamos a curva em um gráfico de Absorbância (eixo x) x concentrações dos calibradores (eixo y).

Após a preparação dos calibradores, foi preparada a amostra onde, primeiramente, fizemos a diluição de 1:5 (20 µL das amostras e 8 µL de água deionizada). Pipetou-se 6 µL das amostras diluídas nos poços da placa.

Utilizando uma pipeta multicanal, 194 µL do reagente de trabalho foram adicionados aos poços. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos à 37 °C. O leitor de Elisa foi programado para leitura a 340nm.

Para obter a concentração da microalbumina nas amostras, a diferença de absorção: A2 – A1 foi calculada. Em seguida, a diferença de absorção encontrada (A2-A1) foi relacionada a cada um dos pontos da curva padrão. Calculou-se, então, a equação da reta que define esta correlação e, de posse dela, interpolamos os valores de absorbância encontrados em cada amostra à equação, obtendo a quantidade de microalbumina em um determinado volume de urina. A unidade utilizada foi microgramas de albumina a cada mililitro de urina (mg/mL).

Para a expressão do resultado em mg/24 horas foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\text{Microalbuminúria} = \text{microalbuminúria} \times \text{volume urinário}$$

7.2.3. Dosagem de Sódio e Potássio

As dosagens de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) nas amostras de plasma e urina foram determinadas por fotometria de chama (CELM, FC180). O fotômetro de chama mede a intensidade da radiação emitida pelos átomos excitados dos metais terrosos e a intensidade dessa emissão é proporcional a concentração desses metais nas amostras. Previamente à leitura das amostras, o fotômetro foi calibrado com as soluções padrões de sódio (140 mEq/l) e potássio (5mEq/l). As amostras de plasma foram diluídas 1:200 para a leitura de sódio e potássio. Já as amostras de urina foram diluídas 1:200 para a leitura do sódio e para a leitura do potássio foi feito uma diluição de 1:30 e um segunda diluição de 1:200.

$$\text{FENa}^+ (\%) = \text{QE Na}^+ / \text{QFNa}^+ \times 100$$

$$\text{FEK}^+ (\%) = \text{QEK}^+ / \text{QFK}^+ \times 100$$

$$\text{FRNa}^+ (\%) = 100 - \text{FENa}^+$$

$$\text{FRK}^+ (\%) = 100 - \text{FEK}^+$$

Sendo: FE, fração de excreção; FR, fração de reabsorção; QE, quantidade excretada; QF, quantidade filtrada

7.2.4. Osmolalidade Plasmática e Urinária

A medida da osmolalidade sérica e urinária foi feita utilizando um osmômetro de ponto de congelamento (Microsmette, Advanced Instruments). As amostras de plasma foram diluídas 1:2 e as amostras de urina foram diluídas 1:4. Previamente à leitura das amostras, o osmômetro foi calibrado com soluções padrões cujas concentrações eram de 100 mOsm/kg, 290 mOsm/kg e 500 mOsm/kg.

Cosm (mL/min) = osmolalidade urina (μ Osm/mL) / osmolalidade plasmática (μ Osm/mL) x FU (ml/min)

CH₂O (mL/min) = FU (mL/min) - Cosm (mL/min)

Sendo: C, *clearance*; osm, osmolar; FU, fluxo urinário

7.3 Análises Histológicas

7.3.1. Rim

Cortes longitudinais do rim esquerdo foram coletados de todos os animais, conforme descrito no item 7.1.3. Os rins foram armazenados em álcool etílico 70% até o processamento histológico. O processamento histológico foi realizado da seguinte maneira:

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

Duas lâminas de cada amostra com 3 cortes de 6 µm contendo a área de interesse foram processadas para a coloração com hematoxilina e eosina (HE), seguindo as seguintes etapas:

- imersão em xilol (I) por 30 minutos
- imersão em xilol (II) por 15 minutos
- imersão em xilol (III) por 15 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 90% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 80% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 70% por 2 minutos
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de hematoxilina de Harris por 40 segundos
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de eosina por 1 minuto
- 3 mergulhos rápidos em água corrente
- imersão em álcool etílico a 90% por 1 minuto
- imersão em álcool etílico a 95% por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 1 minuto
- imersão em xilol (I) por 2 minutos
- imersão em xilol (II) por 2 minutos
- imersão em xilol (III) por 10 minutos

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

7.3.2. Maxila

Após a fixação como descrito no item 7.1.4, as maxila foram submetidas à imersão em água corrente para remoção do excesso de fixador e neutralização do ácido fórmico através de quatro banhos de 15 minutos. Em

seguida, elas foram desmineralizadas em solução de Planck Rychlo por um período de aproximadamente 48 horas. Após a desmineralização, as maxilas foram imersas em água corrente para a remoção do excesso de descalcificador em quatro banhos de 15 minutos. O seguinte processo de inclusão foi utilizado:

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

Foram obtidos de cada amostra cerca de 30 cortes semi-seriados de 6 µm de espessura montados em lâminas histológicas previamente silanizadas com silano 2%. Duas lâminas de cada amostra com 4 cortes no total contendo a área de interesse foram processadas para a coloração com Tricrômico de Masson, segundo as seguintes etapas:

- imersão em xilol (I) por 30 minutos
- imersão em xilol (II) por 15 minutos
- imersão em xilol (III) por 15 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 90% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 80% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 70% por 2 minutos
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de Tricrômico de Masson por 8 minutos
- 3 mergulhos rápidos em água corrente
- imersão em álcool etílico a 90% por 1 minuto

- imersão em álcool etílico a 95% por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 1 minuto
- imersão em xilol (I) por 2 minutos
- imersão em xilol (II) por 2 minutos
- imersão em xilol (III) por 10 minutos

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

7.4 Análises Morfométricas

7.4.1. Rim

As secções de rim de 6 μm , retiradas sempre longitudinalmente com presença de área medular e cortical, foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina para avaliação morfométrica. Posteriormente, foram adquiridas imagens digitais do tecido com auxílio do microscópio óptico modelo Olympus BX 41 (objetiva de 40x), acoplado a uma câmara digital microcâmara JVC TK-1270/RGB. Imagens adquiridas de 10 campos contendo glomérulos, por lâmina, foram submetidas às análises morfométricas utilizando-se o programa *Image J*. Através desse programa, os seguintes parâmetros histológicos foram analisados: diâmetro da cápsula de Bowman (Figura 6A), diâmetro do tufo glomerular (Figura 6B), diâmetro do espaço de Bowman (calculado pela diferença entre o diâmetro da cápsula de Bowman e o diâmetro do tufo glomerular).

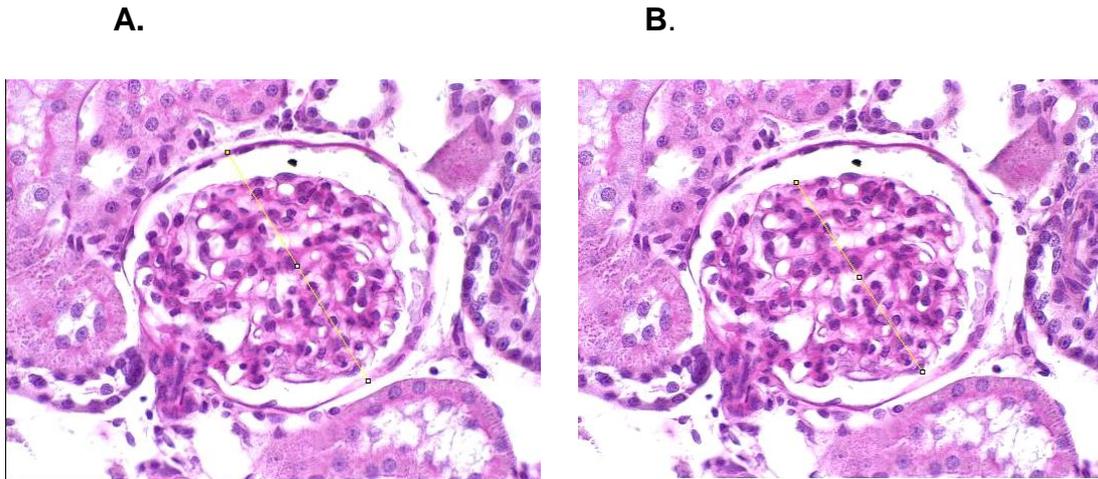


Figura 6: Medida do diâmetro da cápsula de Bowman (A) e do diâmetro do tufo glomerular (B). Coloração: HE; aumento de 40x. A linha delgada amarela indica a extensão da medida. Fonte: (Portella.,2010)

7.4.2. Alvéolo (Maxila)

Os alvéolos das raízes distais foram divididos anatomicamente em terços apical, médio e cervical (Figura 7). Em quatro cortes histológicos diferentes foram obtidas 12 imagens (40X) de cada terço (apical e médio) de alvéolos distais bem definidos, totalizando uma área de $6,4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ por terço. 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. 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.

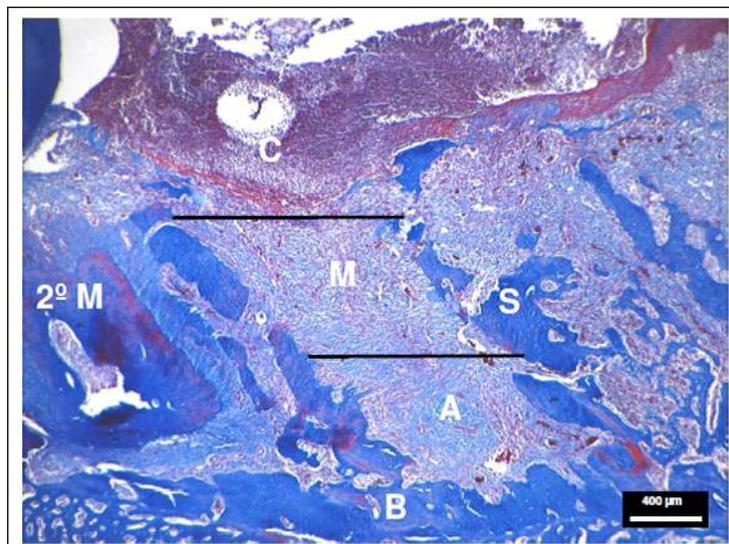


Figura 7: Divisão anatômica do alvéolo da raiz distal do primeiro molar superior em terços apical, médio e cervical. A: terço apical; M: terço médio; C: terço cervical; 2ºM: segundo molar; B: osso basal; S: septo ósseo. Barra = 400µm. Coloração pelo Tricrômico de Masson. Fonte: Mendes *et al.*, 2008.

Cálculo para determinar o percentual de trabéculas ósseas neoformadas nos alvéolos

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

8. Análise Estatística

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

V. RESULTADOS

1. Esterilização por Radiação Gama

1.2. Plaqueamento em Meios de Cultura

As Tabelas 1 a 10 sumarizam o número de colônias de microrganismos que proliferaram após o processo de esterilização por irradiação Gama. Podemos observar que nas placas contendo HY não houve proliferação de microrganismos nos controles. Nos outros biomateriais, colônias foram observadas nos controles e nas amostras que foram esterilizados até a dose de 500 gy, sendo que esse número diminuiu com o aumento da dosagem de radiação. A partir dessa dose não houve proliferação de colônias.

Tabela 1: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do HY testado em meio BHI.

	HY (BHI)											
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 2: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do HY testado em meio SAB.

	HY (SAB)											
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 3: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPS testado em meio BHI.

	NTCPS (BHI)											
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 4: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPS testado em meio SAB.

	NTCPS (SAB)											
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 5: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPH-HY testado em meio BHI.

NTCPS-HY (BHI)												
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 6: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPH-HY testado em meio SAB.

NTCPS-HY (SAB)												
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	1	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 7: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM testado em meio BHI.

NTCPM (BHI)												
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	13	10	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 8: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM testado em meio SAB.

		NTCPM (SAB)										
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 9: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM-HY testado em meio BHI.

		NTCPM-HY (BHI)										
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	67	51	35	21	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Tabela 10: Eficiência da radiação Gama no processo de esterilização do NTCPM-HY testado em meio SAB.

		NTCPM-HY (SAB)										
	C	100gy	250gy	500gy	1kgy	2,5kgy	5kgy	10kgy	15kgy	20kgy	25kgy	30kgy
A1	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	14	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3	16	5	30	20	0	0	0	0	0	0	0	0

A: amostra; C: controle.

Com o objetivo de confirmar os dados apresentados anteriormente, avaliamos a eficiência do processo de esterilização por radiação Gama comparando o número de colônias de microrganismos presentes em placas que passaram ou não pelo processo de esterilização. Vale lembrar que os biomateriais foram previamente inoculados com 10^7 bactérias de uma espécie esporulada. Observamos que a dose de 250gy foi suficiente para eliminar todas as bactérias que foram inoculadas no HY. Para os demais biomateriais, o número de colônias observadas após a esterilização com a dose de 2,5kgy foi irrelevante, pois nos controles um número superior a 300 colônias em cada amostra foi observado (Tabela 11).

Tabela 11: Análise microbiológica dos biomateriais após serem esterilizados por irradiação Gama.

Parâmetro	HY (250gy)		NTCPS (2,5Kgy)		NTCPS-HY (2,5Kgy)		NTCPM (2,5Kgy)		NTCPM-HY (2,5Kgy)	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Amostra 1	9	0	Inc.	34	Inc.	1	Inc.	1	Inc.	33
Amostra 2	12	0	Inc.	36	Inc.	3	Inc.	32	Inc.	29
Amostra 3	13	0	Inc.	42	Inc.	9	Inc.	35	Inc.	30

A esterilização foi realizada 24h após a inoculação das bactérias. Os valores representam o número de colônias bacterianas por μl . C: controle; E: esterilizado; Inc. incontável.

1.2. Avaliação Estrutural do Biomaterial Esterilizado

A análise das eletromicrografias de varredura possibilitou a caracterização estrutural dos biocompósitos. As amostras esterilizadas de HY não apresentaram grandes alterações morfológicas, sendo observado apenas um pequeno aumento na porosidade do material submetido à esterilização quando comparado ao material não esterilizado (controle) (Figuras 8, 10 e 12). Em relação aos biocompósitos de NTC associados ou não ao HY, no menor aumento (150X) (Figura 10 e 11) nenhuma alteração estrutural visível foi observada nas amostras esterilizadas. No médio aumento (500X) (Figuras 12 e

13), todas as amostras de biocompósitos apresentaram microfissuras em sua superfície. Como essas irregularidades também estavam presentes nas amostras não esterilizadas é provável que elas sejam naturais da superfície dos biocompósitos. A superfície dos biocompósitos (NTCPS e NTCPS-HY) submetidos à esterilização apresentou-se um pouco mais lisas do que os seus respectivos controles. Essas microfissuras, anteriormente descritas, foram vistas mais detalhadamente no maior aumento (800X) (Figura 15 e 16), sendo possível observar que não existem diferenças visíveis no número e na disposição destas microfissuras nas amostras de NTCPM, NTCPM-HY e NTCPS-HY. Já nas amostras de NTCPS esterilizadas, observou-se uma superfície ligeiramente mais lisa quando comparado ao seu controle.

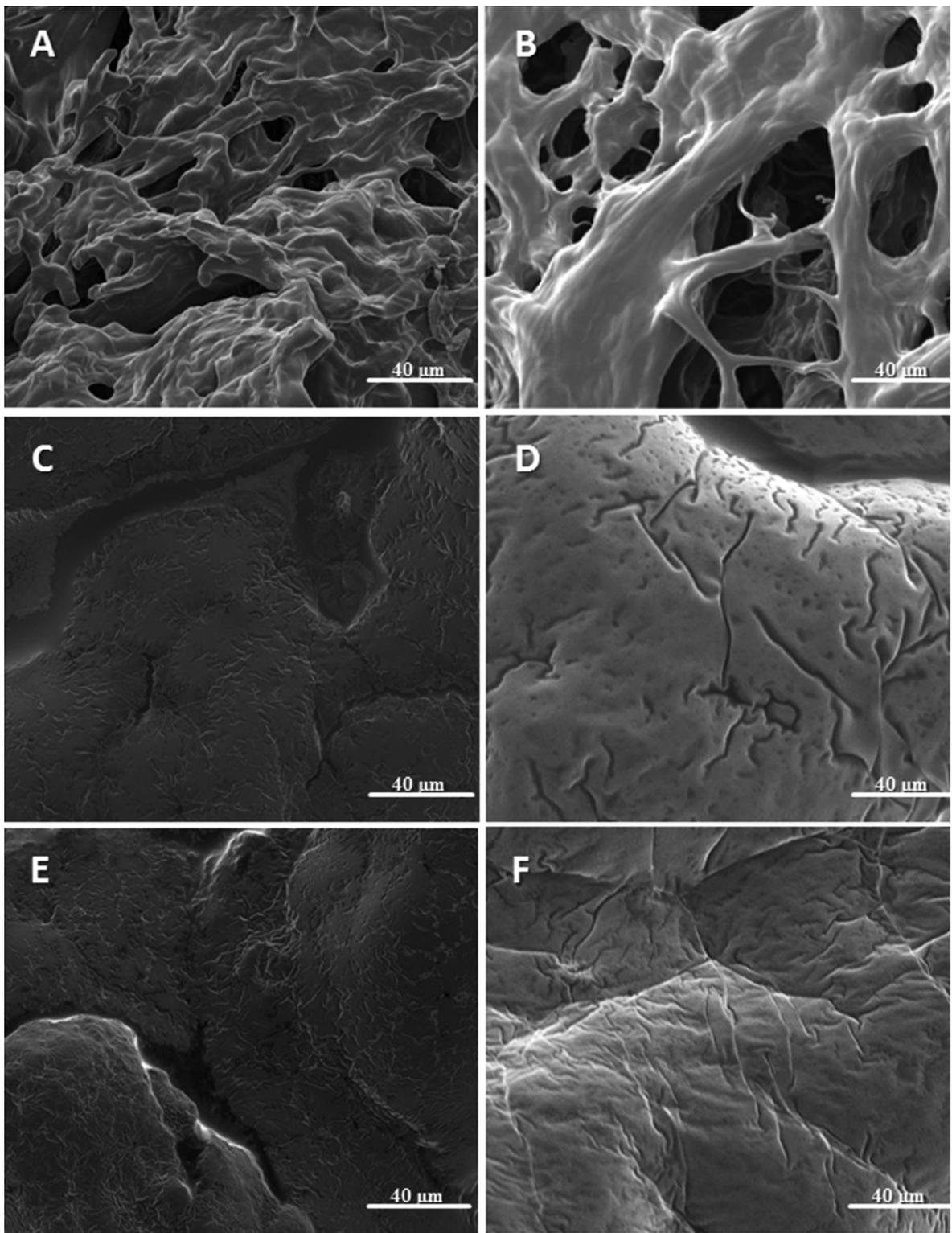
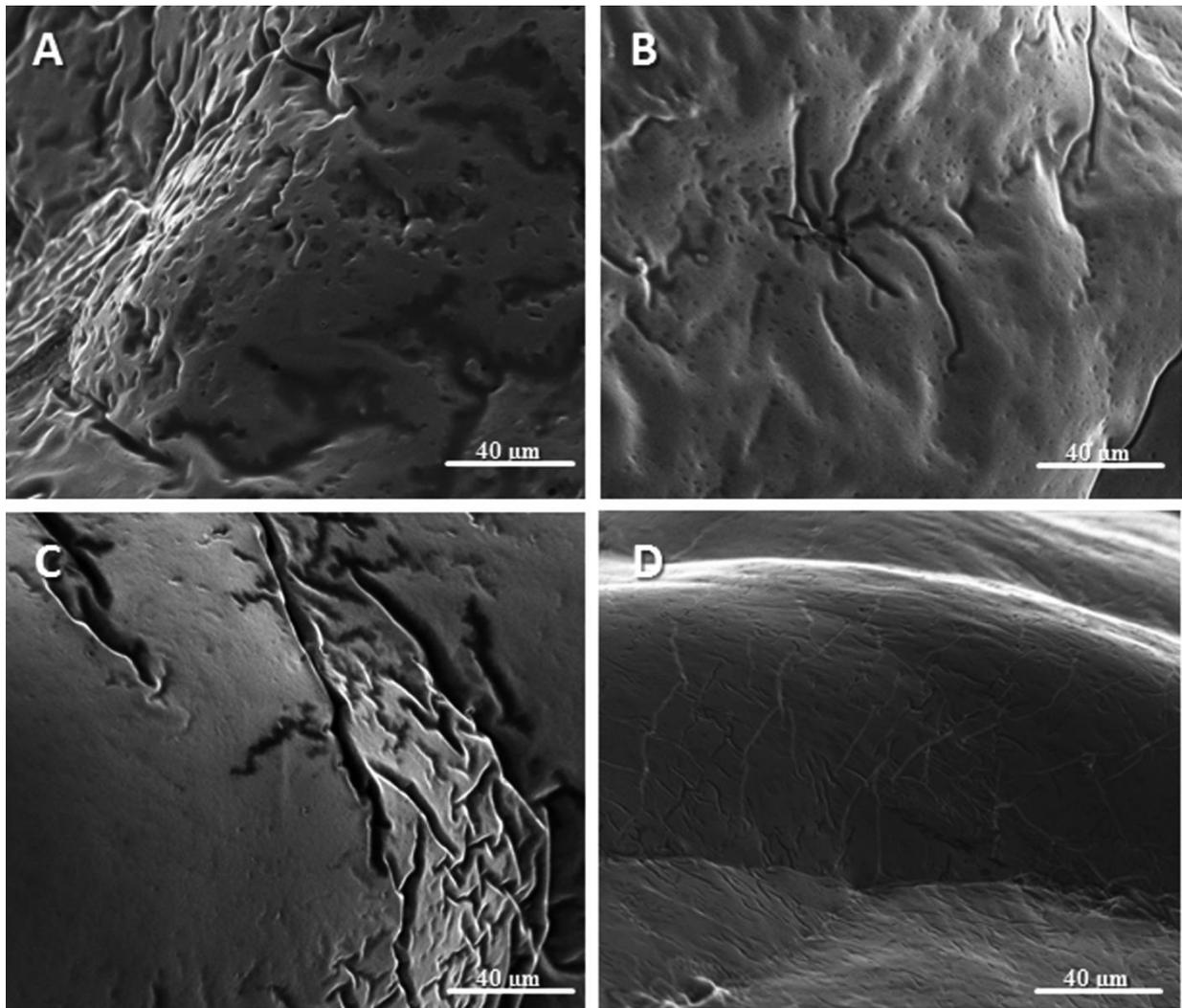


Figura 8. Eletromicrografias de varredura de biocompósitos de NTC associados ou não com HY. Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (HY), C (NTCPM) e (NTCPM-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama em: B(HY) D(NTCPM) e F(NTCPM-HY).



Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (NTCPS) e C (NTCP-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama: B (NTCPS) e D (NTCPS-HY). Observe em todas em as eletromicrografias a presença de microfissuras.

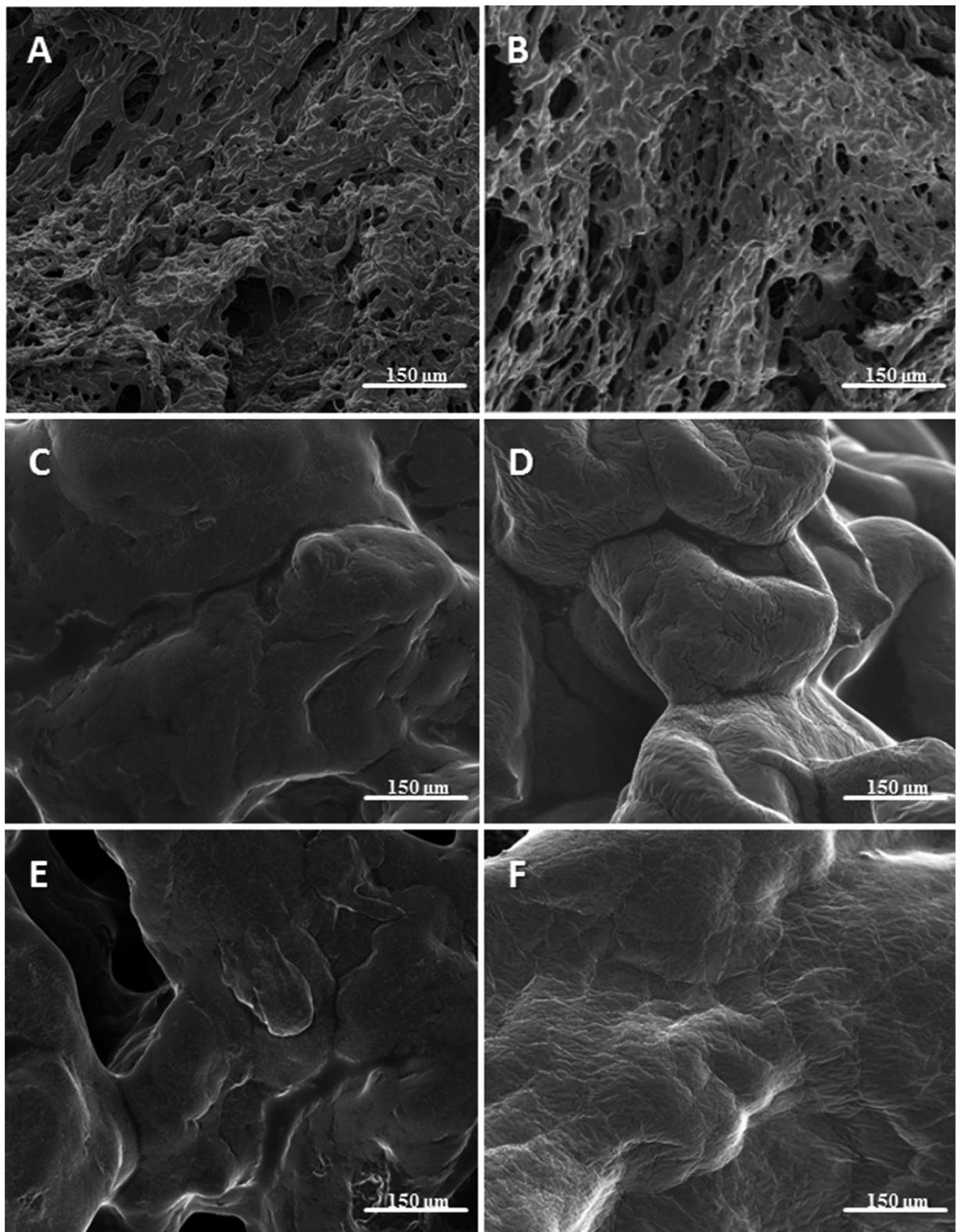


Figura 10. Eletromicrografias de varredura de biocompósitos de NTC associados ou não com HY. Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (HY), C (NTCPM) e (NTCPM-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama em: B(HY) D (NTCPM) e F(NTCPM-HY). Observe a presença de poros nas figuras A e B, observe nos demais aumentos a presença de microfissuras.

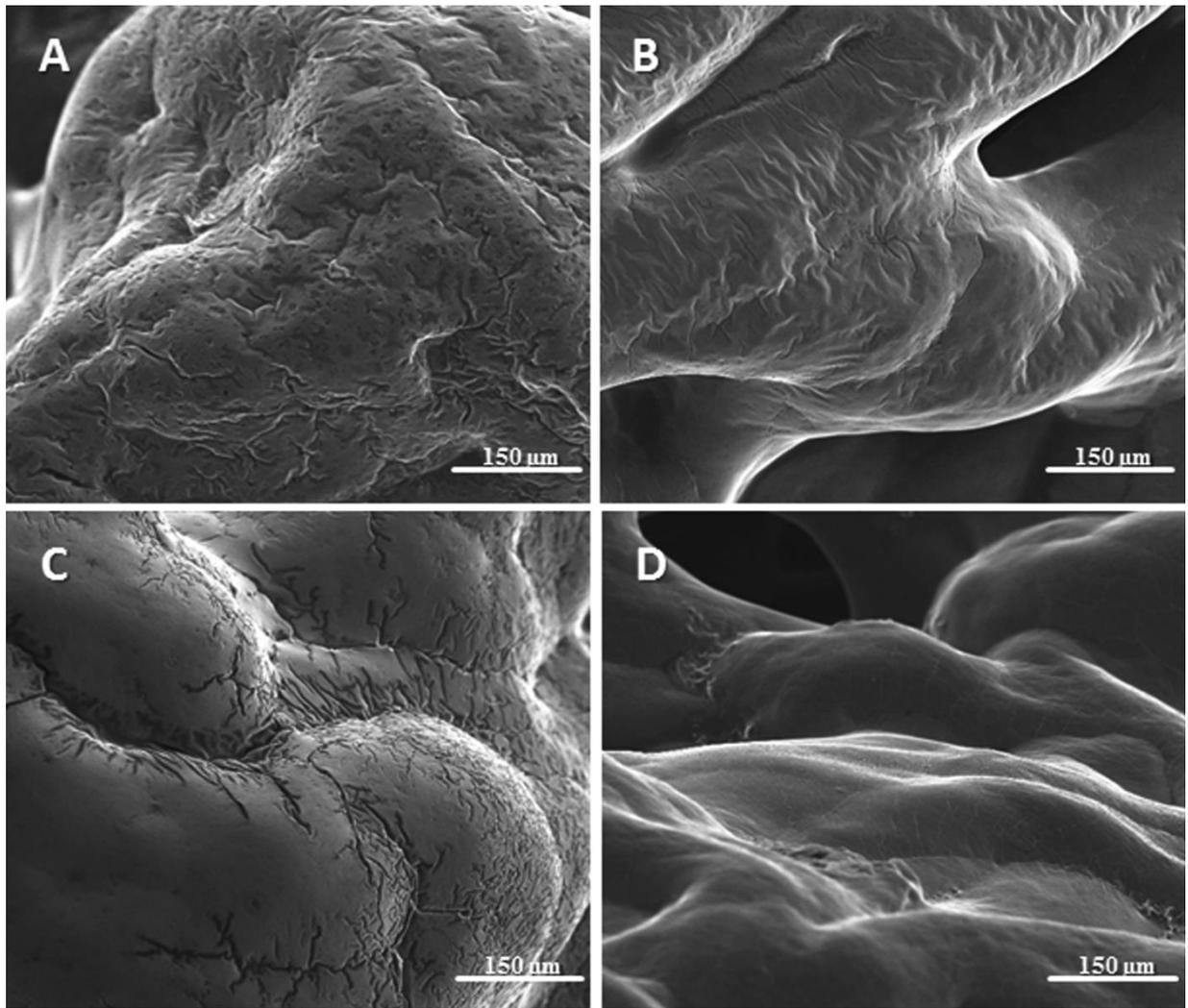


Figura 11. Eletromicrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY. Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (NTCPS) e C (NTCP-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama: B (NTCPS) e D (NTCPS-HY). Observe em todas em as eletromicrografias a presença de microfissuras.

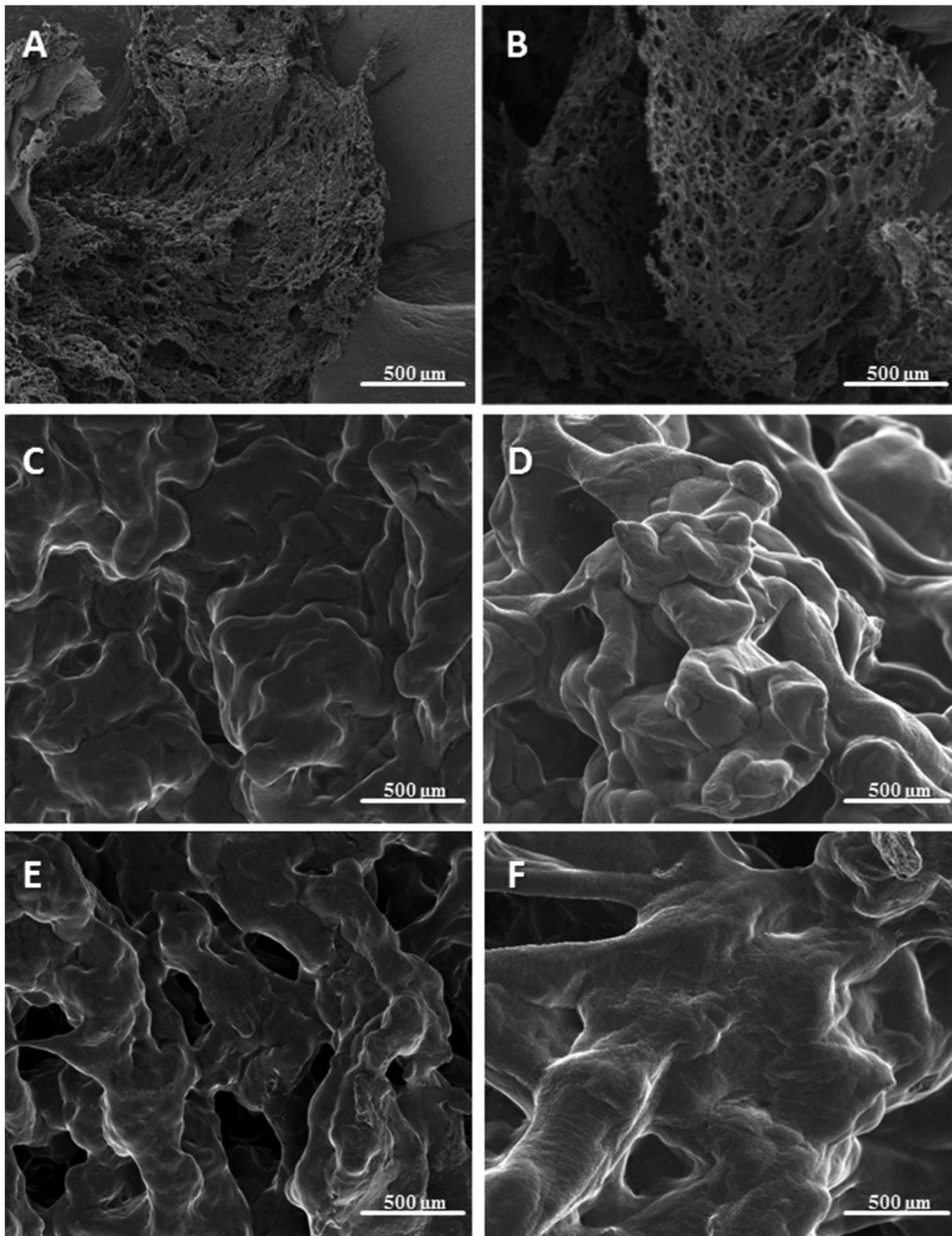


Figura 12. Eletromicrografias de varredura de biocompósitos de NTC associados ou não com HY. Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (HY), C (NTCPM) e (NTCPM-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama em: B (HY) D (NTCPM) e F (NTCPM-HY). Observe a presença de poros nas eletromicrografias A e B.

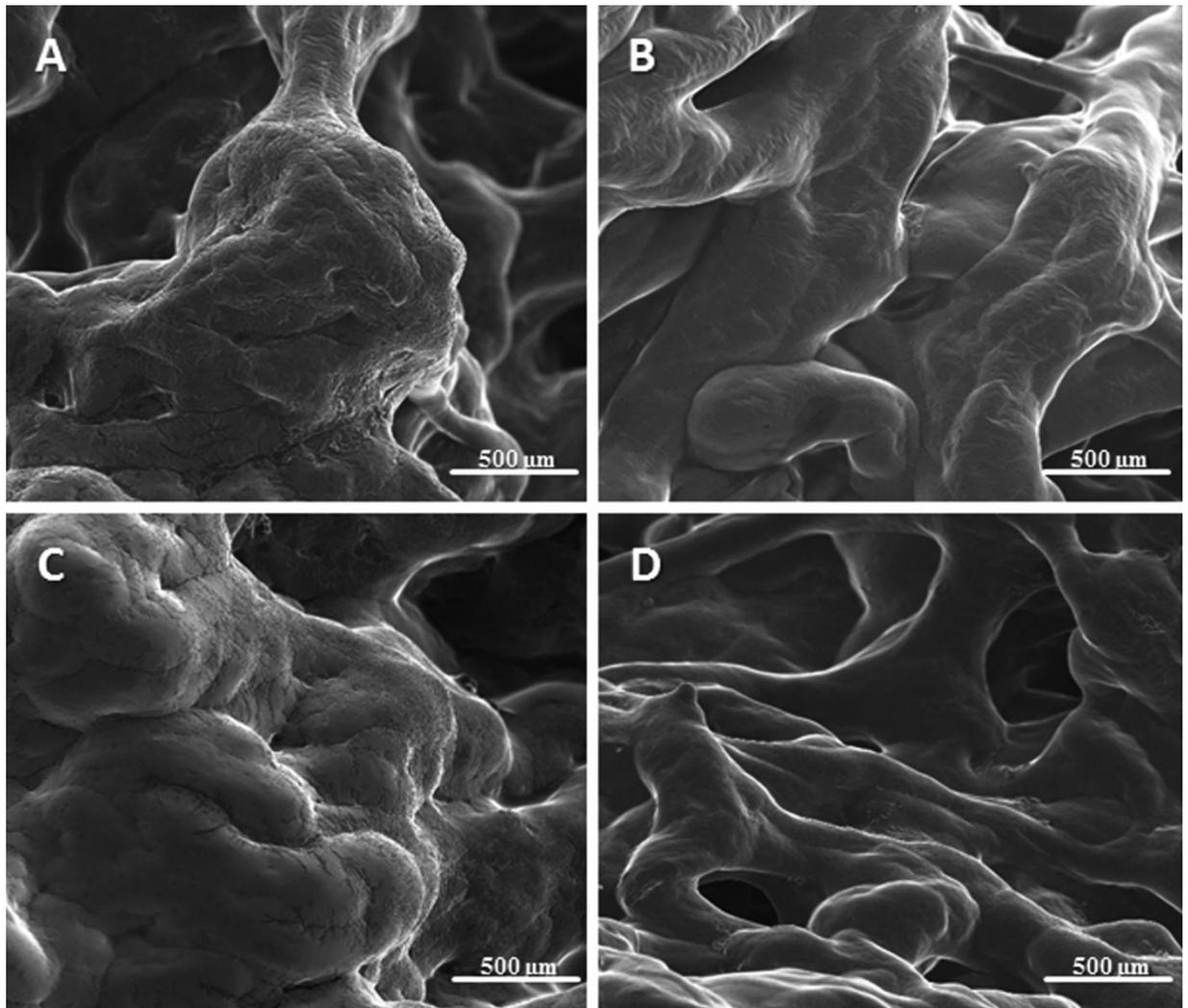


Figura 13: Eletromicrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY. Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (NTCPS) e C (NTCP-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama: B (NTCPS) e D(NTCPS-HY).

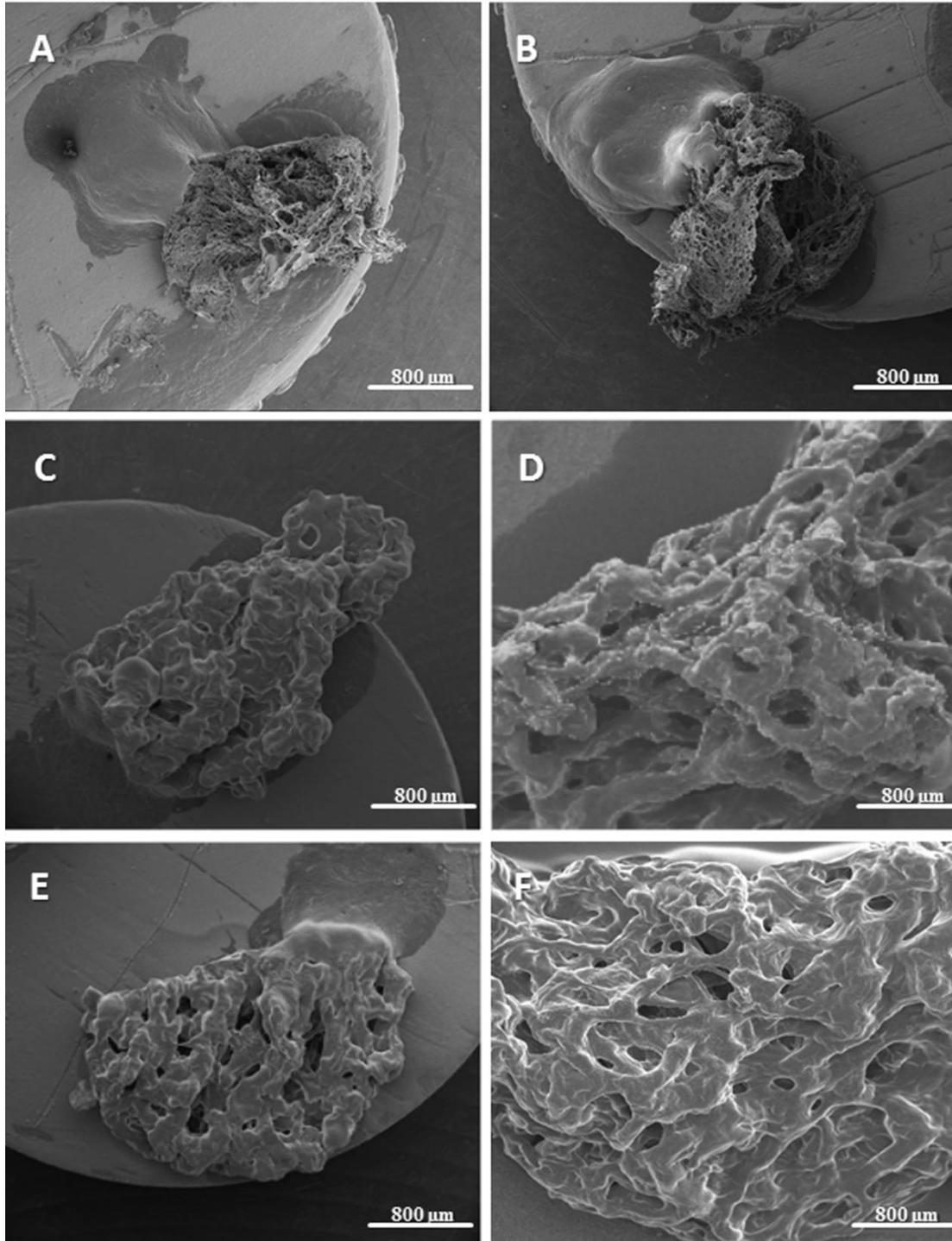


Figura 14. Eletromicrografias de varredura de biocompósitos de NTC associados ou não com HY. Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (HY), C (NTCPM) e (NTCPM-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama em: B (HY) D (NTCPM) e F (NTCPM-HY). Observe a presença de poros nas eletromicrografias A e B.

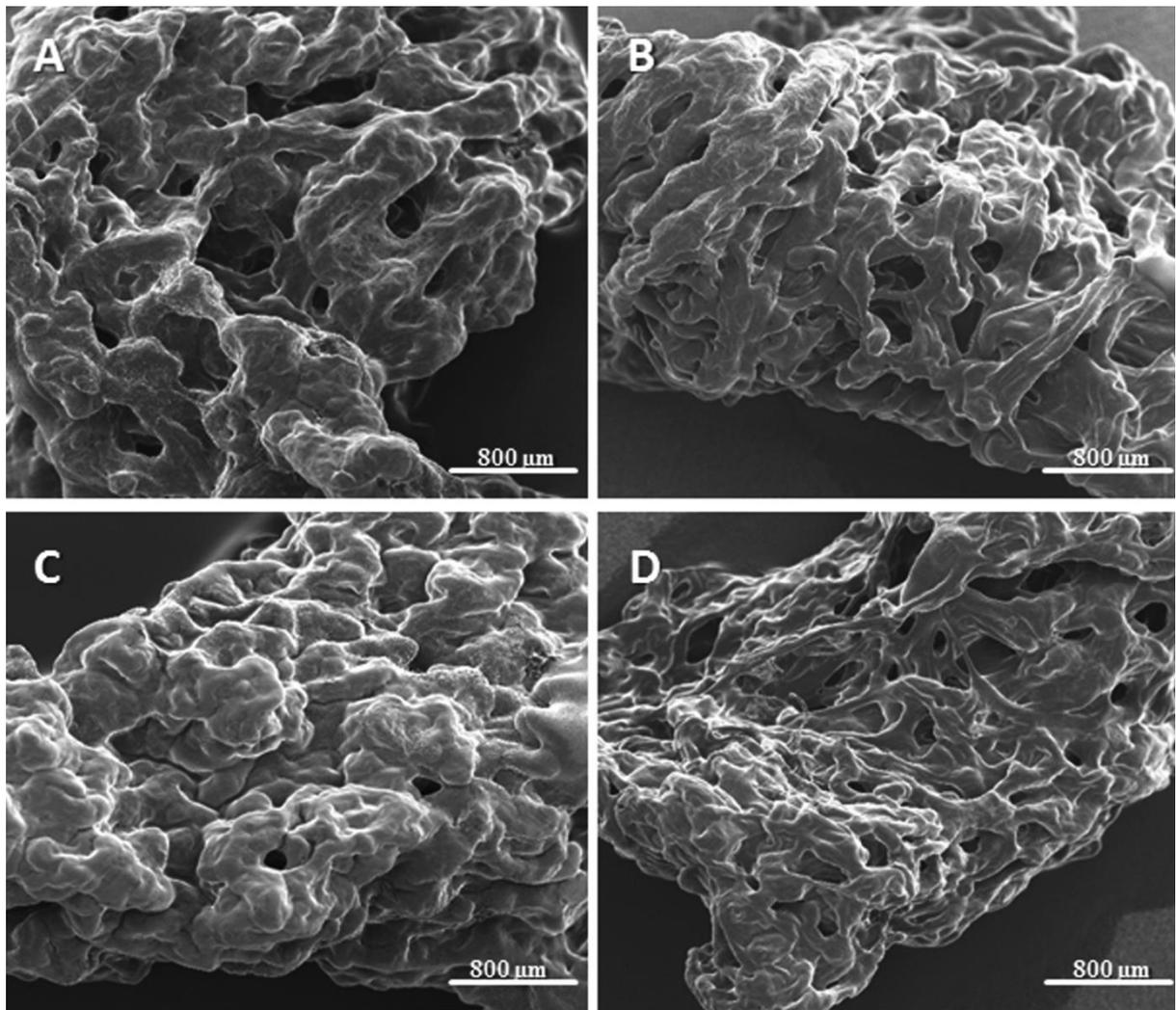


Figura 15: Eletromicrografias de biocompósitos de NTC associados ou não com HY. Amostras controles não esterilizada por radiação Gama: A (NTCPS) e C (NTCP-HY). Amostras esterilizadas por radiação Gama: B (NTCPS) e D (NTCPS-HY).

1.3. Avaliação Funcional dos Biocompósitos Esterilizados por Radiação Gama

Após 7 dias da extração dentária e da administração dos biocompósitos esterilizados por irradiação Gama no defeito ósseo, a análise morfométrica demonstrou que o percentual de trabéculas ósseas, em relação à área total, foi significativamente maior nos alvéolos tratados com tratados com os biomateriais em relação aos alvéolos controle (Figura 16)

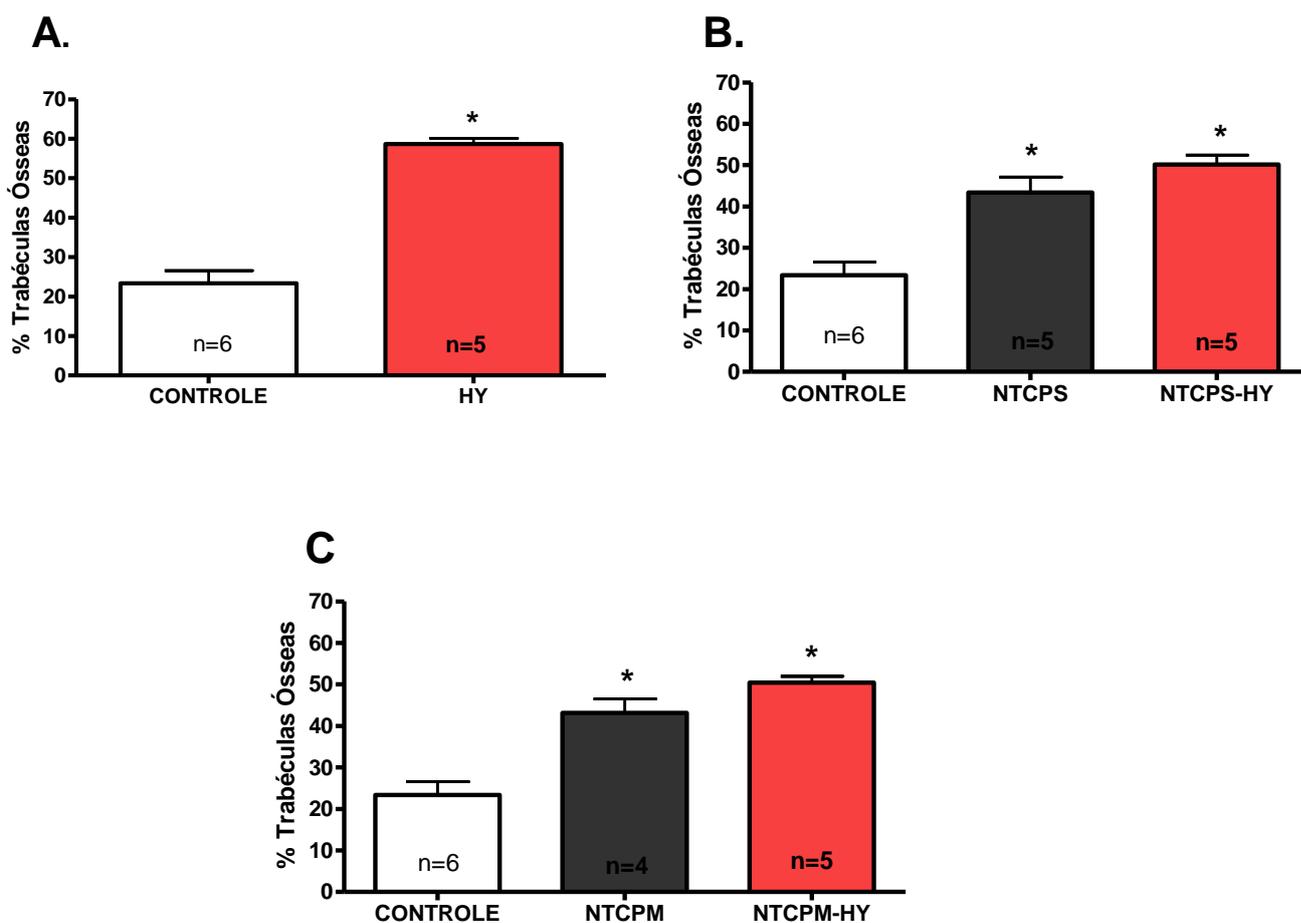


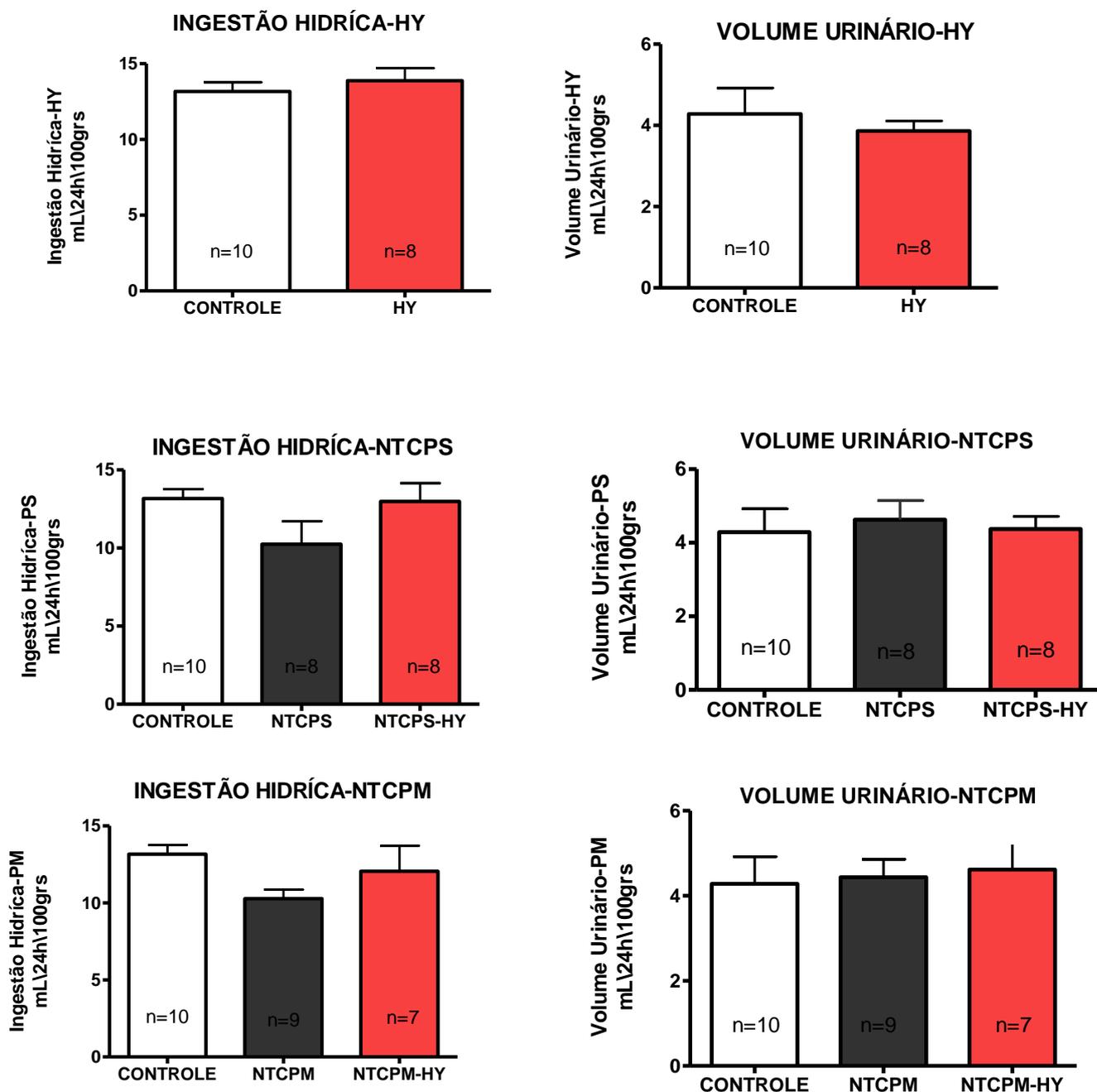
Figura 16: Porcentagem de trabéculas ósseas presentes em alvéolos dentários sete dias após as exodontias em ratos tratados com biocompósitos esterilizados por radiação Gama. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. (teste t de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

2. Efeitos da Administração dos Biocompósitos no Alvéolo Dentário e IP na Função Renal

2.1.1. Ingestão Hídrica e Volume Urinário

As Figuras 17A e 17B mostram que a administração dos biocompósitos no defeito ósseo (Figura 17A) ou via IP (Figura 17B) não modificou os parâmetros de ingestão hídrica e volume urinário nos grupos tratados em relação a seus grupos controles.

A.



B.

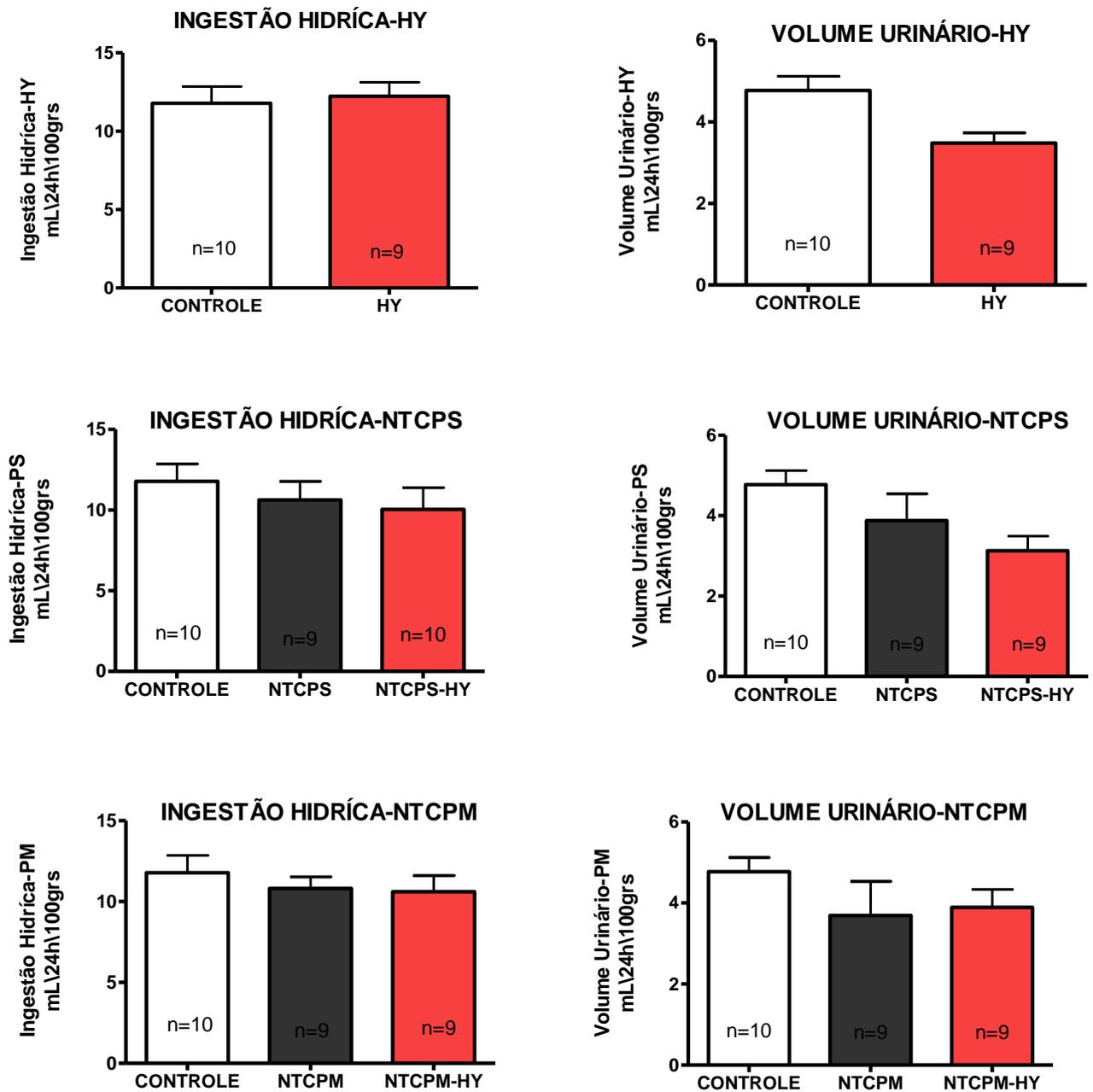


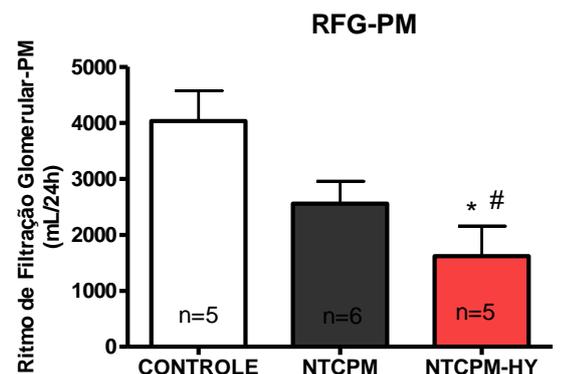
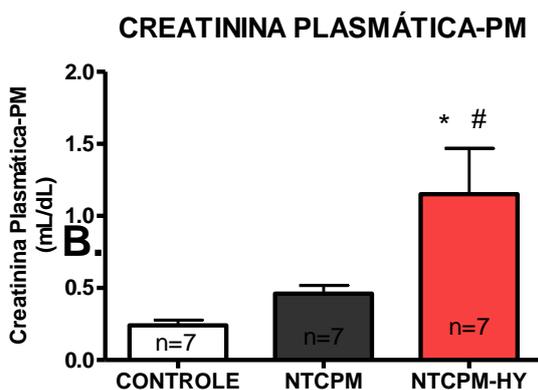
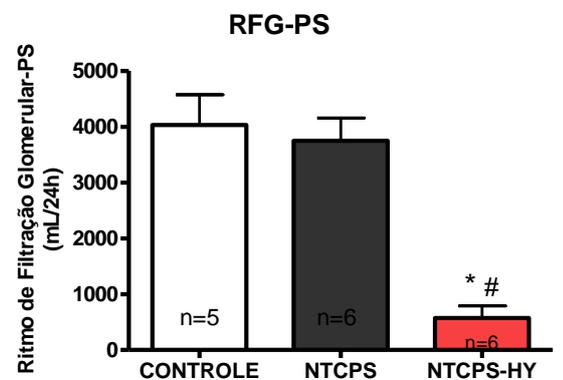
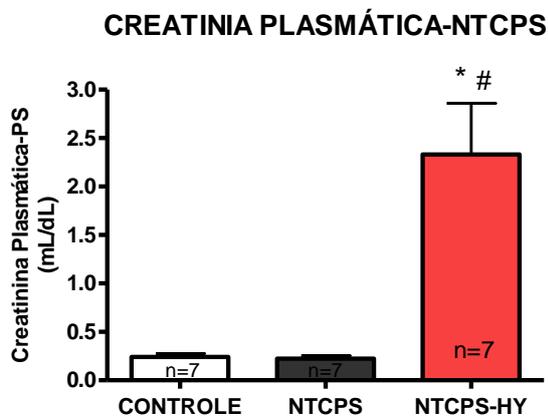
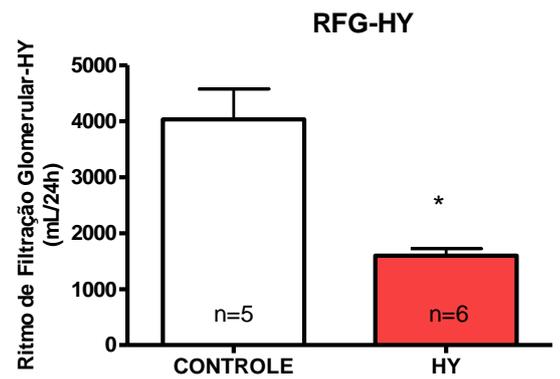
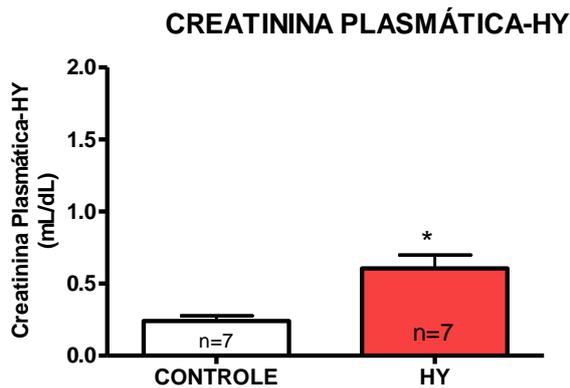
Figura 17. Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (A) ou IP (B) na ingestão hídrica e volume urinário. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. (teste t de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

2.1.2. Creatinina Plasmática e Ritmo de Filtração Glomerular

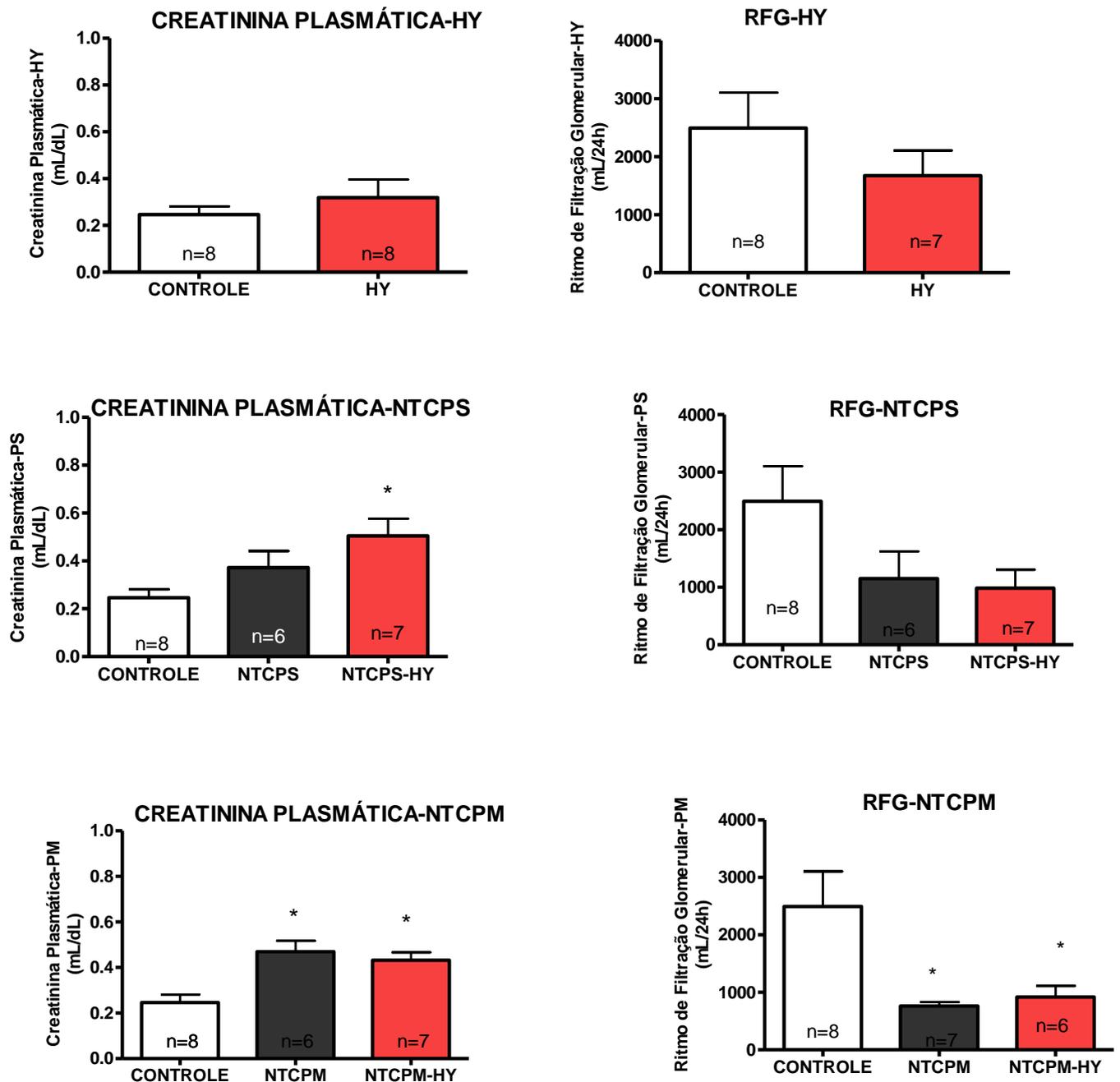
O RFG foi determinado através do *clearance* de creatinina. Conforme ilustrado nas Figuras 18A e 18B, a administração no defeito ósseo e de

NTCPS-HY, NTCPM e NTCPM-HY via IP promoveram um aumento na concentração plasmática de creatinina. Concomitantemente, houve uma queda do RFG nesses mesmos grupos, exceto no grupo NTCPS-HY administrado intraperitonealmente.

A.



B.

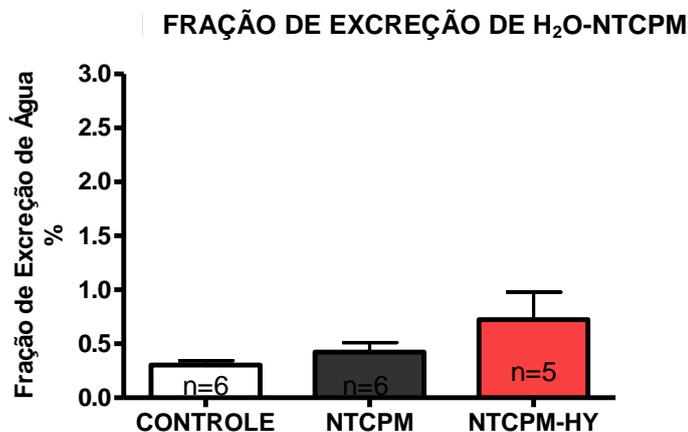
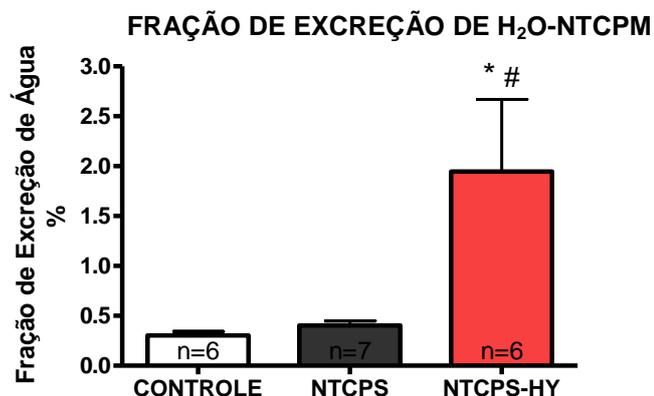


Figuras 18. Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (A) ou IP (B) na creatinina plasmática e no ritmo de filtração glomerular (RFG). Os valores representam a média \pm erro padrão * $P < 0,05$ vs. controle e # $P < 0,05$ vs. NTC não associado ao HY (teste t de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

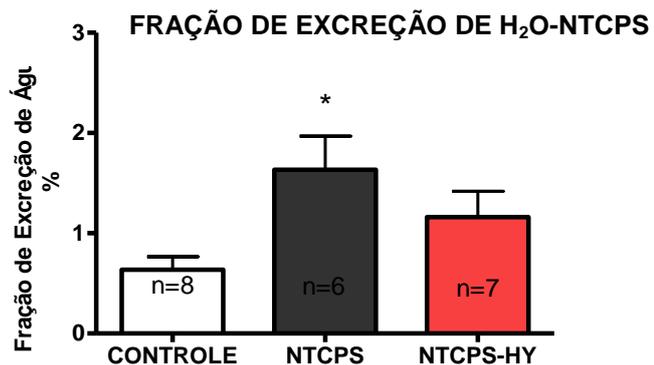
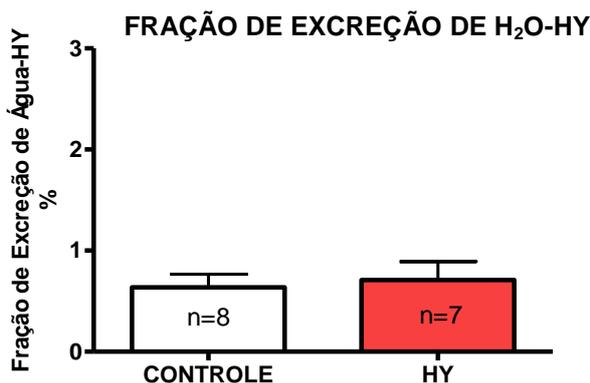
2.1.4. Fração de Excreção de Água Livre

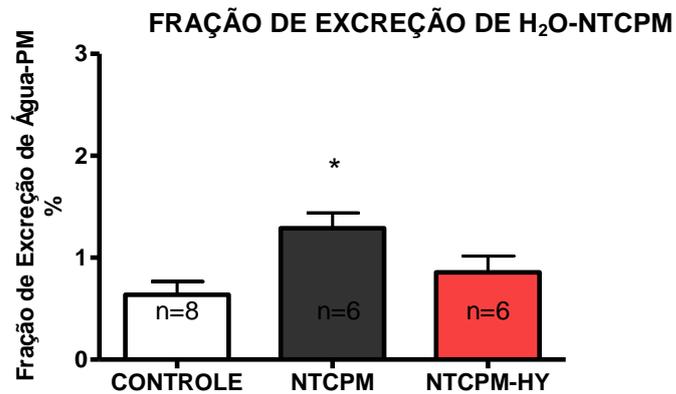
A fração de excreção de água foi significativamente maior nos animais cujos alvéolos foram tratados com HY ou NTCPS-HY (Figura 19A) e nos animais administrados intraperitonealmente com NTCPS e NTCPM (Figura 19B). Nos outros tratamentos não houve diferenças significativas.

A.



B.





Figuras 19. Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (A) ou IP (B) na fração de excreção de água. Os valores representam a média \pm erro padrão * $P < 0,05$ vs. controle (teste t de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

2.1.5. Concentrações de Sódio e Potássio e Osmolalidade

A Tabela 13 sumariza os valores médios das concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, potássio e das osmolalidades plasmáticas e urinárias nos grupos experimentais do defeito ósseo. Observamos uma redução significativa na concentração urinária de sódio no grupo NTCPM-HY em relação ao grupo NTCPM. Além disso, um aumento na osmolalidade plasmática nos grupos HY e NTCPM-HY em relação ao controle e uma redução no grupo NTCPM em relação ao grupo NTCPM-HY foram observados.

Tabela 12: Efeitos dos biomateriais administrados em alvéolos dentários nas concentrações de sódio e de potássio plasmáticos e urinários e nas osmolalidades plasmáticas e urinárias.

Parâmetro	Defeito Ósseo					
	Controle	HY	NTCPS	NTCPS-HY	NTCPM	NTCPM-HY
[Na ⁺] pl mEq/l	111,0±6,80	106,3±3,3	106,4±1,1	109,9±2,7	102,6±2,9	105,9±3,3
[Na ⁺] ur mEq/l	137,8±7,65	134,6±5,7	100,5±16,	136,7±9,7	149,2±5,8	112,1±7,4#
[K ⁺] pl mEq/l	5,7±0,32	6,5±0,49	5,6±0,2	6,1±0,26	7,0±0,67	6,8±0,47
[K ⁺] ur mEq/l	363±52,45	411,9±36,95	334,7±50,47	407,4±37,68	325,7±18,96	325,5±32,29
Osm pl mOsm/l	325,6±9,66	406,6±9,266*	384,5±26,11	378,0±33,56	322,5±20,0	399,5±22,7*#
Osm ur mOsm/l	3054±184,6	2917±119,7	2546±283,9	2479±109,9	2447±203,8	2402±244,0

[], concentração; Osm, osmolalidade; pl, plasma; ur, urina. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. controle e #P<0,05 vs. NTC não associado ao HY (teste *t* de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Em relação ao protocolo IP, houve um aumento na concentração de sódio urinário no grupo NTCPM-HY em relação ao controle e em relação ao grupo NTCPM. Já o potássio plasmático apresentou-se significativamente aumentado nos grupo NTCPS, NTCPS-HY e NTCPM, enquanto que no NTCPM-HY este parâmetro apresentou-se reduzido. O potássio urinário somente estava alterado (elevado) no grupo HY em relação ao controle. Finalmente, observamos um aumento significativo na osmolalidade urinária em todos os grupos tratados.

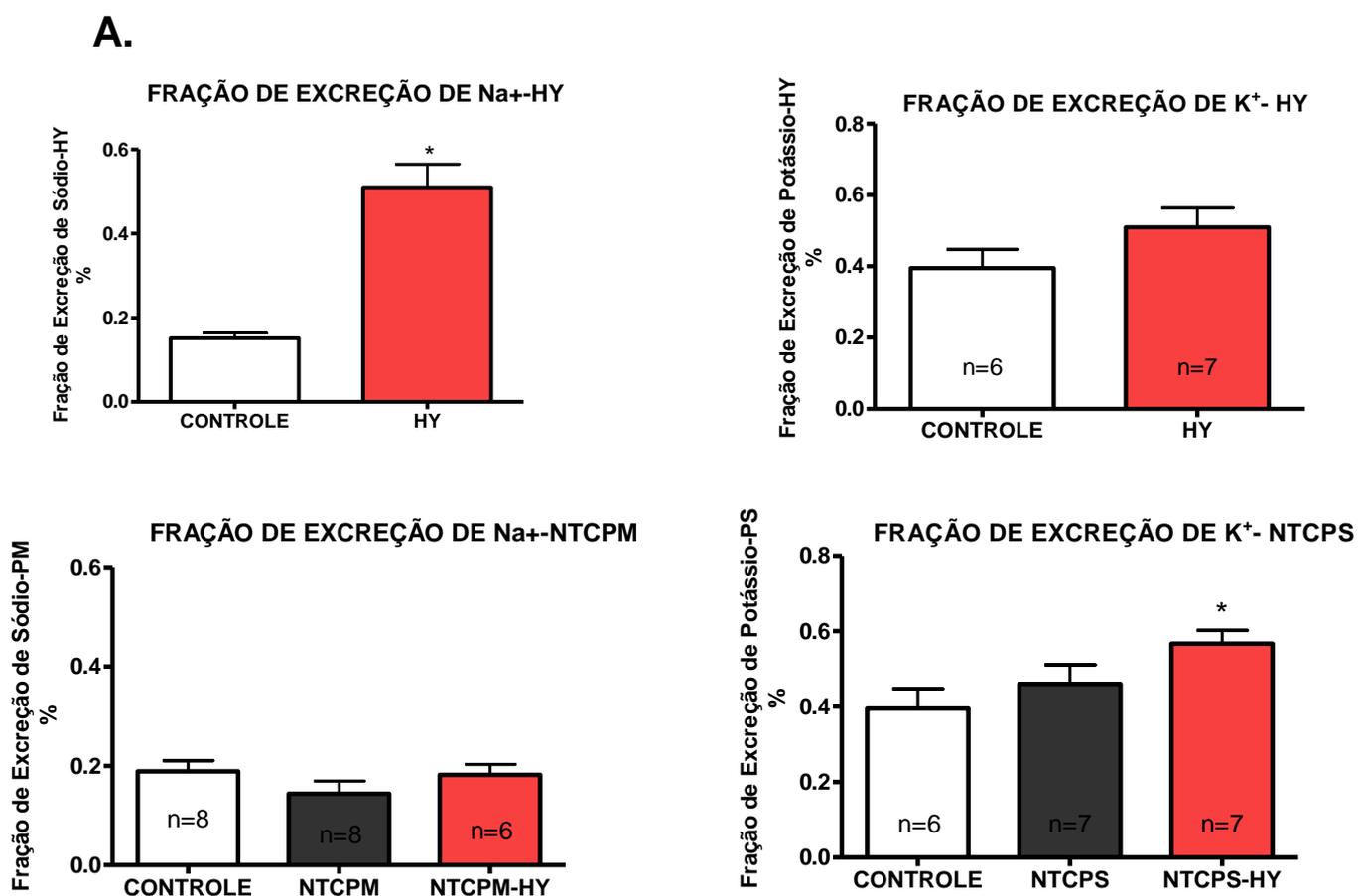
Parâmetro	Intraperitoneal					
	Controle	HY	PS	PS-HY	PM	PM-HY
[Na ⁺] pl mEq/l	120,3±2,66	112,4±5,88	116,5±4,32	118,3±1,78	123,4±3,52	124,5±1,79
[Na ⁺] ur mEq/l	138,8±8,07	150,3±6,59	119,6±6,35	121,9±10,85	127,6±9,67	170,0±9,34*#
[K ⁺] pl mEq/l	6,08±0,26	6,12±0,49	7,25±0,66*	7,71±0,22*	7,73±0,37*	5,29±0,41#
[K ⁺] ur mEq/l	404,7±62,08	513,6±23,4*	574,0±57,00	491,1±57,28	458,6±55,79	407±39,23
Osm pl mOsm/l	341,8±17,26	395,7±26,44	379,0±10,34	370,9±9,42	368,9±8,60	357,7±23,74
Osm ur mOsm/l	3021±207,6	5335±396,4*	4876±719,0*	4618±534,0*	6092±425,1*	6513±463,3*

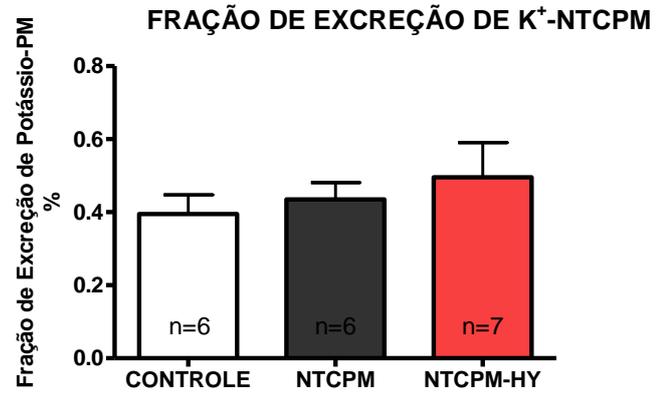
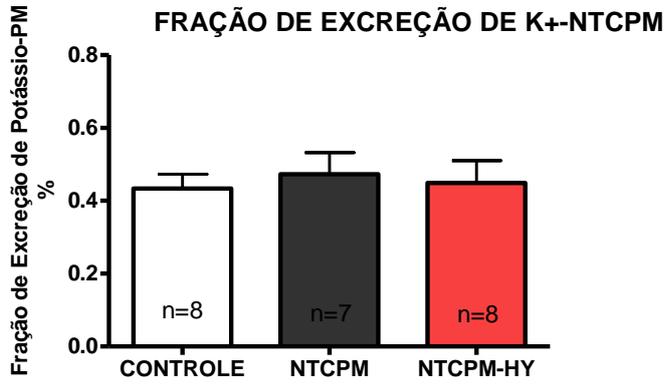
Tabela 13: Efeitos dos biomateriais administrados intraperitonealmente nas concentrações de sódio e de potássio plasmáticos e urinários e nas osmolalidades plasmáticas e urinárias.

[], concentração; Osm, osmolalidade; pl, plasma; ur, urina.. Os valores representam a média ± erro padrão *P<0,05 vs. controle e #P<0,05 vs. NTC não associado ao HY (teste t de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

2.1.6. Fração de Excreção de Sódio e Potássio

Os valores das concentrações urinárias de Na⁺ e de K⁺ estão dispostos nas Tabelas 13 e 14. A partir das dosagens das concentrações urinárias e do fluxo urinário foi calculada a fração excretada de Na⁺ e K⁺. A fração de excreção de sódio foi afetada somente no grupo HY (Fig.20A) e um aumento na fração de excreção de potássio no grupo NTCPS-HY (Fig.20A). Quanto á administração IP, observamos apenas um aumento na fração de excreção de potássio no grupo PS em relação ao controle quanto ao grupo tratado NTCPS-HY (Fig.20B).





B.

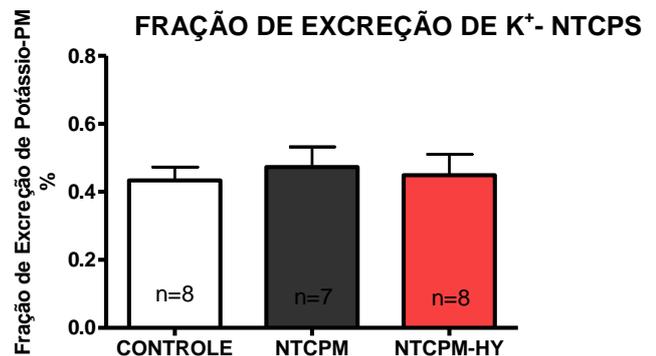
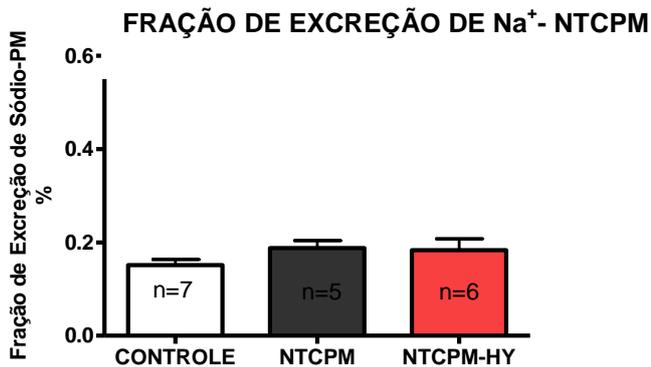
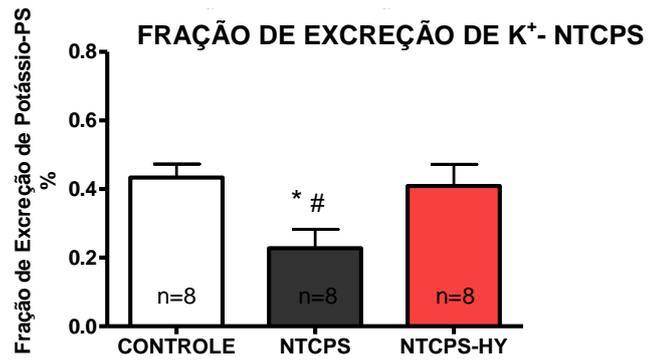
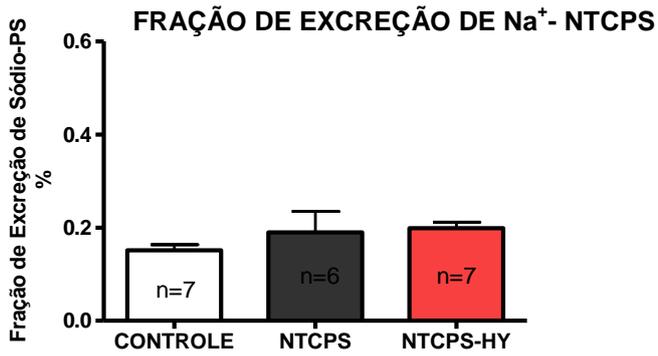
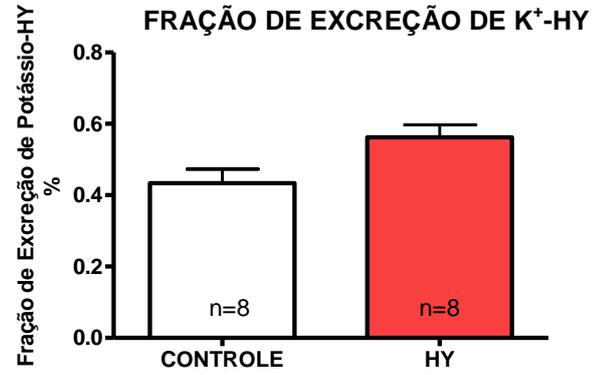
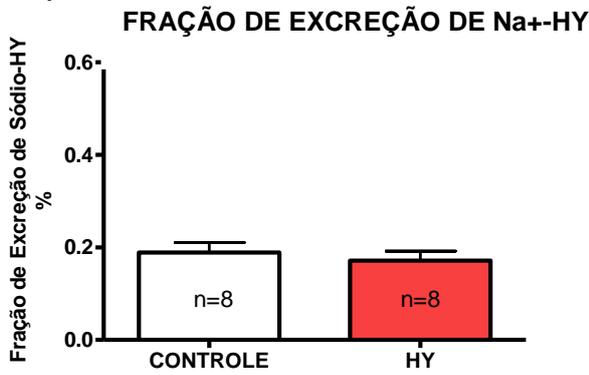
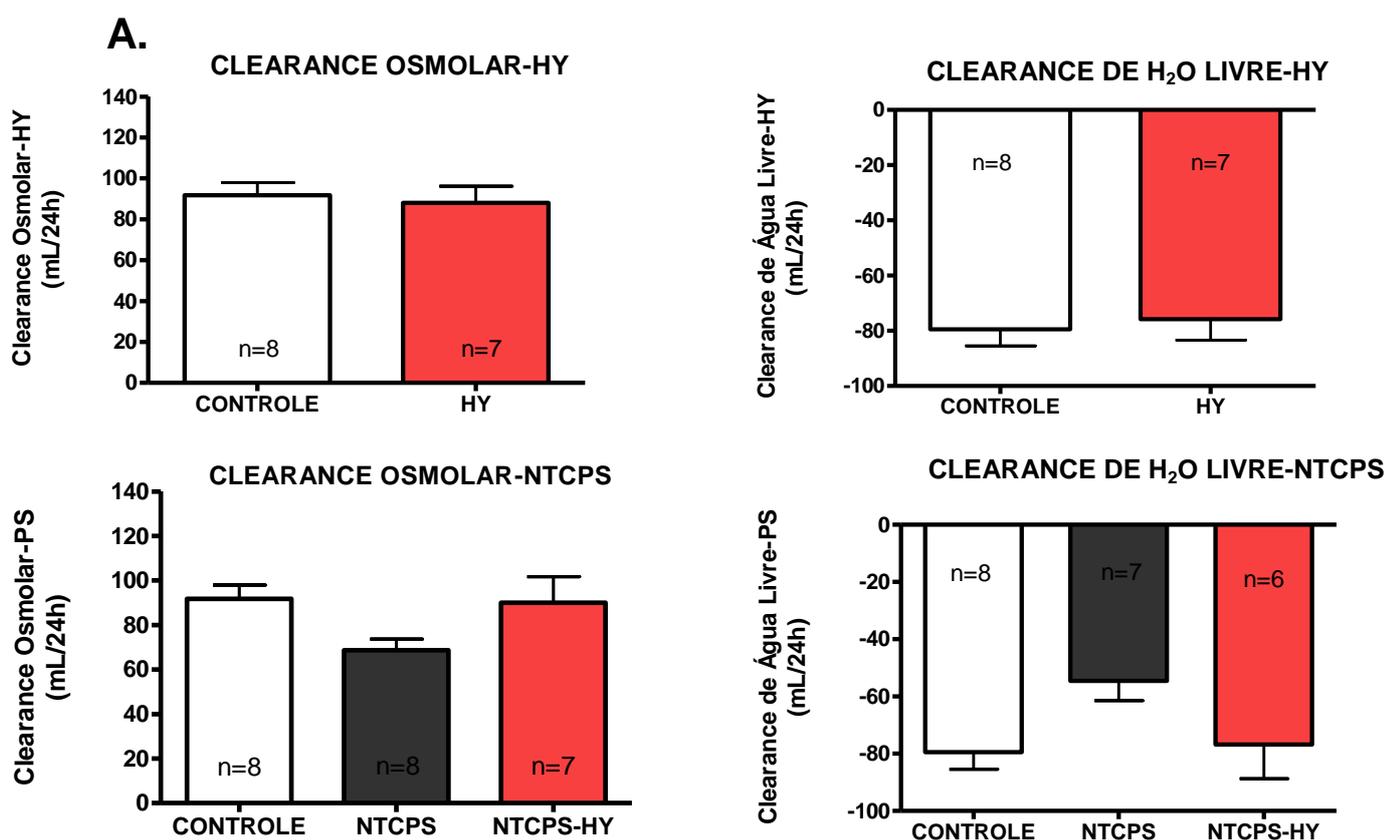


Figura 20. Efeito da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (Figura A) ou IP (Figura B) em ratos sobre a fração de excreção de sódio e potássio. Os valores representam a média \pm erro padrão *P<0,05 vs. controle e #P<0,05 vs. tratamento (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls e teste t de Student).

2.1.7. Clearance Osmolar e Clearance de Água Livre

Os valores das osmolalidades urinárias e plasmáticas estão dispostos nas Tabelas 13 e 14. A partir dessas dosagens e do fluxo urinário foi calculada o *clearance* osmolar e de água livre. Não foram observadas alterações nesses parâmetros em relação ao tratamento no defeito ósseo. Em relação á administração IP, foi observada as seguintes alterações: um aumento no *clearance* osmolar em todos os grupos, exceto no grupo HY como podemos observar na Figura 21B. Um aumento também ocorreu no *clearance* de água livre nos seguintes grupos: NTCPS, NTPS-HY e NTCP-HY (Fig.21B). Ainda assim, o *clearance* de água livre apresenta valores negativos em todos os grupos, indicando que os segmentos distais do néfron mantêm a capacidade de reabsorver água de forma significativa.



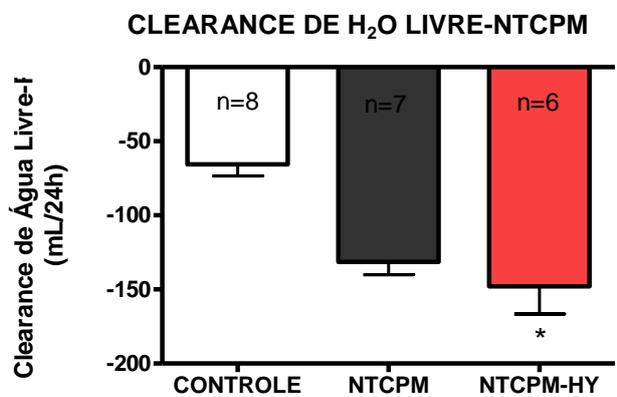
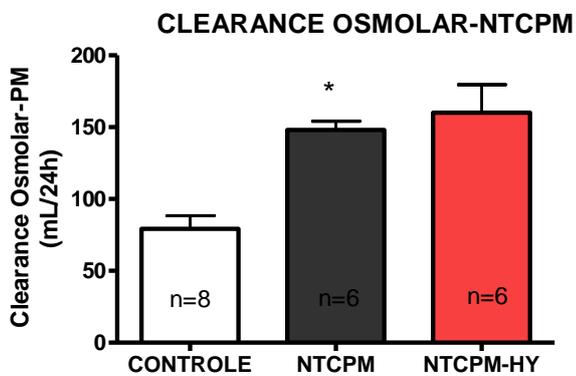
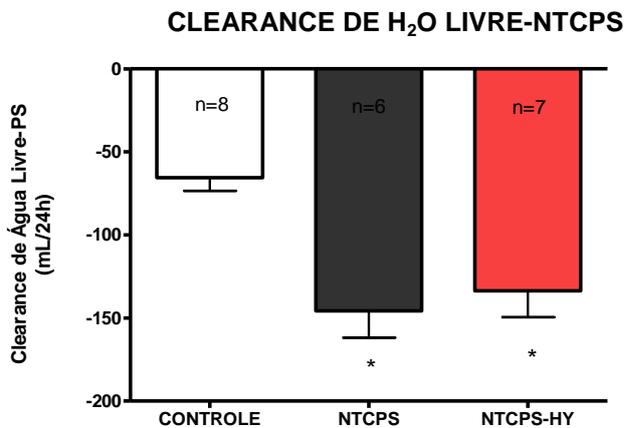
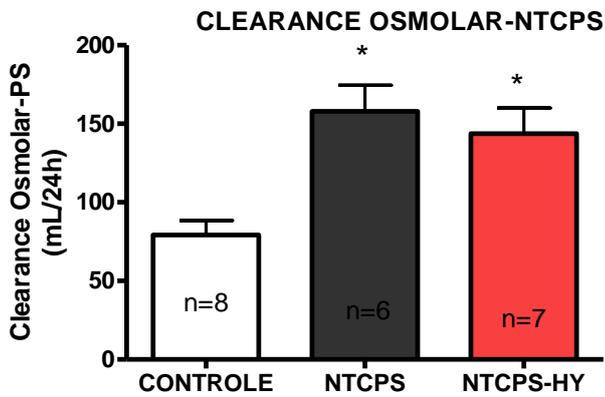
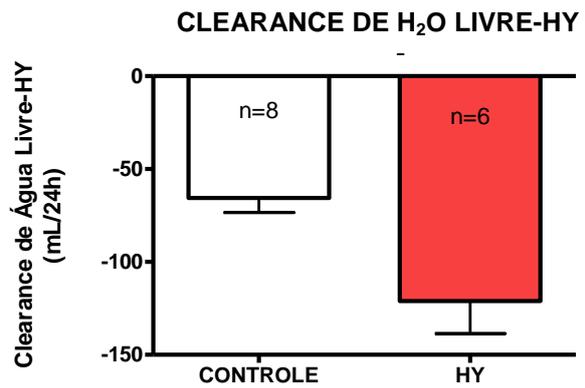
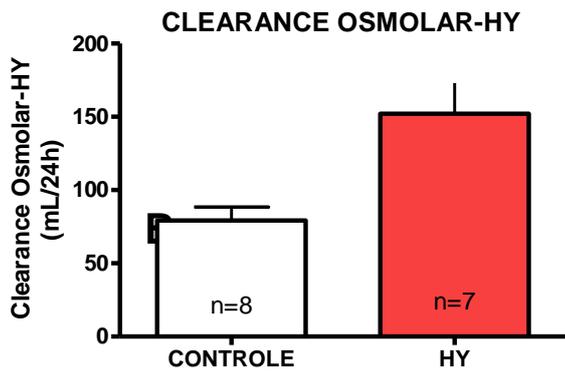
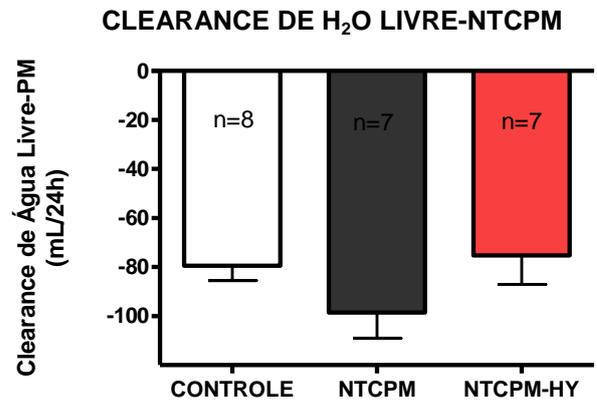
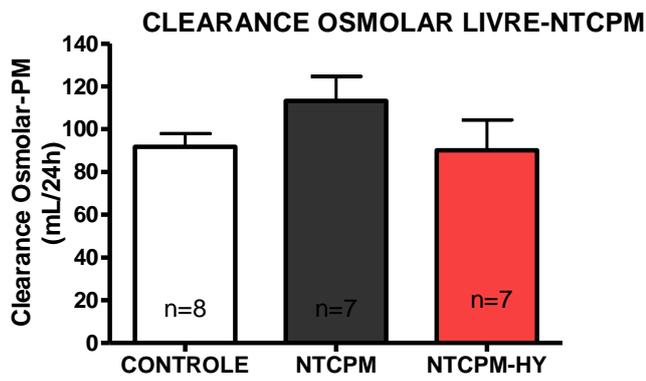
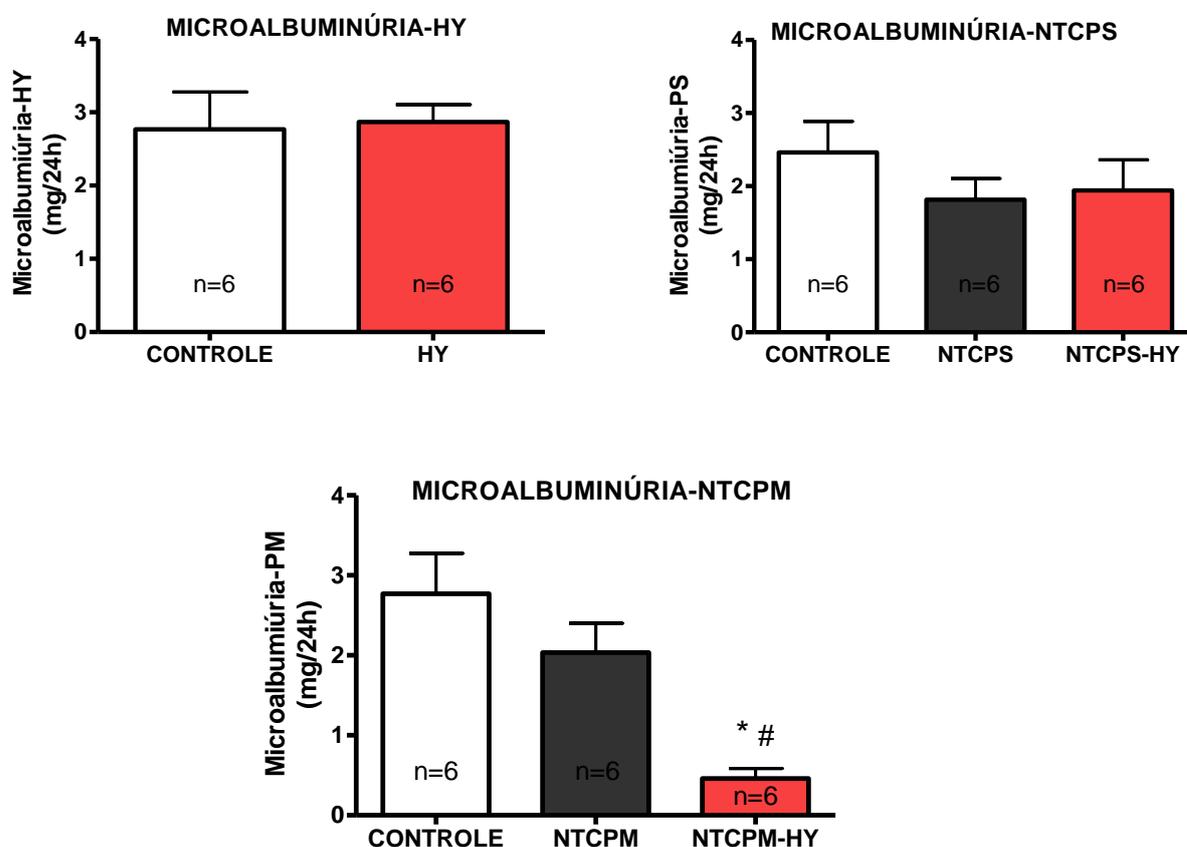


Figura 21. Efeito da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (Figura A) ou IP (Figura B) em ratos sobre *clearance* osmolar e de água livre. Os valores representam a média \pm erro padrão * $P < 0,05$ vs. controle e # $P < 0,05$ vs. tratamento (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls e teste t de Student).

2.1.8. Microalbuminúria

A microalbuminúria (perda de pequenas quantidades de albumina na urina) permite uma avaliação da disfunção glomerular nos seus estágios bem iniciais. Desta forma, neste trabalho, foi utilizada a técnica apropriada para a detecção da presença de quantidades muito baixas de albumina na urina. Observamos uma diminuição significativa do grupo PM-HY (Fig.22A) em relação ao grupo controle e ao grupo PM, esse achado não é relevante, pois se considera valores menores que 30mg/24 h, um valor normal.

A.



B.

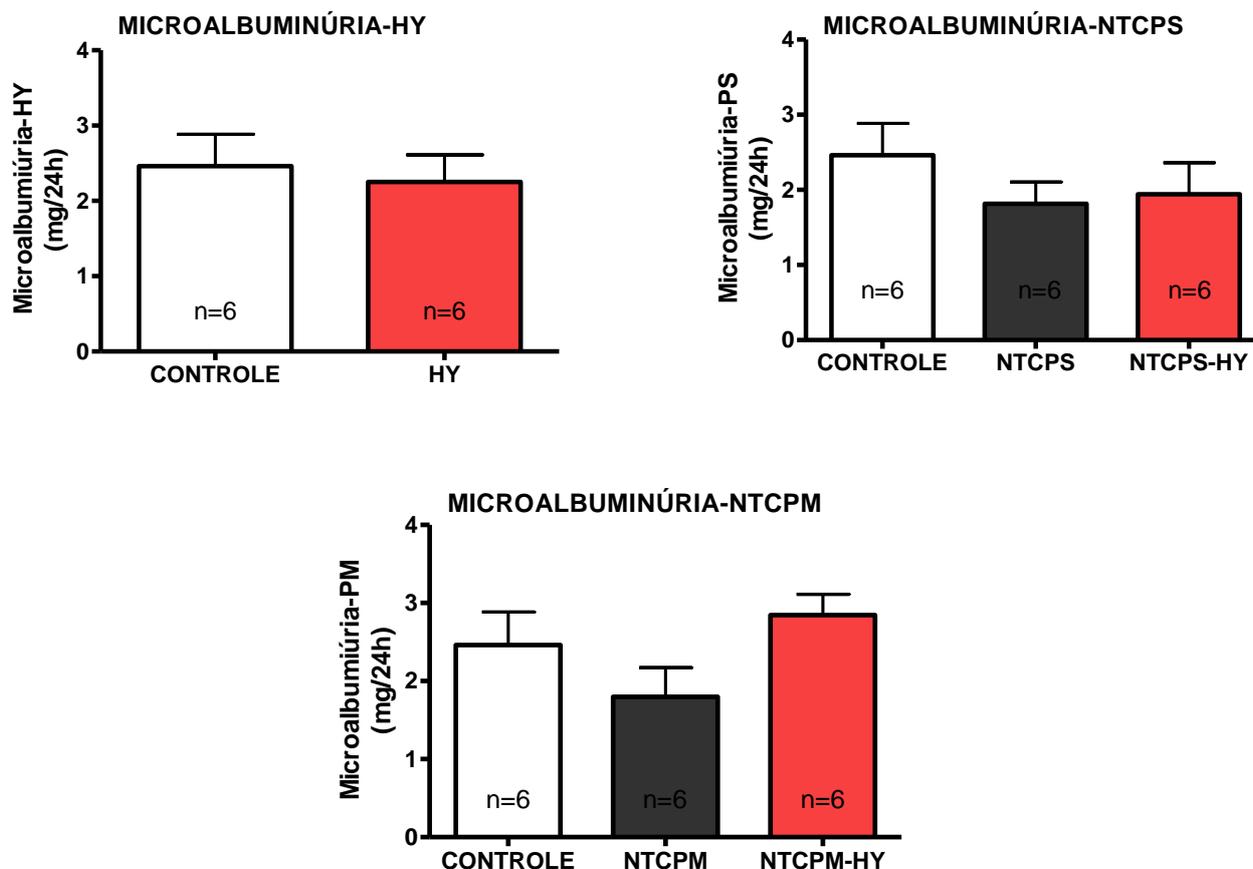


Figura 22. Efeito da administração dos biocompósitos no defeito ósseo (Figura A) ou IP (Figura B) em ratos sobre a microalbuminúria. Os valores representam a média \pm erro padrão * $P < 0,05$ vs. controle e # $P < 0,05$ vs. tratamento (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls e teste t de Student).

3. Análise Morfométrica

As análises morfométricas, não foram demonstraram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados em ambos os protocolos, as Tabelas 14 e 15 sumarizam os valores médios para os diâmetros nas diferentes estruturas do glomérulo.

Tabela 14. Efeitos da administração dos biocompósitos no defeito ósseo no diâmetro da cápsula de Bowman, tufo glomerular e espaço de Bowman.

Diâmetro (μm)	Defeito Ósseo					
	Controle	HY	NTCPS	NTCPS- HY	NTCPM	NTCPM- HY
Cápsula de Bowman	102,5 \pm 3,92	96,17 \pm 4,54	92,88 \pm 3,492	98,67 \pm 3,09	90,56 \pm 2,09	98,86 \pm 3,50
Tufo Glomerular	80,16 \pm 2,91	81,27 \pm 2,95	78,85 \pm 3,04	85,65 \pm 2,04	81,23 \pm 1,56	84,27 \pm 2,70
Espaço da Cápsula de Bowman	17,18 \pm 2,49	16,10 \pm 1,88	12,34 \pm 1,07	9,55 \pm 2,55	9,167 \pm 0,85	14,63 \pm 1,29

Os valores representam a média \pm erro padrão da média. Não foram observadas alterações significativas nos diversos parâmetros avaliados (teste t de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

Tabela 15: Efeitos da administração IP dos biocompósitos no diâmetro da cápsula de Bowman, tufo glomerular e espaço de Bowman.

Diâmetro (μm)	Intraperitoneal					
	Controle	HY	NTCPS	NTCPS- HY	NTCPM	NTCPM- HY
Cápsula de Bowman	95,30 \pm 3,37	93,90 \pm 3,02	92,64 \pm 1,73	97,53 \pm 1,79	95,80 \pm 2,93	95,69 \pm 2,78
Tufo Glomerular	83,96 \pm 2,91	83,67 \pm 2,90	78,85 \pm 3,04	85,65 \pm 2,04	81,23 \pm 1,56	84,27 \pm 2,70
Espaço da Cápsula de Bowman	17,18 \pm 2,49	15,18 \pm 1,59	10,94 \pm 1,01	9,90 \pm 2,59	11,67 \pm 0,50	12,09 \pm 1,93

Os valores representam a média \pm erro padrão da média. Não foram observadas alterações significativas nos diversos parâmetros avaliados (teste t de Student e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls).

VI. DISCUSSÃO

O estudo de biocompósitos baseados nos NTC vem crescendo amplamente nos últimos anos. Contudo, o seu uso em aplicações biológicas e biomédicas é visto com cautela, pois a sua toxicidade ainda precisa ser definida e ao serem manipulados podem contaminar ambientes de uma maneira ainda não totalmente estabelecida pela literatura.

Para o uso *in vitro* e *in vivo* de biomateriais, geralmente empregam-se técnicas de esterilização, tais como, a luz ultravioleta ou imersão em etanol. No entanto, cada processo de esterilização tem alguns inconvenientes e limitações que os tornam inadequados para certas aplicações (Gibb *et al.*, 2012). Devido à capacidade da radiação Gama em penetrar em materiais, em conjunto com os seus procedimentos operacionais relativamente simples e rápidos, esse método tornou-se padrão para atingir esterilidade em muitos produtos usados na área da saúde (Clough *et al.*, 2001). Em relação à eficácia da esterilização por radiação Gama, podemos observar várias vantagens. Como efeito direto, são observados eventos que conduzem à mudanças biológicas e à morte dos patógenos, dentre outros (Diehl, 1995). Dessa forma, em nosso estudo escolhemos o uso da esterilização por radiação Gama. Assim, as amostras dos biocompósitos, foram esterilizadas nas dosagens de 100gy a 30kgy. Realizamos o plaqueamento das amostras em meios ricos para proliferação de fungos e bactérias (BHI e SAB) e observamos que nas placas contendo o HY não houve crescimento de colônias no controle e em nenhuma das doses de radiação utilizada. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de o HY possuir ação bactericida e fungicida (Andrea *et al.*, 2011). Esses autores observaram que o crescimento de algumas espécies de bactérias e fungos é inibido na presença de doses crescentes de HY. Diferentemente do HY, nas placas contendo os outros biomateriais foi possível observar o crescimento de colônias de bactérias e fungos em doses de radiação Gama menores que 1kgy. Esse resultado indica que a partir da dose de 1kgy a radiação Gama é suficiente para eliminar os microrganismos presentes. Uma possível explicação para esse crescimento apesar da presença do HY nos biocompósitos NTCPs-HY e NTCPM-HY é a pequena quantidade de HY nesses biomateriais. Para os experimentos posteriores foram escolhidas as doses de 250gy para o HY e

2,5kgy para os demais biocompósitos. Essas doses são superiores às mínimas estabelecidas pelos experimentos de radiação Gama por uma questão de segurança.

Segundo estudo realizado Barbucci *et al.* (2002), amostras de um biocompósito formulado a base de 50% de HY utilizado no tratamento de osteoartrite em coelhos e que passou pelo método de esterilização por radiação Gama não apresentou alterações morfológicas e nem nas suas propriedades biológicas. Nossos resultados corroboram com os dados de Barbucci e colaboradores, pois também observamos que os biocompósitos contendo NTC apresentaram apenas uma discreta mudança em sua estrutura morfológica após passarem pelo processo de esterilização por radiação Gama. Essas alterações não foram suficientes para os mesmos perderem suas propriedades biológicas, no caso específico, a sua capacidade de acelerar o reparo de alvéolos dentários. Em outras palavras, mesmo após a esterilização, os biocompósitos continuaram a aumentar o número de trabéculas ósseas nos alvéolos dentários de ratos normais (Mendes *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2012). Desta forma, podemos concluir que a radiação Gama é um processo viável para a esterilização dos biomateriais avaliados neste estudo.

Estudos relacionados à toxicidade dos NTC no sistema renal ainda são escassos na literatura. O sistema renal tem grande susceptibilidade aos efeitos tóxicos de fármacos, devido principalmente ao alto fluxo sanguíneo e a concentração de alguns fármacos pelo mecanismo de reabsorção tubular. Dessa forma, o nosso estudo é relevante, pois avaliamos os possíveis danos no sistema renal dos NTC após 7 dias da administração no defeito ósseo ou IP.

Quando se pensa em proteção renal, pensa-se em preservação de néfrons e preservação da função renal. Um dos parâmetros de função renal mais empregado clinicamente é a dosagem plasmática de creatinina que é um indicador do RFG. O RFG é o melhor método disponível para estimar a presença de lesão glomerular difusa de grau leve a moderado, com subsequente acúmulo dos compostos nitrogenados. Entretanto, a dosagem plasmática de creatinina não fornece quantitativamente o grau de função renal individual e nem a taxa de filtração glomerular exato, o que pode ser determinado por métodos de imagem e pelo cálculo do *clearance* da creatinina.

Na análise da creatinina plasmática realizada em nosso estudo, observamos um aumento nos grupos HY, NTCPS-HY e NTCPM-HY quando administrados no defeito ósseo, e conseqüentemente, uma diminuição no RFG também foi vista. Resultados semelhantes foram observados no protocolo IP nos grupos NTCPS-HY, NTCPM-HY e NTCPM. Entretanto, para que a creatinina plasmática seja um marcador clássico de insuficiência glomerular, é importante ressaltar que um aumento constante da concentração plasmática de creatinina deve estar presente, o que significa uma perda funcional de um grande número dos néfrons (cerca de 40-50%). Esse quadro leva um determinado tempo para acontecer, dependendo da intensidade e duração de exposição ao agente agressor (Lisowska, 2010). Assim, nossos resultados estão de acordo com os observados por Ravi e colaboradores (2005) que relataram que após a administração intravenosa de NTC radioativos, eles são eliminados rapidamente da circulação sanguínea sistêmica através do sistema renal e que amostras de urinas observadas por microscopia eletrônica revelaram que os NTC são excretados intactos, sugerindo, assim, que os NTC são eliminados normalmente sem causar nenhum dano ao animal.

Alguns fatores endógenos podem ser responsáveis por um aumento na excreção de Na^+ e K^+ . A filtração glomerular é um dos principais mecanismos que regulam a excreção renal de Na^+ e K^+ . Por exemplo, uma vez que grandes quantidades de Na^+ são filtradas nos rins, pequenas mudanças no RFG podem ter grandes efeitos no Na^+ excretado, apesar de que mudanças na quantidade de Na^+ filtrado normalmente são compensadas com concomitantes mudanças na reabsorção de Na^+ nos túbulos proximais (Eaton & Pooler, 2006). Esse efeito do RFG na fração de excreção Na^+ e K^+ não foram observados em nosso estudo. Pelo contrário, no grupo HY administrado no defeito ósseo o aumento no RFG foi acompanhado por uma diminuição na fração de excreção de Na^+ . Resultados semelhantes foram obtidos na fração de excreção de K^+ em relação ao grupo NTCPS-HY.

O rim cumpre um papel fundamental na regulação da homeostase, principalmente regulando o volume e a osmolalidade do compartimento extracelular. Essa função está relacionada à capacidade renal de excretar uma urina de volume e osmolalidade variáveis, como resultado de um controle estrito da reabsorção tubular de Na^+ e água (Boron *et al.*, 2005). A partir das

concentrações plasmáticas de Na^+ e dos valores de osmolalidade plasmática é possível inferir informações a cerca de condições clínicas específicas (Fernandez *et al.*, 2004). Algumas pequenas alterações (aumento na osmolalidade plasmática nos grupos HY e NTCPM-HY e uma redução na dosagem de Na^+ urinário no grupo NTCPM-HY em relação ao NTCPM) foram observadas nos animais do protocolo de defeito ósseo. Essas alterações não foram suficientes para causar modificações no *clearance* osmolar e no *clearance* de água livre, apesar de um aumento na fração de excreção de água no grupo HY. No protocolo IP, foi observado um aumento plasmático de K^+ nos grupos NTCP, NTCP-HY e NTCPM. Essas alterações foram acompanhadas por um aumento na osmolalidade urinária. Esse aumento também foi visto nos grupos HY e NTCPM-HY. Dessa forma, essas modificações podem ter levado a um aumento na fração de excreção de água nos grupos NTCP e NTCPM. Concomitantemente, um aumento no *clearance* osmolar foi observado nos grupos NTCP, NTCP-HY, NTCPM e NTCPM-HY e também um aumento no *clearance* de água livre dos grupos NTCP, NTCP-HY e NTCPM-HY. É importante salientar que mesmo com essas alterações nos valores de *clearance* de água livre na administração IP dos biomateriais, os valores ainda permaneceram negativos, indicando uma correta reabsorção de água pelos segmentos distais do néfron.

François e colaboradores (2012) sugerem que a microalbuminúria é o resultado inicial de uma hiperfiltração glomerular que pode evoluir para a esclerose do glomérulo e insuficiência renal. Observamos apenas no protocolo de defeito ósseo uma diminuição significativa desse parâmetro no grupo NTCPM-HY em relação ao grupo controle e ao grupo NTCPM. Entretanto, esse achado não é relevante, pois se considera valores menores que 30mg/24h normais. Assim, estes dados associados com a não alteração da ingestão hídrica e do volume urinário sugerem que a administração do biomaterial associado ou não com NTC no defeito ósseo não causa efeitos funcionais significativos no sistema renal. De fato, Sanyog e colaboradores (2011) relataram em seu estudo que sete dias após a administração intravenosa de NTC, os mesmos foram rapidamente removidos da circulação sistêmica pelos rins sem induzir uma possível nefrotoxicidade. É importante salientar que, com o objetivo de confirmar nossos dados, elaboramos um segundo protocolo

administrando os biocompósitos intraperitonealmente. Essa administração utilizando uma via mais agressiva e uma concentração maior dos biocompósitos teve como finalidade evidenciar algum possível efeito tóxico do biomaterial. Corroborando com os dados de protocolo de defeito ósseo, os efeitos observados nesse segundo protocolo foram modificações inconsistentes que não evidenciam uma alteração significativa na função renal.

De acordo com a avaliação funcional, a análise histológica e morfométrica renal demonstrou que a morfologia do glomérulo renal não foi alterada em ambos os protocolos experimentais. Confirmando assim, a biocompatibilidade dos biocompósitos avaliados nesse estudo.

Em síntese, demonstramos que o processo de esterilização por radiação Gama dos biocompósitos estudados não causou dano na sua estrutura, bem como na sua função biológica. Além disso, observamos que os biocompósitos quando utilizados no alvéolo dentário nas dosagens propostas não foram capazes de induzir dano funcional ou estrutural renal. Assim, estes resultados ampliam as perspectivas da aplicabilidade dos NTC, pois os mesmos não demonstraram sinais de toxicidade.

VII. SUMÁRIO

1. Doses de 250gy de irradiação Gama para o HY e 2,5 Kgy, para os demais biomateriais são suficientes para a eliminação de microrganismos.
2. A esterilização por irradiação Gama levou a uma pequena mudança na estrutura morfologia do biomaterial, não sendo suficiente para alterar as propriedades biológicas do biomaterial,
3. A administração dos biomateriais no tratamento do defeito ósseo ou IP, não foi capaz de causar nenhum dano renal.

Assim, nossos resultados demonstram uma biocompatibilidade desses biomateriais com o sistema biológico, sugerindo o possível uso desses biomateriais em terapias de reparo ósseo em humanos.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREA, AR.; RACHELE, G. N.; MARIA C. B.; CLAUDIO, C.; MANUELA, C.; E LENA, R.; BENIAMINO, P & ELISABETTA, B. *Influence of hyaluronic acid on bacterial and fungal species, including clinically relevant opportunistic pathogens*. Journal of Materials Science, v. 22, 2329-2338 p., 2011;

ASLAN, M.; SIMSEK, G & DAYI, E. *The effect of hyaluronic acid-supplemented bone grafting bone healing: experimental study in rabbits*. Journal of Biomaterials Applications, v. 20, 209-219 p., 2006;

BALAZS, E.; BLAND, P., DENLINGER, J.L.; GOLDMAN, A.I.; LARSEN, N.E.; LESHCHINER, E.A.; LESHCHINER, A & MORALES. *Matrix engineering. Blood Coagulum Fibrinolysis*, v. 2, 173 p., 1991;

[BARBUCCI, R.](#), [LAMPONI, S.](#), [BORZACCHIELLO, A.](#), [AMBROSIO, L.](#), [FINI, M.](#), [TORRICELLI, P](#) & [GIARDINO, R.](#) *Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis*. Biomaterials, v.23, 4503–4513p., 2002;

BAUGHMAN, R. H. *Synthesis of SiC nanorods from sheets of single-walled carbon nanotubes*. Chemical Physics Letters, v.359, 5-6, 397-402 p., 2002;

BORON, W.; BOULPAEP, E. *Medical Physiology*. 2.ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2005;

BROWN, M.B. & JONES, S.A. *Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin*, v.3, 19, 308-18 p., 2005;

CHANG, T.M. & PRAKASH, S. *Procedures for micro encapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms*. Molecular Biotechnology, v. 17, 126-148 p., 2001;

CUI, D.; TIAN, F.; OZKAN, C.S.; WANG, M & GAO, H. *Effect of single wall carbon nanotubes on human hek 293 cells*. Toxicology Letters, v.155, 73–85 p., 2005;

DEKANT, W & VAMVAKAS, S. *Biotransformation and membrane transport in nephrotoxicity*. Critical Reviews in Toxicology, v. 26, 309-334 p., 1996;

DECHERT, T.A.; DUCALE, A.E.; WARD, S.I & YAGER, D.R. *Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds*. Wound repair and regeneration, v.14, 252-258 p., 2006;

DIEHL, J.F. *Safety of Irradiated Foods- 2. ed. revised and expanded*. New York, N. Y. Marcel Dekker Inc, 91 -115 p., 1995;

EATON, D.C & POOLER, J.P. *Fisiologia Renal de Vander*. In: EATON, D.C.; POOLER, J.P. Fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular. Porto Alegre: Artmed, 6 ed. cap. 2, 37-51p., 2006;

ELENA, B., YINGCHUN, NI., ERIK B. M., VEDRANA. M., JARED. L., ROBERT .C. H., & VLADIMIR, P. *Applications of carbon nanotubes in biotechnology and biomedicine*, Journal of Biomedical Nanotechnology, v. 1, 3-17 p., 2005;

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

FERNANDEZ, R. *Effect of chronic fish oil supplementation on renal function of normal and cachectic rats*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.3, 1481-1489 p., 2004;

FRANCOIS, C., CHRISTOPHE C., HASSIB C., GREGORY Z., DOLORES M., BLAISE M., PETER F., & ERIC, G. *Microalbuminuria and hyperfiltration in subjects with nephro-urological disorders*. Nefrologia, Dialysis Transplantation, 2012;

FRASER, J. R.E.; LAURENT, T.C & LAURENT, U.B.G. *Hyaluronan: its nature, distribution, function and turn over. Journal of Internal Medicine*, v.242, 27-33 p., 1997;

FU,K.F.; HUANG, W.J.; LIN, Y.; ZHAN, D.H, HANKS, T.W & RAO, A.M. *Functionalization of carbon nanotubes with bovine serum albumin in homogeneous aqueous solution. Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.v.2, 457–61p.,2002;

GARG H.G & HALES C.A. *Chemistry and biology of hyaluronan*. Elsevier Ltd. Oxford: 2004;

GIAN, L. M.; MARIANGELA, T.; IGNAZIO. C.; LICARI, M. L.; ALESSIA, M.; ANNA, M. C & GIORGIO C. *Efficacy of Bacillus clausii spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. Therapeutics and Clinical Risk Management*, v.3, 13-17p., 2007;

GIBB, S. A. MOBASSERI, S & DOWNES ,L. A. *Medical grade sterilization affects synthetic polymer film properties intended for peripheral nerve repair: an in vitro study. Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012;

GLADWIN, K. M.; WHITBY, R. L. D.; MIKHALOVSKY, S. V.; TOMLINS, P. & ADU, J. *In vitro Biocompatibility of multi walled carbon nanotubes with sensory neurons. Advanced Health care Materials*, 2012;

GYTON, A. C & HALL, J. E. Os líquidos corporais e os rins. *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 179-244.,1998;

HALLGRIMSSON, B., BENEDIKTSSON, H. & VIZE, P. D. *Anatomy and histology of the human urinary system. In The Kidney, From Normal Development to Congenital Disease*, 149–164p., 2003;

HARTGERINK, J.D.; BENIASH & STUPP, S, I. *Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers*. Science. 294-1684 p., 2001;

HURT, H., AGNES, B. K & HUAJIAN, G. *Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation*. Nature Nanotechnology, v.6, 714–719p., 2011;

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

IJIMA, S & ICHIHASHI, T. *Single shell carbon nanotubes of 1 nm diameter*. Nature v.358, 603-605 p., 1993;

KHAIRALLAH, W., MERHEB, M., CHAIBAN, J & BADR, K. F. *Hormones and the kidney*. In *Diseases of the Kidney and Urinary Tract* .Schrier, R. W. 234–284p., 2007;

KOGAN, G.; SOLTÉS, L.; STERN, R & GEMEINER, P. *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. Biotechnology Lett, v.17-25 p., 2006;

KONG, J.; FRANKLIN, N. R.; ZHOU, C. W & CHANPLINE, M. G. *Nanotube molecular wires as chemical sensors*. Science, v.28, 622-628 p., 2000;

KOLTOVER, I.; SALTZMAN, T.; RADLER, J. O & SAFINYA, C. R. *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery*. Science, 281 -78 p., 1998;

KOONAN, J. P. *Estimation of renal function in patients with chronic kidney disease*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, v.30, p.1341-1346, 2009;

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

KRISTEN, K.; MC, C & REBECCA, A. W. *Renal stem cells: fact or science fiction?*. Biochemical Journal, v.444, 153-169p., 2012;

KROTO, H. W. *C60 Buckminster fullerene*. Nature, v.318, 162-163 p., 1985;

LACERDA, L., BIANCO, A., PRATO, M & KOSTARELOS, K. *Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology*. Advanced Drug Delivery Reviews Journal Elsevier, v.58, 1460–1470 p., 2006;

LAURENT, T.C.E. *The chemistry, biology, and medical applications of hyaluronan and its derivatives*. Portland Press; v, 32, 1998;

LIAO, X & ZHANG, X. *Preparation, characterization and cytotoxicity of carbon nanotube–chitosan–phycoerythrin complex*. Nanotechnology, v 23, 01-23 p., 2012;

LISOWSKA, M, B. *Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury*. Blood Purification Journal Home, v.5, 29-65p., 2010;

LIU, Z., TABAKMAN, S.; WELSHER, K & DAI H. *Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery*. Nano Research. v.2, 85-120 p., 2009;

LIU, Z. *Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy*. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences. v.105, 1410-1415 p., 2008;

LIU, Y., ZHAO, Y., SUN, B & CHEN C. *Understanding the toxicity of carbon nanotubes*. Accounts of Chemical Research. 2012;

MAEDA, H., SAWA, T & KOUNO T. *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS*. J. Control Release. 74-87 p., 2001;

MALARKEY,E.B.; M & PURPURA V. *Carbon Nanotubes in neuroscience*. Acta Neurochirurgica Supplement, v. 106, n 9,337-341 p., 2010;

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

MENDES, R.; SILVA, G. A.; LIMA, M.; CALIARI, M.; ALMEIDA, A.; ALVES, J. B & FERREIRA, A. J. *Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats*. Archives of Oral Biology, v. 53, 1155-1162 p., 2008;

MENDES, R.; SILVA, G. A.; LIMA, M.; CALIARI, M.; ALMEIDA, A.;LADEIRA,L,O & FERREIRA, A. J. *Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair*.Life Sciences, v. 87, 215-222p.,2010;

MOSELEY,R.; LEAVER, M.; WALKER, M.;WADDINGTON,R. J.;PARSONS,D.; CHEN, W. Y.J & EMBERY, G. *Comparison of the antioxidant properties of HYAFF⁻¹¹p75,AQUACEL and hyaluronanto wards reactive oxygen species in vitro*.Biomaterials,v.23,2255-2264 p., 2002;

NICOLA,V.; JUERGEN, S.; ROBERT, S & LADISLAV, S. *Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan*. Current Medicinal Chemistry, v.16, 718-1745 p., 2009;

NUSGENS, B.V. *Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?* Ann Dermatology Venereol, v.137, 3-8 p., 2010;

PRIYAMVADA,S. *Studies on the protective effect of dietary fish oil on gentamicininduced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, v.78, 369-381p., 2008;

REILLY, R. F., BULGER, R. E & KRIZ, W. *Structural-functional relationships in the kidney*. In *Diseases of the Kidney and Urinary Tract*, v. 2–53p., 2007;

SÁ, M., ANDRADE, V.B. MENDES, R.M., CALIARI, M.V. LADEIRA, L.O., SILVA, E.E., SILVA, G.A.B. CORRÊA, J.D & FERREIRA, A.J. *Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets*. *Oral Diseases*. 2012;

[SANYOG,](#)

[J., VIVEK, S.T., MANASMITA, D., CHANDRAIAH, G., AMIT, K.J., RASHI, M., KRISHNA, C & ANIL, K.](#) M. *Toxicity of multiwalled carbon nanotubes with end defects critically depends on their functionalization density*. *Chemical Research in Toxicology*, v.24, 2028–2039p., 2011;

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

SHVARTZMAN, C.R., ROTH, E. N., ROZEN, R.Y., BASKARAN, E & SUMIO, I. *Helical microtubules of graphitic carbon*. *Nature*, v.354, 56-59 p., 1991;

SHVEDOVA A.A.; CASTRANOVA, V.; KISIN, E.R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MURRAY, A.R.; GANDELSMAN, V.Z.; MAYNARD, A & BARON, P. *Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells*. *Journal of Toxicological and Environmental Health, Parte A*, v. 66, 1909-1926p., 2003;

SMART, S.R.; CASSADY, A.I.; LU, G.Q & MARTIN, D.J. *The biocompatibility of carbon nanotubes*. *Carbon*, v. 44, 1034-1047p., 2006;

SUPRONOWICZ, P. R. *Cellular/molecular responses of electrically stimulated osteoblasts cultured on novel polymer/carbon nanophase substrates*. *Carbon*, v. 4, 14–19 p., 2001;

SZLEIFER, I & KALISMAN, Y.L. *Selective dispersion of single-walled carbon nanotubes in the presence of polymers: the role of molecular and colloidal length scales*. Journal of the American Chemical Society, v. 126, 14850-14857p., 2004;

VINCENT,C; PAUL A. S & RALPH, D. Z. *Occupational nano safety considerations for carbon nanotubes and carbon nanofibers*. American Chemical Society, 2012;

WIGGINS, R. C. *The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases*. Kidney International,v. 71, 1205–1214p.,2007;

XIAN.X., AMIT, K., JHA., DANIEL, A., MARY, C. FARACH,C & XINQIAO, J. *Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks*.EUA National Library of Medicine,v.8 ,3280–3294p.,2012;

XIUPING,W., XUEQIN, L & HEYOU, H. *Evaluation of antibacterial effects of carbon nanomaterials against copper-resistant Ralstonia solanacearum*. Colóides e Superfícies B: Biointerfaces,v, 103,136–142p.,2012;

ZHENG. M., JAGOTA. A & SEMK., E.D.DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. Nat Mater. v 2 ,338–342p.,2003;

YING,L.,YULIANG, Z., BAOYUN,S & CHUNYING, C. *Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications*. International Journal of Nanomedicine,v 7, 5361-5374 p., 2012;