

INGRID RIOS LIMA MACHADO

NANOBIOGÉIS NA REGENERAÇÃO DE OSSOS SUBMETIDOS À FIXAÇÃO RÍGIDA: AVALIAÇÃO CITOTÓXICA, HISTOLÓGICA E TOMOGRÁFICA.

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

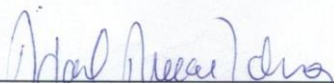
Orientador: Rafael Resende Faleiros

BELO HORIZONTE

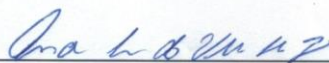
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG

2013

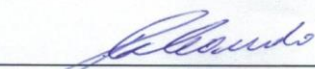
Tese defendida e aprovada em 30 de setembro de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



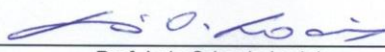
Prof. Rafael Resende Faleiros
Presidente - Orientador



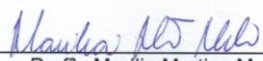
Prof. André Luís do Valle de Zoppa
FMVZ/USP



Prof. Júlio Carlos Canola
UNESP - Campus de Jaboticabal



Prof. Luiz Orlando Ladeira
ICEX - UFMG



Profª. Marília Martins Melo
Escola de Veterinária - UFMG

*Dedico esse trabalho a todos os amigos e colegas que ajudaram em sua realização.
Especialmente ao meu querido esposo Franco Mendes Machado pela paciência,
companheirismo, amor e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, força e principalmente pelos familiares e amigos que estiveram sempre ao meu lado.

Ao meu querido esposo Franco Mendes Machado, por estar junto a mim nessa caminhada e por torna-la mais fácil com seu amor.

Aos meus amados pais pelas sábias orientações e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos pelo apoio companheirismo e afeto.

Ao meu orientador, Ao meu orientador Rafael Resende Faleiros por toda a dedicação, sabedoria, paciência e confiança, mas principalmente pela oportunidade de poder aprender ao seu lado a ser muito mais que um cirurgião... A ser um mestre, um orientador e um amigo.

Aos meus coorientadores Prof. Geraldo Eleno e Prof.^a Eliane Gonçalves por todas as correções e orientações ao longo de todo o doutorado.

Aos Prof. Gregory Kitten e Rodrigo Resende do ICB pelo tralho em conjunto e por toda ajuda.

Aos colegas da Escola de Engenharia Eduardo e Prof. Wander pelo espaço e oportunidade de tornar melhor o nosso trabalho.

Aos colegas do Biotério da Escola de Veterinária Fabiola, Mário, Carla e Karen por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

Aos colegas da Patologia Animal Prof.^a Rogéria, Jankarle, Juneo e Vítor por estarem presentes sempre me ajudando a cada dúvida e dificuldade que surgia.

Aos funcionários da Escola de Veterinária Carlão, Luiz, Eli, Eduardo, Elias, Adão, Ronaldo, João, Ailton, Cátia, Isauto e Tião por tornarem meu trabalho muito mais fácil e alegre.

Aos alunos do curso de Medicina Veterinária Celina, Davi, Fernando, Guilherme, Isabela, Jéssica, Karen, Leonardo, Lívia, Ludimila, Rafael, Saulo e Tatiana Por estarem sempre prontos a ajudar em qualquer tarefa e pela oportunidade de poder aprender a ensinar. Vocês fizeram estes momentos inesquecíveis.

Aos amigos da pós- graduação Heloisa, Viviana, Fabiane, Lívia, Bruno, Leonardo, Rodrigo, Chauê, Sérgio e Arturo pela amizade e ajuda nos momentos mais difíceis.

A minha querida vizinha, Alessandra Dias pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos animais que deram suas vidas para que fosse possível a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE QUADRO	14
LISTA DE ANEXOS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Tecido Ósseo	20
2.1.1. Regeneração Óssea	21
2.1.2. Aspectos moleculares da regeneração óssea	23
2.2. Biomateriais na regeneração óssea	25
2.2.1. Colágeno	26
2.2.2. Nanotubo de carbono	28
3. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO USO DE NANOBIOGÉIS COMO IMPLANTES ÓSSEOS EM RATOS WISTAR	
3.1. Introdução	31
3.2. Materiais e métodos	32
3.2.1. Infraestrutura e animais	32
3.2.2. Protocolo anestésico e cirúrgico	33
3.2.3. Grupos experimentais	33
3.2.4. Síntese do composto gel de colágeno + NTC multiwal	34
3.2.5. Colheita de sangue	35
3.2.6. Análises laboratoriais	35
3.2.7. Colheita de amostras	35
3.2.8. Processamento e análise histológica	35
3.2.9. Delineamento experimental e análise estatística	35
3.3. Resultados e discussão	36
3.3.1. Análises hematológicas	36
3.3.2. Análises bioquímicas T1	37
3.3.3. Análises bioquímica T2	41
3.3.4. Avaliação histopatológica	47
3.4. Conclusão	51
4. CAPÍTULO 3: REGENERAÇÃO ÓSSEA EM RATOS WISTAR TRATADOS COM NANOTUBO DE CARBONO: HISTOPATOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES DE CRESCIMENTO, E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	
4.1. Introdução	52
4.2. Materiais e métodos	53
4.2.1. Infraestrutura e animais	53

4.2.2.	Protocolo anestésico e cirúrgico	54
4.2.3.	Grupos experimentais	54
4.2.4.	Síntese do composto gel de colágeno + NTC multiwall	55
4.2.5.	Colheita de amostras	56
4.2.6.	Análise de expressão gênica	56
4.2.7.	Processamento e análise histológica	56
4.3.	Resultados e discussão	58
4.3.1.	Análise da expressão gênica	58
4.3.2.	Análises histopatológicas	63
4.4.	Conclusão	66
5.	CAPÍTULO 4: EFEITO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDES MÚLTIPLAS NA REGENERAÇÃO ÓSSEA SOB INFLUÊNCIA DE FIXAÇÃO INTERNA RÍGIDA	
5.1.	Introdução	68
5.2.	Materiais e métodos	69
5.2.1.	Infraestrutura e animais	69
5.2.2.	Protocolo anestésico e cirúrgico	69
5.2.3.	Grupos experimentais	70
5.2.4.	Síntese do composto gel de colágeno + NTC multiwall	70
5.2.5.	Colheita de amostras	71
5.2.6.	Processamento e análise histológica	72
5.2.7.	Análises tomográficas	72
5.2.8.	Delineamento experimental e análise estatística	73
5.3.	Resultados e discussão	73
5.3.1.	Análises histopatológicas	73
5.3.2.	Análises tomográficas	80
5.3.2.1.	Análise das médias gerais	80
5.3.2.2.	Análise das médias centrais	82
5.4.	Conclusão	85
6.	CONCLUSÃO GERAL	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	ANEXO I	96

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	Foto do procedimento cirúrgico realizado no fêmur esquerdo de ratos Wistar. Observa-se o defeito de 2mm de diâmetro na diáfise média, perfurando a cortical lateral e medial. A placa de titânio encontra-se na face dorsal do osso.	33
Figura 2	Médias e desvio padrão referentes à porcentagem de ganho de peso em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito.	36

- Figura 3 Gráficos das médias e erros-padrão dos valores hematológicos de hemoglobinas, leucócitos, proteínas totais e hematócrito de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico e 15 dias após a realização do defeito (# Dentro do mesmo grupo, difere de T0, $p < 0,05$). 38
- Figura 4 Gráfico das médias e erros-padrão dos valores hematológicos de eosinófilos de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) ($p < 0,05$). 40
- Figura 5 Gráficos das médias e erros-padrão dos valores hematológicos de eosinófilos, linfócitos e neutrófilos de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico e 15 dias após a realização do defeito (# Dentro do mesmo grupo, difere de T0, $p < 0,05$). 40
- Figura 6 Gráficos das médias e desvio padrões dos valores séricos de ureia e cálcio de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico e 15 dias após a realização do defeito (*) ($p < 0,05$). 42
- Figura 7 Gráfico das médias e erros-padrão dos valores séricos de fosfatase alcalina (ALP) de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur, tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a Colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$). Na comparação entre grupos (a \neq b e ab = a e b). 43
- Figura 8 Gráficos das médias e erros-padrão dos valores séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur, tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). # indicam diferença entre os tempos ($p < 0,05$). 44
- Figura 9 Gráficos das médias e erros-padrão dos valores séricos de ureia e creatinina de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento

- cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). # indicam diferença entre os tempos ($p < 0,05$). 46
- Figura 10 Gráfico das médias e erros-padrão dos valores séricos de cálcio de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur, tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). # indicam diferença entre os tempos ($p < 0,05$). 46
- Figura 11 Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do fígado de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos hepatócitos em torno de uma vênula central (F) nos grupos (A) carbopol (CP), (B) grupo colágeno (CL), (C) carbopol associados a nanotubos de carbono (NT) e (D) nanotubos de carbono associados colágeno (NTCL). 47
- Figura 12 Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do rim de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos glomérulos e dos túbulos renais nos grupos (A) carbopol (CP), (B) grupo colágeno (CL), (C) carbopol associados a nanotubos de carbono (NT) e (D) nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL). 48
- Figura 13 Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do fígado de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina, 45 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos hepatócitos em torno de uma vênula central (F) nos grupos (A) grupo carbopol associado a nanotubos de carbono (NT), (B) nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL), (C) colágeno (CL) e (D) carbopol (CP). 49
- Figura 14 Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do rim coradas com hematoxilina e eosina, de ratos Wistar 45 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos glomérulos e dos túbulos renais nos grupos (A) grupo carbopol associado a nanotubos de carbono (NT), (B) nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL), (C) colágeno (CL) e (D) carbopol (CP). 50
- Figura 15 Radiografia latero medial do fêmur esquerdo de rato Wistar submetidos a defeito ósseo na diáfise média do fêmur após sobrecarga das placas de titânio usadas na estabilização óssea. 58
- Figura 16 Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes de resposta imediata em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito. 59
- Figura 17 Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes reguladores da resposta inflamatória em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com

- carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito. 60
- Figura 18 Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes marcadores da diferenciação de osteoblastos em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito. 61
- Figura 19 Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes marcadores da diferenciação de osteoblastos em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a Colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito. 62
- Figura 20 Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes reguladores da formação de tecido conjuntivo em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito. 63
- Figura 21 Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CP. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido mielofibroso (TM) localizados na região do defeito, entre o osso cortical (OC). 64
- Figura 22 Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NT. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido mielofibroso (TM) localizados na região do defeito, entre o osso cortical (OC). 65
- Figura 23 Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CL. Observa-se região de descontinuidade do osso cortical (OC) e abundante material eosinofílico sugestivo de fibras colágenas (FC). 66
- Figura 24 Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NTCL. Observa-se região de descontinuidade do osso cortical (OC) com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido em processo de diferenciação (TD) entremeadado com nanotubos de carbono (NTC). 67
- Figura 25 Foto do procedimento cirúrgico realizado no fêmur esquerdo de ratos Wistar. Observam-se duas placas de titânio sobrepostas, posicionadas na face dorsal do osso. 70

- Figura 26 Esquema representativo da segunda análise tomográfica realizada na região de interesse (diáfise média do fêmur). A região de interesse foi dividida em três porções: proximal, média e distal, determinada pela divisão do número total de cortes gerados na região do defeito por três. 73
- Figura 27 Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CT. Observa-se uma área de descontinuidade de osso cortical preenchida por tecido mielofibroso (TM), com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e em suas laterais, osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de transição do tecido mielofibroso (TM) e tecido ósseo neoformado (ON). 74
- Figura 28 Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CP. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) localizados entre as extremidades de osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de transição entre osso cortical pré-existente (OC) e tecido ósseo neoformado (ON). 75
- Figura 29 Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CL. Observa-se região de tecido ósseo neoformado (ON) localizados entre as extremidades de osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de transição entre osso cortical pré-existente (OC) e tecido ósseo neoformado (ON). 76
- Figura 30 Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NT. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) localizados entre as extremidades de osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de tecido ósseo neoformado (ON) circundado por material amorfo impregnado com nanotubos de carbono (NTC). 77
- Figura 31 Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NTCL. Observa-se região de tecido ósseo neoformado (ON) com presença de tecido amorfo (TD) entremeadado com nanotubos de carbono (NTC). Em destaque observa-se região de tecido em fase de diferenciação (TD) impregnado com nanotubos de carbono (NTC). 78
- Figura 32 Médias e erros-padrão dos escores atribuídos na avaliação microscópica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Escores variaram de 1 a 3 sendo 1 leve, 2 moderado e 3 intenso. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) 80
- Figura 33 Médias e erros-padrão dos valores referentes a avaliação microtomográfica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol

(NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

81

Figura 34 Médias e erros-padrão dos valores referentes a avaliação microtomográfica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

82

Figura 35 Médias e erros-padrão dos valores referentes a avaliação microtomográfica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

83

Figura 36 Sequência de cortes tomográficos transversais da região de interesse realizados em uma amostra, nos diferentes grupos avaliados neste estudo.

84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros hematológicos apresentados como média \pm desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

37

Tabela 2 Diferencial do leucograma apresentado como média \pm desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

39

Tabela 3 Avaliação bioquímica hepática apresentada como média \pm desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

41

Tabela 4 Avaliação bioquímica dos valores de ureia, creatina, cálcio e fósforo apresentados como médias \pm desvio padrões de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

42

13

Tabela 5	Avaliação bioquímica hepática apresentada como média \pm desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2).	43
Tabela 6	Tab. 6: Avaliação bioquímica da ureia, creatinina e cálcio apresentados como médias \pm desvio padrões de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2).	45
Tabela 7	Médias e erros-padrão dos escores atribuídos na avaliação microscópica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito . Escores variaram de 1 a 3 sendo 1 leve, 2 moderado e 3 intenso	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Descrição dos primers, forward e reverse, usados nas análises de PCR 15 dias após a realização do defeito ósseo em ratos Wistar.	57
----------	--	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais	96
---------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACV-R2a	Receptor de activina A tipo 2
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BMP	Proteína Morfogênica Óssea
Cbfa-1	Core-binding factor alpha 1
CEPA	Centro Experimental de Pequenos Animais
COX	Ciclooxigenases

CTM	Células tronco mesenquimais
CXCR-4	C-X-C chemokine receptor type 4
EGR	Fator 1 de transcrição celular da resposta imediata
FGF	Fator de crescimento fibroblástico 2
GDF	Fator de diferenciação de crescimento
GGT	Gama glutamil transferase
H&E	Hematoxilina e eosina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
MTC	Microtomografia Computadorizada
MWNTC	Nanotubos de carbono de parede múltipla
NTC	Nanotubo de carbono
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PTH	Paratormônio
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$
ROI	Região de interesse do objeto
Runx2	Fator de transcrição Runx2
SC	Subcutâneo
SDF	Fator derivado de células estromais
T0	Tempo inicial
T1	Tempo final
TGF- β	Fator de crescimento transformante β
TNF	Fator de necrose tumoral
TSC-22	TGF-beta-stimulated clone-22
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt	Proteína WNT

RESUMO

Nos últimos anos os Nanotubos de carbono (NTCs) destacaram-se como biomaterial. Eles possuem propriedades únicas e atrativas para as aplicações biomédicas. Entretanto, apesar do grande potencial apresentado pelo NTCs, pouco se sabe sobre os efeitos de sua implantação em organismos vivos, principalmente em relação a sua citotoxicidade e seu efeito osteoindutor. Esse trabalho teve com objetivo avaliar a regeneração óssea sob influência dos nanotubos de carbono assim como o efeito citotóxico do mesmo no organismo. O experimento foi dividido em 3 etapas. Em todas elas ratos Wistar foram submetidos a defeito ósseo no fêmur, preenchidos com diferentes tratamentos, contendo ou não NTCs. Na primeira etapa esses animais foram avaliados quanto ao potencial citotóxico dos NTCs por meio de análises hematológicas, bioquímicas e histológicas dos tecidos sanguíneo, hepático e renal. Esta avaliação ocorreu em dois momentos, 15 (T1) e 45 dias (T2) após a realização do defeito ósseo. Na segunda etapa, a expressão gênica de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios envolvidos na regeneração óssea foi avaliada 15 dias após a realização do defeito. Na terceira etapa, 45 dias após a realização do defeito a regeneração óssea foi avaliada por meio de análises de microtomografia computadorizada e histologia óssea. Os resultados demonstraram uma ótima biocompatibilidade dos NTCs. Sua presença não induziu reações inflamatórias locais ou sistêmicas. Permitiu o suporte, proliferação e diferenciação celular, além do aumento da expressão de genes envolvidos no reparo ósseo, o que gera boas expectativas quanto ao seu uso como biomaterial.

Palavras chave: biomaterial; osteoindução; PCR; citotoxicidade

ABSTRACT

In recent years, carbon nanotubes (CNTs) stood out as a biomaterial. They have unique and attractive properties for biomedical applications. However, despite the huge potential presented by CNTs, knowledge regarding their cytotoxicity and osteoinductive effect on living organisms is small. Objective with this study was to evaluate bone regeneration under the influence of carbon nanotubes as well as the cytotoxic in the body. The experiment was divided into 3 stages. In all of them Wistar rats underwent a bone defect in the femur, filled with different treatments, with or without CNTs. In the first stage these animals were evaluated for cytotoxic potential of CNTs by haematological, biochemical and histological analyzes of the blood, liver and kidney tissues. This evaluation took place in two stages, 15 (T1) and 45 days (T2) after the osseous defect was made. In the second step, the gene expression of growth and inflammatory mediators involved in bone regeneration was evaluated 15 days after the completion of the defect. In the third stage, 45 days after the realization of the defect, bone regeneration was evaluated by analysis of computed microtomography and bone histology. Results demonstrated an excellent biocompatibility of CNTs. His presence did not induce local or systemic inflammatory reactions. Allowed support, cell proliferation and differentiation, and increased expression of genes involved in bone repair, which generates great expectations as to its use as a biomaterial .

Keywords: biomaterial; osteoinduction; PCR; cytotoxicity

1. INTRODUÇÃO

As afecções ortopédicas têm papel de destaque na rotina dos hospitais veterinários e assim como nos humanos, não é raro que o ortopedista se depare com fraturas de difícil resolução causadas por traumas graves, infecção e remoção cirúrgica de tumores (Alievi et al., 2007). A necessidade de materiais, como alternativa para essas grandes perdas teciduais, que não ofereçam riscos em relação à contaminação e que sejam obtidos de forma fácil e na quantidade necessária, contribui para o desenvolvimento de biomateriais. Estes são definidos como qualquer substância natural ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizados em aplicações biomédicas, capazes de interagir com sistemas biológicos, tratando ou substituindo quaisquer tecidos, órgão ou funções corporais (Oliveira et al., 2010).

Investimentos realizados nas pesquisas de engenharia tecidual têm como objetivo, além da regeneração, a recuperação funcional da região afetada. Na ortopedia, as principais funções a serem recuperadas são a sustentação e a mobilidade. Para que isso aconteça, a utilização de métodos de estabilização óssea é necessária. Placas e parafusos para fixação interna são amplamente usados no tratamento de fraturas de ossos longos, especialmente nos casos onde houve extensa perda de massa óssea e que requer uso de enxertos ou biomateriais que auxiliem na recuperação óssea. Nesses casos, um período de proteção de cargas é necessário para prevenir carga excessiva nas fases iniciais da recuperação da fratura e consequentemente a reabsorção prematura do enxerto ou biomaterial (Karnezis, 2000). Entretanto, para que a regeneração óssea ocorra é necessário um ambiente onde haja estímulos mecânicos fisiológicos. As placas causam a diminuição desses estímulos, promovendo retardo da regeneração óssea e consequentemente da funcionalidade do

membro. Sendo assim, ao mesmo tempo em que as placas de fixação interna são necessárias nas fases iniciais de recuperação da fratura, estas causam efeitos colaterais indesejáveis ao longo do tempo. Por isso, a pesquisa por novos materiais osteoindutores, que contraponham o efeito da blindagem de tensões, ou seja, que possam acelerar a regeneração óssea mesmo na ausência de estímulos mecânicos fisiológicos, é extremamente desejável nesses casos (Babis e Soucacos, 2005; Completo et al., 2008; Fan et al., 2008).

Nos últimos 20 anos a ciência de biomateriais se expandiu rapidamente. No campo da engenharia tecidual, essa expansão tem melhorado os materiais e o entendimento das interações destes com os tecidos (Kretlow e Mikos, 2011). Novos materiais estão sendo descobertos e estudados, proporcionando à comunidade científica grandes expectativas para o futuro da engenharia tecidual. Dentre estes materiais destaca-se o uso dos nanotubos de carbono (NTC). Os NTC consistem em átomos de carbono arranjados em anéis aromáticos condensados, formando lençóis de grafeno, enrolados em cilindros (Iijima, 1991). Eles possuem grande área de superfície em relação ao volume em função do seu diâmetro em nanoescala. Essa propriedade é atrativa para as aplicações biomédicas onde uma grande razão área/volume é desejada, pois assim, mais biomoléculas podem ser carregadas e interagir com as células e tecidos (Veetil e Ye, 2009). A capacidade que os NTC têm de anexar grupos funcionais na própria superfície permite sua aplicação como arcabouço para crescimento celular e, além disso, a habilidade osteoindutora tem sido demonstrada (Taton, 2001; Zhao et al., 2005). A viabilidade de fibroblastos, osteoblastos e concentrações de osteocalcina em culturas celulares de osteoblastos na presença de NTC, assim como o grau de estimulação celular, foram examinadas com base na produção de

colágeno tipo 1, IL-6 e radicais livres de oxigênio. O alto grau de viabilidade das células examinadas em contato com o NTC, o rápido aumento na formação de colágeno tipo 1 e a ausência da produção de citocina pró-inflamatória IL-6, assim como de radicais livres, confirmaram a excelente compatibilidade dos NTC. A síntese de colágeno induzida pelos osteoblastos e fibroblastos na presença dos NTC, funcionando como substrato na regeneração de tecidos, pode representar um futuro promissor nas aplicações médicas dos NTCs (Chlopek et al., 2006).

Uma das limitações para o uso dos NTC como biomateriais é a ausência de rigidez, o que dificulta sua aplicação como implante na regeneração óssea. Estudo in vivo demonstrou biocompatibilidade e atividade osteocondutiva de polímeros associados aos NTC (Sitharaman et al., 2008). Entretanto, o uso de polímeros naturais parece ter maior potencial na engenharia tecidual, dentre eles destaca-se o colágeno, uma das proteínas do tecido conectivo fundamental na adesão e migração celular e na integridade e remodelação dos tecidos. Pesquisas com géis compostos de colágeno e NTC têm demonstrado que essa associação melhora as propriedades mecânicas, além de apresentar potencial eletroestimulador ao biocomposto (Bhattacharya et al., 2006; Cao et al., 2007). Além disso, na presença de concentrações fisiológicas de cálcio e fósforo, a associação do gel de colágeno com NTC induz a mineralização de cristais de hidroxiapatita (Silva et al., 2009).

Apesar do grande potencial apresentado pelo NTC na sua aplicação em engenharia tecidual, pouco se sabe sobre os efeitos de sua implantação em organismos vivos,

especialmente em relação a sua citotoxicidade. Os resultados de estudos prévios ainda são controversos (Usui et al., 2008; Silva et al., 2009; Firme e Bandaru, 2010; Patlolla et al., 2011). Essa variação pode ser atribuída à grande diversidade de métodos, de materiais e de tipos celulares aplicados nos estudos. Sabe-se que a interação celular do NTC pode ser influenciada por vários fatores como tipo celular, tipo de NTC, quantidade de impurezas e o tipo de funcionalização (Meg et al., 2009). Por isso a realização de mais estudos se faz necessária para garantir a segurança e o sucesso do uso dos NTC como biomateriais.

Objetiva-se com esse estudo, apresentar aos médicos veterinários um novo biomaterial que possibilite a osteoindução e consequentemente a recuperação mais rápida de seus pacientes, evitando complicações pós-operatórias e melhorando a qualidade de vida destes animais.

Objetivos Gerais:

- Avaliar o reparo de falhas ósseas tratadas ou não por preenchimento com gel de colágeno, NTC (multiwall) ou pela associação de ambos, em um modelo de fêmur murino estabilizado com placa de titânio.

- Avaliar a citotoxicidade da aplicação in vivo do NTC multiwall, por meio de monitoramento do perfil sanguíneo e em órgãos como rins, pulmões e fígado.

- Avaliar qualitativamente a expressão gênica de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias nos diferentes grupos tratados com gel de colágeno, NTC (multiwall) ou pela associação de ambos.

2. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo possui propriedades interessantes graças a sua estrutura, composta por hidroxiapatita, colágeno, pequenas quantidades de proteoglicanos, proteínas não colagênicas e água (Weiner e Wagenr, 1998; Lucchinetti, 2001). O principal componente mineral é a hidroxiapatita, que está disposta como pequenos cristais e o colágeno é o principal componente orgânico. Os minerais presentes no osso proporcionam resistência e rigidez, enquanto as proteínas, flexibilidade e resistência a tração (Taneja et al., 2012). Do ponto de vista macroscópico, o tecido ósseo é, poroso, anisotrópico e não homogêneo. Dois tipos de tecido ósseo podem ser observados: O primeiro é o osso esponjoso, que possui 50 - 95% de porosidade, geralmente encontrados em ossos cuboidais, achatados e nas extremidades proximal e distal dos ossos longos. Seus poros encontram-se conectados uns aos outros e preenchidos por medula óssea. O segundo é o osso cortical, que possui de 5 a 10% de porosidade e é encontrado principalmente em ossos longos. São formados por estruturas cilíndricas conhecidas como sistema Haversiano, que por sua vez são formados por lamelas cilíndricas dispostas ao redor dos canais de Havers (Doblaré et al., 2004).

O osso é um tecido metabolicamente ativo que se encontra em constante renovação (Datta et al., 2008). Os componentes celulares do osso consistem em células progenitoras osteogênicas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, elementos hematopoiéticos da medula óssea (Kalfas, 2001).

As células progenitoras estão presentes ao longo de toda superfície não absorvível do osso e compõem a camada mais profunda do perióstio, que reveste a superfície externa do osso, e do endóstio, que reveste a superfície do canal medular (Kalfas, 2001). Quando devidamente estimuladas, elas possuem capacidade mitótica e de se diferenciarem em osteoblastos (Rosenberg, 1999)

Os osteoblastos têm origem a partir de células osteoprogenitoras mesenquimais da medula óssea e perióstio (Kalfas, 2001; Mackie 2003). Estão localizados na superfície das trabéculas, no canal de Havers, no perióstio e no endóstio (Boeloni, 2012), participam da formação e manutenção da arquitetura esquelética. São responsáveis pela deposição óssea, por meio da secreção de componentes orgânicos da matriz óssea, também chamado de osteóide, além de regular a diferenciação e atividade de reabsorção pelos osteoclastos e por esse motivo, participam indiretamente da homeostase do cálcio (Mackie, 2003). O osteóide é constituído por colágeno tipo1, proteínas não colagênicas, proteoglicanos, sulfato de condroitina e outros (Mackie, 2003; Boeloni, 2012). Depois de secretado, o osteóide passa por um processo de mineralização, dando ao osso resistência e rigidez (Kalfas, 2001)

A proliferação e a diferenciação das células de linhagem osteoblástica ocorrem sob influência de fatores de transcrição, fatores de crescimento e hormônios (Datta et al., 2008), sendo os principais: Runx2, Osterix, Wnt, proteínas morfogênicas do osso (BMP- 2 e BMP-4), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico

2 (FGF-2), paratormônio (PTH), 1,25-diidroxicolecalciferol, estrógeno e triiodotironina (Boeloni, 2012).

Os osteoblastos, após se tornarem maduros, deixam de sintetizar matriz óssea, e passam a ser chamados de osteócitos. Eles ficam presos à matriz óssea e se comunicam com outros osteócitos e com os osteoblastos através de projeções intercanaliculares chamadas junções de gap, que permitem a difusão de íons, metabólitos e moléculas sinalizadoras intracelulares (Mackie, 2003; Datta et al., 2008; Boeloni, 2012). Estudos mostram que essa rede de comunicação criada entre os osteócitos é importante no controle da concentração sérica de cálcio e fósforo pela alteração da concentração desses minerais no fluido extracelular local (Rosenberg, 1999). Supõe-se que os osteócitos agem como sensores aferidores de tensão de deformação mecânica e transmitem esses sinais aos osteoblastos e osteoclastos (Saunders e Lee, 2008).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da fusão mononuclear de precursores hematopoiéticos, mas sua diferenciação e ativação dependem de uma série de fatores locais liberados por células de linhagem osteoblástica e citocinas derivadas de células imunológicas, sendo as principais: IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 e TNF (Rosenberg, 1999; Mackie, 2003; Sims e Gooi, 2008). Apesar dos diferentes mecanismos de sinalização, a maioria converge para uma maneira comum de formação dos osteoclastos, que requer a ativação do receptor RANKL como mediador essencial para formação destes. A linhagem osteoblástica, além de ser responsável pela expressão do RANKL, também expressa o OPG, um receptor da superfamília TNF, que funciona como efetivo inibidor da formação dos osteoclastos (Sims e Gooi, 2008). Sendo assim, pode-se afirmar que, indiretamente, os osteoblastos são responsáveis pela

regulação da atividade de reabsorção óssea (Mackie, 2003). Os osteoclastos estão localizados na superfície das trabéculas, nos canais de Havers, periósteo e endósteo (Datta et al., 2008). Têm como função promover a reabsorção óssea pela liberação de enzimas hidrolíticas capazes de dissolver a matriz orgânica e inorgânica do osso. Esse processo resulta na formação de erosões superficiais na superfície óssea chamadas de lacunas de Howship (Kalfas, 2001).

O osso por possuir natureza dinâmica, pode crescer, modificar sua forma, regenerar e se renovar constantemente. Todos esses processos são coordenados por mecanismos hormonais, fisiológicos e mecânicos (Doblaré et al., 2004).

2.1.1. Regeneração óssea

O osso possui a capacidade intrínseca de regeneração como parte do processo de reparo em resposta a injúria. Essa regeneração é composta por uma série de eventos biológicos orquestrados de indução e condução, envolvendo grande número de tipos celulares e sinalizadores moleculares intra e extracelulares, na tentativa de otimizar o reparo ósseo e restabelecer sua função (Kalfas, 2001; Dimitriou et al., 2011). Ao contrário do que ocorre em outros tecidos, a maioria das injúrias ósseas cicatriza sem a formação de tecido cicatricial e o osso se regenera com suas propriedades pré-existentes restabelecidas (Dimitriou et al., 2011).

A regeneração óssea pode ocorrer de forma primária ou direta, que requer redução anatômica correta das linhas de fratura, sem a presença de lacunas, mediante fixação estável. Esse tipo de cicatrização só é possível após redução cirúrgica com o uso de fixadores internos. Nesses casos, há uma tentativa direta do córtex em restabelecer o sistema Haversiano, pela formação de unidades de remodelamento, na ordem de

restaurar a continuidade mecânica do osso. O endotélio vascular e o sistema perivascular provêm as células osteoprogenitoras que se transformarão em osteoblastos. Durante esse processo, praticamente não se observa resposta periosteal (Dimitriou et al., 2005; Marsell e Einhorn, 2011).

Outra forma de regeneração, conhecida como secundária ou indireta, é a forma mais comum de cicatrização e consiste na combinação da ossificação endocondral e intramembranosa, com a subsequente formação de calo. O canal medular e as áreas inter-corticais participam da formação do calo mole, composto de tecido fibroso e cartilagem, que em seguida, se torna osso por meio da ossificação endocondral. A região subperiosteal e o tecido mole ao redor do foco da fratura formam o calo duro e, em seguida, osso, por meio da ossificação intramembranosa. Essa forma não requer redução anatômica da fratura ou condições de fixação rígida, ao contrário, os micromovimentos e a sustentação de peso contribuem para sua ocorrência. Entretanto, o excesso de micromovimentos ou peso pode resultar em retardo na cicatrização ou não união da fratura (Phillips, 2005; Marsell e Einhorn, 2011).

O processo de regeneração ocorre em três etapas distintas, porém, interconectadas, sendo elas: Inflamação, reparo e remodelamento (Kalfas, 2001; Phillips, 2005). Imediatamente após o trauma, um hematoma se forma no foco da fratura sendo este formado por células sanguíneas da periferia e também da medula óssea. Com a ativação das plaquetas pela trombina e pelo colágeno subendotelial, há a liberação de PDGF e TGF- β , fatores essenciais na iniciação do reparo da fratura, pois induzem migração, ativação e proliferação de células mesenquimais, angiogênese, quimiotaxia de células inflamatórias agudas e ativação plaquetária (Dimitriou et al., 2005). Assim, uma

resposta inflamatória se inicia, resultando na formação de tecido de granulação, crescimento de tecido vascular e migração de células mesenquimais. Nesse estágio inicial, os nutrientes primários e o suprimento de oxigênio são fornecidos pelos músculos e osso esponjoso adjacente (Kalfas, 2001).

Após a formação do tecido de granulação, ocorre a formação endocondral entre as extremidades distal e proximal do foco da fratura, externamente ao periósteo. Devido à instabilidade mecânica, um calo cartilaginoso se forma, conferindo a fratura uma estrutura mais estável (Marsell e Einhorn, 2011). A formação desse calo depende do recrutamento de células tronco mesenquimais (CTMs), originadas de tecidos moles adjacentes, medula óssea, tecido de granulação e camadas mais profundas do periósteo e endósteo (Dimitriou et al., 2005). Achados recentes mostram que um recrutamento sistêmico de CTM circulantes para o local da injúria também desempenha grande importância para uma boa regeneração (Granero-Molto et al., 2009; Marsell e Einhorn, 2011). Após o recrutamento das CTM, uma cascata de eventos moleculares envolvendo produção de matriz de colágeno tipo I e II e ativação de uma série de moléculas sinalizadoras inicia o processo de condrogênese e ossificação endocondral (Marsell e Einhorn, 2009). A medida que os vasos sanguíneos penetram a matriz cartilaginosa, os condrócitos entram em apoptose e são removidos do local juntamente com a matriz extracelular, permitindo assim, que o suprimento sanguíneo chegue ao local da injúria (Marsell e Einhorn, 2011). O VEGF é indicado com um dos mediadores mais importantes durante o processo de angiogênese devido sua habilidade de regular a invasão de vasos sanguíneos na cartilagem hipertrófica. Junto aos demais nutrientes, a invasão vascular traz também células mesenquimais indiferenciadas à região de ossificação, que mais tarde se

diferenciam em osteoblastos e dá início a osteogênese (Yang et al., 2012).

A síntese do osteóide pelos osteoblastos dá origem a dois tipos de osso: o não lamelar ou primário, que é rapidamente formado e possui fibras colágenas dispostas em várias direções, sem organização definida, e o osso lamelar, que possui um padrão de fibras e é formado mais lentamente. Em parte, o tipo de osso sintetizado é determinado de maneira pela qual as proteínas colagênicas ou não colagênicas são depositadas pelos osteoblastos. Entretanto a forma como é determinada essa deposição ainda é desconhecida (Sims e Gooi, 2008).

Após a ossificação do calo cartilaginoso, inicia-se o processo de remodelamento ósseo, que consiste na reabsorção do calo ósseo pelos osteoclastos e deposição de osso lamelar pelos osteoblastos. Esse remodelamento é resultante da polaridade elétrica criada quando há pressão no eixo axial dos ossos longos. Forças piseletricas ativam os osteoclastos e gradualmente o calo ósseo é substituído por osso lamelar, restabelecendo a cavidade medular. Para que o remodelamento ocorra de forma satisfatória, são necessários suprimento sanguíneo adequado e um aumento gradual na estabilidade mecânica (Marsell e Einhorn, 2011).

2.1.2. Aspectos moleculares da regeneração óssea

As moléculas sinalizadoras que participam do processo de reparo ósseo podem ser divididas em três grupos: Citocinas pró-inflamatórias, superfamília do fator de crescimento transformador beta e fatores angiogênicos (Dimitriou et al., 2005).

As principais moléculas envolvidas no processo de reparo ósseo são: TNF- α (Marsell e Einhorn, 2011) IL-1, IL-6,

(Phillips, 2005; Marsell e Einhorn, 2011) TGF- β , IGF, FGF, fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e as BMP (Phillips, 2005). A resposta inflamatória inicial envolve a secreção do TNF- α e interleucinas IL-1, IL-6, IL-11 e IL-18. Esses fatores além de recrutarem células inflamatórias, também promovem a angiogênese.

O TNF- α é expresso por macrófagos, outras células inflamatórias e por células mesenquimais presentes no periósteo. Este induz sinais inflamatórios secundários e age como agente quimiotático no recrutamento de células necessárias ao reparo. Além disso, melhora a síntese de matriz extracelular estimulando a angiogênese e recrutando células fibrogênicas endógenas para o local da injúria. O TNF- α também induz a apoptose de condrócitos durante a ossificação endocondral e estimula a função osteoclástica (Dimitriou et al., 2005).

A IL-1 é expressa juntamente com o TNF- α , é também produzida por macrófagos na fase aguda da inflamação. Esta interleucina induz a produção de IL-6 por osteoblastos, promove a produção do calo cartilaginoso e também a angiogênese no local da injúria pela ativação dos receptores IL-1RI e IL-1RII (Lee e Lorenzo, 2006; Marsell e Einhorn, 2011). A IL-6 por sua vez, estimula a angiogênese pela produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos. (Yang et al., 2007; Marsell e Einhorn, 2011).

Os fatores de crescimento (FC) normalmente estão estocados na matriz extracelular (MEC). Após a injúria, são ativados e liberados pela MEC, células e plaquetas, atuando de maneira autócrina, parácrina e endócrina. Os principais FC com ação no esqueleto são as BMPs, TGF- β , FGF, PDGF, VEGF e IGFs. Eles possuem efeitos em múltiplas células e

podem induzir diferentes funções (Devescovi et al., 2008).

As BMPs são moléculas sinalizadoras, que regulam vários processos biológicos durante o desenvolvimento embrionológico e na vida adulta (Yu et al., 2010). São divididas em quatro subgrupos, dependendo da sequência primária do aminoácido. O grupo um, consiste na BMP-2 e BMP-4, o grupo dois inclui a BMP-5, 6 e 7, o terceiro grupo, as BMP-12 ou GDF-7, BMP-13 ou GDF-6 e BMP-14 ou GDF-5 e finalmente o quarto grupo, as BMP-3 e BMP-3b (Kalfas, 2001; Dimitriou et al., 2005). Possuem efeito pleiotrópico, ou seja, controlam várias ações como: regulação do crescimento, diferenciação e apoptose de vários tipos celulares incluindo osteoblastos, condroblastos, células neurais e epiteliais. Cada uma delas atuam em diferentes tempos durante o processo de reparo ósseo. As BMPs -2, 6 e 9 são as mais eficientes na indução da diferenciação das CTM em células osteoprogenitoras, enquanto as outras BMPs, exceto a BMP-3 e 13, promovem a diferenciação terminal dos precursores de osteoblastos (Chen et al., 2003; Phillips, 2005). Além disso, essas proteínas também estimulam a síntese e secreção de outros fatores de crescimento angiogênico e ósseo como VEGF e IGF respectivamente (Dimitriou et al., 2005).

As BMPs têm sido testadas em estudos clínicos com objetivo de provar sua eficácia e segurança para poderem ser usadas como enxerto ósseo. As BMP-7 e BMP-2 foram liberadas para uso clínico nos anos de 2001 e 2002 respectivamente, especialmente em casos de não união, fraturas expostas e defeitos críticos (Giannoudis e Einhorn, 2009). Além dos enxertos autólogos e alógenos, as BMPs 2 e 7 são os únicos métodos biológicos aprovados no tratamento da regeneração óssea em seres humanos (Yu et al., 2010).

O TGF- β é liberado pelas plaquetas, durante a fase inflamatória inicial do reparo ósseo. Também pode ser produzido por osteoblastos, condrócitos, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos. É armazenado na matriz óssea e funciona como potente estimulador quimiotático de células mesenquimais e contribui para a proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos, condrócitos e osteoblastos. Além disso, induz a produção de proteínas extracelulares como: colágeno, proteoglicano, osteopontina, osteonectina e fosfatase alcalina. Sua principal ação é durante o processo de condrogênese e ossificação endocondral (Sandberg et al., 1993; Dimitriou et al., 2005; Devescovi et al., 2008).

O PDGF é sintetizado por plaquetas, monócitos, macrófagos, células endoteliais e osteoblastos. Funciona como potente estimulador mitogênico de células de origem mesenquimal e também como agente quimiotático estimulador de células inflamatórias. Além disso, contribui para proliferação de monócitos, macrófagos, células do tecido conectivo e angiogênese (Lieberman et al., 1999; Dimitiou et al., 2005; Devescovi et al., 2008).

O FGF é sintetizado por monócitos, macrófagos, células mesenquimais, osteoblastos e condrócitos. Promove o crescimento e a diferenciação de várias células como: fibroblastos, monócitos, osteoblastos e condrócitos. Atuam na angiogênese e mitogênese de células mesenquimais e também na inibição da apoptose de osteoblastos imaturos e indução da apoptose de osteócitos maduros (Dimitiou et al., 2005; Devescovi et al., 2008).

Os IGFs são encontrados na matriz óssea, células endoteliais, osteoblastos e condrócitos e atuam na regulação dos efeitos dos hormônios do crescimento. A

IGF-I promove a formação da matriz óssea pela diferenciação dos osteoblastos. A IGF-II age mais tarde, na formação endocondral e estimulando a produção de colágeno tipo I, matriz cartilaginosa e proliferação celular. (Dimitriou et al., 2005; Devescovi et al., 2008)

O SDF-1 age no recrutamento e posicionamento das CTM no foco da fratura. Estudos mostram que sua expressão está aumentada no local da lesão, especialmente no periósteo localizado nas bordas da fratura. O SDF-1 também é responsável pelo recrutamento das CTM. Sua ausência, ou de seu receptor CXCR-4, faz com que as CTM percam a capacidade de alojamento no foco da fratura (Granero-Molto et al., 2009; Marsell e Einhorn, 2011).

O VEGF é um fator mitógeno específico das células endoteliais vasculares, essencial para a neo-angiogênese. Ele funciona no processo de ossificação endocondral e intramembranosa agindo como um mediador essencial durante esses processos. Está envolvido também em outros aspectos do desenvolvimento ósseo como diferenciação de condrócitos, osteoblastos e no recrutamento de osteoclastos (Yang et al., 2012).

A angiopoetina é um fator de crescimento capaz de promover a regeneração vascular. Está relacionada à formação de grandes vasos e o desenvolvimento de ramos colaterais de vasos pré-existentes. Sua contribuição para regeneração óssea ainda não foi completamente entendida (Dimitriou et al., 2005; Cao et al., 2012).

2.2. Biomateriais na regeneração óssea

A regeneração óssea quando ocorre de forma inadequada pode ter consequências devastadoras, indo desde desfiguração e a perda da função, até mesmo a amputação do

membro. Nos casos de grandes perdas ósseas, onde o osso não pode se regenerar espontaneamente, os clínicos lançam mão do uso de enxertos ósseos ou seus substitutos (Geiger et al., 2003)

Por vários anos o enxerto autólogo foi considerado o padrão ouro para o manejo de defeitos ósseos por combinar todas as propriedades necessárias para um enxerto ósseo: osteoindução, osteogênese e osteocondução (Dimitriou et al., 2011). Essa técnica continua tendo os melhores resultados, entretanto oferece alguns riscos como dor, perda de sangue, risco de infecção e alto custo devido ao aumento do tempo cirúrgico. Além disso, os enxertos autólogos são ineficientes, quando o volume do defeito excede o volume do material colhido. Esses casos são comuns, especialmente em pacientes pediátricos ou geriátricos (Geiger et al., 2003). Por isso, há uma crescente necessidade por meios alternativos ao tradicional enxerto ósseo.

Os biomateriais são definidos como qualquer substância ou combinação dessas, natural ou não, que não seja droga ou fármaco, utilizada em aplicações biomédicas e que possa interagir com sistemas biológicos, tratando, aumentando ou substituindo tecidos, órgão ou funções corporais (Oliveira et al., 2010). São classificados de acordo com a origem (natural ou sintética) e a composição (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos) (Oliveira et al., 2009).

Nos últimos 60 anos a evolução na pesquisa dos biomateriais e sua viabilidade clínica delimitou a existência de três gerações distintas de materiais. Os bioinertes compõem a primeira geração, os bioativos e biodegradáveis a segunda geração, e os materiais destinados a estimular respostas celulares específicas em nível molecular formam a terceira geração. Essas três gerações não devem ser interpretadas de

forma cronológica, mas sim conceitual, já que cada geração representa a evolução dos requisitos e das propriedades de cada material envolvido. Sendo assim, a terceira geração promete novas possibilidades de tratamento e aplicações, o que não significa que essa nova geração irá substituir as gerações anteriores (Navarro et al., 2008).

Nas últimas décadas, a comunidade de pesquisa ortopédica focou sua pesquisa na busca de novos biomateriais considerando os quatro requisitos básicos da regeneração óssea: (1) o sinal morfogenético, fatores de crescimento e diferenciação; (2) células do hospedeiro que responderão aos sinais e serão capazes de se diferenciarem em osteoblastos; (3) biomateriais capazes de carrear estes sinais morfogenéticos a áreas específicas e que sirvam de arcabouço para o crescimento celular; (4) ambiente viável e bem vascularizado (Geiger et al., 2003). Em resumo, pode-se dizer que as características desejáveis aos biomateriais utilizados na regeneração óssea são: biocompatibilidade e degradação em produtos não tóxicos; biodegradabilidade e reabsorção na mesma taxa do reparo tecidual; alta porosidade; osteocondução; resistência mecânica e integridade estrutural nas primeiras fases da formação óssea (Navarro et al., 2008; Oliveira et al., 2010).

A biocompatibilidade reflete a natureza e o grau de interação entre o biomaterial e o tecido do hospedeiro e é uma das principais preocupações em pesquisas relacionadas aos biomateriais (Morais et al., 2010). A presença de resíduos durante o processo de produção ou a liberação de produtos degradantes, são sempre citados como limitantes para o uso de biomateriais sintéticos. Por isso, os de origem natural são considerados mais seguros, pois possuem composição, estrutura e propriedades mecânicas consideradas adaptáveis às funções biológicas do organismo (Neel et al., 2012).

A escolha do biomaterial depende do objetivo de sua aplicação, entretanto, a maioria deles é projetada para acrescentar à função da matriz extracelular permitindo assim, o suporte, a junção, proliferação e diferenciação celular (Neel et al., 2012). Sendo assim, além de mimetizar o ambiente e função da MEC, novos biomateriais também possibilitam a junção de moléculas bioativas em sua superfície, fazendo com que as células sejam orientadas e estimuladas em direção a uma resposta específica (Navarro et al., 2008).

Os biomateriais podem atuar também como sistemas de liberação de fármacos por meio de mecanismos sensíveis a mínimos estímulos do meio, como alteração de temperatura, força iônica e pH local. Alterações nessas variáveis fazem com o biomaterial saia de um estado estável e passa para um estado ativo, liberando fármacos para o meio (Oliveira et al., 2010)

A ciência dos biomateriais evoluiu, entretanto vários desafios ainda precisam ser vencidos. O desenvolvimento de tecnologias que permitam a correta integração entre biomateriais, células, fatores de crescimento e hospedeiros é fundamental para um bom prognóstico e resultados mais adequados (Oliveira et al., 2010)

2.2.1. Colágeno

O colágeno é o componente estrutural mais comum do organismo, representando 20 a 30% da proteína total encontrada no corpo (Friess, 1998). É sintetizado pelos fibroblastos, que geralmente têm origem de células pluripotentes. Possui estrutura única, assim como tamanho e sequência de aminoácidos. Sua molécula possui configuração de tripla hélice que consiste em três cadeias de polipeptídeos torcidas uma em volta da outra, como uma corda (Friess, 1998; Lee et al., 2001). Tem

importante participação na formação dos tecidos e órgãos e está envolvido na expressão funcional de várias células. Funciona também como arcabouço, e participa do reparo tecidual, entretanto, sua função mecânica é a mais importante (Neel et al., 2012). As fibras de colágeno e suas redes funcionam como MEC altamente organizada e com arquitetura tridimensional, desempenhando papel fundamental na manutenção da integridade biológica dessa matriz, assim como em sua dinâmica de constante remodelamento (Cen et al., 2008). Possui propriedades como: biodegradabilidade, baixa antigenicidade e biocompatibilidade superior quando comparado a outros polímeros naturais como albumina (Lee et al., 2001). Apresenta também alta força de tensão, induz à coagulação, além disso, possui boa mobilidade e é facilmente purificado. Pode ser extraído em meio aquoso e moldado em diferentes formas como géis, filmes e pó (Fujioka et al., 1998)

Até agora 28 tipos de colágenos geneticamente distintos foram descritos. Baseado em sua estrutura e organização supramolecular, o colágeno é dividido em diferentes grupos, sendo esses caracterizados pela complexidade e diversidade de suas estruturas e funções. Dentre os diferentes grupos, o maior e mais abundante, com cerca de 90% do total de colágenos, é o grupo das fibrilas. Fazem parte desse grupo os colágenos: tipos I, II, III, V e XI. O colágeno tipo I é o mais abundante e estudado. Ele representa mais de 90% da massa orgânica dos ossos e predominam nos tendões, pele, ligamentos, córnea, e vários outros tecidos conectivos exceto cartilagem hialina, cérebro e humor vítreo. In vivo, as fibras tripla hélice de colágeno tipo I estão incorporadas em compostos contendo também colágeno tipo III (pele e fibras reticulares) ou tipo V (ossos, tendões e córnea) (Fleischmajer et al., 1990). Na maioria dos organismos, especialmente nos tendões e fâscias, o

colágeno tipo I proporciona rigidez elástica, e no osso, é quem define propriedades biomecânicas relacionadas à sustentação de peso, resistência e rigidez a torção (Gelse et al., 2003).

A excelente biocompatibilidade e segurança, devido às características biológicas já mencionadas, fazem do colágeno um dos melhores biomateriais para aplicações médicas. Os principais motivos para usá-lo como biomaterial é sua habilidade em formar fibras extras fortes e estáveis, graças a sua capacidade de agregação e reticulação, sua degradação em componentes fisiológicos toleráveis e a capacidade de penetração celular (Friess et al., 1998; Lee et al., 2001). O colágeno pode funcionar como sistema de liberação de fármacos, fatores de crescimento e células, além disso, pode formar redes, contribuindo para formação de arcabouços e reparação tecidual (Gelse et al., 2003).

O colágeno comercialmente disponível é de origem bovina ou suína, entretanto, pode ser derivados de outras fontes como: equinos, ovelhas, placenta humana e fontes marinhas (Friess, 1998; Neel et al., 2012).

O colágeno também pode ser associado a outros biomateriais. Sua associação a hidroxiapatita e nanotubos de carbono já foram relatadas na literatura com sucesso (Itoh et al., 2001; Rodrigues et al., 2003; Silva et al., 2009).

Apesar de todas as vantagens, há alguns fatores que dificultam o uso do colágeno como biomaterial. O alto custo de purificação, baixa rigidez e efeitos colaterais, como reações alérgicas e transmissão de patógenias, no caso do uso de colágeno derivado de animais (Lee et al., 2001; Cen et al., 2008; Silva et al., 2009).

2.2.2. Nanotubos de carbono

Nos últimos anos, o mundo tem conhecido as inovações proporcionadas pela nanotecnologia que abrangem desde a medicina à eletrônica. Esta ciência baseia-se no desenvolvimento e aplicação de estruturas em escala nanométria (Ribeiro e Araújo-Moreira, 2011). O caráter inovador dessas substâncias, muitas vezes já conhecidas, se dá por meio da manipulação da forma e do tamanho do material, o que leva a aquisição de novas propriedades como resistência, condutividade elétrica e reatividade química, além de outras características ópticas e magnéticas (Medeiros et al., 2006).

Vários materiais têm sido trabalhados em escala nanométria, dentre eles, destaca-se os nanotubos de carbono (NTC). A existência desse material foi reportada pela primeira vez em 1950, mas sua estrutura atômica só foi descrita em 1991 por Sumio Iijima (1991). Os NTCs consistem em átomos de carbono arranjados em anéis aromáticos condensados, formando lençóis de grafeno, enrolados em cilindros. O grafeno é definido como uma folha planar de átomos de carbono densamente compactados em forma de grade bidimensional (Boehm et al., 1994). De acordo com o número de camadas de grafeno, os NTCs podem ser classificados em nanotubos de carbono de parede simples (1 camada de grafeno) ou de paredes múltiplas (múltiplas camadas de grafeno concêntricas) (Iijima, 1991; Bianco et al., 2011).

Os NTCs pertencem à família dos fulerenos, ou seja, a terceira forma alotrópica do carbono, juntamente com o grafite e o diamante. A principal vantagem tecnológica apresentada por esse material é a resistência, mas também possui propriedades eletrônicas, mecânicas e químicas únicas que facilitam sua aplicação

em associação com outros materiais. Ao ser associado a outros materiais, os NTC são capazes de melhorar suas propriedades e inserir novas funções aos mesmos. Isso permite a utilização dos NTCs em vários campos da ciência como química, eletrônica, biologia e outros (Berhanu, et al., 2009 ; Saito et al., 2009; Bianco et al 2011).

Atualmente as três principais formas de produção dos NTCs são: descarga de arco, ablação a laser e deposição de vapor químico. Esses métodos geram uma quantidade significativa de impurezas como debris de grafite, partículas catalíticas e outros fulerenos, que interferem nas propriedades desejadas para os NTCs. Com o intuito de eliminar essas impurezas, diferentes formas de purificação têm sido desenvolvidos, dentre os quais se têm destacado floculação, microfiltração, cromatografia e centrifugação (Vairavapandian et al., 2008).

Outra etapa de grande importância para viabilizar o uso dos NTCs nos campos biológico e médico é a adição de grupos químicos funcionais à estrutura dos NTCs. Esse processo, denominado de funcionalização, é fundamental, pois os NTCs, em seu estado original, são completamente insolúveis na maioria dos solventes orgânicos e meios aquosos (Bianco et al., 2011). Além da solubilização, a funcionalização traz outras vantagens extremamente importantes para as pesquisas biológicas, estando estas relacionadas à capacidade de translocação através de membranas celulares e à redução de efeitos citotóxicos (Kostarelos et al., 2007).

Em termos de diferenças entre os NTCs de camada simples e os de múltiplas camadas, no campo de aplicações biomédicas, ainda não está evidente se um deles apresenta mais vantagens que o outro. As diferenças

entre eles se dão devido à diferente disposição dos átomos de carbono. Ambos são atrativos, pois possuem capacidade de captação celular e quando funcionalizados se tornam capazes de atravessar barreiras biológicas. Contudo, os de camada simples possuem propriedades intrínsecas fotoluminescentes que podem ser usadas no desenvolvimento de diagnósticos e detecções *in vivo*. Já os de camada múltipla, não possuem tais propriedades, mas apresentam diâmetro interno maior, que pode ser explorado para envolvimento de moléculas terapêuticas, e uma grande superfície externa disponível, que oferece a possibilidade de conjugações ou interações com moléculas ativas (Liu et al., 2009).

Considera-se que as principais formas de aplicação dos NTCs na biologia e biomedicina incluem seu uso como biossensores ultrasensitivos, nanocompostos para próteses ortopédicas, dispositivos neurais e sistemas de distribuição. Uma propriedade que os torna atrativos para aplicações biomédicas é que, devido ao seu diâmetro em nanoescala, esses possuem uma grande área de superfície em relação ao seu volume. Essa grande razão área/volume é desejada, pois permite que os NTCs sejam usados como carreadores de biomoléculas, ou seja, moléculas que possam interagir com as células e tecidos (Ménard-Moyon et al., 2010).

Os NTCs têm mostrado grande potencial de uso na área de engenharia tecidual graças a sua alta resistência mecânica, flexibilidade, elasticidade e baixa densidade. Além dessas propriedades os NTCs também podem ser incorporados em outros materiais estruturais, promovendo reforço estrutural ou conferindo novas propriedades como condução elétrica, que pode auxiliar diretamente no crescimento celular (Saito et al., 2009; Veetil e Ye, 2009).

Os NTCs têm sido explorados para o crescimento de diferentes tecidos, dentre eles destacam-se os tecidos ósseo, muscular e nervoso. Em relação ao tecido ósseo, várias pesquisas já foram realizadas reportando a influência dos NTCs em células osteoblásticas cultivadas *in vitro* (Saito et al., 2009). Verificou-se que culturas de fibroblastos e osteoblastos, na presença de NTC, apresentaram alto grau de viabilidade das células, rápida síntese de colágeno tipo I e ausência de citocina pró-inflamatória IL-6, radicais livres e ausência de mudanças nos níveis de osteocalcina (Chlopek et al., 2006).

Estudos *in vitro* também demonstraram que NTCs de parede múltipla, não modificados quimicamente, promoveram formação óssea por meio de sua interação com osteoblastos (Shimizu et al., 2012). Os autores atribuíram a aceleração na diferenciação de osteoblastos ao acúmulo de cálcio promovido pelos NTCs de parede múltipla. A presença dos NTCs aumenta a concentração de cálcio e essa, quando detectada pelos osteoblastos indiferenciados, faz com que os mesmos se diferenciem em osteoblastos maduros, promovendo assim a calcificação. A absorção de cálcio pelos NTCs de parede múltipla é justificada pelo seu potencial negativo, que atrai os íons de cálcio (Yamamoto et al., 2008).

Outros autores defendem a hipótese de que essa aceleração na maturação dos osteoblastos estaria relacionada à capacidade dos NTC em adsorver proteínas. Essa capacidade é atribuída a sua estrutura específica e extensa área de superfície, além das propriedades eletrônicas e catalíticas. Com uma área de superfície maior, a quantidade de fatores de crescimento absorvida é maior e conseqüentemente o recrutamento e ativação celular (Li et al., 2009)

Os NTCs também mostraram efeitos positivos quando associados a materiais metálicos usados em implantes. Estudo comparando o efeito dos NTCs ao titânio puro em culturas de osteoblastos demonstrou que, apesar de não existir diferença na proliferação celular entre os grupos, a diferenciação celular, mensurada por meio da dosagem da fosfatase alcalina e da mineralização da matriz óssea, foi melhor no grupo contendo NTCs (Bhattacharya et al., 2010).

Resultados promissores, demonstrando biocompatibilidade, osteointegração e osteocondução, ou seja, condições fundamentais para o sucesso do uso dos NTCs como implantes ósseos, também têm sido demonstrados em estudos in vivo. Partículas de NTCs de parede múltipla se aderiram diretamente no osso em defeitos tíbiais induzidos em ratos e se integraram à matriz óssea, não interferindo no reparo ósseo e se tornando integrada ao tecido ósseo (Usui et al. 2008). Em coelhos, uma mistura de polipropileno e NTCs de parede múltipla foram usados para preencher defeito no côndilo do fêmur. As análises microtomográficas mostraram que, após 12 semanas, a formação óssea no defeito preenchido com esse material foi significativamente maior que nos outros grupos, sendo de 200% maior que no grupo preenchido apenas com propileno. Também histologicamente, após 12 semanas, observou-se diferença significativa na resposta óssea do grupo tratado com NTCs quando comparado aos outros grupos (Sitharaman et al. 2008).

Apesar de todos os resultados positivos encontrados, ainda não se conhece ao certo

a segurança do emprego dos NTCs. Pesquisas demonstraram influencia biológica dos NTC na proliferação e ciclo celular de fibroblastos e na indução de apoptose de forma dose dependente (Meg et al., 2009). Há também relatos de potencial poder clastogênico e genotóxico de NTCs de paredes múltiplas funcionalizados e não funcionalizados, em células da medula óssea. Os resultados demonstraram que a exposição ao NTCs aumentou significativamente o número de aberrações estruturais cromossômicas, a frequência de células micro-nucleadas e o nível de dano ao DNA, além de diminuir o índice mitótico (Patlolla et al., 2010)

Apesar de todos esses estudos, os resultados relacionados à segurança do uso de NTCs ainda é muito controverso. Os diferentes tipos de funcionalização, assim como as diferentes concentrações usadas, dificultam a padronização dos resultados assim como sua interpretação. Apesar dos poucos estudos realizados in vivo, os resultados são favoráveis ao uso dos NTCs. Entretanto, mais estudos são necessários para determinar sua segurança e seu efeito como implante ósseo, principalmente no que se refere aos efeitos da permanência desse material em longo prazo, no corpo. A superfície química dos NTCs desempenha papel fundamental em sua citotoxicidade. Portanto, a funcionalização da superfície dos NTC com grupos químicos específicos, ou espécies biológicas pode ser uma alternativa viável para o desenvolvimento de sua biocompatibilidade (Liu et al., 2010), assim como da viabilidade de sua aplicação como biomaterial.

3. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO USO DE NANOBIOGÊIS COMO IMPLANTES ÓSSEOS EM RATOS WISTAR

RESUMO

Nos últimos anos diversas áreas médicas têm usado os NTCs com diferentes propósitos e seu uso na bioengenharia tecidual tem se destacado. Apesar das expectativas em torno de seu uso, pouco se sabe a respeito de sua citotoxicidade. Com esse trabalho objetivou-se avaliar a resposta do organismo à implantação de NTCs usados como biomateriais na regeneração óssea por meio da monitoração hematológica, bioquímica e histológica dos tecidos sanguíneo, hepático e renal. Foram usados 48 ratos Wistar submetidos a defeito ósseo na diáfise média no fêmur esquerdo, com 2mm de diâmetro, estendendo-se da cortical lateral até a cortical medial. Os defeitos foram preenchidos com carbopol 2%, colágeno, NTCs associados ao carbopol e NTCs associados ao colágeno. Esses animais foram avaliados em dois momentos, 15 (T1) e 45 dias (T2) após a realização do defeito ósseo. Em T1 as diferenças observadas na avaliação hematológica e bioquímica, entre os grupos, ocorreram independente da presença dos NTCs, exceto para os valores de neutrófilos, que diminuíram ($p < 0,05$) em relação a T0 e cálcio, que foram superiores ($p < 0,05$) apenas nos grupos tratados com NTC. Em T2 as análises bioquímicas demonstraram um aumento nos níveis séricos de creatinina ($p < 0,05$) apenas nos grupos tratados com NTCs. Nas avaliações histológicas do fígado e rins em T1 e T2 não foram observados sinais de inflamação, presença de NTCs, ou outras alterações relevantes em relação a citotoxicidade do material implantado. Os resultados demonstraram que a presença dos NTCs não induziram alterações significativas ($p < 0,05$) da hematologia e avaliações histológicas de fígado e rins. Entretanto mais estudos são necessários para comprovação da ausência de efeitos citotóxicos na utilização dos NTCs como biomaterial na regeneração óssea.

Palavras Chave: nanotubos de carbono; biomaterial; hematologia; bioquímica; histopatologia.

3.1. Introdução

A nanotecnologia desenvolveu-se rapidamente nos últimos anos. Linhas de pesquisas em diversas áreas médicas têm usado os nanotubos de carbono (NTCs) com diferentes propósitos, sendo os principais: sistema de liberação de fármacos, marcadores celulares e arcabouço para crescimento celular. Esses trabalhos despertam cada vez mais o interesse da comunidade científica, graças ao grande potencial de aplicação dos NTCs. Destaque especial se faz para o uso dos NTCs na

bioengenharia tecidual. Particularidades como resistência mecânica, flexibilidade, elasticidade e baixa densidade favorecem sua aplicação como arcabouço para o crescimento de células. Além disso, os NTCs também podem ser incorporados em outros materiais estruturais, promovendo reforço estrutural ou conferindo novas propriedades como condução elétrica, que podem auxiliar diretamente no crescimento celular (Saito et al., 2009; Veetil e Ye, 2009). Graças a essas propriedades físicas, mecânicas e químicas a utilização dos

NTCs têm se mostrado promissora no campo da engenharia tecidual.

Os NTCs, em seu estado natural são insolúveis em água, assim, para que seja possível sua utilização no campo médico, é necessário que estes passem por um processo chamado funcionalização, no qual grupos químicos funcionais são adicionados a suas camadas externas, possibilitando a solubilização em meios aquosos. Além de tornar possível sua solubilização, a funcionalização também é capaz de melhorar sua biocompatibilidade, reduzindo os efeitos citotóxicos (Bianco et al., 2011). Apesar desses avanços, pouco se sabe a respeito da citotoxicidade dos nanomateriais. Muitos estudos demonstraram que algumas nanopartículas são citotóxicas em sistemas biológicos e que a maioria delas libera espécies reativas de oxigênio causando estresse oxidativo e inflamação (Ai et al., 2011). O risco toxicológico é diretamente influenciado pela distribuição tecidual, acumulação e retenção dos NTCs (Bianco et al., 2011). Além disso, a diversidade de tamanhos, concentrações e tipos de funcionalização dificultam uma conclusão em relação à citotoxicidade desse material e a segurança de sua aplicação em seres vivos (Boczkowski e Lanone, 2007). Por exemplo, o uso dos NTCs como biomaterial na regeneração óssea demonstrou sua capacidade de adesão e integração à matriz óssea, sem interferir no reparo ósseo (Usui et al., 2008). Por outro lado, há relatos de sua influência biológica na proliferação e ciclo celular de fibroblastos e na indução de apoptose de forma dose dependente (Meg et al., 2009).

Os conflitos existentes entre os resultados já encontrados demonstram a necessidade de mais pesquisas que comprovem a segurança do uso dos NTCs em organismos vivos. É imperativo que se determine o impacto da exposição dos NTCs em componentes biológicos em seu nível

celular, tecidual e fisiológico para que então sua eficácia terapêutica possa ser comprovada.

O objetivo com este trabalho foi o de avaliar a resposta do organismo à implantação de NTCs usados como biomateriais na regeneração óssea de fêmures de ratos Wistar, em diferentes tempos, por meio da monitoração hematológica, bioquímica e histológica dos tecidos sanguíneo, hepático e renal.

3.2. Material e método

3.2.1. Infraestrutura e animais

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos Departamentos de Morfologia e de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e do Laboratório de Nanomateriais do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. O protocolo de experimentação desenvolveu-se nas dependências físicas dos Departamentos de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Biotério, Laboratório de Técnica Cirúrgica Veterinária, Laboratório de Patologia Veterinária e Laboratório de Toxicologia, todos na Escola de Veterinária – UFMG. Utilizaram-se 48 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, de três meses de idade com média de peso de 400g, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos no CEPA (Centro Experimental de Pequenos Animais) da EV/UFMG, acondicionados em caixas plásticas com quatro ratos/caixa, sendo submetidos a ciclos de claro-escuro de 12h, em ambiente com temperatura controlada. Os animais foram desverminados com tiabendazol e submetidos a um período de adaptação de 30 dias. Durante todo período experimental, os animais receberam ração comercial para roedores (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo, além de micronutrientes) e água ad libitum.

O projeto foi desenvolvido seguindo os princípios éticos preconizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (projeto aprovado sob protocolo nº 236/2011 (Anexo1).

3.2.2. Protocolos anestésico e cirúrgico

Quinze minutos antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam antibioticoterapia profilática com cefalotina sódica (30mg/kg, SC) e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol (2mg/kg, SC). O isoflurano foi o fármaco de escolha para indução e manutenção anestésica, sendo a primeira realizada em caixa anestésica e a segunda por meio de máscara em sistema semiaberto. Logo após a indução, o animal foi pesado em balança de precisão. Para evitar a hipotermia, foram colocadas bolsas de água quente sob a mesa onde o animal estava posicionado para realização do procedimento cirúrgico.

Após a tricotomia e antissepsia do membro posterior esquerdo foi realizada incisão de pele e do tecido subcutâneo, na face lateral da coxa, abrangendo desde a região da epífise proximal do fêmur, até a distal. Realizou-se a incisão da fáscia lateral, seguida de divulsão das porções cranial e caudal do músculos bíceps femoral e deslocamento cranial do quadríceps lateral no fêmur, expondo-se sua diáfise. Uma placa de neutralização de titânio, fixada por quatro parafusos com espaçamento no meio, com 1,5 mm de espessura, foi posicionada na porção dorso-lateral do fêmur para prevenir a fratura deste após a realização do defeito. Após a colocação da placa foi realizado defeito ósseo com 2mm de diâmetro na diáfise média do fêmur, se estendendo da cortical lateral até a cortical medial (Fig.1), produzidos por um broca de aço montada em uma microrretífica. A fim de se evitar o aquecimento dos tecidos, tal procedimento foi realizado em constante

irrigação com solução salina 0,9%. O defeito foi preenchido de acordo com o tratamento estabelecido em cada grupo experimental: carbopol 2%, colágeno, carbopol associado a NTCs e colágeno associado a NTCs. Em seguida, os músculos foram aproximados empregando-se padrão de sutura simples contínuo com fio absorvível de poligrecapone número 000 e a pele suturada com padrão contínuo intradérmico, sendo utilizado o mesmo fio.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas até completa recuperação anestésica, mantendo-se a temperatura ambiente em 37°C. O controle da dor foi realizado com cloridrato de tramadol (2mg/kg, SC), administrado a cada 8h, via oral, durante três dias consecutivos.

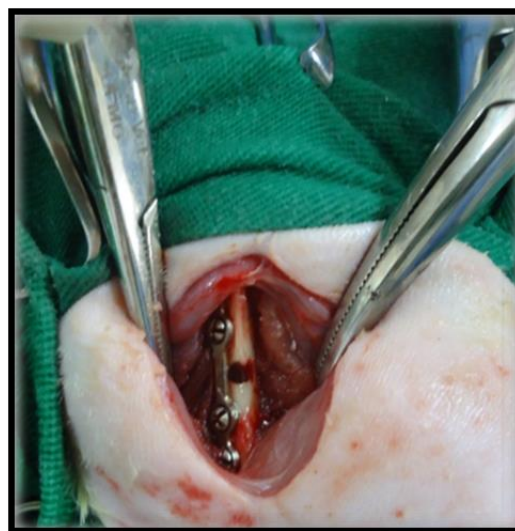


Fig. 1: Foto do procedimento cirúrgico realizado no fêmur esquerdo de ratos Wistar. Observa-se o defeito de 2mm de diâmetro na diáfise média, perfurando a cortical lateral e medial. A placa de titânio encontra-se na face dorsal do osso.

3.2.3. Grupos experimentais

Os animais foram alocados de forma aleatória, em quatro grupos conforme o material usado para preenchimento do defeito, cada um com 12 animais, sendo

seis avaliados 15 dias após a realização do defeito (T1) e os outros seis, 45 dias depois (T2).

- Grupo Carbopol (CP): carbopol (gel inerte).
- Grupo Colágeno (CL): gel de colágeno
- Grupo Nanotubo de carbono (NT): NTC multiwall na concentração de 8% em carbopol.
- Grupo Nanotubo + colágeno (NTCL): NTC multiwall na concentração de 8% em colágeno

3.2.4. Síntese do composto gel de colágeno + NTC multiwall

O colágeno foi cedido pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Desenvolvimento do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A obtenção do colágeno tipo I foi realizada a partir de caudas de ratos coletadas assepticamente, lavadas três vezes em água e três vezes em álcool 70% e em seguida armazenadas em freezer -70°C, conforme descrito por Kitten et al., (1996). Para extração do colágeno as caudas foram submersas em ácido acético na concentração 0.5 mol/L durante 48h a temperatura de 4°C. A solução resultante foi filtrada em várias camadas e gaze para remoção de pequenos vasos e debris teciduais. O filtrado resultante foi centrifugado (14,000g) durante uma hora. O sobrenadante foi coletado e dializado por meio de trocas de ácido acético (0,02 mol/L), mantidos em geladeira a 4°C durante um período de três dias. A concentração final da solução de colágeno usada no presente estudo foi de 5,6 mg/mL contendo mais de 98% de colágeno Tipo I. Após a adição dos meios para ajuste do pH (~pH 7,4), as moléculas de colágeno solubilizadas nessa solução se associam formando fibrilas que subsequentemente formarão um gel tridimensional estável.

Nanotubos de carbono de múltiplas paredes crescidos por CVD (deposição de vapor químico) usando como fonte precursora de carbono o gás etileno C₂H₄ e gás de arraste Ar (argônio) e como suporte de crescimento óxido de magnésio dopado com Fe e Co na proporção 5% Fe 5%Co em peso. A temperatura de crescimento foi de 750° C e o tempo de 30 minutos. Após a produção os NTCs passaram por um processo de purificação no qual foram submetidos a um tratamento térmico a 390° C durante 30 minutos sob atmosfera ambiente de modo a queimar resíduos de carbono amorfo. Em seguida um tratamento com HCl/H₂O 50/50 durante 24 h, de modo a eliminar o óxido de magnésio, assim como as partículas de óxido de ferro e cobalto presentes no material. Em seguida realizou-se ultrafiltração e lavagem com água deionizada usando filtro Millipore de 4 micra com várias passagens de água para ajuste do pH (~7). Para tornar os NTCs hidrofílicos e possibilitar sua interação com sistemas biológicos eles foram adicionados a uma mistura de H₂SO₄/HNO₃ 1:3 sob ação de radiação de micro-ondas. Na sequência os NTCs foram submetidos a sucessivas lavagens com água deionizada para retirada do ácido e em seguida centrifugados. Por se tratar de um material em pó, os NTCs precisaram de um veículo para tornar possível sua implantação no defeito realizado no fêmur. Os veículos usados neste trabalho foram o carbopol 2% e o gel de colágeno. Inicialmente, os MWNTC foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C, para logo após, serem diluídos em água ultra pura na concentração de 800µg/mL. A concentração de NTCs foi determinada segundo recomendações de MacDonald et al., (2008). A diluição foi realizada inicialmente em banho de ultrassom durante 30 minutos. Em seguida, a solução foi diluída em sonificador de ponta, em ciclos de 30 segundos e intervalos de 10 segundos imerso em gelo, repetidos cinco vezes.

Após diluição em água, os NTCs foram misturados ao colágeno e/ou carbopol, conforme a determinação descrita a seguir:

- Para 1mL da solução de NT = 0,1ml de solução de MWCNT + 0,65ml de água destilada + 0,25 ml de carbopol 2%.
- Para 1mL da solução de NTCL = 0,1ml de solução de MWCNT + 0,41ml de água + 0,36ml de colágeno + 0,1ml de meio + 0,015 ml de NaOH o que resultou em uma solução final de colágeno na concentração de 2mg/ml.

3.2.5. Coleta de sangue

Com o intuito de verificar possíveis efeitos tóxicos dos NTCs, amostras de sangue venoso foram obtidas imediatamente após a anestesia dos animais para realização do procedimento cirúrgico (T0), e ao final do experimento, após 15 dias no tempo T1 e 45 dias no tempo T2. A primeira coleta foi realizada por meio de punção da veia lateral da cauda, após vasodilatação com animal em caixa com luz amarela durante cinco minutos, utilizando-se cateter intravenoso BD nº 24. Para a segunda coleta (T1 e T2) realizou-se punção intracardíaca com agulha hipodérmica 0,80 x 25 mm e seringa descartável de 10ml, para obtenção de um maior volume de sangue. Imediatamente após a coleta, as amostras foram transferidas para tubos Eppendorf com e sem anticoagulante (EDTA). As amostras de sangue com EDTA foram centrifugadas e o plasma obtido congelado em freezer -20°C até o dia da realização das análises bioquímicas.

3.2.6. Análises laboratoriais

As avaliações hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Escola de Veterinária da UFMG. A avaliação hematológica foi determinada em contador eletrônico. O volume globular foi avaliado utilizando

centrífuga para técnica do microhematócrito e quantificação em tabela padrão, e a dosagem de proteínas totais foi estimada por refratômetro analógico portátil (MASTER- α). O perfil bioquímico foi realizado para avaliar a função hepática e foram dosadas fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gamaglutamil transferase (GGT) e para função renal, as concentrações de ureia e creatinina. Além disso, também foram realizadas dosagens de cálcio e fósforo sérico utilizando-se aparelho analisador automático bioquímico, seguindo protocolo de kits comerciais de diagnósticos.

3.2.7. Coleta de amostras

Os animais, respeitando-se os tempos estipulados para as análises T1 (15 dias) e T2 (45 dias), foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg) por via intraperitoneal. Imediatamente após, realizou-se necropsia, sendo colhidas amostras de fígado e rins, as quais foram imediatamente fixadas em formalina a 10%, neutra e tamponada para análises histopatológicas.

3.2.8. Processamento e análise histopatológica

As amostras de fígado e rins foram processadas segundo técnicas rotineiras de inclusão em parafina e posteriormente seccionadas em cortes de 5 μ m e coradas com Hematoxilina e Eosina. Esses cortes foram avaliados em microscópio de luz a fim de se descrever possíveis lesões histopatológicas.

3.2.9. Delineamento experimental e análise à estatística

Utilizou-se delineamento do tipo parcela subdividida, onde os tratamentos foram as parcelas e os tempos as subparcelas. Para

comparação entre grupos em cada tempo utilizou-se análise de variância inteiramente casualizada seguida do teste de Student Neumann Keuls para comparação entre médias utilizou-se de teste t de Student pareado. Para todos os testes considerou-se nível de significância $p < 0,05$.

3.3. Resultados e discussão

Todos os animais apresentaram boa recuperação anestésica e não houve complicações em relação ao procedimento cirúrgico ou ao tratamento recebido. Nenhum animal apresentou sinais clínicos de toxemia ou alterações comportamentais. Durante o período pós-operatório os animais ganharam peso, sem que houvesse diferença entre grupos (Fig. 2).

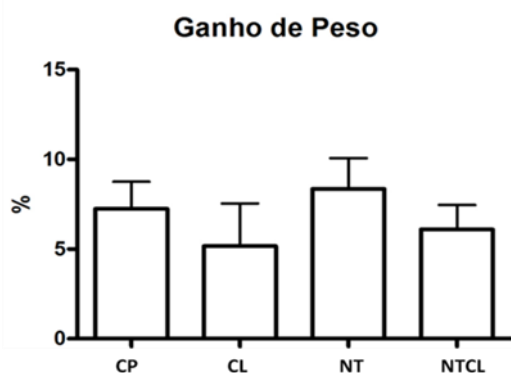


Fig. 2: Médias e desvio padrão referentes à porcentagem de ganho de peso em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito.

3.3.1. Análises hematológicas

Os resultados do hemograma em T0 e T1 (Tab. 1) não mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos. O mesmo ocorreu na comparação de tempos entre cada grupo, exceto para os valores de hemoglobina, leucócitos e proteína total (Fig. 3), que

apresentaram uma diminuição ($p < 0,05$) em seus valores. Esse achado pode ser justificado pela variação no método de coleta do sangue em T0 e T1. Segundo Campbell (2012) a coleta de sangue por meio da cardiopunção resulta em diminuição da contagem de eritrócitos e leucócitos, na concentração de hemoglobina e hematócrito quando comparada a amostras obtidas pela venopunção da cauda. Além disso, coletas de sangue com volume superior a 7,5% do volume total de sangue possuem efeitos biológicos para o organismo. O grau e o tempo de recuperação dependem da quantidade de sangue colhido. O volume sanguíneo pode ser reestabelecido em 48h, entretanto, pode levar mais de duas semanas para que todos os constituintes sanguíneos voltem ao normal. No presente estudo, a média de peso dos animais foi de 386g e o volume de sangue colhido para as análises hematológicas e bioquímicas foi de 3ml, superando os 7,5% mencionados anteriormente. Em animais saudáveis, volumes superiores a 20% do volume total de sangue são colhidos sem que haja prejuízo à saúde do animal. Somente uma diminuição maior que 10% nos parâmetros eritrocitários possuem significância clínica. Como a diminuição desses parâmetros ocorreu em diferentes grupos, foi descartada qualquer associação desses achados com a presença dos NTCs. Apesar dessa diminuição ser significativa, os valores encontrados estão de acordo os valores de referência citados para a espécie, segundo dados de Giknis e Clifford (2008).

No leucograma (Tab. 2), a comparação entre os grupos no momento T0, apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de eosinófilos para o grupo CP (Fig. 4). Na comparação entre os tempos, houve diminuição significativa nos valores de eosinófilos no grupo CP, linfócitos em todos os grupos, exceto NT e neutrófilos nos grupos NT e NTCL (Fig. 5). A concentração de leucócitos em roedores

Tab.1: Parâmetros hematológicos apresentados como média \pm desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

Avaliação Hematológica T1						
		CP	CL	NT	NTCL	REF1*
Hemácias ($\times 10^6$ células/μL)	T0	6,0 \pm 0,9	6,0 \pm 0,9	5,7 \pm 0,5	6,1 \pm 1,2	7,6-9,9
	T1	6,0 \pm 0,8	5,9 \pm 1,7	6,5 \pm 1,5	6,2 \pm 1,0	
Hematócrito (%)	T0	35,3 \pm 1,8	36 \pm 3,2	35,3 \pm 3,4	35,9 \pm 3,0	38,5-52
	T1	34,2 \pm 2,4	31,9 \pm 7,3	37,8 \pm 3,4	36,3 \pm 1,7	
Hemoglobina (g/dL)	T0	13,3 \pm 0,5	13,2 \pm 1,0	13,5 \pm 0,8	13,6 \pm 1,0	13,6-17,4
	T1	12,2 \pm 0,5	11,7 \pm 2,1	12,5 \pm 1,3	12,5 \pm 0,3	
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu$L)	T0	8,1 \pm 1,0	6,5 \pm 1,8	7,4 \pm 1,9	6,9 \pm 1,5	1,9 -11,1
	T1	3,6 \pm 1,1	4,0 \pm 1,7	4,9 \pm 1,7	4,2 \pm 0,9	
Proteína Total (g/dL)	T0	7,7 \pm 0,2	7,6 \pm 0,2	7,7 \pm 0,2	7,8 \pm 0,2	5,6-7,6
	T1	7,3 \pm 0,3	7,2 \pm 0,2	7,5 \pm 0,1	7,4 \pm 0,2	

*Giknis e Clifford, 2008

pode ser influenciada por vários fatores como método de coleta, estresse, ciclo circadiano e idade (Thrall, 2006). Como os valores encontrados permaneceram dentro dos parâmetros de normalidade, acredita-se que as alterações possam ter sido influenciadas por fatores externos como estresse no momento da coleta. Não houve relação entre as alterações encontradas com a presença dos NTCs, exceto para os valores de neutrófilos, que diminuíram em T1 apenas nos animais que foram tratados com NTCs. Não foram encontrados resultados semelhantes a esse na literatura, ao contrário, a presença dos NTCs induziram um aumento no número de neutrófilos (Shvedova et al., 2008). Uma das causas apontadas para diminuição na contagem de neutrófilos é seu intenso consumo durante a resposta inflamatória, entretanto, não houve evidência de processo inflamatório em nenhum dos animais tratados com NTCs (Weiser, 2012). Apesar

dessa diferença encontrada nos grupos NT e NTCL, os valores permaneceram dentro dos parâmetros de normalidade da espécie e por isso não foram considerados clinicamente relevantes.

3.3.2. Análises bioquímicas T1

A análise do perfil renal e hepático dos animais em T1 (AST, ALT, GGT, ALP, creatinina e fósforo), não apresentou alterações na comparação entre os grupos e entre tempos (Tab. 3), exceto para os valores de ureia (Fig. 6), que aumentaram ($p < 0,05$) ao final, nos grupos CP e NTCL, não demonstrando qualquer relação com a presença de NTCs. Os resultados da bioquímica sérica, assim como no hemograma, podem variar com a idade, estado nutricional, condições ambientais (fotoperíodo, temperatura, estresse) e sexo (Campbell, 2012).

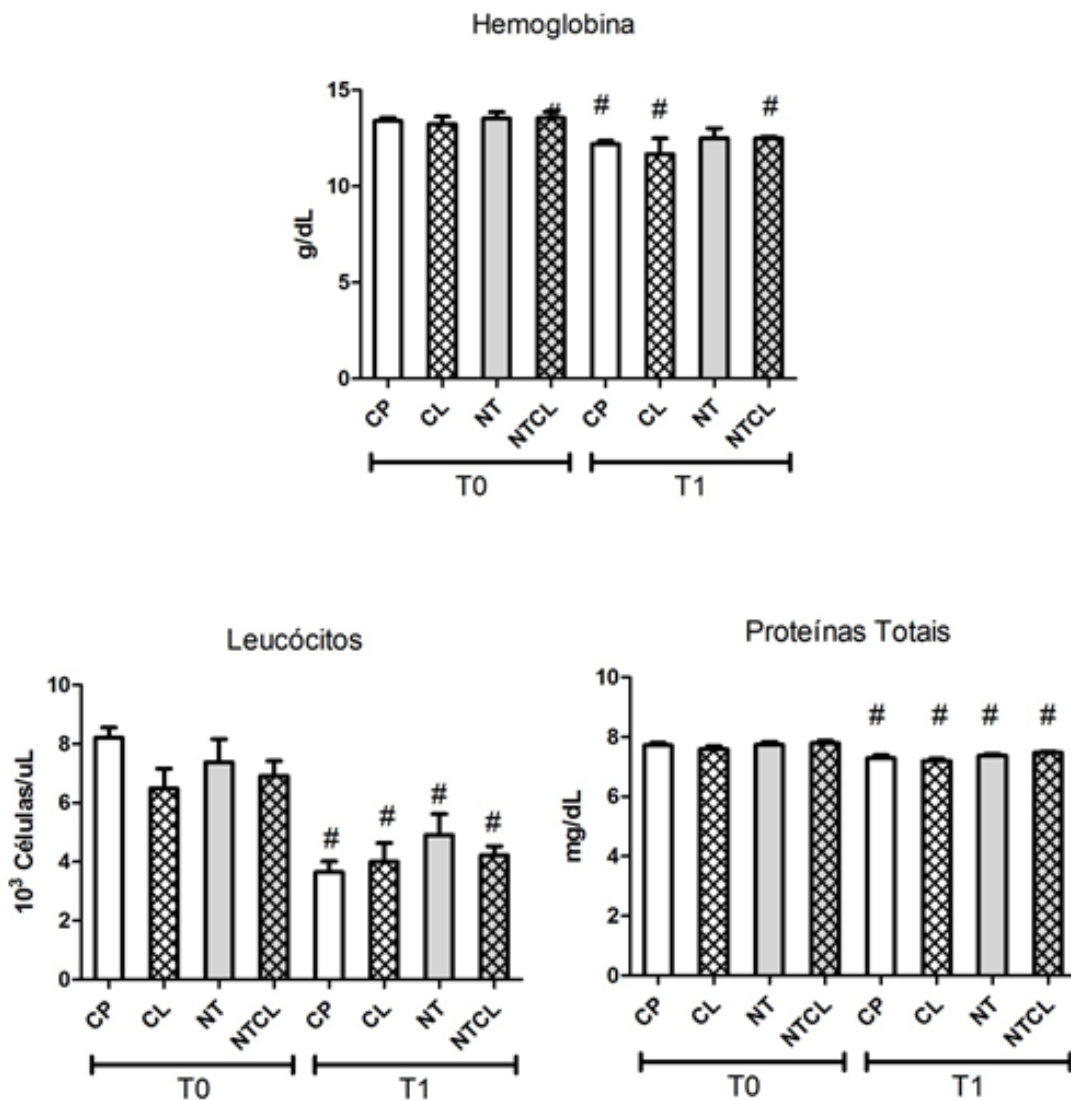


Fig. 3: Gráficos das médias e erros-padrão dos valores hematológicos de hemoglobinas, leucócitos, proteínas totais e hematócrito de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico e 15 dias após a realização do defeito (# Dentro do mesmo grupo, difere de T0, $p < 0,05$).

A função renal é monitorada por meio avaliação dos níveis séricos de creatinina e ureia, sendo o primeiro um indicador mais fidedigno por sofrer menor influências de fatores extra renais (Magro e Vattino, 2007). As concentrações séricas de ureia aumentam com dietas ricas em proteínas,

devido ao aumento no metabolismo de nitrogênio, ao invés de doenças renais. Além disso, o aumento nas concentrações plasmáticas de ureia e creatinina só ocorrem quando mais de 75% das funções renais estão comprometidas (Campbell, 2012). Apesar dos valores de ureia e fosfatase

Alcalina (ALP) encontrados tanto em T0 como em T1 diferirem dos citados por Trall et al. (2008), estão próximos aos relatados

por Oliveira (2012) para ureia e Olfert et al. (1993) para ALP.

Tab.2: Diferencial do leucograma apresentado como média \pm desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

Diferencial Leucograma T1						
		CP	CL	NT	NTCL	REF1*
Leucócitos Totais ($\times 10^3$ células/μL)	T0	8,1 \pm 1,0	6,5 \pm 1,8	7,4 \pm 1,9	6,9 \pm 1,5	1,98 - 11,1
	T1	3,6 \pm 1,1	4,0 \pm 1,7	4,9 \pm 1,7	4,2 \pm 0,9	
Neutrófilos ($\times 10^3$ células/μL)	T0	1,57 \pm 0,79	1,75 \pm 0,80	2,52 \pm 1,00	1,67 \pm 0,65	0,33 - 1,89
	T1	0,97 \pm 0,43	1,06 \pm 0,68	1,39 \pm 0,60	1,09 \pm 0,29	
Linfócitos ($\times 10^3$ células/μL)	T0	5,88 \pm 1,36	4,59 \pm 1,19	4,70 \pm 1,82	4,99 \pm 0,96	1,19 - 9,45
	T1	2,50 \pm 0,85	2,80 \pm 1,21	3,22 \pm 1,17	2,85 \pm 0,88	
Monócitos ($\times 10^3$ células/μL)	T0	0,14 \pm 0,09	0,11 \pm 0,13	0,14 \pm 0,13	0,16 \pm 0,19	0,03 - 0,27
	T1	0,14 \pm 0,11	0,10 \pm 0,08	0,25 \pm 0,10	0,20 \pm 0,18	
Eosinófilos ($\times 10^3$ células/μL)	T0	0,17 \pm 0,12	0,03 \pm 0,04	0,02 \pm 0,04	0,07 \pm 0,08	0,01 - 0,19
	T1	0,04 \pm 0,02	0,04 \pm 0,04	0,06 \pm 0,09	0,07 \pm 0,08	

*Giknis e Clifford, 2008

Não houve diferença na comparação entre grupos e entre tempos nos níveis séricos de creatinina, entretanto, observou-se que no grupo NTCL este valor superou os limites de normalidade da espécie. Sendo assim, se faz necessário uma avaliação histológica para que se possa concluir a verdadeira importância das alterações nos níveis séricos de ureia e para verificar se os tratamentos utilizados tiveram ou não influencia nestes resultados.

Na comparação entre tempos, houve aumento ($p < 0,05$) nos níveis séricos de cálcio nos grupos NT e NTCL (Fig. 6). Apesar desse aumento, os valores encontrados permaneceram dentro dos parâmetros de normalidade. Estudos in vitro revelam que os NTCs de parede múltiplas, graças ao seu potencial negativo, são capazes de atrair íons de cálcio, promovendo aumento de sua concentração em meios de cultura (Shimizu et al., 2012).

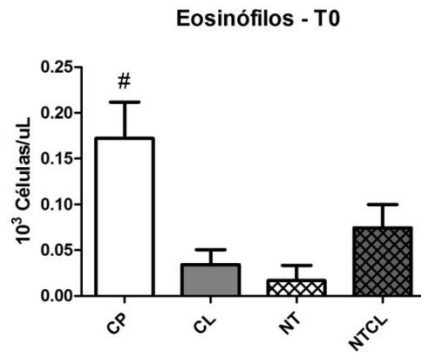


Fig. 4: Gráfico das médias e erros-padrão dos valores hematológicos de eosinófilos de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) (# $p < 0,05$).

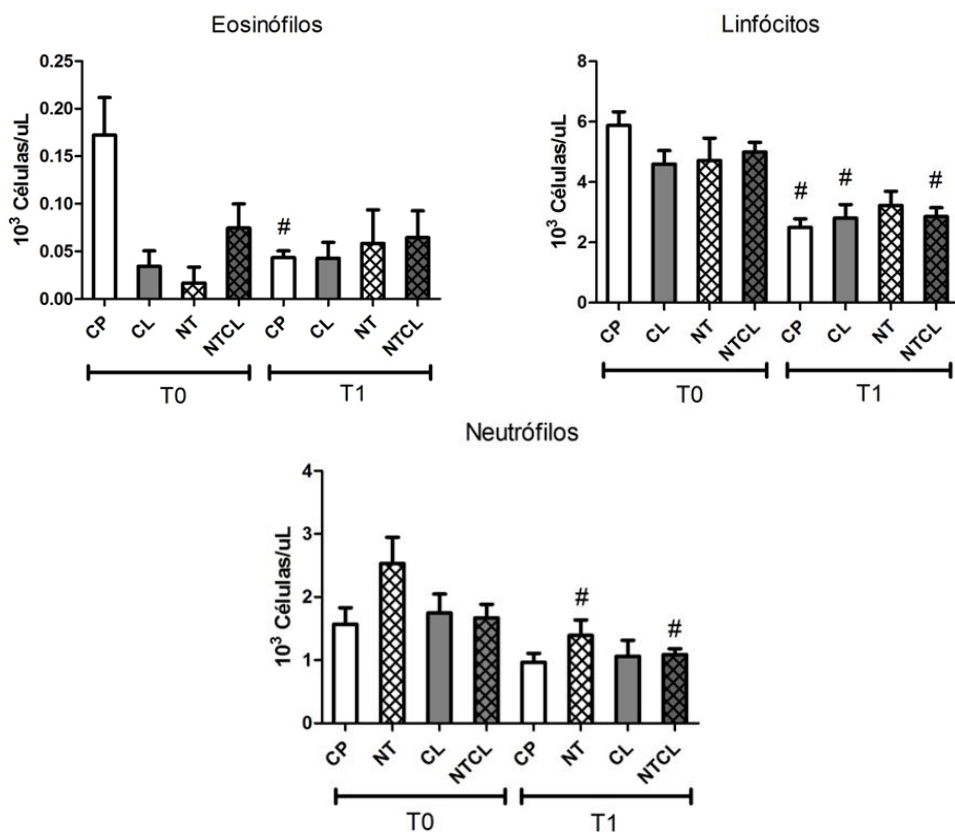


Fig. 5: Gráficos das médias e erros-padrão dos valores hematológicos de eosinófilos, linfócitos e neutrófilos de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico e 15 dias após a realização do defeito (# Dentro do mesmo grupo, difere de T0, $p < 0,05$).

Embora os níveis séricos avaliados neste estudo tenham aumentado somente nos grupos tratados com NTCs, não há evidências suficientes para afirmar que este aumento foi desencadeado pelos NTCs. Assim como os demais parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados, as concentrações dos hormônios responsáveis pela regulação dos níveis plasmáticos de cálcio (paratormônio, calcitonina e 1,25

dihidroxitamina D³) podem ser influenciadas pelo fotoperíodo e estresse. Além disso, pequenas variações (5 – 10%) na concentração dos níveis séricos de cálcio podem estimular ou inibir a secreção do paratormônio (Campbell, 2012). Sendo assim, são necessários maiores estudos para afirmar que o uso de implantes ósseos com NTCs pode causar aumento dos níveis séricos de cálcio.

Tab.3: Avaliação bioquímica hepática apresentada como média ± desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

Avaliação Bioquímica T1 – Perfil Hepático						
		CP	CL	NT	NTCL	REF1*
AST	T0	76,6 ± 5,9	85,5 ± 21,1	80,3 ± 15,5	76,0 ± 24,9	54 - 192
	(U/L) T1	70,8 ± 19,2	60,4 ± 24,7	97,2 ± 91,4	72,7 ± 13,7	
ALT	T0	41,7 ± 12,3	40,7 ± 18,8	59,9 ± 14,8	55,0 ± 17,4	52 – 144
	(U/L) T1	47,8 ± 11,6	49,6 ± 29,7	37,1 ± 6,9	53,9 ± 12,9	
GGT (mg/dl)	T0	3,2 ± 1,6	4,5 ± 3,3	3,3 ± 0,9	2,9 ± 2,3	-
	T1	2,6 ± 1,9	7,1 ± 7,1	1,6 ± 1,2	4,4 ± 8,7	
ALP	T0	297,2 ± 91,2	244,4 ± 20,3	197,6 ± 61,5	270,6 ± 06,5	40 – 191
	(U/L) T1	274,1 ± 112,9	177,0 ± 73,8	240,2 ± 57,1	248,5 ± 06,0	

* Thrall et al., 2012

3.3.3. Análises bioquímicas (T2)

Nos resultados das análises bioquímicas, observou-se que as enzimas hepáticas AST, ALT e GGT estiveram dentro do limite de normalidade estabelecido para a espécie nos

tempos T0 e T2. Já a ALP apresentou valores acima dos citados como referência no grupo CL em T0 e nos grupo NT em T2 (Tab.5). A análise estatística mostrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre grupos.

Tab.4: Avaliação bioquímica dos valores de ureia, creatina, cálcio e fósforo apresentados como médias ± desvio padrões de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 15 dias após a realização do defeito (T1).

Avaliação Bioquímica T1						
		CP	CL	NT	NTCL	REF1*
Ureia (mg/dl)	T0	41,9 ± 6,4	40,6 ± 5,8	36,7 ± 4,0	40,0 ± 6,0	16 – 19
	T1	49,8 ± 5,8	42,9 ± 7,2	47,2 ± 12,9	60,7 ± 23,6	
Creatinina (mg/dl)	T0	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,5 – 1,4
	T1	1,0 ± 0,7	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,6 ± 2,2	
Cálcio (mg/dl)	T0	9,4 ± 2,8	7,1 ± 1,4	7,4 ± 2,0	5,9 ± 1,7	7,6 – 12,6
	T1	11,0 ± 1,5	8,6 ± 4,0	10,3 ± 1,2	8,3 ± 1,8	
Fósforo (mg/dl)	T0	8,3 ± 1,2	8,2 ± 1,0	7,3 ± 1,0	7,5 ± 0,7	5 - 13
	T1	7,7 ± 1,2	8,6 ± 1,8	8,2 ± 1,7	7,6 ± 0,8	

* Thrall et al., 2012

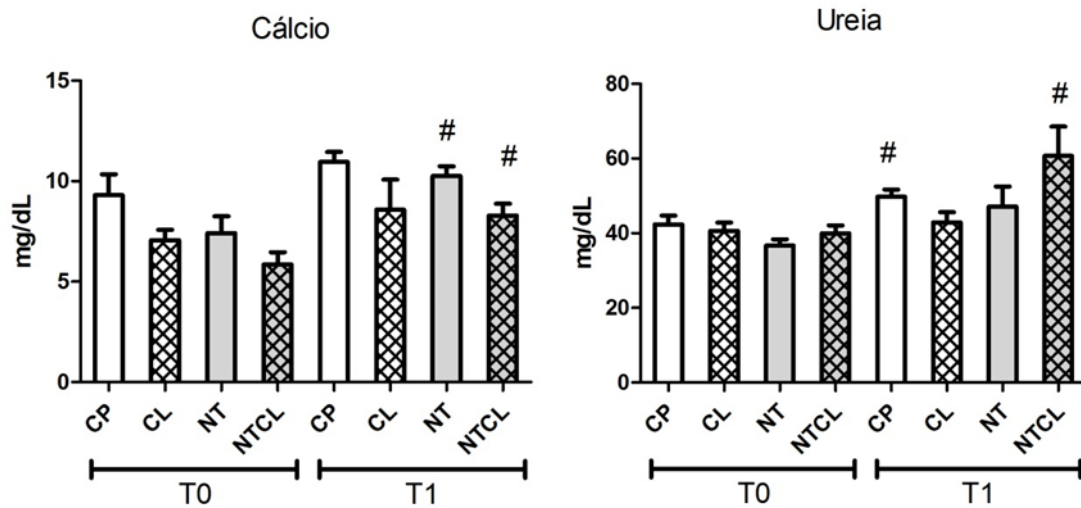


Fig. 6: Gráficos das médias e desvio padrões dos valores séricos de ureia e cálcio de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico e 15 dias após a realização do defeito (*) (# p<0,05).

Tab. 5: Avaliação bioquímica hepática apresentada como média \pm desvio padrão de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2).

Avaliação bioquímica T2 – Perfil hepático						
		CP	CL	NT	NTCL	REF1*
AST (U/L)	T0	81,03 \pm 16,39	83,71 \pm 17,67	99,96 \pm 33,95	86,37 \pm 32,53	54 - 192
	T2	55,93 \pm 3,98	70,44 \pm 21,69	56,71 \pm 8,26	56,68 \pm 7,18	
ALT (U/L)	T0	41,98 \pm 4,61	38,55 \pm 8,71	37,18 \pm 2,78	34,94 \pm 2,72	52 - 144
	T2	51,11 \pm 9,35	63,95 \pm 18,63	50,19 \pm 6,53	56,98 \pm 16,58	
GGT (mg/dl)	T0	4,06 \pm 2,13	3,64 \pm 2,77	3,39 \pm 1,51	4,27 \pm 3,32	
	T2	5,81 \pm 2,56	5,12 \pm 2,39	5,51 \pm 2,58	5,73 \pm 2,89	
ALP (U/L)	T0	140,61 \pm 38,87	273,21 \pm 24,23	184,77 \pm 48,70	123,61 \pm 45,01	40 - 191
	T2	170,75 \pm 60,63	172,36 \pm 34,04	194,92 \pm 41,54	123,33 \pm 45,41	

* Thrall et al., 2012

Em T0, o grupo CL apresentou valores significativamente maiores ($p < 0,05$) que os grupos NTCL e CP. Entretanto, não houve diferença entre grupos no momento T2 (Fig.7). Na comparação entre tempos observou-se uma diminuição ($p < 0,05$) de AST nos grupos NT, e CP e um aumento ($p < 0,05$) de ALT nos grupos NT, NTCL e CL (Fig. 8).

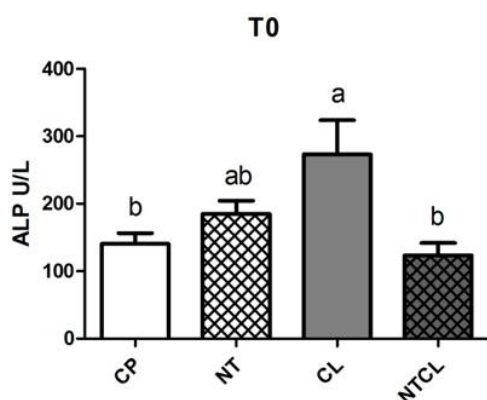


Fig. 7: Gráfico das médias e erros-padrão dos valores séricos de fosfatase alcalina (ALP) de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no

fêmur, tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a Colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). Letras diferentes indicam diferença ($p < 0,05$). Na comparação entre grupos ($a \neq b$ e $ab = a$ e b).

Apesar da enzima ALT ser mais específica que a AST na avaliação de lesões hepáticas, nos roedores, essa enzima também possui atividade no intestino, rins, coração, músculos esqueléticos e cérebro. Alterações como dano muscular severo podem levar o aumento sérico desta enzima (Campbell, 2012), que poderia ser justificado pela lesão cirúrgica. Entretanto, nesse estudo não foram realizadas avaliações que pudessem confirmar o aumento da ALT devido a lesão muscular, como por exemplo a mensuração dos níveis séricos de creatina quinase (CK).

Os níveis de ALT nos grupos CL, NT e NTCL em T2, não ultrapassaram os valores de normalidade para a espécie. Há relatos

na literatura de valores semelhantes aos encontrados nessa avaliação (Olfert et al., 1993), porém, o aumento significativo em T2 sugere uma maior atividade dos microsomas hepáticos, responsáveis pela metabolização de diversas substâncias no

organismo (Oshima-Franco e Franco, 2003). Não houve relação entre o aumento das enzimas hepáticas com a presença dos NTCs, já que o grupo CL, que não recebeu NTCs, também apresentou aumento da ALT.

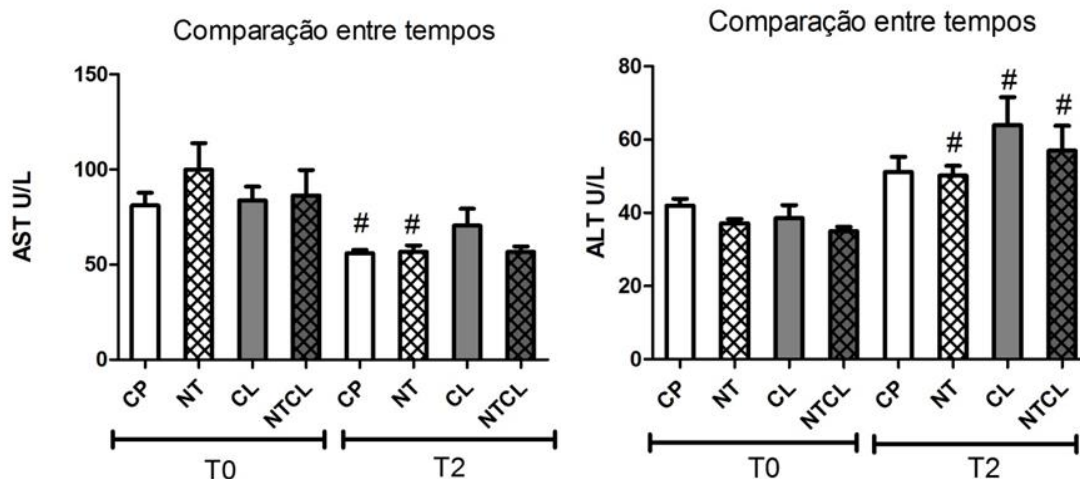


Fig. 8: Gráficos das médias e erros-padrão dos valores séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur, tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). # indicam diferença entre os tempos ($p < 0,05$).

Na avaliação do perfil renal observa-se que os valores de creatinina estiveram dentro dos valores de referência citados, enquanto os de ureia apresentaram aumento em relação a estes (Tab. 6). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) desses valores na comparação entre os grupos em T0 e T2, entretanto, na comparação entre tempos houve aumento dos níveis séricos de ureia em todos os grupos, exceto em NT e nos níveis de creatinina nos grupos NTCL e NT (Fig. 9). Apesar dos valores de ureia estarem acima dos valores relatados por Thrall et al. (2012) estão próximos aos encontrados por Oliveira (2012). Vários fatores podem causar o aumento dos níveis séricos de ureia no organismo e esses podem ser classificados em pré-renais,

renais ou pós-renais. Entre as causas pré-renais destacam-se: hipovolemia, hemorragias, aumento do catabolismo proteico e níveis aumentados de cortisol (Tripathi et al., 2011). Nos resultados observa-se que o aumento de ureia ocorreu independente da presença dos NTCs, o que pode sugerir influência do aumento dos níveis de cortisol desencadeado pelo transporte, contenção e coleta do sangue.

Apesar dos níveis de creatina permanecerem dentro dos valores de referência em T2, houve diferença na comparação entre tempos apenas nos grupos tratados com NTCs. Não há relatos na literatura que correlacione a presença de

NTCs ao aumento dos níveis sérios de ureia e creatina.

O cálcio sérico manteve-se dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie em T0 e T2. Na comparação entre grupos não foram observadas diferenças relevantes, entretanto, na comparação entre tempos houve diferença nos grupos CP, NT e CL (Fig. 10). As concentrações plasmáticas de calcitonina em ratos são extremamente variáveis com a idade, ciclos de claro e escuro e esforço (Campbell, 2012). Apesar

de in vitro culturas de osteoblastos apresentarem aumento das concentrações de cálcio na presença de NTCs (Shimizu et al., 2012), tal mudança não pôde ser observada nas concentrações séricas de cálcio. O aumento deste na comparação entre os tempos ocorreu em diferentes grupos independente da presença dos NTCs. Também não foi possível estabelecer uma correlação do aumento de cálcio com os grupos tratados com carbopol ou colágeno, por isso, acredita-se que esse aumento não foi influenciado pelos tratamentos usados.

Tab. 6: Avaliação bioquímica da ureia, creatinina e cálcio apresentados como médias \pm desvio padrões de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur e tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2).

Avaliação Bioquímica T2						
		CP	CL	NT	NTCL	REF1*
Ureia (mg/dl)	T0	38,40 \pm 6,45	38,61 \pm 6,36	38,61 \pm 6,36	34,61 \pm 4,21	16-19
	T2	48,11 \pm 7,11	49,31 \pm 10,32	50,47 \pm 15,09	43,02 \pm 3,14	
Creatinina (mg/dl)	T0	0,57 \pm 0,16	1,07 \pm 1,19	0,49 \pm 0,06	0,47 \pm 0,10	0,5-1,4
	T2	0,85 \pm 0,48	1,20 \pm 0,32	1,07 \pm 0,23	1,06 \pm 0,34	
Cálcio (mg/dl)	T0	9,21 \pm 1,34	8,86 \pm 1,15	8,48 \pm 1,24	10,11 \pm 1,25	7,6-12,6
	T2	11,77 \pm 0,94	10,80 \pm 0,58	11,37 \pm 1,91	11,41 \pm 1,67	

* Thrall et al., 2012

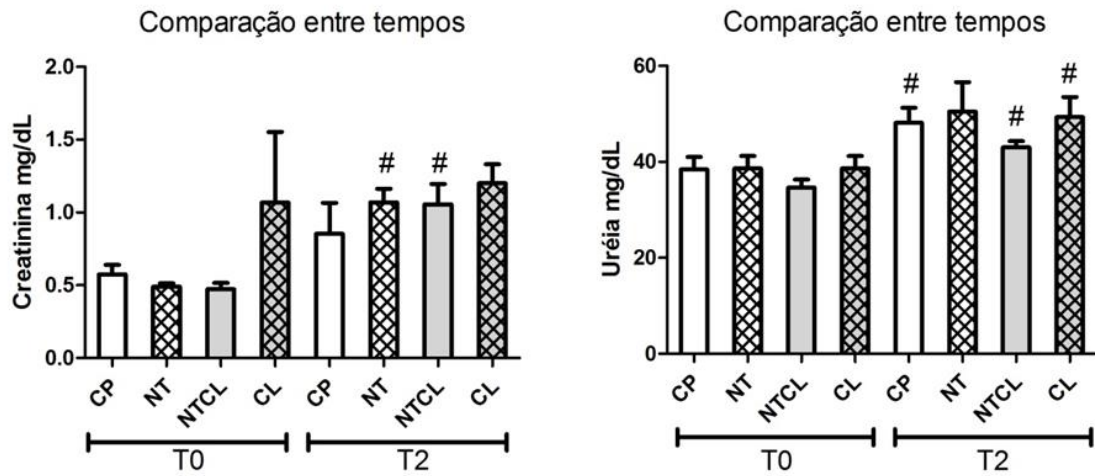


Fig. 9: Gráficos das médias e erros-padrão dos valores séricos de ureia e creatinina de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). # indicam diferença entre os tempos ($p < 0,05$).

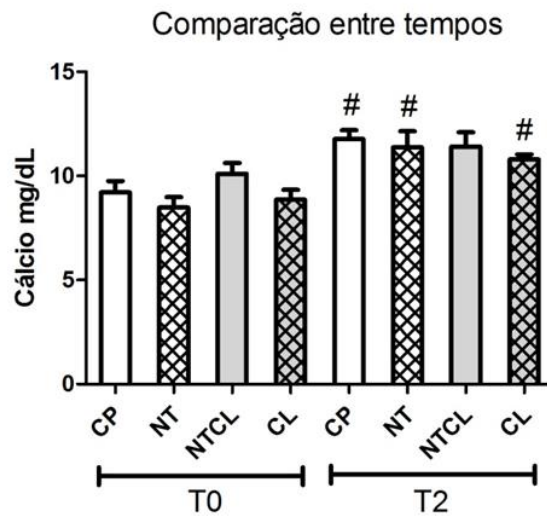


Fig. 10: Gráfico das médias e erros-padrão dos valores séricos de cálcio de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur, tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) imediatamente antes do procedimento cirúrgico (T0) e 45 dias após a realização do defeito (T2). # indicam diferença entre os tempos ($p < 0,05$).

3.3.4. Avaliação histopatológica

Na avaliação histológica dos órgãos, fígado e rins, não foram observados sinais de inflamação, presença de NTCs, ou outras

alterações relevantes em relação à citotoxicidade do material implantado nos grupos tratados durante os tempos T1 (Fig. 11 e 12) e T2 (Fig.13 e 14)

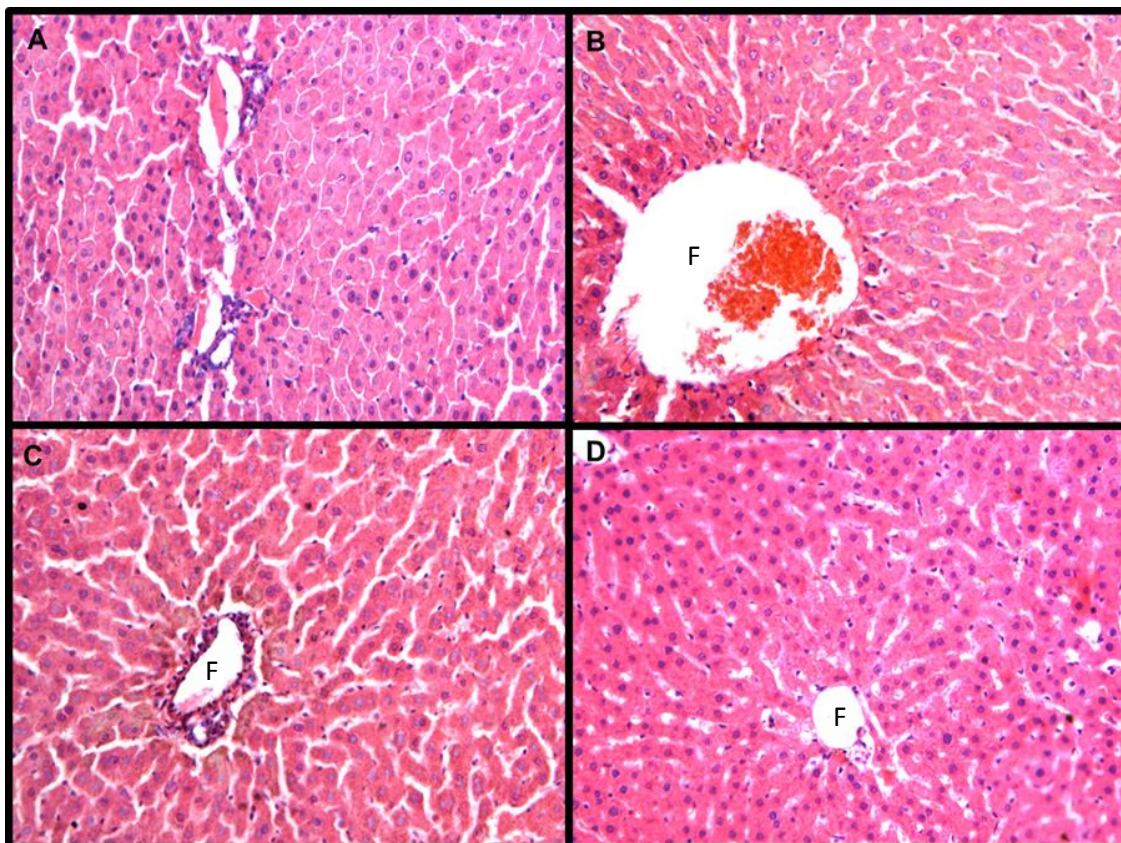


Fig. 11: Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do fígado de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos hepatócitos em torno de uma vênula central (F) nos grupos (A) carbopol (CP), (B) grupo colágeno (CL), (C) carbopol associados a nanotubos de carbono (NT) e (D) nanotubos de carbono associados colágeno (NTCL).

Há duas situações em que os NTCs podem apresentar alterações citotóxicas: a primeira seria um exposição acidental, por meio da inalação de aerossóis durante a produção dos NTCs e a segunda como resultado de uso nas áreas biomédicas (Boczkowski e Lanone, 2007). Os estudos que relatam respostas citotóxicas mais graves estão, na maior parte dos casos, relacionados a primeira forma de exposição, onde os NTCs

são inalados em sua forma natural ou seja sem que tenham sido submetidos a processo de funcionalização ou mesmo purificação (Lam et al., 2004; Shvedova et al., 2005; Mangum et al., 2006). Resultados demonstram que a inalação de NTCs de parede simples não purificados é capaz de induzir resposta inflamatória e estresse oxidativo, culminando no desenvolvimento

de pneumonia granulomatosa multifocal e

fibrose intersticial (Shvedova et al., 2008).

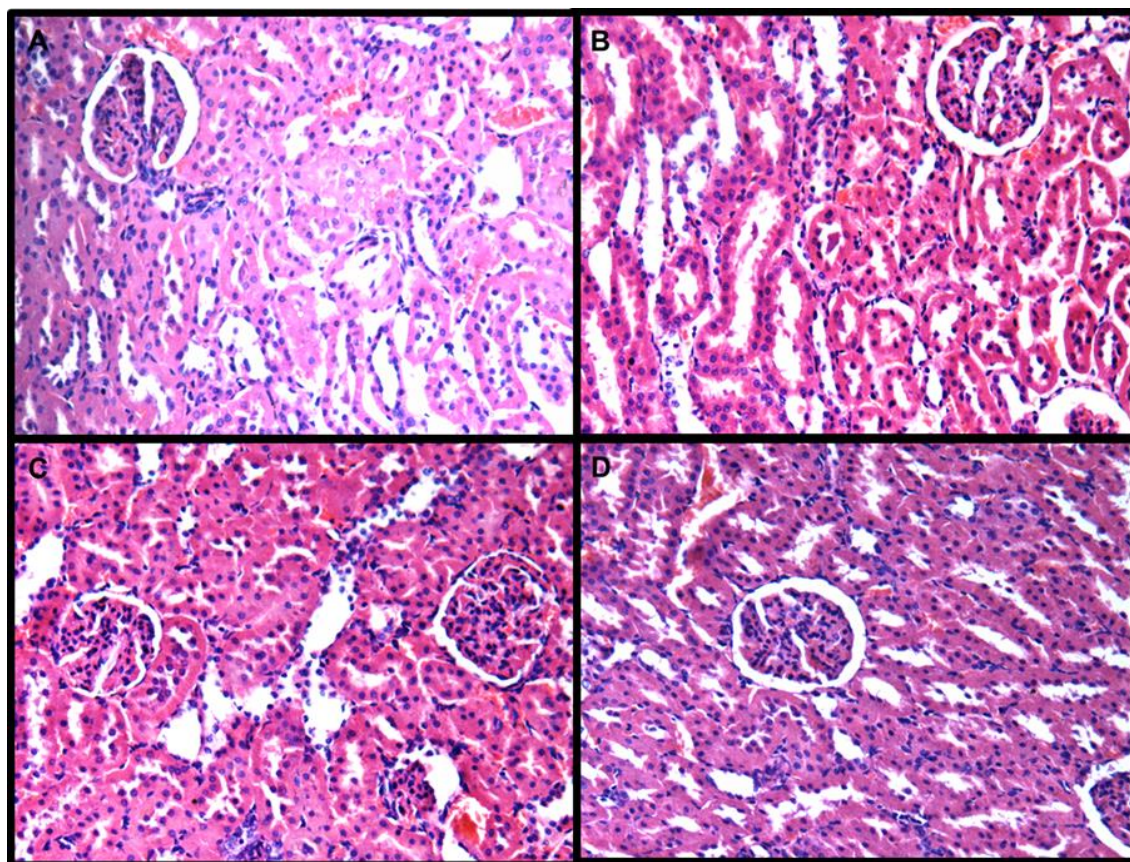


Fig. 12: Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do rim de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos glomérulos e dos túbulos renais nos grupos (A) carbopol (CP), (B) grupo colágeno (CL), (C) carbopol associados a nanotubos de carbono (NT) e (D) nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL).

Em relação a segunda situação, há um grande número de resultados controversos em sobre à distribuição e toxicidade dos NTCs. Essa diversidade se dá graças às diferentes propriedades de superfície, concentrações, pureza, funcionalização e vias de administração dos NTCs (Ai et al., 2011), o que torna difícil a comparação dos resultados encontrados neste estudo com resultados já relatados. Por exemplo, estudo conduzido *in vivo* demonstrou que a administração de NTCs de parede simples injetados por via intravenosa em camundongos causou aumento das enzimas hepáticas, ALT e AST de forma dose dependente, mesmo 90 dias após sua

aplicação. Embora tenha sido observado aumento dessas enzimas e agregados de NTC no fígado, pulmão e baço, a análise histopatológica não apresentou comprometimento desses tecidos, exceto nos pulmões onde foi encontrado infiltrado inflamatório (Yang et al., 2008). A administração de NTCs de parede múltiplas na corrente sanguínea também levou ao acúmulo desses nos pulmões, fígado e baço. Segundo relatado, a toxicidade foi inversamente proporcional à capacidade de dispersão dos NTCs e apesar da presença desse material no fígado não foram observadas alterações nos níveis séricos de AST e ALT (Qu et al., 2009). A injeção

intraperitoneal de NTCs de parede simples, funcionalizados com grupos carboxilas, apresentou resultados semelhantes. Houve aumento de espécies reativas de oxigênio e de marcadores hepatotóxicos, além de serem observadas alterações na morfologia hepática (Patlolla et al., 2012). Apesar de as variáveis analisadas serem semelhantes às realizadas neste estudo, a via de administração, a quantidade e o método de funcionalização e o tempo de permanência dos NTCs no organismo foram diferentes, o que pode justificar os diferentes resultados. Cada vez mais estudos comprovam que o potencial citotóxico desse material é influenciado por vários fatores como estrutura, comprimento, área de superfície,

grau de agregação, topologia de superfície, grupos funcionais, métodos de produção, concentração e dose oferecida as células ou organismos. Entretanto, o tamanho dos NTCs tem tido destaque na indução de processos inflamatórios devido à incapacidade dos macrófagos de fagocitar partículas maiores que $20\mu\text{m}$ (Vardharajula et al., 2012). Estudos demonstram que as concentrações seguras de NTCs estão por volta de $40\mu\text{g/ml}$ e o tamanho de aproximadamente $10\mu\text{m}$ (Firme e Bandaru, 2010). Os NTCs usados neste estudo estão de acordo com a concentração e tamanho considerado seguro para que não haja indução de efeitos citotóxicos.

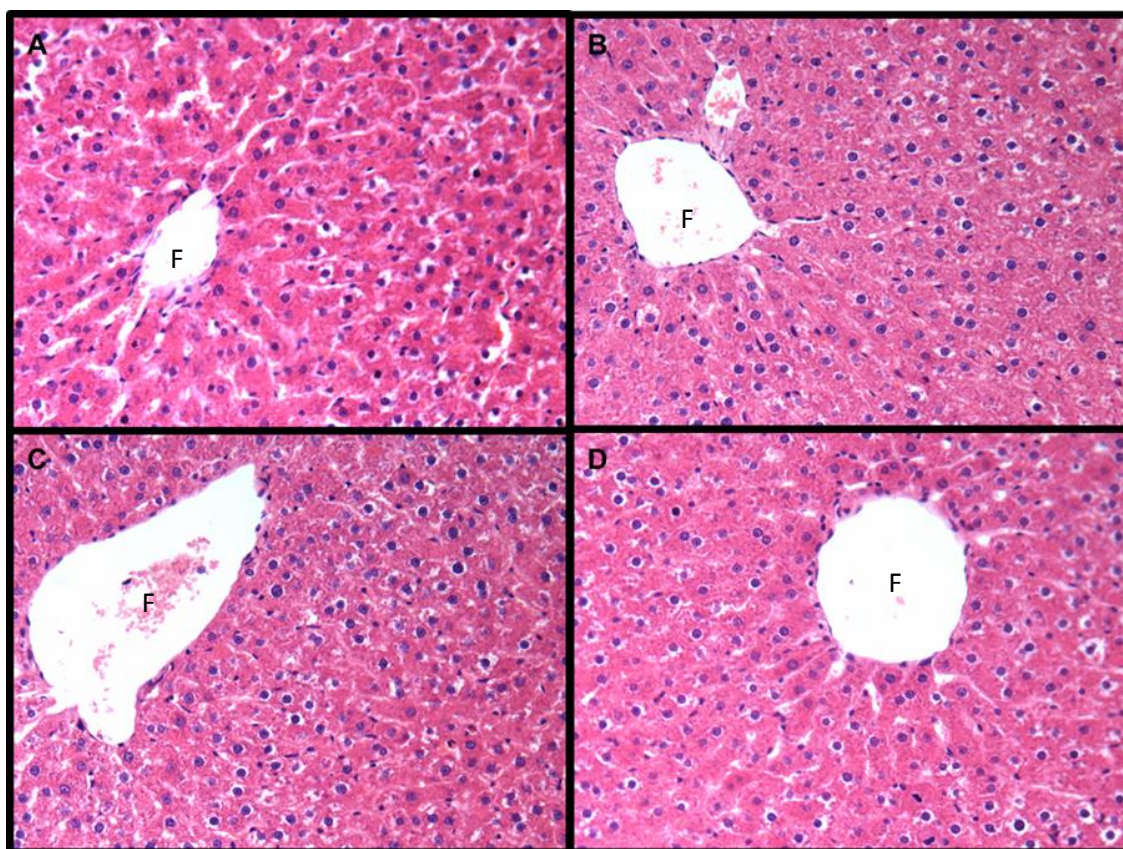


Fig. 13: Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do fígado de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina, 45 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos hepatócitos em torno de uma vênula central (F) nos grupos (A) grupo carbopol associado a nanotubos de carbono (NT), (B) nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL), (C) colágeno (CL) e (D) carbopol (CP).

Pouco se sabe a respeito dos efeitos sistêmicos dos NTCs quando usados como biomateriais na regeneração óssea. As pesquisas *in vivo*, até o momento, mantiveram-se restritas a seus efeitos locais, apresentando resultados promissores como biocompatibilidade, osteointegração e osteocondução (Sitharaman et al., 2008; Usui et al., 2008; Shing et al., 2010).

Apesar de não terem sido observadas alterações histológicas no fígado e rins,

observou-se no perfil renal e em algumas enzimas hepáticas. Por isso faz-se necessário à realização de mais estudos que esclareçam como ocorre a metabolização dos NTCs e conseqüentemente, se podem ou não representar risco a saúde animal. Até o momento, a utilização dos NTCs requer cautela, principalmente em animais portadores insuficiência renal e hepatopatias.

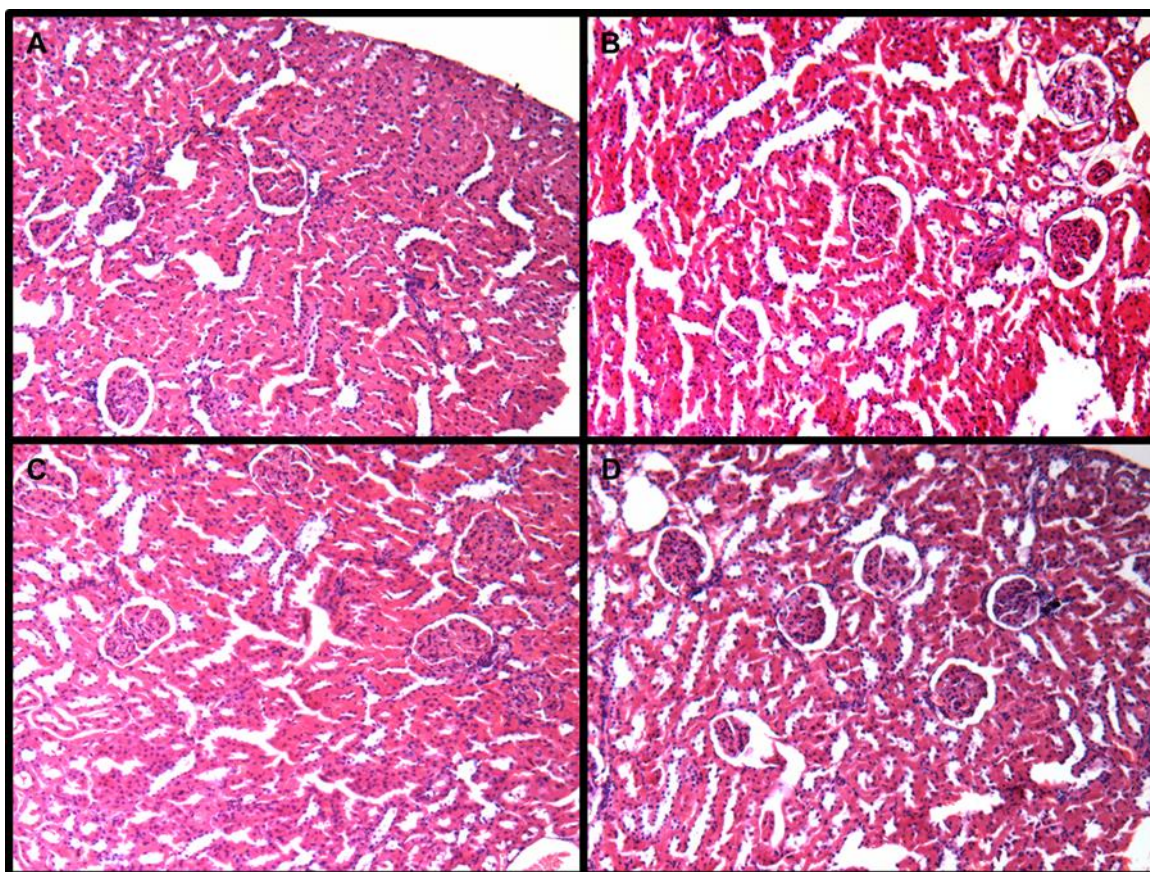


Fig. 14: Fotomicroscopia (20x) de secções transversais do rim coradas com hematoxilina e eosina, de ratos Wistar 45 dias após a realização do defeito ósseo no fêmur. Observa-se a integridade dos glomérulos e dos túbulos renais nos grupos (A) grupo carbopol associado a nanotubos de carbono (NT), (B) nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL), (C) colágeno (CL) e (D) carbopol (CP).

3.4. Conclusão

Os resultados obtidos com este estudo demonstram que a utilização de NTCs como biomaterial na regeneração óssea não induziu alterações significativas ($p < 0,05$) nas análises hematológicas e histológicas de fígado e rins de ratos Wistar nos períodos

de 15 e 45 dias. Entretanto, o aumento dos níveis séricos de creatinina apenas nos grupos tratados com NTCs sugere influencia deste material na função renal. Por isso, é precoce qualquer afirmação em relação a segurança dos NTCs usados como biomaterial na regeneração óssea. Para isso mais estudos são necessários.

4. CAPÍTULO 3: REGENERAÇÃO ÓSSEA EM RATOS WISTAR TRATADOS COM NANOTUBOS DE CARBONO: HISTOPATOLOGIA E EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES DE CRESCIMENTO, E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

RESUMO

A regeneração óssea, em casos clínicos onde houve grande perda de massa óssea, pode não ocorrer de maneira adequada, sendo necessário o uso de materiais que auxiliem nesse processo de reparo. A descoberta de novos materiais biocompatíveis capazes de mimetizar a matriz extracelular é um dos passos mais importantes no avanço nas pesquisas de bioengenharia tecidual. Graças as suas propriedades físicas e químicas, os NTCs têm tido destaque nessa busca. Além das características favoráveis a sua aplicação como matriz extracelular, há grande expectativa em relação ao seu potencial osteoindutor. Sendo assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar a histologia e a expressão gênica de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios envolvidos na fase inicial do processo de regeneração óssea. Para isso foram usados 28 ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur de 2mm de diâmetro, estendendo-se de cortical a cortical e preenchidos com carbopol 2%, colágeno, NTCs associados ao carbopol e NTCs associados ao colágeno. Após 15 dias os animais foram eutanasiados e os ossos tratados coletados. Para a análise da expressão gênica os genes foram agrupados de acordo com a resposta gerada e demonstrou-se que nos grupos NT e CL os picos ocorreram para os genes envolvidos na resposta imediata e inflamatória, enquanto para o grupo NTCL para os genes marcadores da diferenciação de osteoblastos, formação óssea e de tecido conectivo. Na análise histológica não foi observado infiltrado inflamatório, formação de cápsula fibrosa ou outros sinais de citotoxicidade em nenhum dos grupos. Nos grupos tratados com NTCs observou-se grande número de vasos sanguíneos, presença de grânulos de NTC intracitoplasmáticos e envoltos por osteóides. Os achados histológicos e as análises de expressão gênica sugerem uma melhor resposta do processo de reparo na presença dos NTCs.

Palavras chave: PCR; osteoindução; biocompatibilidade; biomaterial

4.1. Introdução

A regeneração óssea é um evento fisiológico, complexo e bem orquestrado que pode ser observado durante a recuperação de uma fratura. Em algumas condições clínicas, onde grandes quantidades de osso neoformado são necessárias para reconstrução de defeitos gerados por traumas, infecções ou ressecções tumorais, existem recursos que podem ser usados na melhoria do processo

regenerativo, que muitas vezes é insuficiente para que o reparo completo aconteça (Dimitriou et al., 2011). Embora o enxerto autólogo seja usado na rotina ortopédica, algumas desvantagens como quantidade limitada e morbidade do local doador contribuem para o desenvolvimento de novos biomateriais (Lutolf et al., 2003).

Encontrar novos materiais biocompatíveis capazes de mimetizar a matriz extracelular natural, permitindo a regeneração tecidual e

fornecendo condições ideais para a adesão e migração celular, é um dos passos mais importantes no avanço dessas pesquisas. Quatro componentes são considerados essenciais para o desenvolvimento da engenharia tecidual: matriz extracelular (MEC), células, citocinas e um bioreator. Sendo assim, para sintetizar uma matriz orgânica que mais se assemelhe à natural, deve-se fornecer as células indiferenciadas tudo que elas precisam para se desenvolver (Tonelli et al., 2012).

Um dos destaques nessa busca por novas matérias são os nanotubos de carbono (NTCs). Graças a suas propriedades únicas como baixo peso, alta condutividade elétrica, estabilidade química, condutibilidade térmica, força mecânica e fácil incorporação de grupos funcionais, sua aplicação na engenharia tecidual tem tido resultados promissores (Harrison et al., 2007). Além disso, o alto grau de flexibilidade e elasticidade, a presença de poros de diâmetro similar a MEC e sua grande área de superfície de contato são outras importantes características que contribuem para sua aplicação como MEC (Wong et al., 1997; Raymundo-Pinero et al., 2002). Graças aos mecanismos de funcionalização, melhoras nas propriedades de solubilidade e dispersão foram obtidas, assim como a possibilidade de adição de novas partículas em sua cadeia, tornando os NTCs ainda mais eficientes na tentativa de mimetizar a MEC (Tonelli et al., 2012).

Relatos do uso dos NTCs em culturas de osteoblastos mostraram que a proliferação celular não foi prejudicada e que a diferenciação celular e mineralização foram melhoradas na presença desses (Bhattacharya et al., 2010).

Também foi observado, em culturas de fibroblastos e osteoblastos em contato com o NTCs, alto grau de viabilidade celular, rápida síntese de colágeno tipo I e ausência

de citocina pró-inflamatória IL-6 e de radicais livres (Cholpek et al., 2006). Além de atuarem como arcabouço para o crescimento celular, os NTCs são capazes de transportar em sua cadeia, fatores de crescimento que contribuem para diferenciação de células progenitoras. Essa nanobiointerface pode assegurar o controle do comportamento celular e, portanto otimizar a regeneração tecidual (Ilie et al., 2012).

Apesar de todos os avanços, pouco se sabe a respeito do potencial de ação dos NTCs in vivo. Para melhor entender quais os mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação celular induzida pelos NTCs, este trabalho teve como objetivos avaliar a histologia e a expressão gênica de fatores de crescimento, e mediadores inflamatórios envolvidos na fase inicial do processo de regeneração óssea.

4.2. Material e método

4.2.1. Infraestrutura e animais

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos Departamentos de Morfologia e de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e do Laboratório de Nanomateriais do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. O protocolo de experimentação desenvolveu-se nas dependências físicas dos Departamentos de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Biotério, Laboratório de Técnica Cirúrgica Veterinária, Laboratório de Patologia Veterinária e Laboratório de Toxicologia, todos na Escola de Veterinária – UFMG. Utilizaram-se 28 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, de três meses de idade com média de peso de 400g, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos no CEPA (Centro Experimental de Pequenos Animais) da EV/UFMG, acondicionados em caixas

plásticas com quatro ratos/caixa, sendo submetidos a ciclos de claro-escuro de 12h, em ambiente com temperatura controlada. Os animais foram desverminados com tiabendazol e submetidos a um período de adaptação de 30 dias. Durante todo período experimental, os animais recebem ração comercial para roedores (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo, além de micronutrientes) e água ad libitum. O projeto foi desenvolvido seguindo os princípios éticos preconizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (projeto aprovado sob protocolo nº 236/2011 (Anexo1)).

4.2.2. Protocolos anestésico e cirúrgico

Quinze minutos antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam antibioticoterapia profilática com cefalotina sódica (30mg/kg, SC) e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol (2mg/kg, SC). A indução e manutenção anestésica foram feitas com isoflurano, sendo a indução feita em caixa anestésica e a manutenção por meio de máscara em sistema semiaberto. Logo após a indução, o animal foi pesado em balança de precisão. Para evitar a hipotermia, foram colocadas bolsas de água quente sob a mesa onde o animal estava posicionado para realização do procedimento cirúrgico.

Após a tricotomia e antissepsia do membro posterior esquerdo foi realizada incisão de pele e do tecido subcutâneo, na face lateral da coxa, abrangendo desde a região da epífise proximal do fêmur, até a distal. Realizou-se a incisão da fáscia lateral, seguida de divulsão das porções cranial e caudal do músculos bíceps femoral e deslocamento cranial do quadríceps lateral no fêmur, expondo-se sua diáfise. Uma placa de neutralização de titânio, fixada por quatro parafusos com espaçamento no meio, com 1,5 mm de espessura, foi

posicionada na porção dorso-lateral do fêmur para prevenir a fratura deste após a realização do defeito. Após a colocação da placa foi realizado defeito ósseo com 2mm de diâmetro na diáfise média do fêmur, se estendendo da cortical lateral até a cortical medial produzidos por um broca de aço de mesmo diâmetro montada em uma microrretífica. A fim de se evitar o aquecimento dos tecidos, tal procedimento foi realizado em constante irrigação com solução salina 0,9%. O defeito foi preenchido de acordo com o tratamento estabelecido em cada grupo experimental. Em seguida, os músculos foram aproximados empregando-se padrão de sutura simples contínuo com fio absorvível de poligrecapone número 000 e a pele suturada com padrão contínuo intradérmico, sendo utilizado o mesmo fio.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas até completa recuperação anestésica, mantendo-se a temperatura ambiente em 37°C. O controle da dor foi realizado com cloridrato de tramadol (2mg/kg, SC), administrado a cada 8h, via oral, durante três dias.

4.2.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos de forma aleatória, em quatro grupos, cada um com sete animais conforme o material usado para preenchimento do defeito, sendo avaliados 15 dias após a realização do defeito

- Grupo Carbopol (CP): carbopol (gel inerte).
- Grupo Colágeno (CL): gel de colágeno
- Grupo Nanotubo de carbono (NT): NTC multiwall na concentração de 8% em carbopol.
- Grupo Nanotubo + colágeno (NTCL): NTC multiwall na concentração de 8% em colágeno

4.2.4. Síntese do composto gel de colágeno + NTC multiwall

O colágeno foi cedido pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Desenvolvimento do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A obtenção do colágeno tipo I foi realizada a partir de caudas de ratos coletadas assepticamente, lavadas três vezes em água e três vezes em álcool 70% e em seguida armazenadas em freezer -70°C, conforme descrito por Kitten et al., (1996). Para extração do colágeno as caudas foram submersas em ácido acético na concentração 0.5 mol/L durante 48h a temperatura de 4°C. A solução resultante foi filtrada em várias camadas e gaze para remoção de pequenos vasos e debris teciduais. O filtrado resultante foi centrifugado (14,000g) durante uma hora. O sobrenadante foi coletado e dializado por meio de trocas de ácido acético (0.02 mol/L), mantidos em geladeira a 4°C durante um período de três dias. A concentração final da solução de colágeno usada no presente estudo foi de 5.6 mg/mL contendo mais de 98% de colágeno Tipo I. Após a adição dos meios para ajuste do pH (~pH 7,4), as moléculas de colágeno solubilizadas nessa solução se associam formando fibrilas que subsequentemente formarão um gel tridimensional estável.

Nanotubos de carbono de múltiplas paredes (NWNT multiwalled nanotubes) crescidos por CVD (Chemical Vapour Deposition) usando como fonte precursora de carbono o gás etileno C₂H₄ e gás de arraste Ar (argônio) e como suporte de crescimento óxido de magnésio dopado com Fe e Co na proporção 5%Fe5%Co em peso. A temperatura de crescimento foi de 750 C e o tempo de 30 minutos. Após a produção os NTCs passaram por um processo de purificação no qual esses são submetidos a um tratamento térmico a 390 C durante 30 minutos sob atmosfera ambiente de modo a queimar resíduos de carbono amorfo. Em

seguida um tratamento com HCl/H₂O 50/50 durante 24 h de modo a eliminar o óxido de magnésio e as partículas de óxido de ferro e cobalto presentes no material. Em seguida realizou-se ultrafiltração e lavagem com água DI usando filtro Millipore de 4 micra em PTFE com várias passagens de água para ajuste do pH (~7) Para tornar os NTCs hidrofílicos e possibilitar sua interação com sistemas biológicos eles foram adicionados a uma mistura de H₂SO₄/HNO₃ 1:3 sob ação de radiação de microondas Na sequência os NTCs foram submetidos a sucessivas lavagens com água deionizada para retirada do ácido e em seguida centrifugados. Por se tratar de um material em pó, os NTCs precisaram de um veículo para tornar possível sua implantação no defeito realizado no fêmur. Os veículos usados nesse trabalho foram o carbopol 2% e o gel de colágeno. Inicialmente, os MWNTC foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C, para logo após, serem diluídos em água ultra pura na concentração de 800µg/mL. Essa diluição foi realizada inicialmente em banho de ultrassom durante 30 min. Em seguida, a solução foi diluída em sonicador de ponta, em ciclos de 30 segundos e intervalos de 10 segundos imerso em gelo, repetidos cinco vezes.

Após sua diluição em água, os NTCs foram misturados ao colágeno e/ou carbopol, conforme a determinação descrita a seguir:

- Para 1mL da solução de NT = 0,1ml de solução de MWCNT + 0,65ml de água destilada + 0,25 ml de carbopol 2%
- Para 1mL da solução de NTCL = 0,1ml de solução de MWCNT + 0,41ml de água + 0,36ml de colágeno + 0,1ml de meio + 0,015 ml de NaOH o que resultou em uma solução final de colágeno na concentração de 2mg/ml.

4.2.5. Coleta de amostras

Quinze dias após a indução da lesão e tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg) por via intraperitoneal. Imediatamente após, realizou-se necropsia. Os fêmures esquerdos de todos os animais foram colhidos e dissecados, quatro foram seccionados transversalmente, isolando o terço médio da diáfise correspondente a região do defeito ósseo realizado e imediatamente após a coleta, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em freezer – 80° C, para posterior análise molecular. As demais amostras de osso foram fixadas em formalina tamponada 10% para análise histopatológica.

4.2.6. Análise de expressão gênica

As amostras de fêmures congelados foram utilizadas para determinação da expressão gênica de fatores de crescimento, citocinas e proteínas de processo inflamatório, descritos no Quadro 1, na qual os genes em negrito, considerados normalizadores, foram usados para realização das análises. Para isso foram realizadas análises de PCR quantitativo SYBR em tempo real. Estas análises foram realizadas segundo técnicas de rotina do Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia. Para tanto, os mRNAs foram extraídos com reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As amplificações de PCR foram realizadas usando um GeneAmp 5700 (Perkin-Elmer). As reações, executadas em uma mistura com 10 µL de volume final contendo tampão 1× SYBR PCR (Perkin-Elmer), 1000 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dUTP, 0,125 U/µL AmpliTaq Gold, 0,05 U/µl AmpEraseUNG (uracil-N-glicosilase), 15 mM MgCl₂, e 900 nM de cada primer. O protocolo do PCR foi feito a 5 minutos de desnaturação a 95 °C e 50 ciclos a 1 min para anelamento e alongação a 60°C, e 10 s

de desnaturação a 95°C. A fluorescência foi detectada ao final de cada fase de extensão. Realizou-se a incubação da AmpErase UNG a 50°C por 2 min para prevenir areamplificação dos produtos do PCR, e a ativação da AmpliTaq Gold polimerase a 95°C por 10 min. Para excluir a contaminação de produtos inespecíficos da PCR tais como os dímeros de primer, a análise da curva de dissociação foi aplicada a todos os produtos ao final da ciclagem. Os grupos foram analisados separadamente, sendo considerado o pool de todos os indivíduos para cada tipo de gene pesquisado. Os resultados foram analisados de acordo com a expressão relativa dos genes, ou seja, a quantificação das mudanças do gene alvo teve como referência a quantificação do grupo controle.

4.2.7. Processamento e análise histológica

As amostras de fêmur foram submetidas a processo de descalcificação em solução de ácido fórmico a 24%, sendo esta solução trocada a cada 2 dias, durante 45 dias. Após a completa descalcificação, os ossos foram lavados em água corrente durante 24h. Realizou-se a retirada das epífises proximal e distal, a diáfise resultante foi seccionada longitudinalmente em duas metades iguais, em seguida processadas pelas técnicas de rotina para inclusão na parafina. As secções histológicas de 5 micrômetros foram realizadas longitudinalmente e na sequencia coradas segundo a técnica de hematoxilina e eosina e avaliadas em microscópio de luz, a fim de se descrever o processo cicatricial no foco da fratura.

QUADRO.1: Descrição dos primers, forward e reverse, usados nas análises de PCR 15 dias após a realização do defeito ósseo produzido em fêmur de ratos Wistar.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CINC-1	GGAGACCATTAGGTGTCAACCA	CCTAACACAAAACACGATCCCA
IL-1 β	GTTTCCCTCCCTGCCTCTGACA	GACAATGCTGCCTCGTGACC
TNF- α	ATGGCCCAGACCCTCACACTCAGA	CTCCGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
TGF- β 1	GGTGGACCGCAACAACGCAATCTA	CTGGCACTGCTTCCCGAATGTCTG
PDGF-B	TGACCCGAGCACATTCTGGA	GTCTTGCACTCGGCGATTACG
Sox-9	GGCCCTTCTCTCCTCAACC	ACTGCCGTGGCCTTTTACA
cbfa1	TACGAAATGCCTCTGCTGTTATGG	GAGGATTTGTGAAGACCGTTATG
Osteocalcin	GCTGGCCCTGACTGCATCTG	ATTCACCACCTTACTGCCCTCCTG
ALP	CGAGCAGGAACAGAAGTTTGC	TGGCCAAAAGGCAGTGAATAG
Col I	TTGACCCTAACCAAGGATGC	CACCCCTTCTGCGTTGTATT
Col III	AGAGGATGGCTGCACTAAACAC	TTGGTCACTTTCACTGGTTGAC
Aggrecan	CTTGGGCAGAAGAAAGATCG	GTAGGTGTTGGGGTCTGTGC
Biglycan	GGAGGCCAGAATCCTATCC	ACTCCCTCCTGCTGGGTACA
Decorin	TAGCATCACCGTTGTGGAAA	CCGGACAGGGTTGCTATAAA
BMP-2	GGAAAACCTCCCGACGCTTCT	CCTGCATTTGTTCCCGAAAA
BMP-3	GAAGATGTCCTCGCTCAGCAT	GAATGGAGCGTTTGAGTGTGTT
BMP-4	TTATGAGGTTATGAAGCCCCCA	GCTCACATCGAAAAGTTTCCAC
BMP-6	CCTTGGTCCACCTTATGAATCC	GACATTGGAGTTGTCTGTCGAA
BMP-7	AACCGCTCCAAGACTCCAAAG	CCTCTGGTCACTGCTGCTGTT
BMP-R1a	GGTTCAGCGAACTATTGCCAAA	TCACCACGCCATTTACCCA
BMP-R2	CAGAACGAACGCAACCTATCAC	GCTGGACATTGAATGCTCAGA
ACV-R 2a	TGTGGCTAATCACGGCTTTTCA	CCTCTAGCCATGGTTTCTGCAA
IL1a	AAGACAAGCCTGTGTTGCTGAAGG	TCCCAGAAGAAAATGAGGTGCGTC
IL1b	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
IL1RA	AAGACCTTCTACCTGAGGAACAACC	GCCCAAGAACACATTCCGAAAGTC
IL1R1	GTTTTTGGAACACCCTTCAGCC	ACGAAGCAGATGAACGGATAGC
IL1R2	CATTTCAGACACCTCCAGCAGTTC	ACCCAGAGCGTATCATCCTTCAC
IL6	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCTTAGCC
IL6R	AAGCAGGTCCAGCCACAATGTAG	CCAACTGACTTTGAGCCAACGAG
TNF α	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
TNF-r2	TGCAACAAGACTTCAGACACCGTG	AGGCATGTATGCAGATGGTCCAG
<i>Bactin</i>	<i>AAGTCCCTCACCTCCCAAAAG</i>	<i>AAGCAATGCTGTACCTTCCC</i>
<i>CypA</i>	<i>TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG</i>	<i>CTTCTGCTGGTCTTGCCATTCC</i>
<i>GAPDH</i>	<i>GTATTGGGCGCCTGGTACC</i>	<i>CGCTCCTGGAAGATGGTGTATGG</i>
<i>RPS18</i>	<i>CTAGTGATCCCCGAGAAGTTTC</i>	<i>TGTCTGCTTTCCTCAACACC</i>

4.3. Resultados e discussão

Todos os animais apresentaram boa recuperação anestésica e não houve complicações em relação ao procedimento cirúrgico ou ao tratamento recebido. Entretanto, em sete, dos 28 animais submetidos ao procedimento cirúrgico, houve sobrecarga da placa de titânio, fazendo com que esta arqueasse (Fig.15), desestabilizando a região onde o defeito ósseo foi realizado. Este fato ocorreu em animais de todos os grupos e em diferentes tempos não existindo nenhuma relação entre eles. Os sete animais que apresentaram sobrecarga da placa foram retirados do experimento.



Fig. 15: Radiografia latero medial do fêmur esquerdo de rato Wistar submetidos a defeito ósseo na diáfise média do fêmur após sobrecarga das placas de titânio usadas na estabilização óssea.

4.3.1. Análise da expressão gênica

Para melhor análise dos resultados de PCRs, os genes foram agrupados de acordo com o tipo de resposta gerada por cada um,

e analisados em conjunto. Os processos de proliferação e diferenciação celular são induzidos por interações entre fatores extracelulares e receptores específicos localizados na superfície celular, que geram rápidas mudanças bioquímicas no citoplasma. Entretanto, essas mudanças não são suficientes para que esses processos ocorram. Para isso, sinais de ativação devem atravessar a membrana nuclear e alterar a expressão de genes capazes de ditar respostas funcionais específicas. Esses genes capazes de induzir todas essas mudanças são chamados de genes de resposta imediata ou primária (McMahon e Monroe, 1992). Os produtos dos genes de resposta imediata são responsáveis pelo reconhecimento de sequências de DNA específicas e regulação da expressão de genes que contém tais sequências em seu domínio. São expressos por vários tipos celulares e ativados por fatores de crescimento ou diferenciação celular (Nose et al., 1991). No presente estudo, a análise desses genes mostrou que houve aumento da expressão nos grupos CL, NT e NTCL, sendo maiores nos dois primeiros grupos, principalmente para os genes EGR-1, COX-2 e TSC-22 (Fig.16).

O EGR-1, conhecido como fator 1 de transcrição celular da resposta imediata, normalmente apresenta baixos níveis de expressão tecidual, mas pode ser rapidamente estimulado por sinais como hipóxia, estresse mecânico e injúrias agudas. Seu papel é estimular a produção de fatores de crescimento que irão promover o reparo tecidual como, por exemplo: fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaqueta e outros (Bryant et al., 2000; Wu et al., 2009). Estudos in vivo demonstraram que animais tratados com Egr-1 tiveram ativação dos fatores de crescimento VEGF, TGF- β 1 e PDGF- α , além do aumento da produção de colágeno e angiogênese (Bryant et al., 2000).

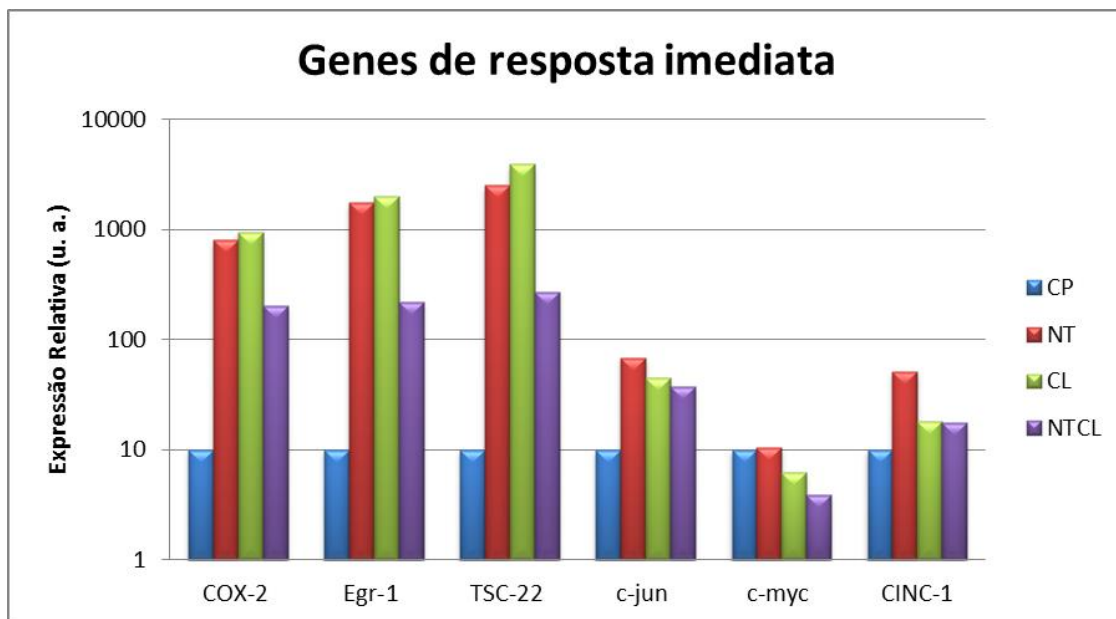


Fig.16: Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes de resposta imediata em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito.

As prostaglandinas desempenham funções importantes no metabolismo ósseo e suas taxas de produção são controladas pela atividade das ciclo-oxigenases COX-1 e COX-2. A COX-1 é constantemente produzida e funciona na manutenção da homeostase enquanto a COX-2 age como um gene de resposta ao estresse é responsável pelos altos níveis de produção de prostaglandinas durante a inflamação e, além disso, é necessária para a formação intramembranosa e endocondral durante o reparo de fraturas (Simon et al., 2002; Zang et al., 2013).

O TSC-22 é um fator de transcrição que foi primeiramente isolado de osteoblastos como um gene de resposta imediata para TGF- β 1 (Dohrmann et al., 2002). Ele é capaz de inibir o crescimento celular, promover apoptose e estimula a diferenciação de leucócitos em monócitos, sugerindo assim que esse tenha ação como supressor de genes tumorais (Yu et al., 2009).

Sendo assim, pode-se sugerir que nos grupos CL e NT os genes responsáveis pela cascata de eventos que dará início aos processos de proliferação e diferenciação celular apresentaram maior atividade que os grupos NTCL e CP, 15 dias após a realização do defeito.

Para os genes reguladores da resposta inflamatória (Fig. 17) também houve aumento da expressão nos grupos NT e CL, entretanto, a expressão desses no grupo NTCL, esteve abaixo das do grupo CP, para a maioria dos genes analisados.

Durante a fase inflamatória da regeneração óssea as citocinas IL-1, IL-6 TNF- α são secretadas por macrófagos, células inflamatórias e mesenquimais presentes no periósteo. Essas possuem efeito quimiotático sob células inflamatórias, contribuem para formação da matriz extracelular, estimulam a angiogênese e o recrutamento de células para o foco da fratura. Seus picos de expressão ocorrem

24h após a injúria e permanecem aumentadas durante toda a fase inflamatória, diminuído apenas no período de formação de cartilagem, logo em seguida, durante a fase de remodelamento, elas são expressas novamente (Tsiridis et

al., 2007). As diversidades de células que expressam esses fatores sugerem que os mesmos possuem múltiplas funções em diferentes tempos durante o processo de regeneração óssea (Kon et al., 2001).

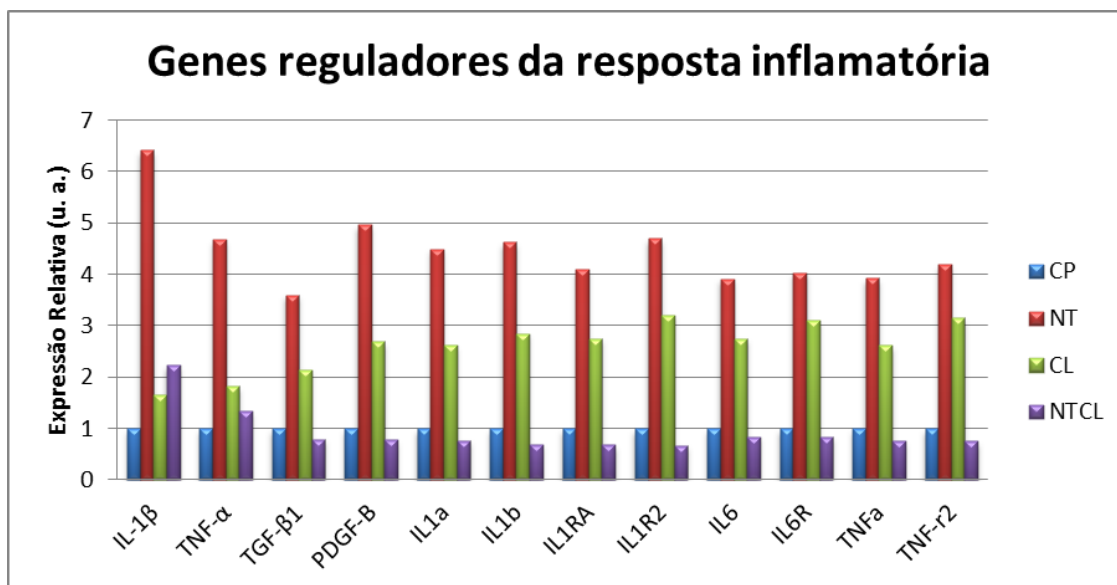


Fig.17: Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes reguladores da resposta inflamatória em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associados a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito.

O TGF- β é secretado pelas plaquetas durante a fase inflamatória inicial, é uma potente estimulador quimiotático de células mesenquimais, além de estimular a proliferação de pré-osteoblastos, condrócitos e osteoblastos, induzir a produção de proteínas extracelulares como colágeno, proteoglicanos, osteopontina, osteonectina e fosfatase alcalina. Também é responsável pela sinalização para síntese de BMP pelas células osteoprogenitoras (Dimitriou et al., 2005; Devescovi et al., 2008). O PDGF também é liberado por plaquetas no mesmo período e funciona como um potente estimulador quimiotático para células inflamatórias, mesenquimais e osteoblastos (Lieberman et al., 2002).

O resultado da expressão desses genes demonstra intensa atividade inflamatória nos grupos NT e CL.

A expressão dos genes responsáveis pela diferenciação de osteoblastos demonstrou que Cbfa-1, osteocalcina, osteonectina e ALP tiveram sua expressão aumentada nos grupos tratados (NTCL, CL e NT) em relação ao grupo CP. A análise da Fig.18 mostra que na comparação entre os grupos tratados o grupo NTCL foi o que apresentou os maiores índices de expressão para osteocalcina, ALP e principalmente osteonectina.

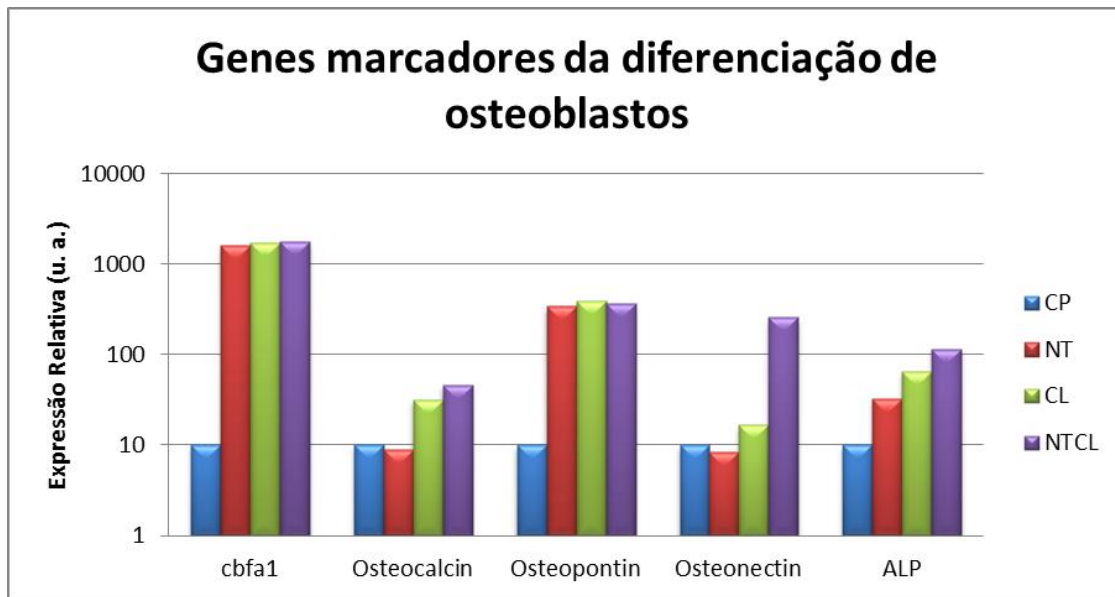


Fig.18: Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes marcadores da diferenciação de osteoblastos em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito.

O Cbfa-1 é um fator de transcrição responsável pela regulação da diferenciação de osteoblastos e expressão de genes da matriz óssea codificadores de osteocalcina e colágeno tipo I. É fundamental para osteogênese, formação da matriz óssea e diferenciação de condrócitos (Masaki et al., 2005). A osteocalcina, osteonectina e osteopontina, compõem a matriz extracelular. Essas proteínas não colagênicas participam da diferenciação de células ósseas, maturação e mineralização da matriz óssea. A osteocalcina é inicialmente expressa durante a diferenciação dos osteoblastos, enquanto a osteonectina está associada com a formação da matriz óssea (Nefussi et al., 1997).

Para os genes reguladores da formação óssea pode-se verificar que os grupos tratados tiveram aumento da expressão gênica, exceto no grupo NT para BMP-4 e BMP-R1a (Fig.19).

As BMPs fazem parte da superfamília das TGF- β , são produzidas por células

osteoprogenitoras, mesenquimais, osteoblastos e condrócitos. Elas induzem uma cascata de eventos que incluem quimiotaxia, proliferação e diferenciação celular, angiogênese e síntese de matriz extracelular, que levam a osteogênese e a condrogênese (Franceschi, 2005). As BMP-2, -4 e -6 controlam a taxa de proliferação e maturação dos condrócitos e estimulam a produção de colágeno. As BMP-2 e -7 induzem a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e estimulam a mineralização da matriz óssea. Essas proteínas exercem sua função por meio da ligação e ativação dos seus receptores de membrana BMP-R1, BMP-R2 e ACV-R2a (Ngo et al., 2006). Possuem padrão temporal de expressão único, onde a BMP 2 é expressa durante a fase inflamatória, no período em que as células mesenquimais estão sendo recrutadas para o local da injúria, e as BMPs 3, 4, 7 e 8, nas fases mais tardias da condrogênese e osteogênese, onde são expressas durante um período restrito, quando a fase osteogênica é mais ativa (Cho et al., 2002).

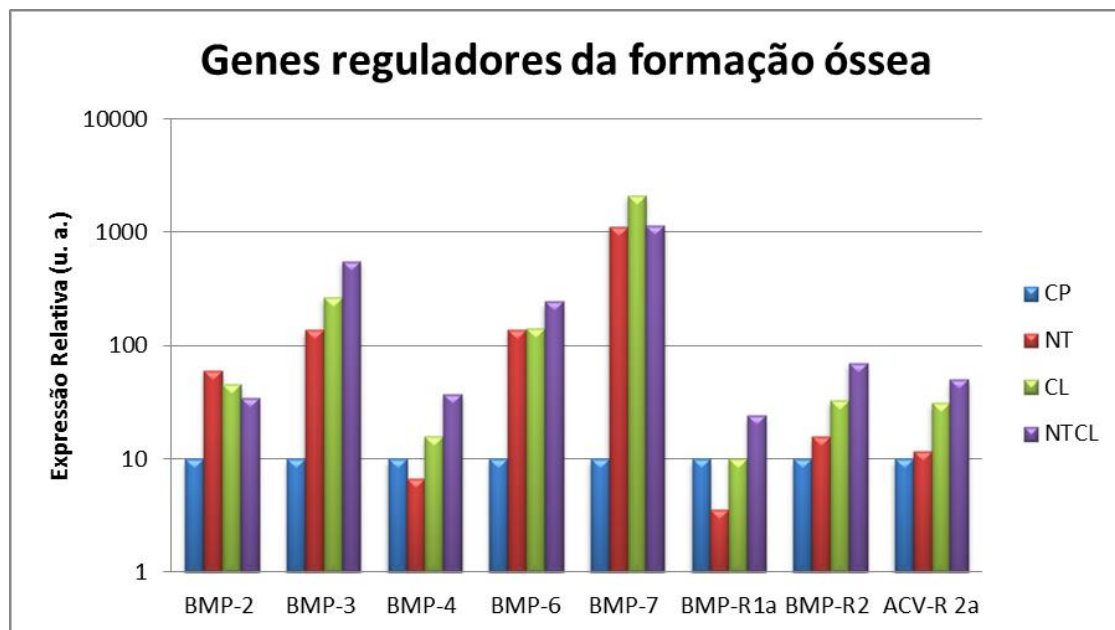


Fig.19: Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes marcadores da diferenciação de osteoblastos em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a Colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito.

Observa-se (Fig. 20) que no caso dos genes responsáveis pela formação de tecido conjuntivo também houve maior expressão nos grupos tratados, exceto para colágeno tipo II. Segundo Majumdar et al (2001) a IL-1 β é capaz de diminuir a expressão de colágeno tipo II e agrecan. Os altos índices de IL-1 β nos grupos tratados (Fig.17) justificam os baixos valores expressados para colágeno tipo II e agrecan, principalmente no grupo NT.

O Sox-9 é um fator de transcrição responsável pela regulação da expressão genica do colágeno tipo II e agrecan, além disso, está envolvido na indução da diferenciação condrogênica de células mesenquimais pelas BMPs (Majumdar et al., 2001)

A matriz extracelular da cartilagem é formada por agrecan, decorin, biglican e colágeno tipo II, que são depositados por meio da diferenciação de células

mesenquimais expostas ao TGF- β 3. Enquanto o decorin atua como componente inicial da matriz extracelular durante a condrogênese, o agrecan e o biglican são incorporados a ela nas fases mais tardias. Já a expressão o colágeno tipo II é baixa na cartilagem imatura, aumentando de acordo com sua maturação (Barry et al., 2001). A expressão de colágeno tipo I é evidenciada durante a fase osteogênica com início três dias depois da lesão e contínua elevação durante todo esse período (Kon et al., 2001). Assim, os resultados sugerem que na presença de colágeno, a expressão dos genes agrecan e biglican, associados à formação da matriz óssea cartilaginosa foram estimulados, enquanto que na associação colágeno + NTC houve estímulo da osteogênese.

A regeneração óssea é caracterizada pelo envolvimento de múltiplos fatores que são expressos em uma sequência temporal bem definida (Gerstenfeld et al., 2003). Esse

processo pode ser caracterizado em três etapas: inflamação, reparo e remodelamento (Phillips, 2005).

Na análise dos genes envolvidos nas diferentes fases da regeneração observa-se que nos grupos NT e CL os picos de expressão ocorrem para os genes envolvidos na resposta imediata e

inflamatória enquanto que para o grupo NTCL foram para os genes marcadores da diferenciação de osteoblastos, formação óssea e tecido conectivo. Essa análise sugere que a associação colágeno + NTCs teve efeito positivo na expressão dos genes envolvidos no processo de regeneração óssea.

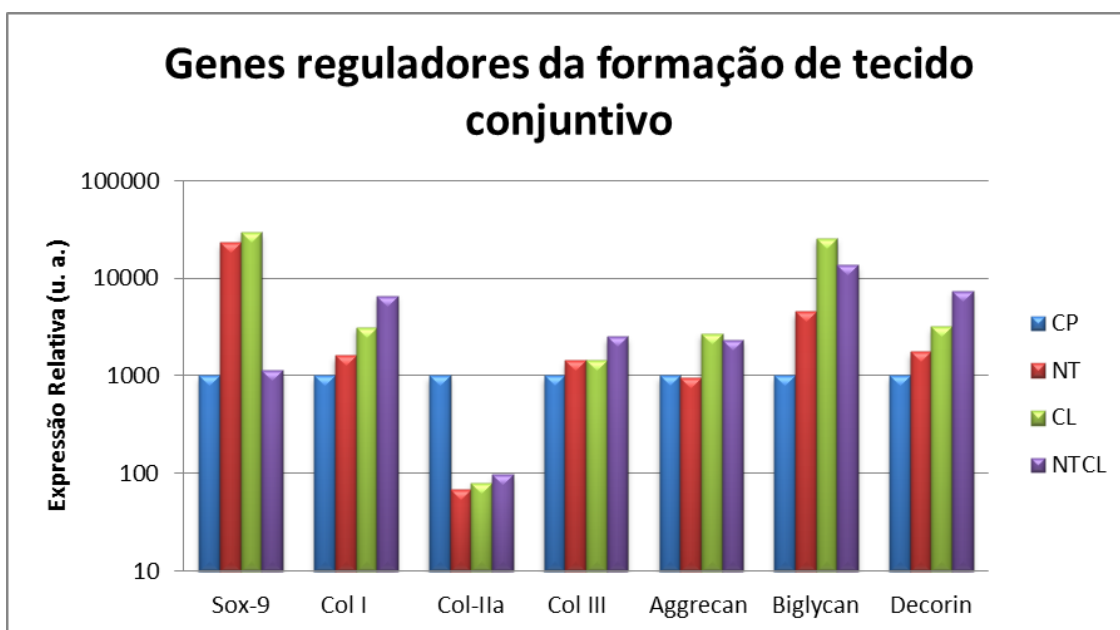


Fig.20: Gráfico da análise qualitativa da expressão dos genes reguladores da formação de tecido conjuntivo em ratos Wistar submetidos a defeito ósseo no fêmur tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 15 dias após a realização do defeito.

Estudos in vitro com a associação colágeno + NTC demonstraram que esta é capaz de melhorar as propriedades mecânicas do colágeno como matriz extracelular, além de induzir a formação de cristais de hidroxiapatita na presença de concentrações fisiológicas de cálcio (Cao et al., 2007; Silva et al., 2009).

A capacidade dos NTCs em promover a formação óssea também foi comprovada in vivo. Foi demonstrado que na presença de NTCs a associação de colágeno com BMP-2 formou uma quantidade de osso

significativamente maior quando comparado ao grupo sem NTCs. Também foi demonstrado que a expressão gênica de osteocalcina e CBFAa-1 apresentou aumento significativo em culturas de osteoblastos incubadas com NTCs após cinco dias (Shimizu et al., 2012).

4.3.2. Análises histopatológicas

Devido à deformação das placas, o número de animais ao final do experimento permitiu apenas a análise descritiva dos achados histológicos, sendo os principais:

Grupo CP: Área de descontinuidade óssea no osso compacto com formação focal extensa de osso trabecular e tecido fibroso. Nas áreas de osso trabecular observou-se intensa atividade osteoclástica e

osteoblástica, enquanto nas áreas de fibroplasia observou-se fibrócitos e fibroblastos ativos e presença de material extracelular eosinofílico fibrilar, em fase de organização (Fig.21).

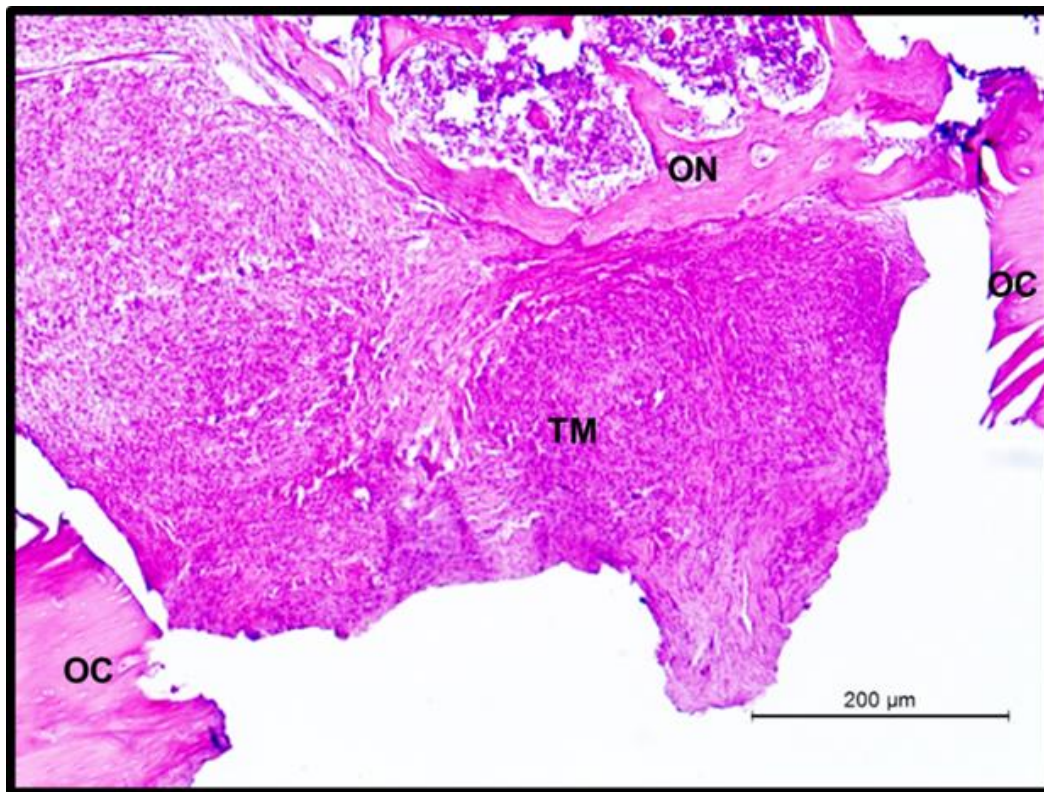


Fig.21: Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CP. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido mielofibroso (TM) localizados na região do defeito, entre o osso cortical (OC).

Grupo NT: Achados semelhantes aos encontrados no grupo CP (Fig.22).

Grupo CL: Áreas multifocais com osso trabecular além de material extracelular abundante, fortemente eosinofílico, sugestivo de fibras colágenas (Fig.23).

Grupo NTCL: Área extensa de osso trabecular e tecido conjuntivo, ricamente vascularizado, pouco organizado e com presença de grânulos enegrecidos multifocais, sugestivos de NTC, inclusive intracitoplasmáticos (Fig. 24).

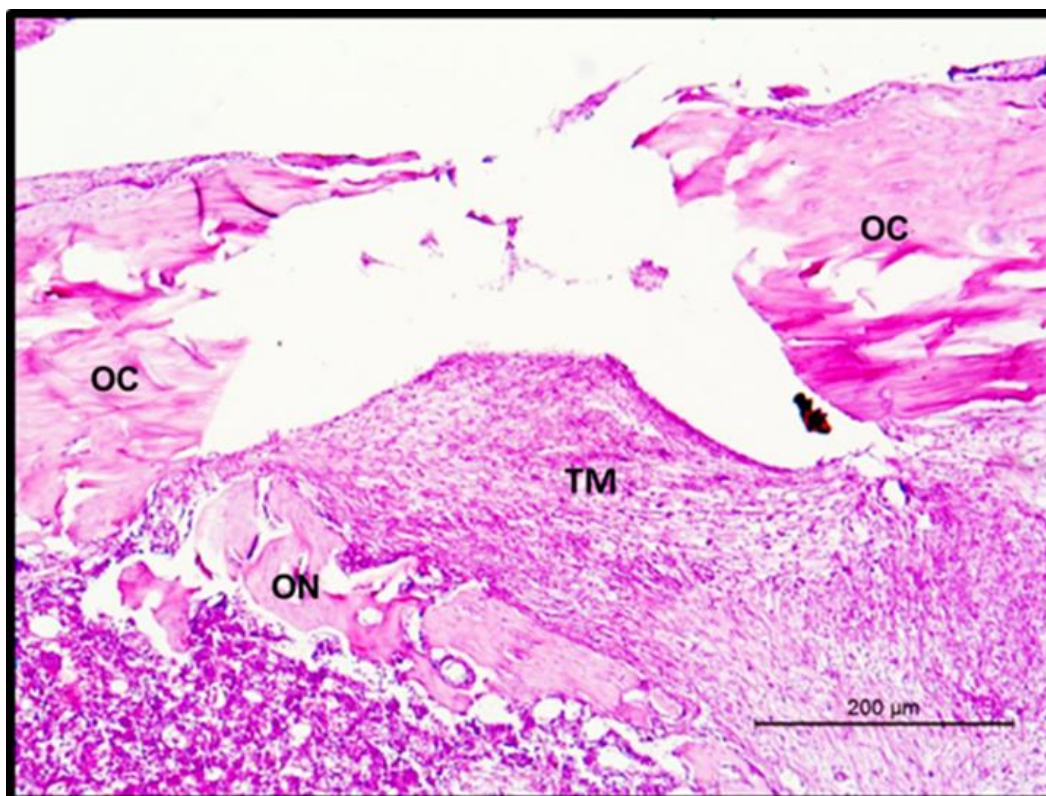


Fig.22: Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NT. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido mielofibroso (TM) localizados na região do defeito, entre o osso cortical (OC).

Em nenhum dos grupos foi observado infiltrado inflamatório, formação de cápsula fibrosa ou outros sinais de citotoxicidade.

As análises histopatológicas, não permitem a afirmação de que a presença dos NTCs foi capaz de promover a regeneração óssea. Isso pode ser justificado pelo número limitado de amostras e pelo curto intervalo de tempo decorrido após a realização do defeito, onde apenas pequenas áreas de tecido neoformado puderam ser observadas. No grupo NTCL observou-se um grande número de vasos sanguíneos. Como a

angiogênese tem papel extremamente importante no reparo tecidual, esse pode ser um indício de que a evolução do processo cicatricial nesse grupo possa ocorrer mais rapidamente nos estágios subsequentes da cicatrização, graças a essa intensa vascularização.

A presença de grânulos de NTC intracitoplasmáticos e também envoltos por osteóides, além da ausência de infiltrado inflamatório deixa clara a boa biodegradabilidade e biocompatibilidade desse material.

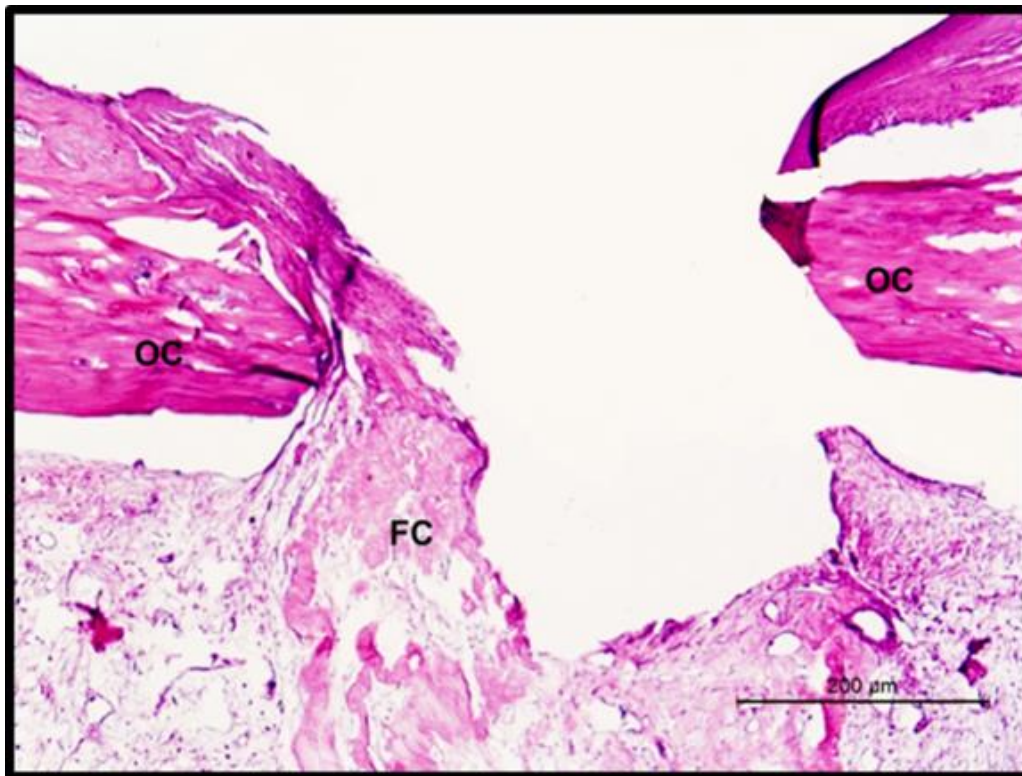


Fig.23: Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CL. Observa-se região de descontinuidade do osso cortical (OC) e abundante material eosinofílico sugestivo de fibras colágenas (FC).

Apesar dos achados terem sido limitados, a análise histopatológica suporta os achados observados nas análises de expressão gênica que sugerem uma melhor reposta de reparo na presença dos NTCs associados ao colágeno. Esses resultados trazem expectativas em relação ao uso dos NTCs como biomaterial na regeneração óssea, entretanto não são suficientes para determinar o seu sucesso. A análise dos eventos subsequentes se faz extremamente importante na determinação da capacidade osteoindutora dos NTC, pois assim será possível a determinação das respostas geradas pelo aumento da expressão dos genes envolvidos no reparo ósseo.

4.4. Conclusão

A análise qualitativa do PCR mostrou que os grupos tratados com a associação de NTCs e colágeno, após 15 dias de implantação óssea sob influência das placas de fixação rígida, apresentaram valores superiores na expressão dos genes responsáveis pela diferenciação de osteoblastos, formação de tecido ósseo e tecido conjuntivo, sugerindo melhor resposta do processo de reparo ósseo.

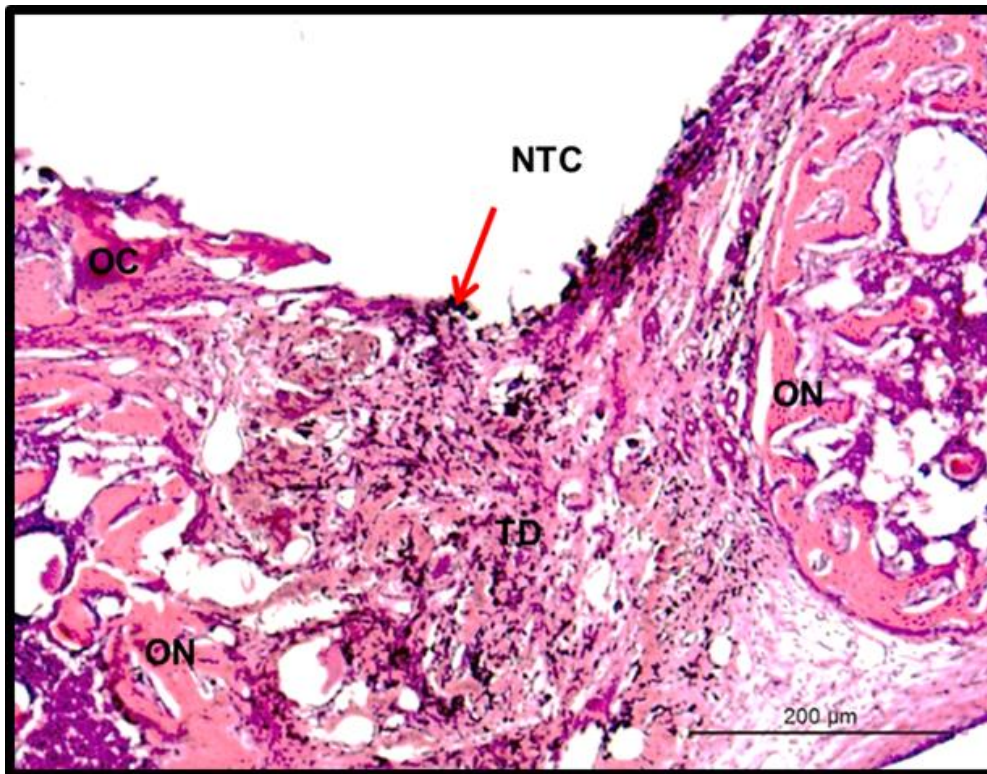


Fig.24: Fotomicroscopia de secções longitudinais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina, 15 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NTCL. Observa-se região de descontinuidade do osso cortical (OC) com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido em processo de diferenciação (TD) entremeadado com nanotubos de carbono (NTC).

5. CAPÍTULO 4: EFEITO DOS NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA SOB INFLUÊNCIA DE FIXAÇÃO INTERNA RÍGIDA.

RESUMO

A manutenção da massa óssea é regulada por diversos estímulos bioquímicos e mecânicos capazes de estimular a formação óssea. Reduções nas cargas mecânicas que atuam sobre o osso causam perdas ósseas significativas, assim como alterações na sua mineralização. Essas alterações podem ser observadas durante a utilização de fixações rígidas fazendo com que o processo de reparo ocorra de forma mais lenta. Com o intuito de contornar esses efeitos negativos causados pela presença das placas, biomateriais que auxiliem no processo de reparo tem sido pesquisados no últimos anos. Os NTCs têm apresentado resultados promissores relacionados ao seu potencial osteoindutor. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a formação óssea sob influência de fixação rígida em animais tratados ou não com NTCs por meio de análises tomográficas e histológicas. Foram usados 30 ratos Wistar submetidos a defeito ósseo na diáfise média do fêmur, com 2mm de diâmetro, estendendo-se de cortical a cortical. Os animais foram distribuídas em cinco grupos de acordo com o material de preenchimento recebido, sendo carbopol 2%, colágeno, NTCs associados ao carbopol, NTCs associados ao colágeno e sem preenchimento. Quarenta e cinco dias após a implantação dos materiais os animais foram eutanasiados e ossos tratados avaliados por meio de microtomografia e histologia. Na avaliação histológica observou-se sinais evidentes de biocompatibilidade e integração dos NTCs a matriz óssea em formação. A análise estatística qualitativa mostrou que nos grupos tratados (NT, CL e NTCL) houve maior presença de tecido ósseo e maior maturidade do tecido neoformado ($p < 0,05$). As análises tomográficas indicaram que não houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, exceto para grupo CP que apresentou índices inferiores para padrão trabecular, número Euler e separação trabecular indicando que o carbopol interferiu no processo de reparo ósseo e por isso o colágeno foi um veículo superior para os NTCs. Apesar de uma excelente biocompatibilidade os NTCs associados ou não ao colágeno não induziram a formação de tecido ósseo sob influência de fixação rígida.

Palavras chave: histologia; tomografia; osteoindução; biomaterial

5.1. Introdução

A manutenção da massa óssea é regulada por diversos estímulos bioquímicos e mecânicos que são reconhecidos pelas células ósseas que irão determinar uma resposta celular de produção ou reabsorção óssea (Gusmão e Belangero, 2009). Cargas mecânicas estimulam a formação óssea e suprimem a reabsorção, enquanto a falta dessas possui o efeito contrário. A redução

dessas cargas causam perdas ósseas significativas e mudanças na mineralização (Ehrlich e Lanyon, 2002). Essas alterações podem ser observadas durante a utilização de fixações rígidas no reparo de fraturas. Nesses casos, a ausência de estímulos mecânicos, devido à sustentação das cargas pela placa faz com que o processo de regeneração óssea ocorra de forma mais lenta (Fan et al., 2008). Apesar disso, as vantagens oferecidas por esse método,

como curto período de internação, rápido retorno das funções e baixa incidência de má união faz com seja amplamente usado na rotina ortopédica. Nos casos onde há extensa perda de massa óssea causada por infecções, tumores e traumas graves, além dos métodos de fixação, também é necessário o uso de enxertos ou biomateriais que auxiliem no reparo ósseo.

Nos últimos anos vários materiais têm sido estudados na tentativa de conseguir um substituto para o enxerto autólogo, considerado o padrão ouro no auxílio da regeneração óssea. Nesse contexto os NTCs tem tido destaque, pois sua estrutura em nanoescala é capaz de simular a estrutura da matriz extracelular, possibilitando sua interação com proteínas e células, contribuindo assim para o crescimento e migração celular (Tonelli et al., 2012). Além disso, seu potencial osteoindutor tem sido demonstrado. Segundo relatos, os NTCs são capazes de induzir a diferenciação de osteoblastos e também a formação de cristais de hidroxiapatita (Yamamoto et al., 2008; Silva et al., 2009).

A expectativa desse trabalho é de que, na presença dos NTCs, o efeito da blindagem de tensão causado pelas placas possa ser contornado e que a formação óssea possa ocorrer mais rapidamente. Dessa forma, o presente objetiva-se com esse estudo avaliar a formação óssea em ratos Wistar submetidos a defeitos ósseos no fêmur por meio de análises tomográficas e histológicas.

5.2. Material e método

5.2.1. Infraestrutura e animais

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos Departamentos de Morfologia e de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e do

Laboratório de Nanomateriais do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. O protocolo de experimentação desenvolveu-se nas dependências físicas dos Departamentos de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Biotério, Laboratório de Técnica Cirúrgica Veterinária, Laboratório de Patologia Veterinária e Laboratório de Toxicologia, todos na Escola de Veterinária – UFMG. Utilizaram-se 30 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, de três meses de idade com média de peso de 400g, provenientes do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos no CEPA (Centro Experimental de Pequenos Animais) da EV/UFMG, acondicionados em caixas plásticas com quatro ratos/caixa, sendo submetidos a ciclos de claro-escuro de 12h, em ambiente com temperatura controlada. Os animais foram desverminados com tiabendazol e submetidos a um período de adaptação de 30 dias. Durante todo período experimental, os animais receberam ração comercial para roedores (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo, além de micronutrientes) e água ad libitum. O projeto foi desenvolvido seguindo os princípios éticos preconizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (projeto aprovado sob protocolo nº 236/2011 (Anexo1).

5.2.2. Protocolos anestésico e cirúrgico

Quinze minutos antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam antibióticoterapia profilática com cefalotina sódica (30mg/kg, SC) e medicação pré-anestésica com cloridrato de tramadol (2mg/kg, SC). A indução e manutenção anestésica foram feitas com isoflurano, sendo a indução feita em caixa anestésica e a manutenção por meio de máscara em sistema semiaberto. Logo após a indução, o animal foi pesado em balança de precisão. Para evitar a hipotermia, foram colocadas bolsas de água quente sob a mesa onde o

animal estava posicionado para realização do procedimento cirúrgico.

Após a tricotomia e antissepsia do membro posterior esquerdo e respeitando rigorosamente a técnica cirúrgica asséptica, foi realizada incisão de pele e do tecido subcutâneo, na face lateral da coxa, abrangendo desde a região da epífise proximal do fêmur, até a distal. Realizou-se a incisão da fáscia lateral, seguida de divulsão das porções cranial e caudal do músculos bíceps femoral e deslocamento cranial do quadríceps lateral no fêmur, expondo-se sua diáfise. Foram usadas duas placas de neutralização, cada uma com 1,5mm de espessura, quatro parafusos com espaçamento no meio, sobrepostas para aumentar sua resistência (Fig. 25), posicionadas na porção dorso-lateral do fêmur para prevenir a fratura do mesmo após a realização do defeito.

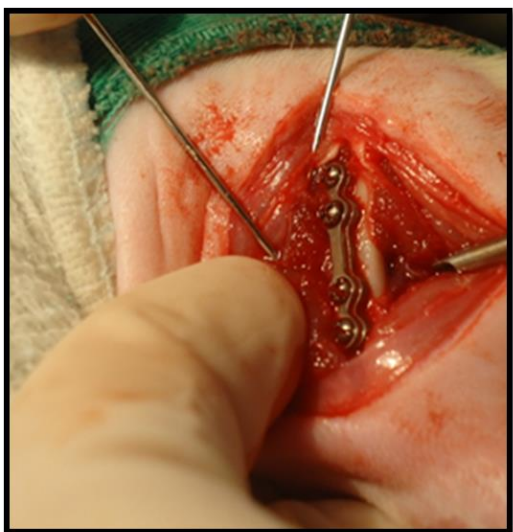


Fig. 25: Foto do procedimento cirúrgico realizado no fêmur esquerdo de ratos Wistar. Observam-se duas placas de titânio sobrepostas, posicionadas na face dorsal do osso.

Os fêmures foram submetidos a um defeito ósseo na diáfise média, com 2 mm de diâmetro, se estendendo da cortical lateral até a cortical medial, produzidos por um

broca de aço de mesmo diâmetro montada em uma microrretífica. A fim de se evitar o aquecimento dos tecidos, tal procedimento foi realizado em constante irrigação com solução salina 0,9%. O defeito foi preenchido de acordo com o tratamento estabelecido em cada grupo experimental. Em seguida, os músculos foram aproximados empregando-se padrão de sutura simples contínuo com fio absorvível de poligrecapone número 000 e a pele suturada com padrão contínuo intradérmico, sendo utilizado o mesmo fio.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em caixas aquecidas até completa recuperação anestésica, mantendo-se a temperatura ambiente em 37°C. O controle da dor foi realizado com cloridrato de tramadol (2mg/kg), administrado a cada 8h, via oral, durante três dias.

5.2.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos de forma aleatória, em cinco grupos cada um com 6 animais, conforme o material usado para preenchimento do defeito, exceto no grupo controle, onde o defeito não foi preenchido por nenhum material:

- Grupo Controle (CT): sem preenchimento
- Grupo Carbopol (CP): carbopol (gel inerte)
- Grupo Colágeno (CL): gel de colágeno
- Grupo Nanotubo de carbono (NT): NTC multiwall na concentração de 8% em carbopol
- Grupo Nanotubo + colágeno (NTCL): NTC multiwall na concentração de 8% em colágeno

5.2.4. Síntese do composto gel de colágeno + NTC multiwall

O colágeno foi cedido pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Desenvolvimento do Departamento de Morfologia do Instituto de

Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A obtenção do colágeno tipo I foi realizada a partir de caudas de ratos coletadas assepticamente, lavadas três vezes em água e três vezes em álcool 70% e em seguida armazenadas em freezer -70°C, conforme descrito por Kitten et al., (1996). Para extração do colágeno as caudas foram submersas em ácido acético na concentração 0.5 mol/L durante 48h a temperatura de 4°C. A solução resultante foi filtrada em várias camadas e gaze para remoção de pequenos vasos e debris teciduais. O filtrado resultante foi centrifugado (14,000g) durante uma hora. O sobrenadante foi coletado e dializado por meio de trocas de ácido acético (0.02 mol/L), mantidos em geladeira a 4°C durante um período de três dias. A concentração final da solução de colágeno usada no presente estudo foi de 5.6 mg/mL contendo mais de 98% de colágeno Tipo I. Após a adição dos meios para ajuste do pH (~pH 7,4), as moléculas de colágeno solubilizadas nessa solução se associam formando fibrilas que subsequentemente formarão um gel tridimensional estável.

Nanotubos de carbono de múltiplas paredes (NWNT multiwalled nanotubes) crescidos por CVD (Chemical Vapour Deposition) usando como fonte precursora de carbono o gás etileno C₂H₄ e gás de arraste Ar (argônio) e como suporte de crescimento óxido de magnésio dopado com Fe e Co na proporção 5% Fe 5% Co em peso. A temperatura de crescimento foi de 750 C e o tempo de 30 minutos. Após a produção os NTCs passaram por um processo de purificação no qual esses são submetidos a um tratamento térmico a 390 C durante 30 minutos sob atmosfera ambiente de modo a queimar resíduos de carbono amorfo. Em seguida um tratamento com HCl/H₂O 50/50 durante 24 h de modo a eliminar o óxido de magnésio e as partículas de óxido de ferro e cobalto presentes no material. Em seguida realizou-se ultrafiltração e lavagem com água DI usando filtro Millipore de 4

micra em PTFE com várias passagens de água para ajuste do pH (~7) Para tornar os NTCs hidrofílicos e possibilitar sua interação com sistemas biológicos eles foram adicionados a uma mistura de H₂SO₄/HNO₃ 1:3 sob ação de radiação de micro-ondas. Na sequência os NTCs foram submetidos a sucessivas lavagens com água deionizada para retirada do ácido e em seguida centrifugados. Por se tratar de um material em pó, os NTCs precisaram de um veículo para tornar possível sua implantação no defeito realizado no fêmur. Os veículos usados nesse trabalho foram o carbopol 2% e o gel de colágeno. Inicialmente, os MWNTC foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C, para logo após, serem diluídos em água ultra pura na concentração de 800µg/mL. Essa diluição foi realizada inicialmente em banho de ultrassom durante 30 min. Em seguida, a solução foi diluída em sonificador de ponta, em ciclos de 30 segundos e intervalos de 10 segundos imerso em gelo, repetidos cinco vezes.

Após sua diluição em água, os NTCs foram misturados ao colágeno e/ou carbopol, conforme a determinação descrita a seguir:

- Para 1mL da solução de NT = 0,1ml de solução de MWCNT + 0,65ml de água destilada + 0,25 ml de carbopol 2%
- Para 1mL da solução de NTCL = 0,1ml de solução de MWCNT + 0,41ml de água + 0,36ml de colágeno + 0,1ml de meio + 0,015 ml de NaOH o que resultou em uma solução final de colágeno na concentração de 2mg/ml.

5.2.5. Coleta de amostras

Os animais foram submetidos à eutanásia 45 dias após a indução da lesão e o tratamento com sobredose de tiopental sódico²⁷ (100 mg/kg) por via intraperitoneal. Imediatamente após, realizou-se necropsia, sendo coletados os

fêmures esquerdo. Tais amostras foram imediatamente fixadas em formalina a 10%, neutra e tamponada para análises histopatológicas.

5.2.6. Processamento e análise histológica

As amostras de fêmur foram submetidas a processo de descalcificação em solução de ácido fórmico a 24%, sendo esta solução trocada a cada 2 dias, durante 45 dias. Após a completa descalcificação, os ossos foram lavados em água corrente durante 24h e seccionados transversalmente, sendo destinada a análise apenas a região correspondente ao defeito. Todas as amostras foram processadas pela técnica de rotina para inclusão em parafina e posteriormente seccionadas em cortes de 5µm e coradas segundo a técnica de hematoxilina e eosina e avaliadas em microscópio de luz, a fim de se descrever o processo de regeneração óssea nos ossos e possíveis lesões histopatológicas no fígado e rins.

Para descrever a evolução do processo de regeneração óssea foram atribuídos escores de 1(leve), 2 (moderado) e 3 (intenso), para os seguintes itens avaliados:

- Presença de tecido mielofibroso
- Presença de tecido ósseo neoformado
- Maturidade do tecido neoformado
- Organização do tecido mielofibroso

5.2.7. Análise tomográfica

A análise tomográfica foi realizada 48h após a coleta e fixação dos fêmures em formalina 10% tamponada. O equipamento usado foi o SkyScan 1172, localizado no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais. As análises foram geradas com 59 kVp, 170 µA e um filtro de alumínio de 0,5mm foi

usado. O processamento das imagens foi realizado no programa SkyScan CT-Analyser v.1.10. Duas análises foram geradas, na primeira foi estabelecida uma região de interesse (ROI) padronizada, incluindo toda a região do defeito, realizado na porção média da diáfise, na qual foram gerados vários cortes bidimensionais (± 900 cortes para cada amostra) de 8 µm cada. Devido ao grande número de cortes, a análise estatística foi feita a partir das médias obtidas de cada animal. A segunda análise teve com objetivo a avaliação apenas da região central do defeito, excluindo a periferia e consequentemente possíveis erros durante a penetração da broca. Para isso a região de interesse foi dividida em três porções (Fig. 26): proximal, média e distal, determinada por meio divisão do número total de cortes gerados na região do defeito por três. Foi calculada a média dessas três regiões para cada animal. Em seguida o seguinte cálculo foi realizado:

$$\left(\frac{MTP + MTD}{2}\right) - MTC$$

MTP = Média do terço proximal

MTD = Média do terço distal

MTC = Média do terço médio

Os seguintes índices morfométricos da tomografia foram avaliados:

- ✓ Área óssea total
- ✓ % de área óssea
- ✓ Padrão trabecular
- ✓ Número de Euler
- ✓ % de poros fechados
- ✓ Separação de trabéculas
- ✓ % de poros abertos
- ✓ Área total de poros
- ✓ Espessura trabecular

- ✓ Número de trabéculas
- ✓ Momento de inércia

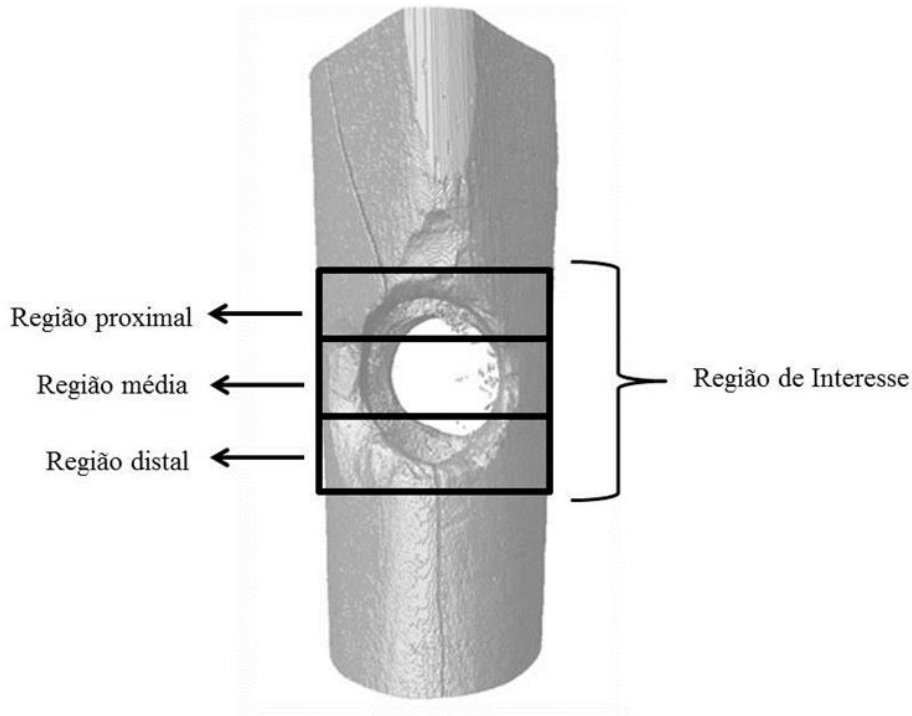


Fig. 26: Esquema representativo da segunda análise tomográfica realizada na região de interesse (diáfise média do fêmur). A região de interesse foi dividida em três porções: proximal, média e distal, determinada pela divisão do número total de cortes gerados na região do defeito por três.

5.2.8. Delineamento experimental e análise estatística

Utilizou-se delineamento do tipo parcela subdividida, onde os tratamentos foram as parcelas e os tempos as subparcelas. Para comparação entre grupos em cada tempo utilizou-se análise de variância inteiramente casualizada seguida do teste de Student Neumann Keuls para comparação entre médias utilizou-se de teste t de Student pareado. Para as análises não paramétricas utilizou-se a análise de variância e o teste de Dunnett's na comparação entre os grupos. Para todos os testes considerou-se nível de significância $p < 0,05$.

5.3. Resultados e discussão

Os animais apresentaram uma boa recuperação anestésica não havendo complicações em relação ao procedimento ortopédico durante os 45 dias do experimento, exceto um animal do grupo CP que apresentou perda dos movimentos do membro operado após a cirurgia e por isso foi retirado do estudo.

5.3.1. Análises histopatológicas

A avaliação anatomohistopatológica dos ossos apresentou os seguintes resultados:

Grupo CT = nas duas regiões do defeito observou-se área focalmente extensa e intensa de tecido mielofibroso associado a

áreas multifocais de necrose, circundados por áreas de osso trabecular neoformado (Fig. 27).

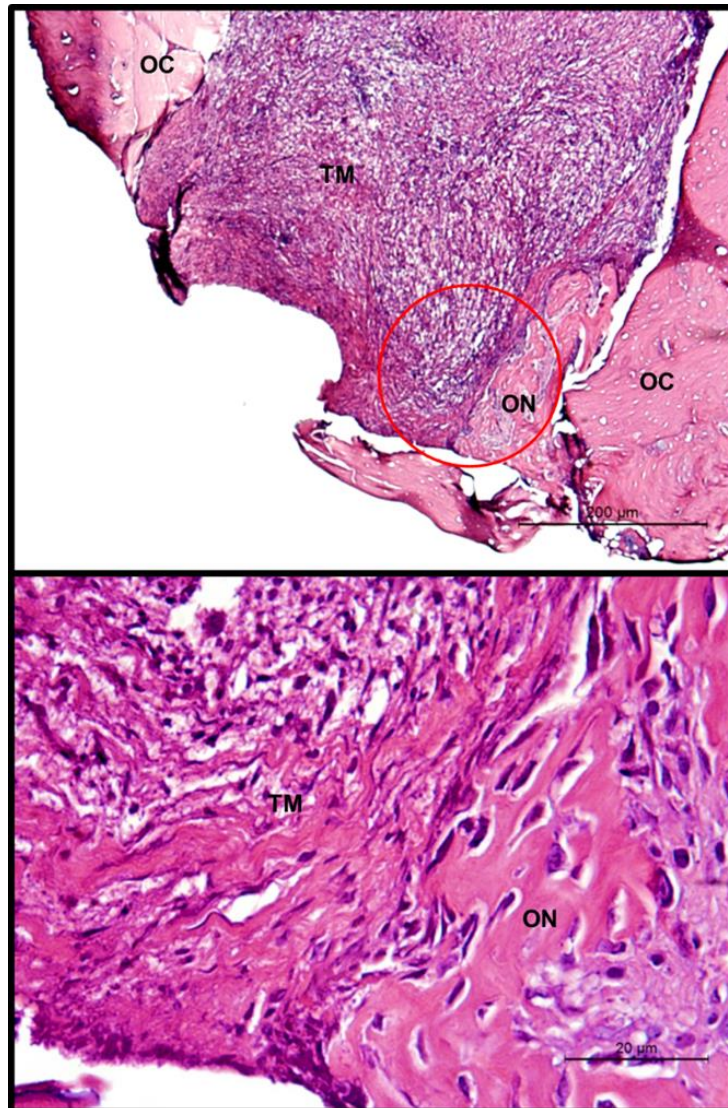


Fig. 27: Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CT. Observa-se uma área de descontinuidade de osso cortical preenchida por tecido mielofibroso (TM), com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) e em suas laterais, osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de transição do tecido mielofibroso (TM) e tecido ósseo neoformado (ON).

Grupo CP = Áreas de perda óssea com regiões de mielofibrose focalmente extensa,

moderada, na superfície externa da cortical na região de perióstio. Na porção

contralateral do osso observou-se uma área com neoformação óssea aonde a matriz se encontra bem mineralizada com lacunas em

seu interior hora vazias, hora ocupadas por osteócitos que apresentam núcleo condensado (Fig. 28).

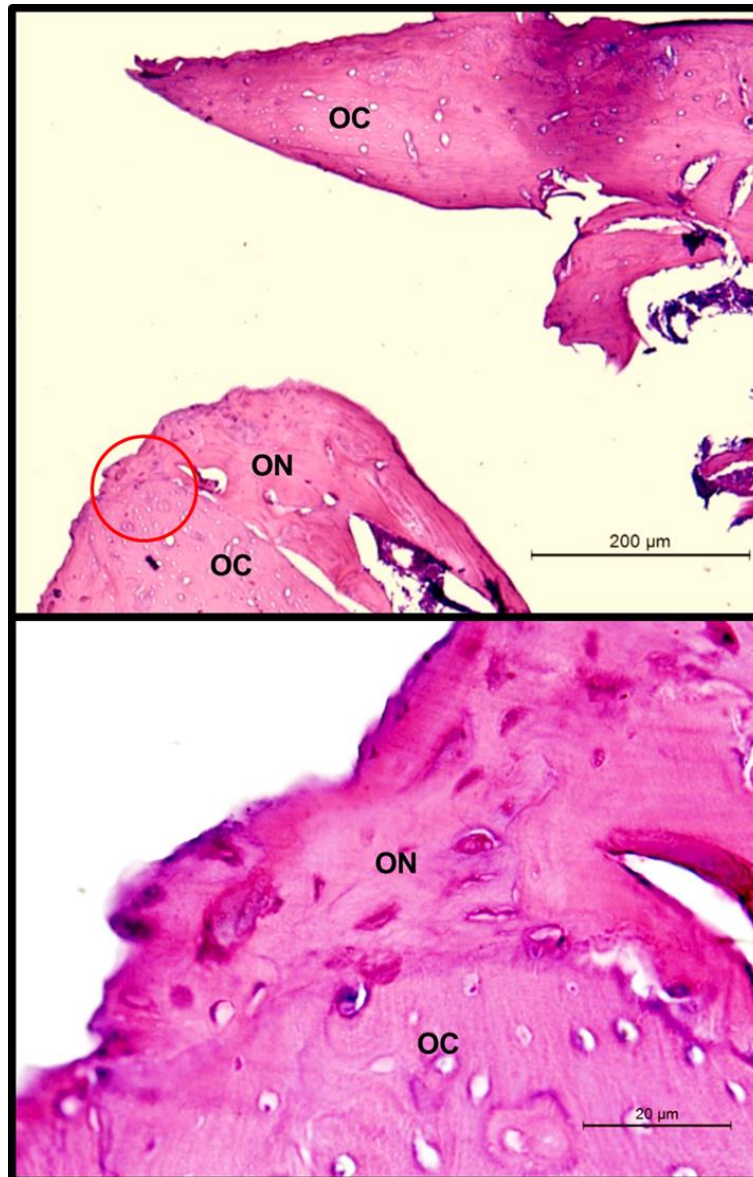


Fig. 28: Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CP. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) localizados entre as extremidades de osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de transição entre osso cortical pré-existente (OC) e tecido ósseo neoformado (ON).

Grupo CL = Ambos os lados do defeito apresentam área de perda óssea completa sendo que em um dos lados observou-se mielofibroose focalmente extensa, moderada. O tecido fibroso apresenta-se mais

organizado, com áreas discretas de neovascularização. Há também áreas focais com formação de matiz óssea não mineralizada (osteóide) (Fig.29).

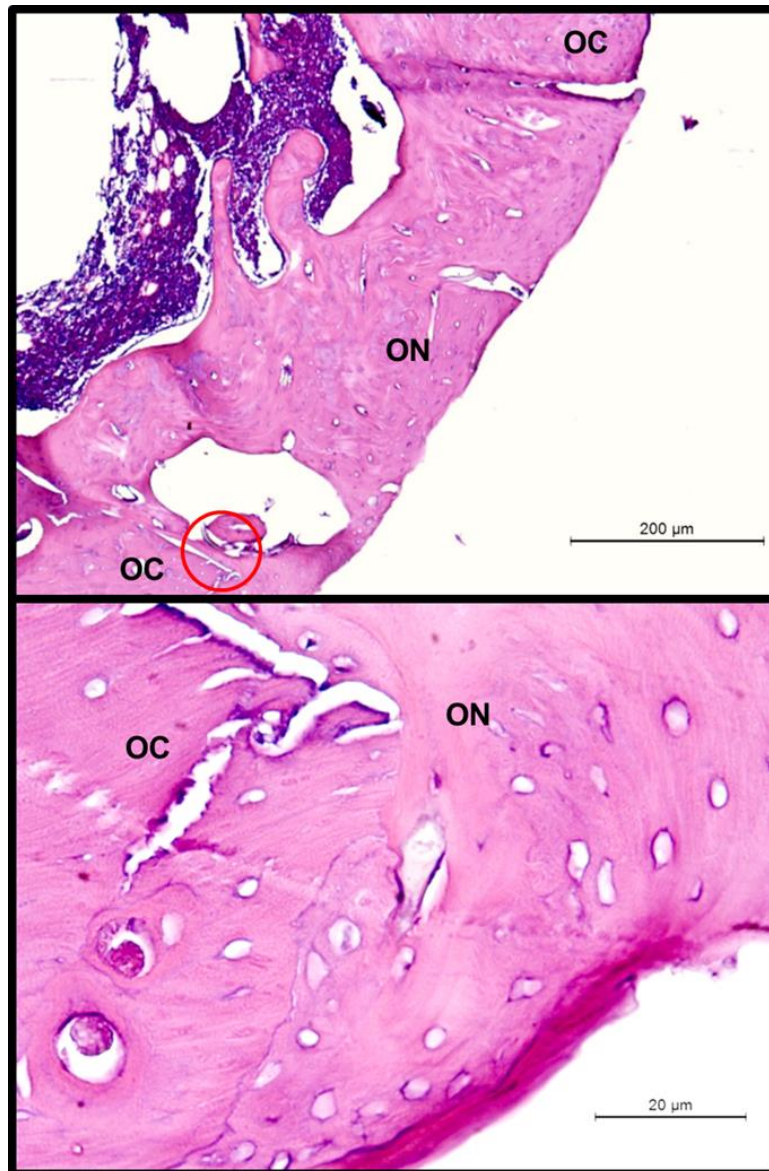


Fig. 29: Fotomicroscopia de secções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo CL. Observa-se região de tecido ósseo neoformado (ON) localizados entre as extremidades de osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de transição entre osso cortical pré-existente (OC) e tecido ósseo neoformado (ON).

Grupo NT = Área de tecido conjuntivo denso focalmente extenso, moderado, associado a pigmento escuro revestindo a superfície externa da cortical em uma das áreas de descontinuidade óssea. Na região contralateral, área focalmente extensa de tecido conjuntivo denso mais organizado

característico de tecido colagênico. Aumento de celularidade no centro da área de mielofibrose circundada pelo pigmento preto, sendo essas células poligonais volumosas com núcleo de cromatina frouxa ou densa sugestivo de osteoblastos (Fig. 30).

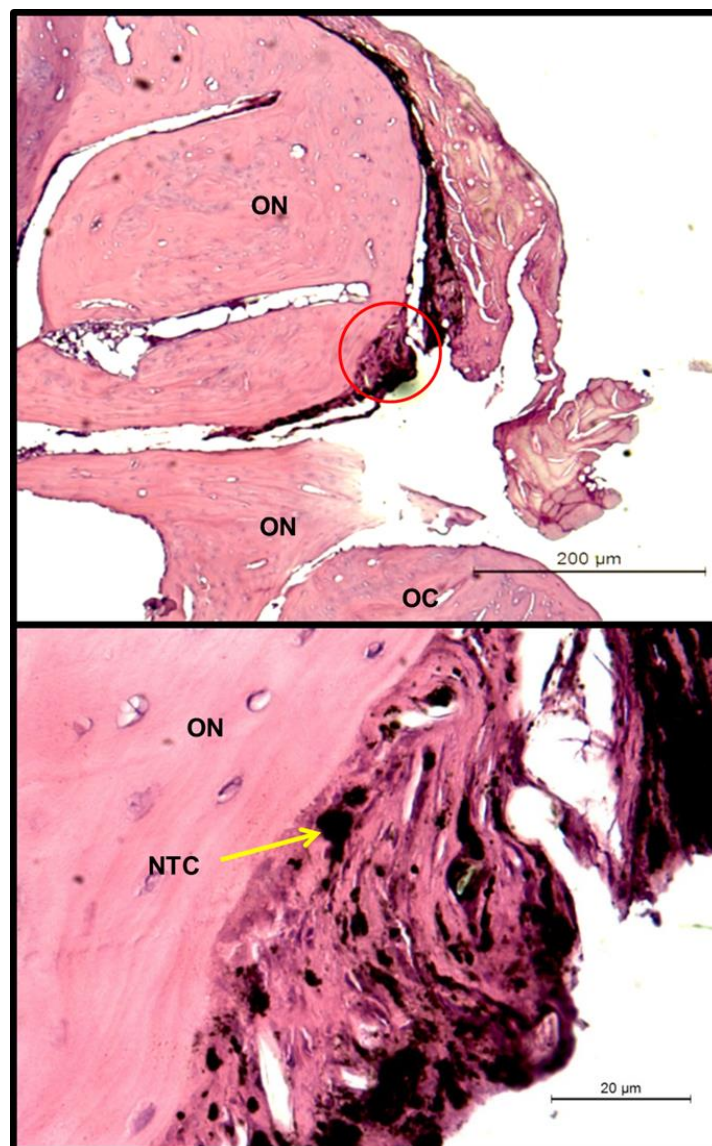


Fig. 30: Fotomicroscopia de seções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NT. Observa-se região de descontinuidade óssea com regiões de tecido ósseo neoformado (ON) localizados entre as extremidades de osso cortical (OC). Em destaque observa-se região de tecido ósseo neoformado (ON) circundado por material amorfo impregnado com nanotubos de carbono (NTC).

Grupo NTCL = Áreas de neoformação óssea com matriz óssea bem mineralizada e evidência de linhas de sementação. Lacunas ora vazias, ora ocupadas por

osteócitos. Observou-se áreas apresentando intensa angiogênese tanto no tecido ósseo quanto no tecido fibroso (Fig.31)

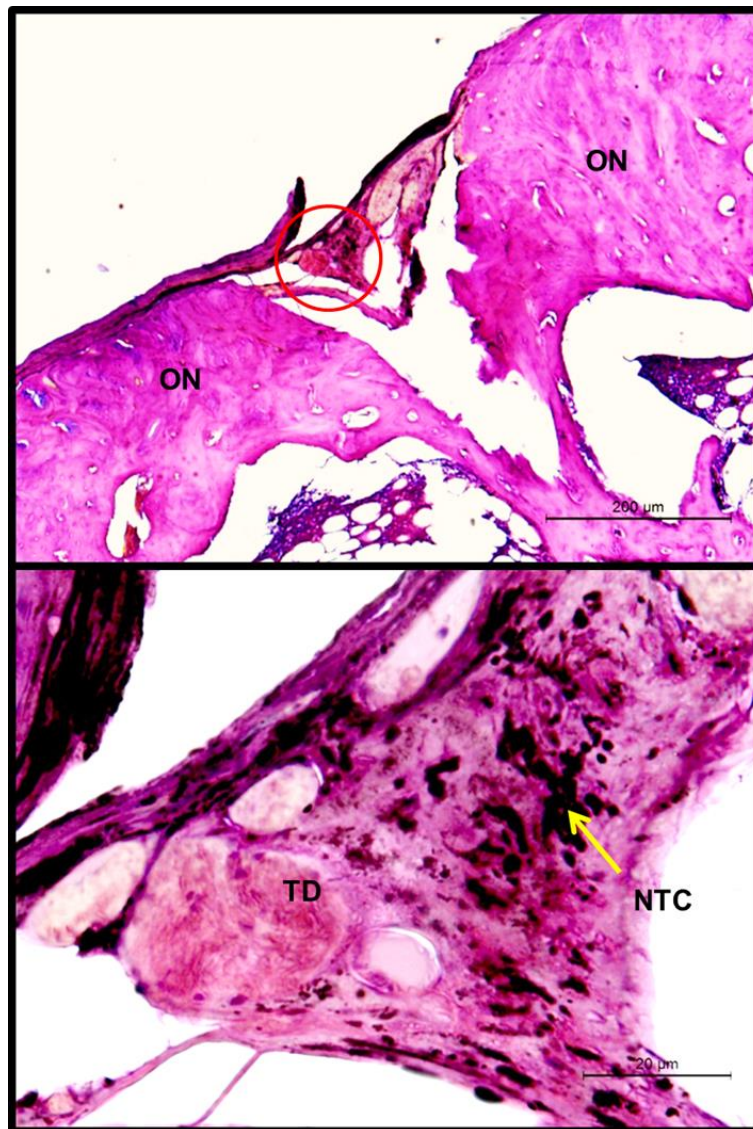


Fig. 31: Fotomicroscopia de seções transversais do fêmur de ratos Wistar coradas com hematoxilina e eosina 45 dias após a realização do defeito ósseo no grupo NTCL. Observa-se região de tecido ósseo neoformado (ON) com presença de tecido amorfo (TD) entremeado com nanotubos de carbono(NTC). Em destaque observa-se região de tecido em fase de diferenciação (TD) impregnado com nanotubos de carbono (NTC).

A presença dos NTCs não induziu alterações inflamatórias apresentando evidentes sinais de biocompatibilidade e integração à matriz óssea em formação. Além disso, não houve nenhuma reação entre os NTCs e as placas de titânio usadas para estabilizar a região onde foi realizado o defeito, indicando uma boa interação entre esses materiais. Resultados promissores, demonstrando biocompatibilidade, osteointegração e osteocondução já foram relatados em estudos in vivo. A exemplo, partículas de NTCs de parede múltipla aderiram diretamente em defeitos tibiais induzidos em ratos, e se integraram à matriz óssea, sem interferir no reparo ósseo e se tornando integradas ao tecido ósseo (Usui et al.,

2008). Em ovinos, testou-se um composto de hidroxiapatita, polimetilmetacrilato e NTCs funcionalizados em defeitos realizados na tibia. Doze semanas após a implantação, as análises histológicas mostraram cobertura periosteal da superfície do implante e ausência de reações adversas na interface entre osso cortical e o implante. Não foram observadas células inflamatórias nem tecido fibroso e houve clara penetração de novo osso nos poros do material (Shing et al., 2010).

Para melhor caracterizar o processo de regeneração óssea foram estabelecidos escores de um a três sendo um para leve, dois para moderado, e três para intenso para os itens relacionados na Tab.7.

Tab.7: Médias e erros-padrão dos escores atribuídos na avaliação microscópica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito . Escores variaram de 1 a 3 sendo 1 leve, 2 moderado e 3 intenso.

Avaliação Histológica					
	CT	CP	CL	NT	NTCL
Presença de tecido mielofibroso	2,25 ±	1,5 ±	2 ±	1 ±	1,75 ±
Presença de tecido ósseo neoformado	0,96	0,58	0,82	0	0,96
Maturidade do tecido neoformado	1 ±	1,5 ±	2,25 ±	2,5 ±	2,25 ±
Organização do tecido mielofibroso	0	0,58	0,96	0,58	0,6
Maturidade do tecido neoformado	1 ±	1,5 ±	2 ±	1,75 ±	2 ±
Organização do tecido mielofibroso	0	0,58	0,82	0,96	0
Organização do tecido mielofibroso	2,25 ±	1,5 ±	2,25 ±	1,5 ±	2,5 ±
Organização do tecido mielofibroso	0,5	0,58	0,96	0,58	0,58

A análise estatística qualitativa do processo de regeneração óssea demonstrou que nos grupos tratados houve maior formação de

tecido ósseo ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu na avaliação da maturidade óssea (Fig. 32).

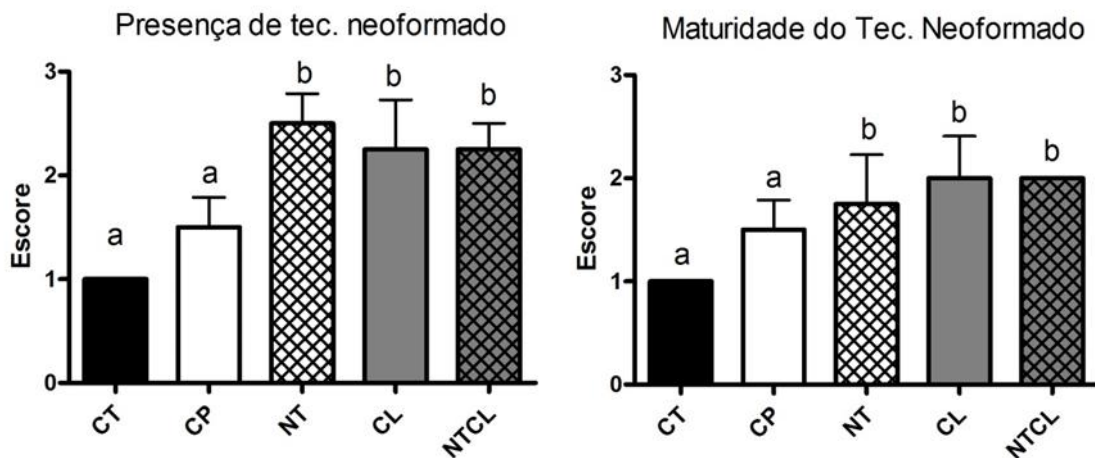


Fig.32: Médias e erros-padrão dos escores atribuídos na avaliação microscópica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Escores variaram de 1 a 3 sendo 1 leve, 2 moderado e 3 intenso. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

A análise desses resultados indica um potencial osteoindutor dos NTCs e do colágeno. Existem duas teorias relacionadas à capacidade dos NTCs em induzir a formação óssea. Uma delas é de que NTCs de parede múltipla são capazes de promover a formação óssea por meio de sua interação com osteoblastos (Shimizu et al., 2012). A aceleração na diferenciação destas células é atribuída ao acúmulo de cálcio promovido pelos NTCs que quando detectada pelos osteoblastos indiferenciados, faz com que esses se diferenciem, promovendo a calcificação. A absorção de cálcio pelos NTCs de parede múltipla é atribuída ao seu potencial negativo, que atrai os íons de cálcio (Yamamoto et al., 2008). A segunda teoria é de que aceleração na maturação dos osteoblastos estaria relacionada à capacidade dos NTCs em adsorver proteínas. Essa capacidade é atribuída à sua estrutura específica e extensa área de superfície, além das propriedades eletrônicas e catalíticas. Pela área de superfície maior, a quantidade de fatores de crescimento absorvida é maior e

consequentemente o recrutamento e ativação celular (Li et al., 2008).

Apesar de não estarem claros quais os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação e maturação dos osteoblastos induzidas pelos NTCs, sua presença in vivo foi capaz de acelerar o processo de formação e maturação óssea, mesmo na presença de placas de fixação rígida, onde essa diferenciação ocorre de forma mais lenta devido à diminuição dos estímulos mecânicos. A boa interação entre o titânio e os NTCs é mais fator que contribui para o sucesso da aplicação destes como biomaterial na regeneração óssea.

5.3.2. Análises tomográficas

5.3.2.1. Análise das médias gerais

Na avaliação dos índices morfométricos da MTC observou-se que não houve diferença na comparação entre grupos para os seguintes parâmetros: área óssea total, % de área óssea, % de poros abertos, porosidade total e momento de inércia, enquanto para

padrão trabecular, número Euler, % de poros fechados, espessura trabecular, números de trabéculas e separação de

trabéculas houve diferença entre os grupos ($p < 0,05$, Fig. 33 e 34).

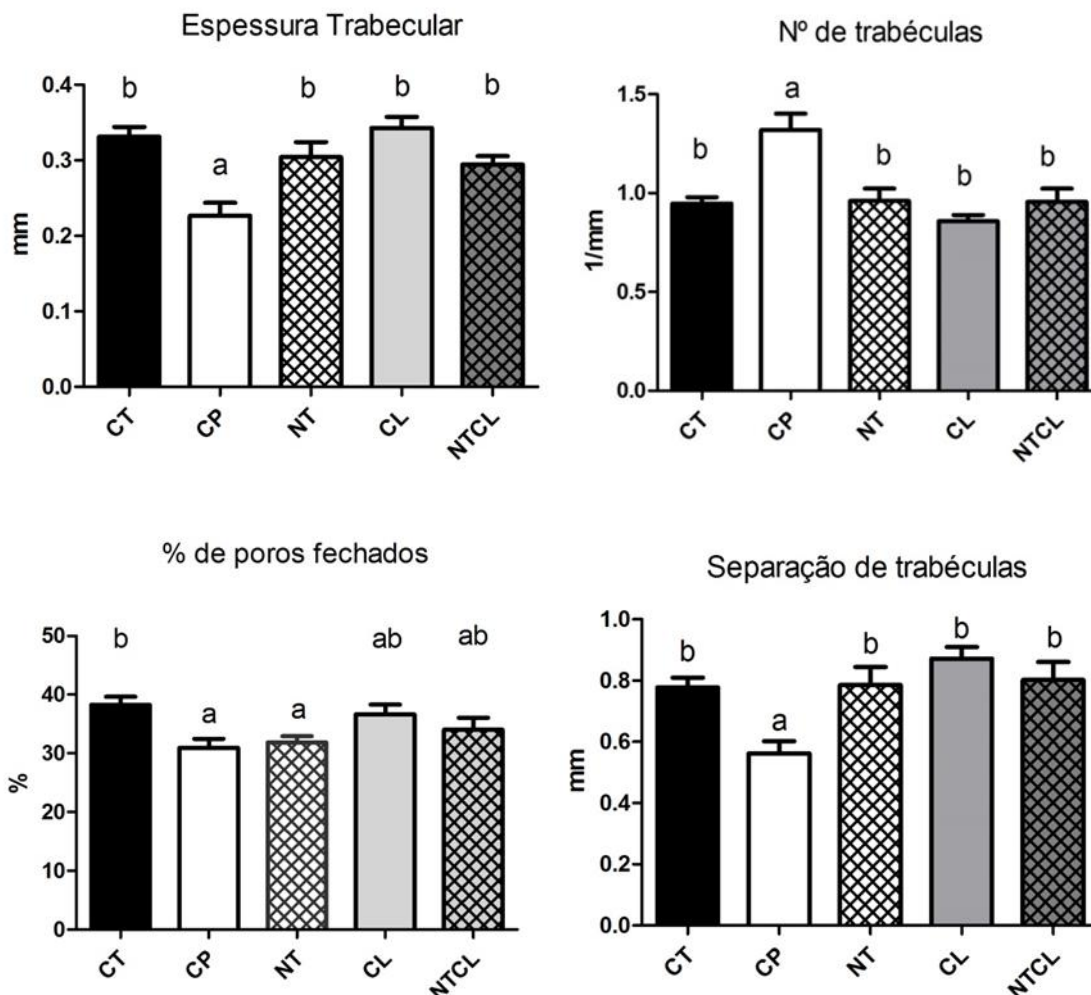


Fig. 33 : Médias e erros-padrão dos valores referentes a avaliação microtomográfica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Entre as diferenças encontradas, destaca-se o grupo CP que foi diferente dos demais em todas as análises, exceto porcentagem de poros fechados. Nesse grupo os valores dos números de trabéculas foram superiores que os demais, enquanto os valores de padrão trabecular, espessura e separação de

trabéculas e número de Euler foram inferiores. Este resultado foi de certa forma inesperado, uma vez que o carbopol é considerado um gel inerte e vem sendo utilizado como controle para comparação de preenchimentos com biomateriais em falhas ósseas (Mendes et al., 2010).

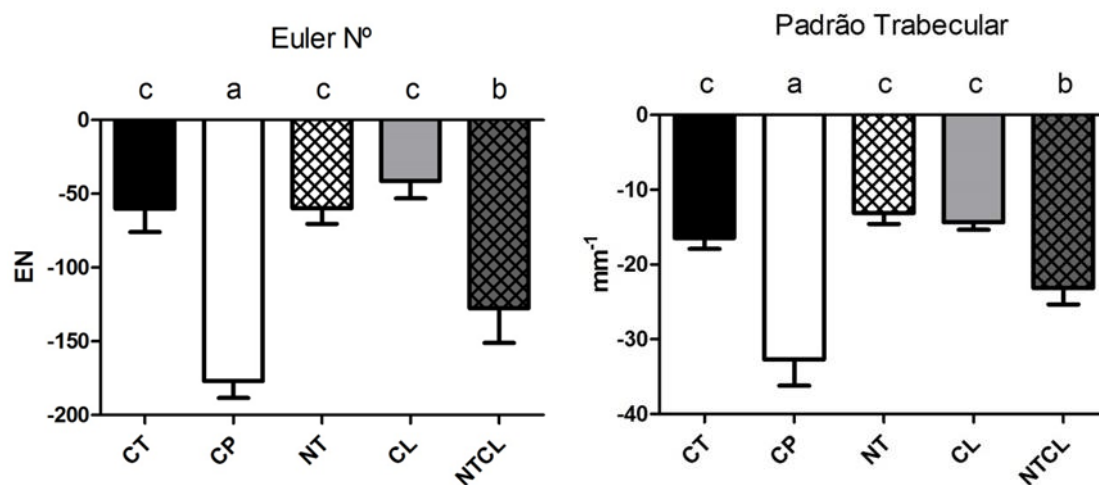


Fig. 34: Médias e erros-padrão dos valores referentes a avaliação microtomográfica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Apesar das trabéculas no grupo CP serem as com menor espessura, a maior quantidade de trabéculas associadas a valores inferiores para padrão trabecular, número de Euler e separação trabecular indicam melhor conectividade trabecular nesse grupo. A análise do número de Euler fornece uma medida da densidade de conectividade, indicando o número de ligações redundantes entre estruturas trabeculares por unidade de volume, valores maiores indicam maior desconectividade (Vermeirsch et al., 2004). O padrão trabecular também está relacionado à conectividade trabecular, quanto menor seu valor, melhor a conectividade entre as trabéculas (Skyscan, 2009)

Bons indicadores de conectividade trabecular foram verificados no tratamento com colágeno associado aos NTCs, uma vez que os valores do grupo NTCL, apesar de não alcançarem os do grupo CP, diferiram dos demais grupos (CN, NT e CL) para o número de Euler e padrão trabecular.

No osso cortical, as propriedades mecânicas são influenciadas pela porosidade, nível de mineralização e organização da matriz mineralizada (Young Rho et al., 1998). Segundo Martin e colaboradores (1991) ossos mais densos estão associados a um maior número de poros fechados enquanto ossos menos densos a um maior número de poros abertos. Em relação à porcentagem de poros fechados, não houve diferença entre os tratamentos, contudo os valores dos grupos CP e NT foram inferiores ao grupo controle.

5.3.2.2. Análise das médias centrais

Na análise comparativa entre o centro da lesão com suas margens pôde-se detectar aspectos que passaram despercebidos na análise de toda área. Assim percebeu-se que os grupos tratados com colágeno associado ou não aos NTCs (CL e NTCL) apresentaram menor diferença de porcentagem óssea central quando comparadas com defeitos preenchidos com carbopol associado ou não aos NTCs (CP e NT), como observado na Fig. 35. Embora

esses achados demonstrarem uma superioridade da utilização de colágeno como veículo em comparação com o

carbopol, esses resultados não diferiram do grupo controle, que não recebeu qualquer tipo de preenchimento.

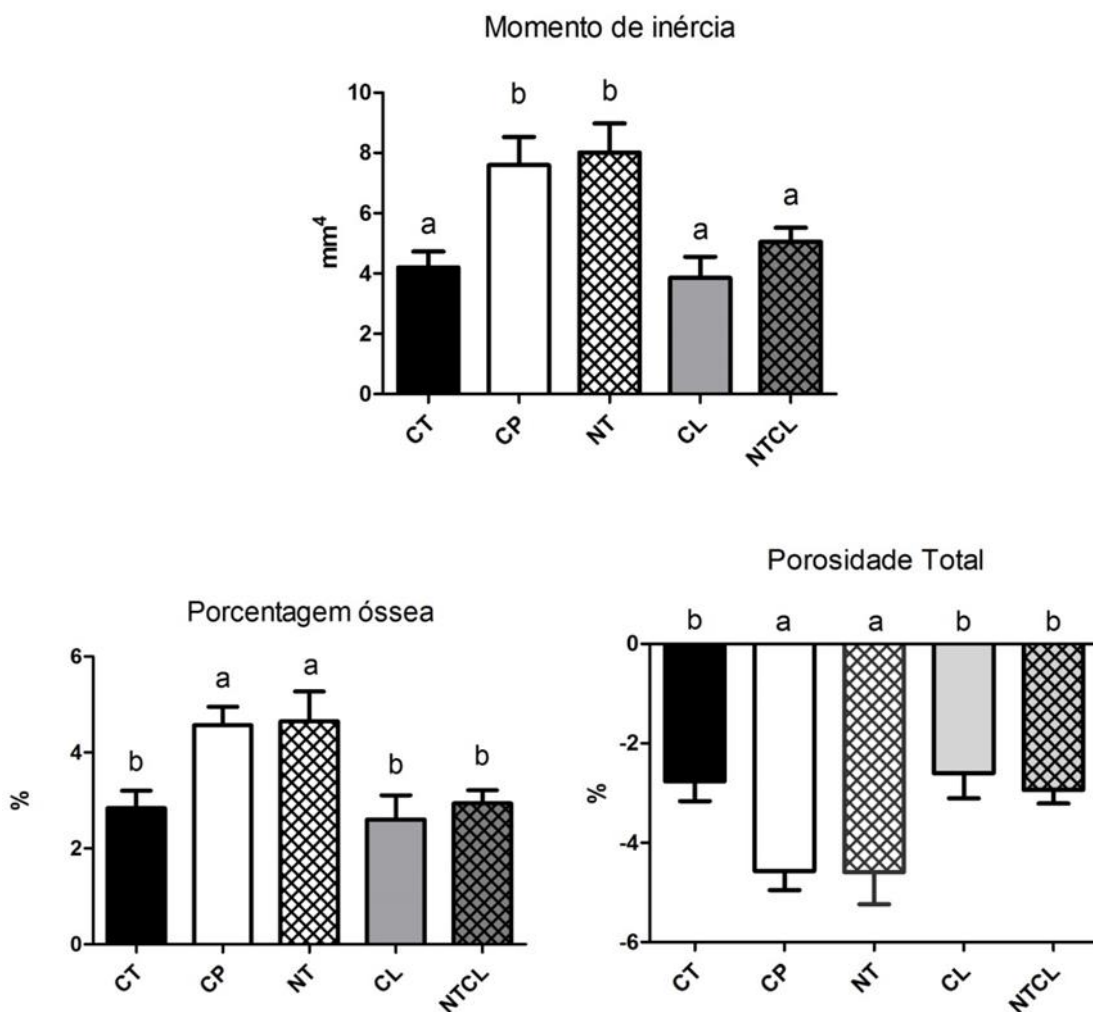


Fig. 35: Médias e erros-padrão dos valores referentes a avaliação microtomográfica do fêmur de ratos Wistar submetidos a defeito ósseo. Grupo controle (CT), tratados com carbopol (CP), colágeno (CL), nanotubos de carbono associado a carbopol (NT) e nanotubos de carbono associados a colágeno (NTCL) 45 dias após a realização do defeito (T1). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Resultado semelhante foi observado para o momento de inércia que foi maior e para a porosidade total que foi menor nos grupos CL e CLNT. O momento de inercia é um índice de força que indica resistência à rotação em torno de um determinado eixo

(Skyscan, 2009). Sendo assim, a interpretação desses dados sugere uma maior resistência central para os grupos tratados com colágeno, mas novamente, sem diferença para o controle negativo.

Sugere-se que a diferença entre resultados das médias gerais e centrais pode ter sido causada pelos diferentes estágios de regeneração em que as porções do defeito ósseo se encontram. Na análise das imagens

observa-se a diminuição das bordas do defeito o que indica que a regeneração óssea nessas porções já ocorreu, enquanto no centro do defeito o processo de reparo ainda está em andamento (Fig. 36).

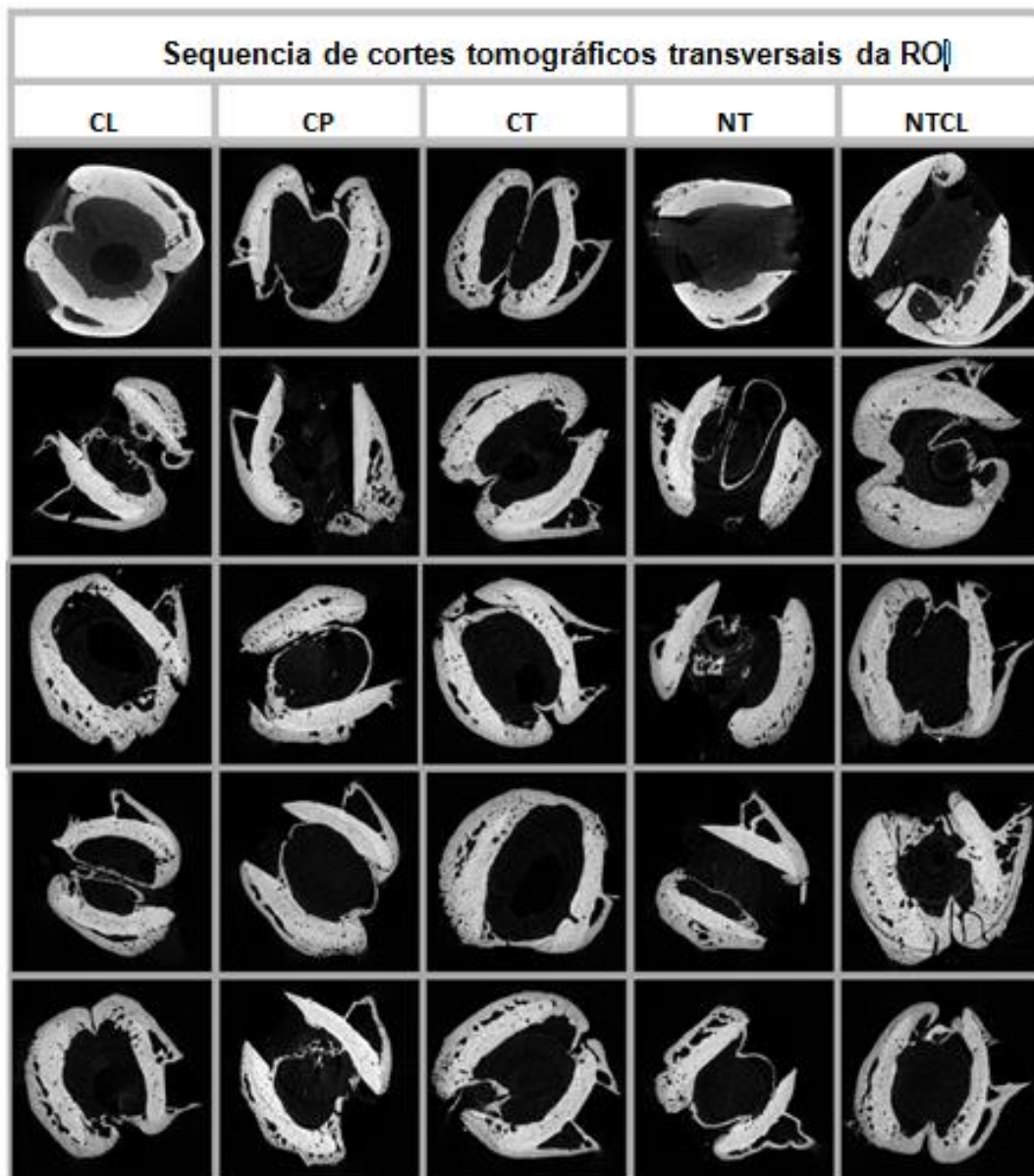


Fig. 36: Sequência de cortes tomográficos transversais da região de interesse realizados em uma amostra, nos diferentes grupos avaliados neste estudo.

Apesar dos grupos tratados com colágeno e/ou NTCs apresentarem escores superiores para deposição de tecido neoformado na análise histológica, o estudo por MTC não revelou maior deposição de tecido ósseo. Até pouco tempo, técnicas de histologia quantitativa eram o padrão para avaliação de osso trabecular e cortical. Embora essa análise forneça informações únicas a respeito da celularidade e índices dinâmicos de remodelamento ósseo, ela possui limitações no que se refere ao acesso da microarquitetura óssea (Bouxsein et al., 2010). A microtomografia computadorizada tem sido usada em vários trabalhos como um método de avaliação da arquitetura óssea e hoje se tornou uma análise de grande importância (Rüegsegger et al., 1996). Por meio da avaliação da imagem é possível quantificar vários componentes morfométricos como espessura, espaçamento e número de trabéculas (Cancedda et al., 2007)

No presente estudo, considerou-se que tanto a microtomografia e quanto a avaliação anatomohistomorfométrica foram fundamentais para o entendimento do processo de reparo da falha óssea. Os achados da MTC demonstram que carbopol não é uma substância tão inerte como parece, pois permitiu uma maior conectividade trabecular no defeito. Tal conectividade, contudo não garantiu melhor preenchimento ósseo, maior resistência ou menor porosidade no centro do defeito, uma vez que os grupos que usaram colágeno associado ou não aos NTCs foram

superiores. Também de forma interessante, observou-se que embora os achados histológicos tenham relevado evidências de um efeito benéfico do preenchimento com colágeno e NTCs, o uso desses materiais não foi suficiente para oferecer maior preenchimento ósseo e/ou resistência quando comparado ao grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de preenchimento.

5.4. Conclusão

Dentro do período estudado o tratamento com NTCs ou colágeno induziram uma maior deposição óssea e melhores características tomográficas de resistência mecânica em falhas ósseas na diáfise de fêmur murino sob influência das placas de fixação rígida .

O carbopol não é um preenchimento para falhas ósseas totalmente inerte, pois induziu alterações no número, espessura e conectividade de trabéculas ósseas na diáfise de fêmur murino implantada com placa de neutralização de titânio.

O colágeno demonstrou ser um veículo superior ao carbopol para NTCs pois, comparativamente, induziu mais características tomográficas de resistência mecânica em falhas ósseas na diáfise de fêmur murino implantada com placa de neutralização de titânio.

6. CONCLUSÃO GERAL

Os NTCs mostraram uma ótima biocompatibilidade. Sua presença não induziu reações inflamatórias locais ou sistêmicas. Permitiu o suporte, proliferação e diferenciação celular, o que gera boas expectativas quanto ao seu uso como substituto da MEC.

Apesar da análise tomográfica não ter confirmado os resultados positivos em relação ao uso dos NTCs na formação de tecido ósseo observados na histologia, ainda há muito que investigar em relação ao uso desse como biomaterial na regeneração óssea. Ainda há um grande potencial oferecido pelos métodos de funcionalização, que permitem a adição de grupos funcionais ou mesmo de sinais morfogenéticos nas cadeias dos NTCs o que pode resultar numa melhor reposta desse material em relação osteoindução.

A associação dos NTCs com colágeno apresentou resultados superiores na expressão dos genes responsáveis pela diferenciação de osteoblastos, formação de tecido ósseo e tecido conjuntivo, em ossos

sob influencia de fixação rígida, sugerindo uma melhor reposta de reparo ósseo. Entretanto, por se tratar de uma análise qualitativa não é possível verificar se há diferença entre essa associação e os demais tratamentos. Portanto, estudos que sejam capazes de quantificar as respostas genéticas geradas pelos NTCs ainda são necessários para melhor compreender sua ação no organismo.

O carbopol interferiu no processo de regeneração óssea, não sendo assim indicado como veículo para implantação dos NTCs.

As pesquisas envolvendo o uso dos NTCs como biomaterial na regeneração óssea ainda estão nas fases iniciais. Apesar do grande número de trabalhos publicados, muitos aspectos relacionados a metabolização, citotoxicidade e permanência desse material no organismo por longos períodos ainda não foram esclarecidos. Por isso, deve-se ter cautela na interpretação dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AI, J.; BIAZAR, E.; JAFARPOUR, M. et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine.* , v. 6, p. 1117- 1127. 2011.
- ALIEVI, M. M.; SCHOSSLER, J. E. W. et al. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. *Ciência Rural.* V.37, n.2, p.450 – 457. 2007.
- ALLISON, R. W. Laboratory Evaluation of the Liver. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W. et al. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* Ames: Wiley-Blackwell, 2012. 776p.
- BABIS, G. C.; SOUCACOS, P. N. Bone scaffolds: The role of mechanical stability and instrumentation. *International Journal of the Care of the Injured.*, v. 36, n.4 (S), p. 38- 44. 2005.
- BARRY, F.; BOYNTON, R. E.; LIU, B. et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental cell research.*, v.268, n. 2, p. 189-200. 2001.
- BERHANU, D.; DYBOWSKA, A.; MISRA, S. K. et al. Characterisation of carbon nanotubes in the context of toxicity studies. *Environmental Health : A Global Access Science Source.* , v. 8, Suppl. 1, p. S3. 2009.
- BHARRACHARYYA, S.; SALVETAT, J. P.; SABOUNGI, M. L. Reinforcement of semicrystalline polymers with collagen modified single walled carbon nanotubes. *Appl. Phys. Lett.*, v. 88, n. 23, p. 223119. 2006
- BHATTACHARYA, M.; WUTTICHAROENMONGKOL-THITIWONGSAWET, P.; HAMAMOTO, D. T. et al. Bone formation on carbon nanotube composite. *Journal of biomedical materials research. Part A.*, v. 96, n. 1, p. 75 – 82. 2010.
- BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable. *Chemical communications.*, v. 47, n. 37, p. 10183 – 10188. 2011.
- BOCZKOWSKI, J.; LANONE, S. Potential uses of carbon nanotubes in the medical field: how worried should patients be? *Nanomedicine.* , v. 2, n. 4, p.407-410. 2007.
- BOEHM, H.; SETTON, R.; STUMPP, E. Nomenclature and terminology of graphite intercalations compounds. *Pure e Appl. Chem.*, V. 66, n. 9, p. 1893-1901. 1994.
- BOELONI, J. N. Efeitos in vivo e in vitro dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. 2012. 226f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BOUXSEIN, M.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone And Mineral Research.* , v. 25, n.7, p.1468-1486. 2010.

- BRYANT, M.; DREW, G. M.; HOUSTON, P. et al. Tissue repair with a therapeutic transcription factor. *Human gene therapy.*, v. 11, n. 15, p. 2143- 2158. 2000.
- CAMPBELL, T. W. Mammalian hematology: Laboratory Animals and miscellaneous Species. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W. et al. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. 776p.
- CANCEDDA, R.; CEDOLA, A.; GIULIANI, A. et al. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction. *Biomaterials.*, v. 28, n.15, p. 2505-2524. 2007.
- CAO, L.; LIU, X.; LIU, S. et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials.*, v. 100, n. 5, p. 1229 -1236. 2012.
- CAO, Y.; ZHOU, Y. M.; SHAN, Y. et al. Preparation and characterization of grafted collagenmultiwalled carbon nanotubes composites. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 7, n. 2, p. 447- 451. 2007.
- CEN, L.; LIU, W.; CUI, L. et al. Collagen Tissue Engineering : Development of Novel Biomaterials. *International Pediatric Research Foudation.*, v.63, n. 5, p. 492 – 496. 2008.
- CHENG, H.; JIANG, W.; PHILLIPS, F. M. et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg.*, v. 85-A, n.8, p.1544- 1552. 2003.
- CHO, T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *Journal of bone and mineral research.*, v. 17, n. 3, p.513-520. 2002.
- CHOLPEK, J.; CZAJKWSKA, B.; SZARANIEC, B. et al. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon.*, v. 44, n. 1, p. 1106-1111. 2006
- COMPLETO, A.; FONSECA, F.; SIMÕES, J. A. Avaliação experimental do efeito de strain shielding no fêmur distal induzido pela utilização de hastes na revisão da artroplastia total do joelho. *Revista da Associação Portuguesa de Análise Experimental de Tensões.*, v. 15, p.51-71. 2008.
- DATTA, H.K.; NG, W.F.; WALKER, J.A. et al. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.*, v.61, p.577-587, 2008.
- DEVESCOVI, V.; LEONARDI, E.; CIAPETTI, G. et al. Growth factors in boné Repair. *La Chirurgia degli organi di movimento.*, v. 92, n. 3, p. 161-168. 2008.
- DIMITRIOU, R.; JONES, E.; McGONAGLE, D. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine.*, v. 9, n. 4, p. 1-10. 2011.
- DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUSDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.*, v. 36, n. 12, p. 1392-1404. 2005.
- DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J. M.; GÓMEZ, M. J. Modelling boné tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics.*, v.71, n. 13-14, p. 1809-1840. 2004

- DOHRMANN, C. E.; NORAMLY, S.; RAFTERY, L. A.; et al. Opposing effects on TSC-22 expression by BMP and receptor tyrosine kinase signals in the developing feather tract. *Developmental dynamics.*, v. 223, n.1, p.85-95. 2002.
- EHRlich, P. J.; LANYON, L. E. Mechanical Strain and Bone Cell Function : A Review. *Ostiorosis International.*, v. 13, n. 9, p.688-700. 2002.
- FAN, Y.; XIU, K.; DUAN, H. et al. Biomechanical and histological evaluation of the application of biodegradable poly-L-lactic sushion to hte plate internal fixation for boné fracture healing. *Clinical Biomechanics.* v. 23, n. S1, p. S7-S16. 2008.
- FIRME, C. P.; BANDARU, P. R. Toxicity issues in the application of carbon nanotubos to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*, v. 6, n. 2, p. 245-256. 2010.
- FLEISCHMAJER, R.; MACDONALD, E. D.; PERLISH, J. S. et al. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J. Struct. Biol.*, v. 105, n. 1-3, p.162-169. 1990.
- FRANCESCHI, R. Biological Approaches to Bone Regeneration by Gene Therapy. *Journal of Dental Research.*, v. 84, n.12, p.1093-1103. 2005.
- FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.*, v. 45, n. 2, p. 113 – 136. 1998.
- FUKIOKA, K.; MAEDA, M.; HOJO, T, et al. Proterin release from collagen matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, v. 31, n. 3, p. 247-266. 1998.
- GEIGER, M.; LI, R. H.; FRIESS, W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, V. 55, N. 12, P. 1613 – 1629. 2003.
- GELSE, K.; POSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, V. 55, N. 12, P. 1531 – 1546. 2003.
- GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L. et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry.*, v. 88, n. 5, p. 873-884. 2003.
- GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T. A. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury.*, n. 40, p. S1-3. 2009.
- GIKNIS, M. L. A.; CLIFFORD, C. B. Clinical laboratory parameters for crl:wi (han). Charles River Lab., p. 1-17, 2008.
- GINEBRA, M. P.; PLANELL, J. A.; ONTAON, M. et al. Structure and mechanical properties of cortical bone. In: ELICES, M. *Structural biological materials: Design and Structure-Property Relationships.* 1º Ed. Kidlington, Elsevier Science Ltd, 2000. v. 4, Cap. 3, p. 33 –71.
- GRANERO-MOLTÓ, F.; WEIS, J. A.; MIGA, MICHAEL. I. et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells.*, v. 27, n. 8, p. 1887-1898. 2009.
- GUSMÃO, C. V. B.; BELANGERO, W. D. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico ? *Revista Brasileira de Ortopedia.*, v. 44, n.4, p.299-305. 2009.

- HARRISON, B. S.; ATALA, A. Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials.* , v. 28, n. 2, p.344–353. 2007.
- IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature.*, v.354, p.56-58. 1991.
- ILIE, I.; ILIE, R.; MOCAN, T. et al. Influence of nanomaterials on stem cell differentiation: designing an appropriate nanobiointerface. *International Journal of Nanomedicine.* , v. 7, p.2211-2225. 2012.
- ITOH, S.; KIKUCHI, M.; TAKAKUDA, K. et al. The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP-2. *Journal of Biomedical Materials Research.*, v. 54, n. 3, p. 445-453. 2001.
- KALFAS, I. H. Principles of bone healing. *Neurosurgical focus.*, v. 10, n. 4, p. 1-4. 2001.
- KARNEZIS, I. A. Biomechanical considerations in biological femoral osteosynthesis: an experimental study of the bridging and wave plating techniques. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery.*, v. 120, n. 5-6, p. 272-275. 2000.
- KITTEN, G.T., KOLKER, S.J., KROB, S.L. et al. Type VI collagen in the cardiac valves and connective tissue septa during heart development. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, v. 29, n.9, p.1189-1193. 1996
- KON, T.; CHO, T.; AIZAWA, T. et al. Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of NF- κ B Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing. *J Bone Miner Res.*, v. 16, n.6, p. 1004–1014. 2001.
- KOSTARELOS, K.; BIANCO, A.; PRATO, M. Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nature nanotechnology.* , v. 4, n.10, p.627-633. 2009.
- KRETLOW, J. D.; MIKOS, A. G. Bones to Biomaterials and Back Again – 20 yrs of taking from nature to engineer synthetic polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res A.*, v. 98, n. 3, p. 323-331. 2011.
- LAM C, JAMES JH, MCCLUSKEY R, HUNTER R. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* , v. 77, p. 126–134. 2004.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *International journal of pharmaceutics.*, v. 221, n. 1-2, p. 1 - 22. 2001.
- LEE, S. K.; LORENZO, J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Current Opinion in Rheumatology.*, v.18, n. 4, p.411 – 418. 2006.
- LI, X.; GAO, H.; UO, M. et al. Maturation of osteoblast-like SaoS2 induced by carbon nanotubes. *Biomedical Materials.*, v. 4, n. 1, p. 1-8. 2009.
- LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; STEVENSON, S. et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2- producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg.*, v. 81, n. 7, p.905-917.1999.
- LIU, D.; YI, C.; ZHANG, D. et al. Inhibition of Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Carboxylated Carbon Nanotubes. *ACS nano.*, v.4, n.4, p.2185 -2195. 2010.

- LIU, Z.; TABAKMAN, S.; DAI, H. Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery. *Nano Research.*, v. 2, n. 2, p. 85 – 120. 2009.
- LUCCHINETTI E. Composite models of bone properties. In: COWIN, S. C. *Bone mechanics handbook*, 2º Ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. Capítulo 3, p. 12.1–19.
- LUTOLF, M. P.; WEBER, F. E.; SCHMOEKEL, H. G. et al. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nature biotechnology.* , v. 21, n. 5, p.513-518. 2003.
- MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry e Cell Biology.*, v. 35, n. 9, p. 1301-1305. 2003.
- MAGRO, M. C. S.; VATTIMO, M. F. Evaluation of renal function: creatinine and other biomarkers. *Rev. Bras. Ter. Int.*, v. 19, n. 2, p. 182-185, 2007.
- MAJUMDAR, M. K.; WANG, E.; MORRIS, E. A. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *Journal of cellular physiology.* , v. 189, n. 3, p.275-284. 2001.
- MANGUM, J. B.; TURPIN EA, A. A et al. Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-induced interstitial fibrosis in the lungs of rats is associated with increased levels of PDGF mRNA and the formation of unique intercellular carbon structures that bridge alveolar macrophages in situ. *Part. Fibre Toxicol.*, v. 3,n. 15, (2006).
- MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. *Injury.*, v. 42, n. 6, p. 551-555. 2011.
- MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury.*, v.40, Supl. 3, p. S4–7. 2009.
- MARTIN, R. B. Determinants of the mechanical properties of bones. *Journal of Biomechanics.*, v. 24, Suppl. 1, p. S79-88. 1991.
- MASAKI, C.; SCHNEIDER, G. B.; ZAHARIAS, R. et al. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clinical Oral Implants Research.*, v. 16, n. 6, p. 650-656. 2005.
- MCMAHON, S. B.; MONROE, J. G. Role of primary response genes in generating cellular response to growth factors. *The FASEB Journal.* v. 6, p.2707 – 2715. 1992
- MEDEIROS, E.S.; PATTERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C. *Nanotecnologia In: DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.* São Paulo, 2006: Artliber, p14-29.
- MEG, J.; YANG, M.; SONG, L. et al. Concentration control of carbon nanotubes in aqueous solution and its influence on the growth behavior of fibroblasts. *Collids and Surfaces B: Biointerfaces.*, v. 71, n. 1, p. 148-153. 2009.
- MÉNARD-MOYON, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. et al. Functionalized carbon nanotubes for probing and modulating molecular functions. *Chemistry e biology.*, v. 17, n.2, p.107-115. 2010.
- MENDES, R. M.; SILVA, G. A. B.; CALIARI, M. V. et al. Effects of single

- wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences.*, v. 87, n.8, p. 215-222. 2010.
- MENDES, R. M.; SILVA, G. A.; LIMA, M. F. et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology.* , n. 53, v. 12, p.1155–1162. 2008.
- MORAIS, J. M.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D. J. Bioaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response. *The AAPS Journal.*, v.12, n. 2, p. 188-196. 2010.
- NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANO, O. et al. Biomaterial em orthopaedics. *J. R. Soc. Interface.*, v. 5, n. 27, p.1137-1158. 2008.
- NEEL, E. A. A.; BOZEC, L.; KNOWLES, J. C. et al. Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. *Advanced drug delivery reviews.*, p. 1- 28. 2012.
- NEFUSSI, J. R.; BRAMI, G.; MODROWSKI, D. et al. Sequential Expression of Bone Matrix Proteins During Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation In Vitro. *Journal of Histochemistry e Cytochemistry.*, v. 45, n. 4, p.493-503. 1997.
- NGO, T. Q.; SCHERER, M. A.; ZHOU, F. H. et al. Expression of bone morphogenic proteins and receptors at the injured growth plate cartilage in young rats. *The journal of histochemistry and cytochemistry.*, v.54, n. 8, p.945-954. 2006.
- NOSE, K.; SHIBANUMA, M.; KIKUCHI, K. et al. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *European journal of biochemistry.*, v. 198, n.1, p. 99-106. 1992.
- OLFET, E. D.; CROSS, B. M.; ANN McWILLIAM, A. Guide to the care and use of experimental animals. *Canadian Council on Animal Care.*, v. 1, p. 1-298. 1993.
- OLIVEIRA, K. M. Efeitos de diferentes doses de ω -conotoxina MVIIC no tratamento de ratos submetidos ao trauma medular agudo compressivo. 2012. 61f. Dissertação (Mestrado -) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, L. S. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.*, v. 9 supl. 1, p. 37-44. 2010.
- OLIVEIRA, S. M.; MIJARES, D. Q.; TURNER, G. et al. Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. *Tissue Eng. Part A.*, v.15, n.3, p.635-643, 2009.
- OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde em Revista.*, v.5, n.9, p.69 – 76. 2003.
- PATLOLLA, A. K.; HUSSAIN, S. M.; SCHALAGER, J. J. et al. Water Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes Inhibit Stimulated Endocytosis in Neurons. *Environ Toxicol.*, v. 25, n. 6, p. 608 – 621. 2010.
- PATLOLLA, A.; MCGINNIS, B.; TCHOUNWOU, P. Biochemical and histopathological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotubes in Swiss-Webster mice. *Journal of Applied Toxicology.*, v. 31, n.1, p. 75-83. 2011.

PATLOLLA, A.; MCGINNIS, B.; TCHOUNWOU, P. Biochemical and histopathological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotube in Swiss-Webster mice. *Journal of applied toxicology.*, v. 31, n. 1, p.75-83. 2012.

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. *Injury.*, v. 36, Supl. 3, p. S5-7. 2005.

QU, G.; BAI, Y.; ZHANG, Y. et al. The effect of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice. *Carbon.*, n.47, n. 8, p. 2060-2069. 2009.

RAYMUNDO-PIÑERO, E.; CAZORLA-AMORÓS, D.; LINARES-SOLANO, A. et al. High surface area carbon nanotubes prepared by chemical activation. *Carbon.*, v. 40, p. 1597–1617. 2002.

RHO, J.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering e Physics.*, v.20, n.2, p.92-102. 1998.

RIBEIRO, L. N. M.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M. Da nanotecnologia à nanobiotecnologia: definições e aplicações. *Biociências, Biotecnologia e Saúde.*, n. 1, p.47-55. 2011.

RODRIGUES, C. V. M.; SERRICELLA, P. LINHARES, A. B. R. et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials.*, v. 24, n. 27, p. 4987-4997. 2003.

ROSENBER, A. Bones, Joints, and soft tissue tumors. In: CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Pathologic basis of disease.* Ed Saunders,1999. 6° Ed. Cap. 28,p.1225-1268.

RÜEGSEGGER, P.; KOLLER, B.; MÜLLER, R. A Microtomographic System for the Nondestructive Evaluation of Bone Architecture. *Calcified Tissue International.*, v. 29, n.1, p.24-29. 1996.

SAITO, N.; USUI, Y.; AOKI, K. et al. Carbon nanotubes: biomaterial applications. *Chemical Society reviews.*, v. 38, n. 7, p. 1897-1903. 2009.

SANDBERG, M. M.; HANNU, T. A.; VUORIO, E. I. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop.*, v. 289, n. 4, p.292-312. 1993.

SAUNDERS, M. M.; LEE, J. S. The influence of Mechanical Environment on Bone Healing and Distraction Osteogenesis. *Atlas of the oral and maxillofacial surgery clinics of North America.*, v. 16, n.2, p. 147-158. 2008.

SHIMIZU, M.; KABAYASHI, Y.; MIZOGUCHI, T. et al. Carbon nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. *Advanced Materials.*, v. 24, n. 16, p. 2176 – 2185. 2012.

SHVEDOVA, A. A.; KISIN ER, M. R. et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, v. 289, p.698–708. 2005.

SHVEDOVA, A. A.; KISIN, E.; MURRAY, A. R. et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, v. 295, n. 4, p.552-565. 2008.

SILVA, E. E.; COLLETA, H. H. M. D.; FERLAUTO, A. S. et al. Nanostructured 3-D collagen/nanotube composites for future

- bone regeneration scaffolds. *Nano Research.*, v.2, n. 2, p. 462-473. 2009.
- SIMON, A. M.; MANIGRASSO, M. B.; O'CONNOR, P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *Journal of bone and mineral research.*, v. 17, n. 6, p.963-976. 2002.
- SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in cell e developmental biology.*, v. 19, n. 5, p. 444-451. 2008.
- SINGH, M. K.; GRACIO, J.; LeDUC, P. et al. Integrated biomimetic carbon nanotube composites for in vivo systems. *Nanoscale.* , v. 2, n. 12, p. 2855-2863. 2010.
- SITHARAMAN, B.; SHI, X.; WALBOOMERS, X. F. et al. In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. *Bone.*, v. 42, n. 5, p. 362-370. 2008
- SKYSCAN. Morphometric parameters in ct-analyser. 36 f. 2009
- SHVEDOVA, A. A.; KISIN, E. R.; MURRAY, A. R. et al. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicology and Applied Phargmacology.*, v. 231, n. 2, p. 235 -240. 2008.
- TANEJA, K.; PAREEK, A.; VERMA, P.; JAIN, V. et al. Nanocomposite: An emerging tool for bone tissue transplantation and drug delivery. *Indian Journal of Transplantation.* , v. 6, n.3, p. 88-96. 2012.
- TATON, T. A. Nanotechnology Boning up on biology. *Nature.*, v. 412, n. 6850, p.491-492. 2001
- THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W. et al. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária.* São Paulo: Rocca, 2006. 582p.
- THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W. et al. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária.* São Paulo: Rocca, 2006. 582p.
- TONELLI, F. M. P.; SANTOS, A. K.; GOMES, K. N. et al. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine.* , v. 7, p. 4511-4529. 2012.
- TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury.*, v. 38, suppl 1, p. S11-25. 2007.
- USUI, Y.; AOKI, K.; NARITA, N.; MURAKAMI, N.; NAKAMURA, I.; NAKAMURA, K.; ISHIGAKI, N.; YAMAZAKI, H.; HORIUCHI, H.; KATO, H.; TARUTA, S.; KIM, Y. A.; ENDO, M.; SAITO, N. Carbon nanotubes with high boné-tissue compatibility and boné-formation acceleration effects. *Biocompatible Materials. Small.*, v.4, n. 2, p. 240-246. 2008.
- VAIRAVAPANDIAN, D.; VICHCHULADA, P.; LAY, M. D. Preparation and modification of carbon nanotubes: review of recent advances and applications in catalysis and sensing. *Analytica chimica acta.*, v. 626, n. 2, p. 119 -129. 2008.
- VARDHARAJULA, S.; ALI, S. Z.; TIWARI, P. M. et al. Functionalized carbon

- nanotubes: biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine.*, v. 7, p. 5361-5374. 2012.
- VEETIL, J. V.; YE, K. Tailored Carbon Nanotubes for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol Prog.*, v. 25, n. 3, p. 709 – 721. 2009.
- VERMEIRSCH, H.; NUYDENS, R. M.; SALMON, P. L. et al. Bone cancer pain model in mice : evaluation of pain behavior , bone destruction and morphine sensitivity. *Pharmacology Bichemistry and Behavior.*, v. 79, n.2, p. 243-251. 2004.
- WEINER, S.; WAGNER, H.D. The material bone: structure-mechanical function relations. *Ann Rev Mater Sci.*, v. 28, p. 271-298. 1998
- WONG, E. W.; SHEERAN PE, L. C. M. Nanobeam mechanics: elasticity, strength and toughness of nanorods and nanotubes. *Science.* , v. 277, p. 1971–1975. 1997.
- WU, M.; MELICHIAN, D. S.; GARZA, M. et al. Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *The American Journal of Pathology.*, v. 175, n. 3, p. 1041-1055. 2009.
- YANG, S. T.; WANG, S.; JIA, G. et al. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicol. Lett.*, v. 181, n. 3, p.182–189. 2008.
- YANG, X.; RICCIARDI, B. F.; HERNANDEZ-SORIA, A. et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone.*, v.41, n.6, p.928 - 936. 2007.
- YANG, Y.; TAN, Y.; WONG, R. et al., The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *International journal of oral science.*, v. 4, n. 2, p. 64-68. 2012.
- YU, J.; ERSHLER, M.; YU, L. et al. Lymphoid Neoplasia TSC-22 contributes to hematopoietic precursor cell proliferation and repopulation and is epigenetically silenced in large granular lymphocyte leukemia. *Blood.*, v. 113, n. 22, p. 5558-5567. 2009.
- YU, Y. Y.; LIEU, S.; LU, C. et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone.*, v. 47, n. 1, p. 65-73. 2010.
- ZHAO, B.; HU, H.; MANDAL, S. K. et al. A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes. *Chem. Mater.*, v. 17, n. 12, p. 3235- 3241. 2005.

ANEXO 1



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 236/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Uso de nanobiogeis na regeneração óssea de ratos wistar**", que tem como responsável(is) **Rafael Resende Faleiros**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/11/2011**.

Este certificado expira-se em **9/11/2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 236/2011**, related to the project entitled "**Use of nanobiogeis in wistar rats for osseous regeneration**", under the supervisors of **Rafael Resende Faleiros**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 9, 2011**.

This certificate expires in **November 9, 2016**.

Belo Horizonte, 11 de Novembro de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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