

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

**Utilização de nanopartículas fosfatadas contendo estrôncio
associadas ao ácido hialurônico como estratégia para
acelerar o reparo ósseo**

Bruno Amaral Jacoby

Belo Horizonte – MG
Fevereiro – 2017

Bruno Amaral Jacoby

**Utilização de nanopartículas fosfatadas contendo estrôncio
associadas ao ácido hialurônico como estratégia para
acelerar o reparo ósseo**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Belo Horizonte – MG

Fevereiro – 2017

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Cardíaca vinculado ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal do Departamento de Morfologia do ICB da UFMG;
- Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia Geral do ICB da UFMG.

Contou com o auxílio das seguintes agências de fomento:

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

“Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as
dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”
John Quincy Adams

Agradecimentos

Aos meus pais, pelo esforço e amor investidos na minha formação humana e profissional;

Ao meu irmão, por ser presente mesmo na distância;

À Izabela, por fazer o caminho ter mais sentido;

À Laura e Luiza, por fazerem a vida ter mais sentido;

Ao Prof. Anderson, por ter me mostrado o prazer da pesquisa e pelos mais de 10 anos de ensinamentos;

Aos Profs. José Dias Corrêa Junior e Marcelo Vidigal Caliari, por possibilitarem a realização deste trabalho;

Aos colegas Prof. Marcos e Vanessa, que abraçaram o projeto e tornaram a jornada menos árdua;

À Dra. Betânia e aos colegas do Laboratório de Biologia Cardíaca;

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

À CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

Resumo

O tecido ósseo está em constante remodelação, corrigindo alterações em sua matriz extracelular e mantendo a homeostase local. Quando lesado é capaz de reativar vias ontogenéticas relacionadas ao desenvolvimento ósseo, levando à regeneração tecidual. O desenvolvimento de biomateriais para acelerar o reparo ósseo é essencial para o tratamento de pacientes vítimas de traumas ortopédicos, oncológicos e com doenças congênitas do tecido ósseo. O uso de substâncias que mimetizem sua matriz extracelular, orgânica ou mineral, é uma das modalidades com melhores resultados. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a utilização de uma nanopartícula baseada em fosfato contendo estrôncio (NPC-Sr) como estratégia para potencializar a regeneração óssea, isoladamente ou associada ao ácido hialurônico (HY). Para avaliar os efeitos do HY, NPC-Sr e da associação HY+NPC-Sr, foi utilizado modelo de falha óssea não-crítica em tibia de ratos. Os animais foram separados em quatro grupos: (i) ratos controle/carbopol; (ii) ratos tratados com HY (1%); (iii) ratos tratados com NPC-Sr (0,5 mg/mL) e (iv) ratos tratados com HY+NPC-Sr. Após criar a falha óssea com uso de broca helicoidal, o tratamento foi administrado no local da lesão. No sétimo dia do experimento, os animais foram sacrificados e as tíbias processadas para avaliação histológica e morfométrica com quantificação da porcentagem de trabéculas ósseas. A avaliação morfométrica demonstrou que o tratamento com HY ($21,8 \pm 2,7\%$), NPC-Sr ($20,4 \pm 5,5\%$) ou HY+NPC-Sr ($19,7 \pm 3,7$) foram capazes de acelerar o processo de reparo ósseo quando comparados ao grupo controle ($13,5 \pm 2,2\%$). A análise histológica demonstrou um aumento na formação trabecular nos animais tratados com os materiais, assim como uma maior maturidade do tecido ósseo neoformado. Em ambas as análises, não houve diferença significativa entre os três tratamentos. Com os resultados encontrados podemos concluir que o HY e as NPC-Sr possuem capacidade de acelerar o reparo ósseo em defeitos não-críticos em tíbias de ratos e que a associação dos dois compostos não possui efeito somatório ou deletério.

Palavras chave: Hialuronato de sódio; Nanopartículas fosfatadas; Reparo ósseo.

Abstract

Bones are constantly been remodeling to repair damages in their extracellular matrix and to maintain local homeostasis. This tissue is able to reactivate ontogenetic pathways related to bone development when it is injured, leading to tissue regeneration. The development of biomaterials able to enhance bone repair is essential for the treatment of patients suffering from orthopedic, oncological and congenital bone diseases. The use of compounds that mimic their organic and mineral extracellular matrix is one of the actual strategies with better results. The aim of this study was to evaluate the use of a phosphate-based nanoparticle (NPC) alone or associated with hyaluronic acid (HY) as a strategy to potentiate bone regeneration. Thus, to evaluate the effects of HY, NPC-Sr and HY+NPC-Sr, a non-critical bone defect model in tibia of rats was used. The animals were separated into four groups: (i) control/carbopol rats; (ii) HY (1%) treated rats; (iii) NPC-Sr (0.5 mg/mL) treated rats; and (iv) HY+NPC-Sr treated rats. After creating the bone defect using a helical drill, the treatment were given at the injury site. On the seventh day of the experiment, the animals were sacrificed and the tibiae were processed for histological and morphometric evaluation with quantification of the percentage of bone trabeculae. The morphometric analysis showed that treatment with HY ($21.8 \pm 2.7\%$), NPC-Sr ($20.4 \pm 5.5\%$) or HY+NPC-Sr (19.7 ± 3.7) accelerated the bone repair process when compared to the control group ($13.5 \pm 2.2\%$). The histological analysis confirmed this increase in the trabecular formation, as well as the greater maturity of the formed bone tissue in all tested groups. In both analyzes, no significant differences were observed among the three treatments. Thus, we conclude that HY and NPC-Sr have the ability to accelerate the bone repair in non-critical defects in rat tibia and that the association of these two compounds has no additional or deleterious effects.

Keywords: Sodium hyaluronate, Calcium phosphate nanoparticles, Bone repair.

Lista de Figuras

Figura 1: Cascata de sinalização das BMPs (Katagiri & Tsukamoto, 2013).....	16
Figura 2: Diferenciação da linhagem celular óssea (Sinha & Zhou, 2013).....	18
Figura 3: Os quatro pilares da consolidação (Giannoudis et al, 2007)	20
Figura 4: Participação do CD44 na osteoclastogênese (Li et al, 2015).....	24
Figura 5: Imagem representativa de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a morfologia das NPC-Sr.....	34
Figura 6: Composição elementar dos NPC-Sr obtida por microscopia eletrônica analítica.....	35
Figura 7: Fotomicrografias representativas das secções histológicas analisadas.	37
Figura 8: Quantificação da área de trabéculas ósseas em tíbias tratadas com HY.	39
Figura 9: Quantificação da área de trabéculas ósseas em tíbias tratadas com NPC-Sr.....	40
Figura 10: Quantificação da área de trabéculas ósseas em tíbias tratadas com HY+NPC-Sr.....	41
Figura 11: Quantificação da área de trabéculas ósseas nos três tratamentos (HY, NPC-Sr e HY+NPC-Sr).....	42

Lista de Abreviaturas

BMP-2: Proteína morfogenética do osso tipo 2
BMPs: Proteínas morfogenéticas do osso
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBFA-1: Fator de ligação ao núcleo 1
CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Col I: Colágeno tipo I
DBM: Matriz óssea desmineralizada
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM: Erro padrão da média
FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos
GAGs: Glicosaminoglicanas
HAp: Hidroxiapatita
HMWHY: Ácido hialurônico de alto peso molecular
HY: Hialuronato de sódio (ácido hialurônico)
HYS: Ácido hialurônico sintase
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina
LMWHY: Ácido hialurônico de baixo peso molecular
LRP5: Receptor associado à lipoproteínas de baixa densidade
MEC: Matriz extracelular
MMP: Metaloproteinases de matriz
MPC: Células mesenquimais multipotentes
NPC: Nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio
NPC-Sr: Nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio contendo estrôncio
NTC: Nanotubos de carbono
OPG: OSteoprotegerina
OPN: Osteopontina
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

RANKL: Ligante do receptor ativador do fator nuclear- $\kappa\beta$

RHAMM : Receptores de motilidade mediados pelo hialuronato

siRNA: RNA de interferência

TGF- α : Fator de transformação do crescimento alfa

TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	ix
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 A biologia da regeneração óssea	12
1.2 Enxerto ósseo, substitutos ósseos e ortobiológicos	19
1.3 Ácido hialurônico	22
1.4 Estrôncio e nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Nanopartículas	29
4.2 Síntese das nanopartículas baseadas em fosfato contendo estrôncio	29
4.3 Morfologia e composição elementar por microanálise de raio-X	29
4.4 Distribuição de diâmetro	30
4.5 Procedimento cirúrgico	30
4.6 Processamento histológico	31
4.7 Análise histológica e morfométrica	32
4.8 Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Caracterização das NPC-Sr quanto a morfologia e distribuição de diâmetro	34
5.2 Composição elementar por microanálise de raio-x	35
5.3 Análise histológica	36
5.4 Análise morfométrica	39
6. DISCUSSÃO	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 A biologia da regeneração óssea

A constituição do tecido ósseo forma uma estrutura altamente adaptada, capaz de resistir a grandes forças com resiliência apropriada. Essa característica mecânica permite ao osso suportar o peso corporal e servir de alavanca para os movimentos articulares (Gray Anatomy, 2008; Ren et al, 2015).

O tecido ósseo é formado por uma parte orgânica, na qual predomina as fibras de colágeno tipo I (Col I) e uma parte inorgânica, representada pela hidroxiapatita. Microscopicamente observa-se que o tecido é organizado em estruturas conhecidas como osteons, nas quais aglomerados de fibras de colágeno se dispõem em lamelas ao redor de um canal central, o canal de Havers.

A manutenção da microestrutura óssea é essencial para que o tecido consiga tolerar as lesões causadas pelo estresse mecânico diário. Essa função é dependente da interação entre as células do tecido ósseo (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) e a matriz extracelular (MEC). Nesse aspecto, os osteócitos cumprem função mecanosensitiva pela percepção do fluxo de líquido intersticial canalicular, modulando o ganho e perda local de MEC (Klein-Nulend et al, 2003; Ren et al, 2015).

Além do controle estrutural contínuo das pequenas lesões, o tecido ósseo também é capaz de regenerar-se quando fraturado. O processo de consolidação da fratura forma um tecido novo que é indistinguível do osso prévio à lesão (Rockwood and Green's Fractures in adults, 2015; Marsell et al, 2011). Durante o reparo da fratura, as vias ontogenéticas da ossificação são recapituladas, com a participação orquestrada de diferentes tipos celulares e fatores de crescimento (Ferguson et al, 1999).

A consolidação de uma fratura pode ocorrer por dois mecanismos básicos: consolidação direta (primária) ou consolidação indireta (secundária). Para que ocorra a consolidação primária é necessária a intervenção médica para redução anatômica da fratura, compressão do foco e estabilidade absoluta. Nessas

condições ocorre a consolidação da fratura por remodelamento direto do osso lamelar, canais Haversianos e vasos sanguíneos (Marsell & Einhorn, 2011).

A consolidação secundária é a forma mais comum e envolve a ossificação intramembranosa e endocondral (Gerstenfeld et al, 2006). Nesse tipo de reparo, a presença e o tipo de micromovimentos no local da lesão são importantes para a formação óssea e determinam o tipo de ossificação (Morgan et al, 2010).

O reparo da fratura pode ser dividido em três etapas que se sobrepõem: inflamação, reparo e remodelamento. Após o trauma, é formado um hematoma local e tem início a resposta inflamatória aguda. O processo inflamatório inicial é essencial para a regeneração tecidual (Gerstenfeld et al, 2003). Nesta fase, diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF) e membros da superfamília de fatores de transformação do crescimento beta (TGF- β), incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), são liberados no foco de fratura (Ai-Aql et al, 2008; Ko, et al 2001).

O hematoma cria um microambiente hipóxico, atraindo células da linhagem osteoclástica e induzindo a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A reabsorção do hematoma pelas células multinucleadas e a angiogênese são passos críticos para o reparo da lesão (Riddler et al, 2009).

A liberação de fatores angiogênicos é fundamental para a consolidação da fratura. Durante a ossificação endocondral, a apoptose dos condrócitos e a retirada da matriz cartilaginosa são necessárias para que possa haver invasão vascular local. Nessa etapa, a ausência da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) acarreta alterações no processo de ossificação (Colnot et al, 2003). A principal molécula envolvida na revascularização do foco de fratura é a VEGF, que é expressa em níveis altos por condroblastos hipertróficos e osteoblastos. A hiperexpressão de VEGF acelera a regeneração óssea, enquanto a sua falta pode levar a não consolidação da fratura (Keramaris et al, 2008).

A ação parácrina do VEGF é mediada pelo receptor tipo 2 associado a tirosinoquinase (VEGFR2). A ligação do VEGF ao seu receptor acarreta a ativação de vias de sinalização intracelular, incluindo MAPK, PI3K/AKT, Src e Rac (Koch et al, 2011). Durante a ossificação endocondral as células precursoras osteblásticas

expressam altas concentrações de VEGF. Porém, a diferenciação na linhagem óssea não é dependente do VEGF parácrino, mas de atuação intrácrina, cujo mecanismo ainda é desconhecido (Liu et al, 2012).

Na fase de reparo da fratura, a diferenciação das células mesenquimais pluripotentes (MPC) em células osteoblásticas também dependem da atuação de citocinas e fatores de crescimento liberados na fase inflamatória. Entre eles, as BMPs exercem papel fundamental na diferenciação osteoblástica e posterior formação óssea. Através de duas vias de transdução de sinal (Smad e Smad-independente), as BMPs ativam o gene da Runx2, controlando a diferenciação das MPC e a formação óssea (Rahman et al, 2015).

Em 1965, Urist observou a capacidade da matriz óssea desmineralizada (DBM) em induzir a formação de tecido ósseo e cartilaginoso quando implantada no tecido muscular. O fator presente na DBM capaz de induzir a ossificação heterotópica foi chamado de proteína morfogenética óssea (BMP). Ainda hoje essa capacidade é exclusiva das BMPs (Katagiri & Tsukamoto, 2013).

As BMPs, como membros da superfamília TGF- β , ligam-se a receptores transmembrana associados à cinases da serina/treonina (tipo I e tipo II). As moléculas de BMP se ligam como dímeros, associando-se a tetrâmeros de receptores (dois tipo I e dois tipo II). O complexo receptor ativa as cascatas de sinalização intracelular Smads, MAPK e PI3K, como demonstrado na Figura 1 (Nohe et al, 2004).

Lee e colaboradores demonstraram que a ativação da via Smad induzida por BMP-2 resulta no aumento de expressão de Runx2/Cbfa1 (fator de ligação nuclear alfa-1) mediada pelo fator de transcrição DLX5. Runx2 é um fator de transcrição gênico essencial para o desenvolvimento do sistema esquelético. A ausência desse fator leva à completa falta de ossificação endocondral e intramembranosa por falha na diferenciação osteoblástica (Datta et al, 2008).

Não apenas os fatores biológicos influenciam o destino das MPC e a produção de tecido ósseo, mas a interação com a MEC e os estímulos físicos também alteram a formação óssea. Em 2011, Zouani e colaboradores demonstraram que, mesmo na ausência de fatores biológicos para diferenciação

osteogênica, a presença de nanopperfurações de tamanho adequado na placa de cultura (100 nm) é capaz de induzir a agregação e diferenciação osteoblástica das MPC.

Não se sabe exatamente como a morfologia da MEC e o estresse mecânico alteram a biologia molecular das células, ditando os acontecimentos seguintes no processo de ossificação. Porém, a via de sinalização da Wnt/ β -catenina é implicada como um dos atores principais no processo de formação do tecido ósseo (Lara-Castillo, et al, 2015; Santos et al, 2010).

Um mecanismo importante de reconhecimento e adesão entre células e entre células e a MEC é a interação entre as integrinas e a sequência RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) presente em algumas proteínas. A família das integrinas é constituída por proteínas transmembrana, formadas por dímeros de subunidades α e β , que funcionam como receptores de adesão, transmitindo sinais biomecânicos para o interior da célula. A associação de diferentes subunidades formam integrinas com afinidades por diferentes substratos (Harburger & Calderwood, 2009).

Osteoblastos expressam entre outras, a integrina $\alpha 5 \beta 1$ que reconhecem a sequência RGD da fibronectina. Em 2015, Saidak e col. utilizando cultura celular de MPC observaram que a estimulação de integrinas $\alpha 5 \beta 1$ ativa a via de transcrição Wnt/ β -catenina, levando à diferenciação osteoblásticas dessas células.

O Wnt, uma glicoproteína secretada na matriz, pode ativar três vias distintas de sinalização intra-celular: Wnt/ β -catenina, ou via canônica, Wnt/ Ca^{2+} , e via de polaridade celular planar (Komiya & Habas, 2008).

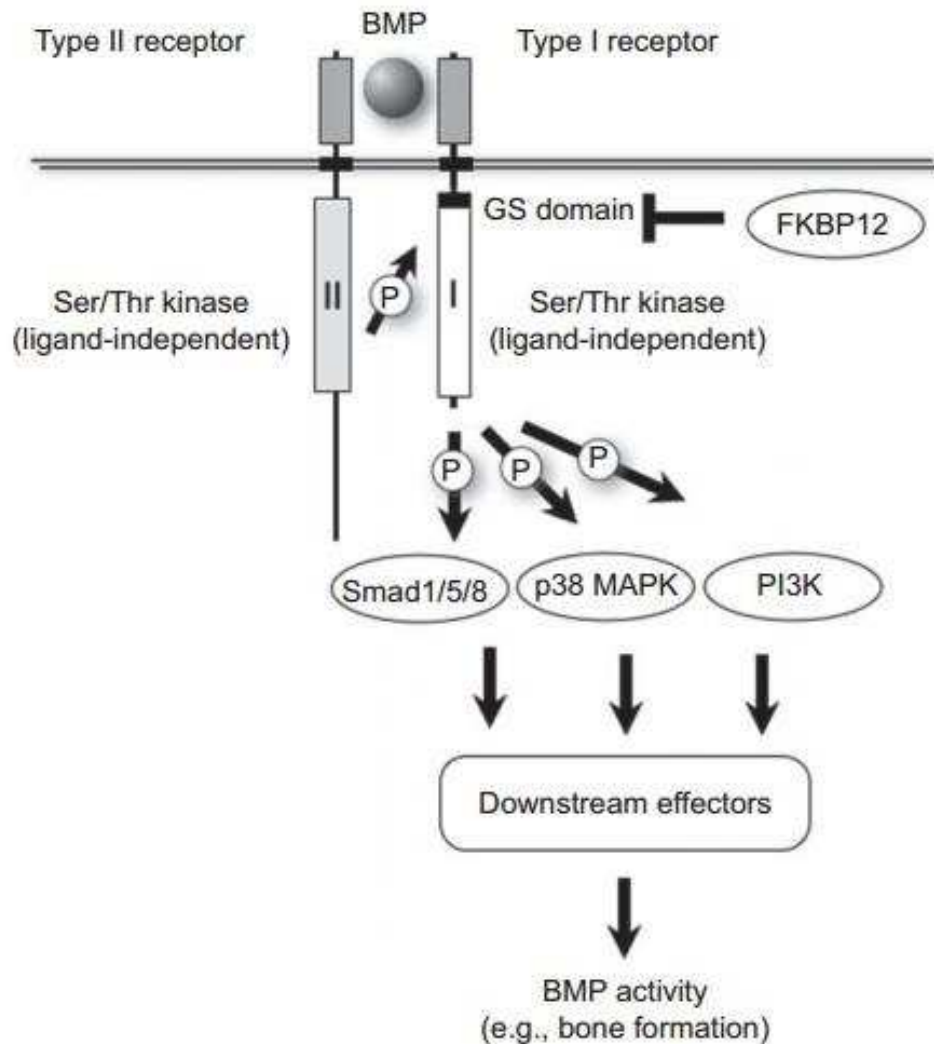


Figura 1: Cascata de sinalização das BMPs. O receptor do tipo II é constitutivamente ativo. A ligação do BMP resulta em fosforilação do domínio GS do receptor tipo I, deslocando o inibidor FKBP12. A cinase ativa do receptor tipo I fosforila efetores das cascatas de sinalização Smad, MAPK e PI3K (Katagiri & Tsukamoto, 2013).

Na via canônica, a ligação da glicoproteína Wnt com o complexo receptor frizzled/LRP5 (receptor associado a lipoproteínas de baixa densidade) inibe fosforilação da β -catenina, permitindo a sua migração para o núcleo, onde se associa a fatores de transcrição gênica (He et al, 2004). Em 2005, Day e col. observaram que a estimulação da via canônica do Wnt direciona as MPCs para a

linhagem osteoblástica, enquanto a deleção da β -catenina nas MPCs leva à formação ectópica de condrócitos.

A deposição de MEC óssea tem início com a produção de osteoide pelos osteócitos. Esse tipo celular é caracterizado por expressar colágeno tipo I, osteocalcina, fator de ligação nuclear alfa-1 (cbfa-1), fosfatase alcalina e osterix (Bonewald, 2011). Sinha e Zhou, em 2013, demonstraram o controle genético da linhagem celular óssea de forma clara, como mostrado na Figura 2.

Com a mineralização do osteoide, a MEC no foco de fratura passa a ter a mesma composição daquela prévia à lesão, porém sua microestrutura ainda é diferente. A porção orgânica de sua MEC é composta predominantemente por colágeno do tipo I, organizado em nanofibras com diâmetro variando de 50 – 500 nm, enquanto a parte inorgânica compreende nanocristais de apatita. A conformação típica em tripla-hélice do colágeno tipo I permite que os cristais iônicos sejam acomodados nos intervalos das fibras de colágeno (Orgel et al, 2011; Landis & Silver, 2009).

A terceira etapa, a remodelação, é fundamental para que a microarquitetura óssea seja reestabelecida. A resistência ao estresse é ditada pela organização das fibras de colágeno I e pelo conteúdo mineral embebido na MEC (Boivin et al, 2008). Para que isso ocorra é necessária a reabsorção da matriz pelos osteoclastos e a deposição de fibras de colágeno orientadas com as do tecido sadio. O principal estímulo para a ativação dos osteoclastos é a apoptose dos osteócitos aprisionados no osteoide. Após a degradação da MEC do osteoide, inicia-se a reposição de colágeno pelos osteoblastos locais, com posterior mineralização da nova matriz orgânica (McNamara, 2010).

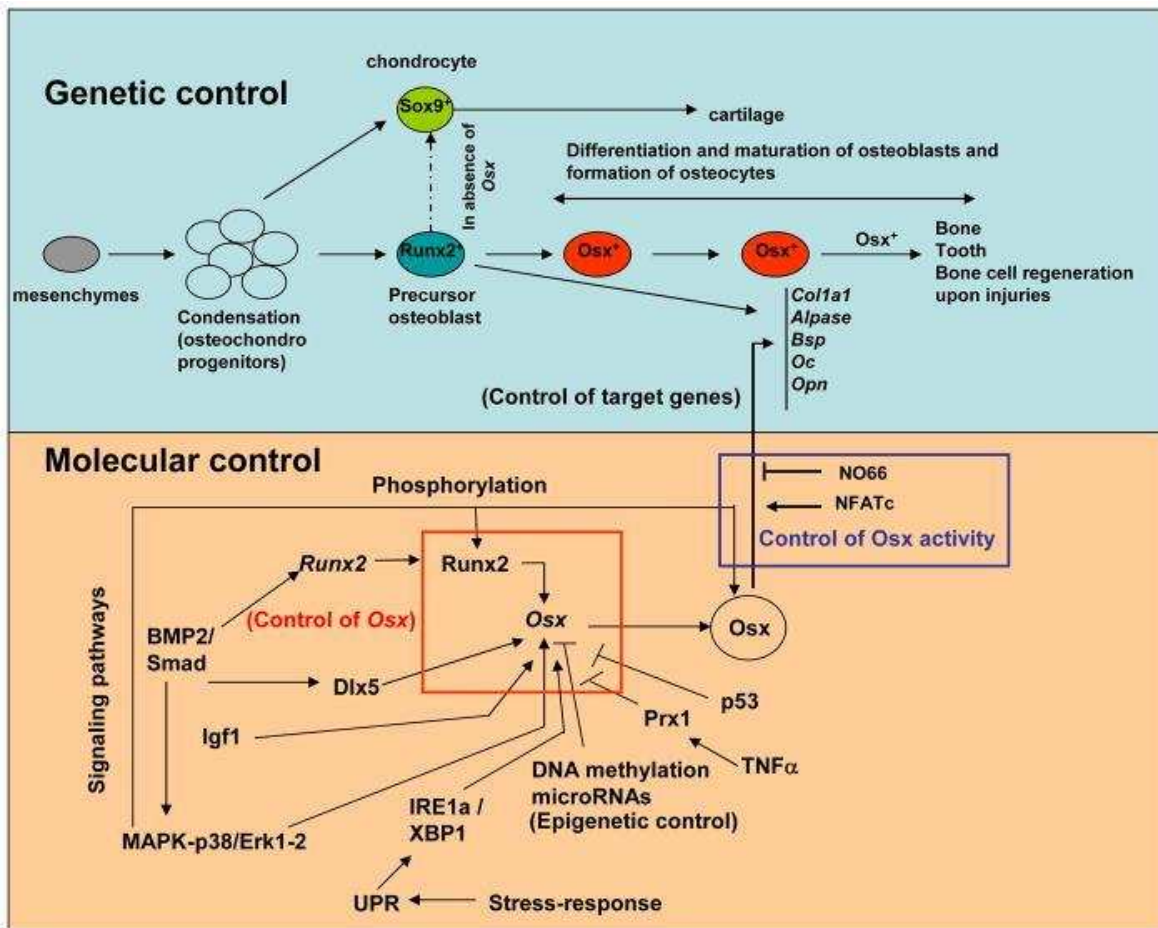


Figura 2: Diferenciação da linhagem celular óssea. Em rosa é demonstrado o controle molecular da expressão gênica com Osx. Fatores como BMP2, via Smad, Runx2, Dlx5, fator de crescimento similar à insulina tipo 1 (Igf1) e stress reticular aumentam a produção de mRNA Osx, enquanto a metilação do DNA, TNF- α e p53 influenciam negativamente a expressão de Osx. NA região azul, a expressão de Osx é determinante para a diferenciação das MPC Runx2⁺ na linhagem osteoblástica. Essas células expressam altos níveis de marcadores osteoblásticos, como colágeno tipo I (Col1a1), fosfatase alcalina embrionária (Akp), sialoproteína óssea (Bsp) e osteocalcina (Oc) (Sinha & Zhou, 2013).

No final do processo de remodelamento, o tecido formado é indistinguível do osso sadio e há continuidade estrutural das unidades funcionais (ósteons corticais e trabéculas medulares). Assim, o osso é capaz de se regenerar, mantendo as suas funções primordiais.

O tempo decorrido entre a fratura e a formação do calo duro, clinicamente definido como a consolidação da lesão, pode demorar semanas ou até meses. Ainda, por influência de fatores mecânicos e biológicos, podem ocorrer falhas no mecanismo de ossificação, levando à não consolidação da lesão. Por esses motivos há grande interesse no desenvolvimento de substitutos ósseos e em materiais para acelerar o processo de regeneração.

1.2 Enxerto ósseo, substitutos ósseos e ortobiológicos

Por ser a consolidação óssea um processo biológico complexo, é comum a ocorrência de atraso ou não consolidação das fraturas. Apesar da falta de dados confiáveis, considera-se que 10% das fraturas em geral e 50% das fraturas expostas de tíbia evoluam com problemas na consolidação (Einhorn, 1995). A escolha do método de tratamento das fraturas e de suas complicações afeta diretamente o custo envolvido. Em 2009 Busse e colaboradores analisaram o custo total do tratamento de fraturas de tíbia de baixa energia e concluíram que o valor pode variar entre US\$7,500 a US\$17,000, dependendo da escolha do tratamento.

Para que se obtenha sucesso no tratamento das fraturas, deve-se levar em consideração toda a cascata de acontecimentos e os fatores que influenciam o processo de consolidação. Desse modo, diferentes estratégias podem ser utilizadas para que se obtenha a consolidação da fratura, no menor tempo e com o menor custo. Giannoudis e colaboradores, em 2007, descreveram um modelo com os quatro pilares que devem ser considerados ao se abordar uma fratura ou pseudoartrose: uso de células osteogênicas, uso de *scaffolds* osteocondutores, uso de fatores de crescimento e a estabilidade mecânica da fratura. (Figura 3).

O enxerto ósseo autólogo é considerado o padrão ouro para tratamento das pseudoartroses. O enxerto retirado do próprio paciente possui três características fundamentais para a consolidação óssea: 1) Efeito osteoindutor: os fatores de crescimento presentes no enxerto estimulam o recrutamento e diferenciação das células osteogênicas pluripotentes; 2) Efeito osteocondutor: fornece um microambiente de suporte (*scaffold*) para o crescimento vascular e adesão das

células osteoprogenitoras; 3) Efeito osteogênico: fornece células da linhagem osteogênica diferenciadas para o processo de formação óssea (Myeroff & Archdeacon, 2011).

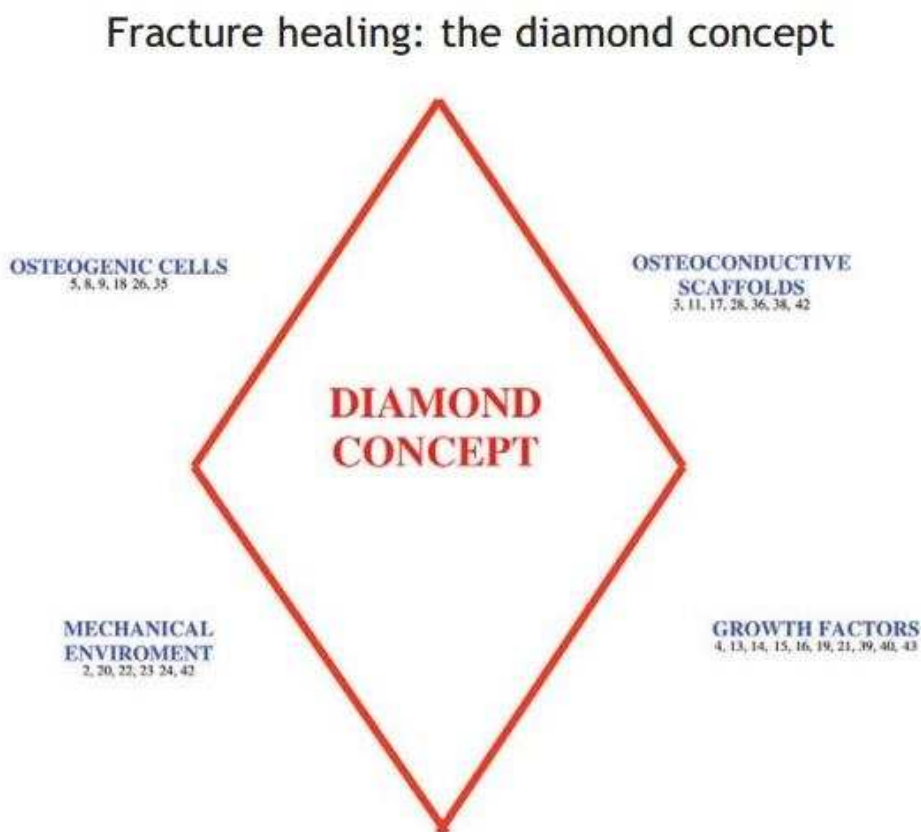


Figura 3: Os quatro pilares da consolidação (Giannoudis et al, 2007)

Apesar de ser considerado o melhor tipo de tratamento, o enxerto autólogo possui limitações, como infecção do local doador, dor pós-operatória, aumento do tempo cirúrgico e limitado volume doador (Fowler et al, 1995). Em 2011 Dimitriou e col. realizaram revisão sistemática da literatura e encontraram taxa de complicação de 19,37% após retirada de enxerto do íliaco, incluindo infecção, formação de hematomas, fratura do íliaco e cicatriz hipertrófica.

Uma opção quando não é desejado o enxerto autólogo é a utilização de matriz óssea desmineralizada (DBM). Esse tipo de enxerto consiste na liofilização e descalcificação do tecido ósseo, preservando proteínas colagenosas (colágeno

l) e fatores de crescimento, como os BMPs. Os enxertos de DBM possuem capacidade osteoindutora, porém a mesma é variável entre fornecedores e entre lotes do mesmo fornecedor (Drosos et al, 2015). Bae e col avaliaram a concentração de BMP-2 e BMP-7 em 10 amostras de um mesmo lote de DBM disponível comercialmente e o uso desse produto na fusão vertebral lombar (artrodese lombar) em ratos. Foi observado que a concentração de BMP2 e BMP-7 era muito variável entre as amostras (22 a 110pg de BMP-2 por miligrama do produto e 44 a 125pg de BMP-7 por miligrama do produto) e que essa variação interferia no desfecho da artrodese.

O substituto ósseo ideal deve ter estrutura similar ao do tecido ósseo, ser biocompatível, bioabsorvível, osteocondutor, osteoindutor e possuir custo acessível. As cerâmicas de cálcio-fosfato estão entre as mais utilizadas no meio ortopédico. Possuem efeito osteocondutor, exercendo função de suporte para o crescimento ósseo. O exemplar padrão é a hidroxiapatita (HAp), mineral de ocorrência natural e presente no tecido ósseo. As vantagens desses materiais são a biodegradação lenta, osteointegração e alta resistência mecânica (Roberts & Rosenbaum, 2012).

As BMP-2 e BMP-7 são ortobiológicos disponíveis para uso em humanos. Múltiplos estudos em pacientes com fratura exposta de tíbia utilizando BMP-2 demonstraram melhores resultados quanto ao tempo de consolidação, cicatrização da ferida e taxa de infecção (Jones et al, 2006; Swiontkowski et al, 2006; Govender et al, 2002).

Além disso, o uso de células tronco para o reparo ósseo é uma estratégia em desenvolvimento. Diversas fontes de células são testadas em estudos *in vitro* e *in vivo*. Kim e colaboradores estimularam células tronco extraídas do tecido adiposo associadas à DBM e mostraram melhora na capacidade de regeneração óssea com o uso dessas células. Em 2009 Hernigou e colaboradores utilizaram aspirado autólogo de medula óssea para tratamento de necrose avascular da cabeça do fêmur, e observaram melhora no resultado final.

Uma variedade de substâncias envolvidas no processo de ossificação está em estudo com o objetivo de melhorar o manejo de fraturas e pseudoartroses. Ito

e colaboradores, utilizando terapia gênica e vetor viral, demonstraram que enxertos ósseos com expressão aumentada de VEGF e ligante do receptor ativador do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL) induzem remodelação óssea aumentada e maior neovascularização medular (Ito et al, 2005).

Uma parte da engenharia tecidual voltada para o tecido ósseo compreende o desenvolvimento de biomateriais associando scaffolds a fatores de crescimento e células-tronco (Fernandez-Yaque et al, 2015; Drosse et al, 2008). Há grande interesse no desenvolvimento de novos materiais para uso na engenharia tecidual.

Estudos com biovidros demonstram que a formação de uma camada de HAp ao redor do biomaterial é fundamental para a biocompatibilidade (Rezwan et al, 2006). A dissolução de minerais a partir do biovidro também interfere na função celular. A liberação local de silício e estrôncio aumentam a diferenciação e atividade osteoblástica (Tan et al, 2014; Xynos et al, 2000).

Apesar da grande opção de matérias sintéticos disponível, nenhum consegue preencher os requisitos para se tornar o padrão ouro no tratamento dos defeitos ósseos, explicando o motivo pelo qual eles representam ainda apenas 10% do uso de substitutos ósseos. Por isso, muito esforço é despendido em pesquisas para melhorar a oferta de substitutos ósseos para tratamento de lesões do sistema esquelético.

1.3 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (HY), uma glicosaminoglicana (GAG) natural, é um dos principais constituintes da MEC do tecido conjuntivo. Consiste em um polissacarídeo de alto peso molecular ($10^3 - 10^6$ kDa), carregado negativamente e com grande potencial osmótico, atraindo água para o meio onde se encontra.

Meyer e colaboradores caracterizaram o HY inicialmente no humor vítreo e, mais tarde, no cordão umbilical, isolando os seus componentes sacarídeos N-acetilglicosamina e ácido D-glucorônico (Meyer et al, 1936). Diferente de outras GAGs, o HY é sintetizado na face interna da membrana celular pela ação de diferentes HY sintases (HYS1, HYS2 e HYS3). As isoformas de HYS sintetizam

diferentes tipos de HY, sendo a HYS3 responsável pela produção de HY de baixo peso molecular (LMWHY), com menos de 300kDa (Weigel et al, 1997).

A função do HY depende do tamanho da molécula ativa. Apesar de ser encontrada com peso molecular maior que 10^6 kDa, o HY pode ser clivado por hialuronidases e formar moléculas de menor peso molecular. As moléculas de alto peso possuem característica de bloqueio físico à angiogênese e migração celular, além de propriedades anti-inflamatória e imunossupressora (Day et al, 2005; Temple et al, 2000). Já moléculas pequenas, 4-15 dissacarídeos, podem promover a angiogênese e aumentar o fluxo sanguíneo local (Lees et al, 1995).

O HY possui a função primordial de manter a arquitetura dos tecidos, influenciando a mobilidade e adesão celular. Alterações na quantidade ou qualidade do HY da MEC também pode influenciar a proliferação celular (Sohara et al, 2001). As células conseguem reconhecer o HY principalmente através de interações com receptores CD44 e receptores de motilidade mediados pelo hialuronato (RHAMM). Quando ativados, esses receptores podem iniciar cascatas de sinalização intra-celulares ou a endocitose do HY (Hemshekhar et al, 2016).

O receptor CD44 é uma glicoproteína de membrana presente na maioria das células de mamíferos, possuindo característica multifuncional na adesão célula-célula e célula-matriz. Além do HY, o CD44 pode interagir com outras proteínas da MEC, como a fibronectina, colágeno, fatores de crescimento, citocinas e MMPs (Naor et al, 1997).

Estudos utilizando células tumorais mostraram que a ativação da MMP-9 mediada pelo CD44 libera moléculas de TGF- β latentes na MEC, regulando a invasão tumoral e angiogênese local (Yu & Stamenkovic, 2000; Yu & Stamenkovic, 1997). De forma análoga, a molécula de CD44 pode ser clivada pela MMP-9, produzindo um domínio intra-celular que interage com o Runx2 aumentando a síntese de MMP-9 (Chellaiah & Ma, 2013).

No tecido ósseo o HY estimula a expressão de RANKL pelas células do estroma medular. Cao e col. em 2015 mostraram que animais CD44 (-/-) possuem maior massa óssea na tíbia e menor expressão de RANK. Também em 2015, Li e colaboradores utilizando camundongos com deleção do CD44, relacionaram a

importância deste receptor com a osteoclastogênese. A estimulação de células progenitoras com RANKL aumenta a expressão de CD44, enquanto este receptor potencializa a via de sinalização do RANKL, como representado na Figura 4.

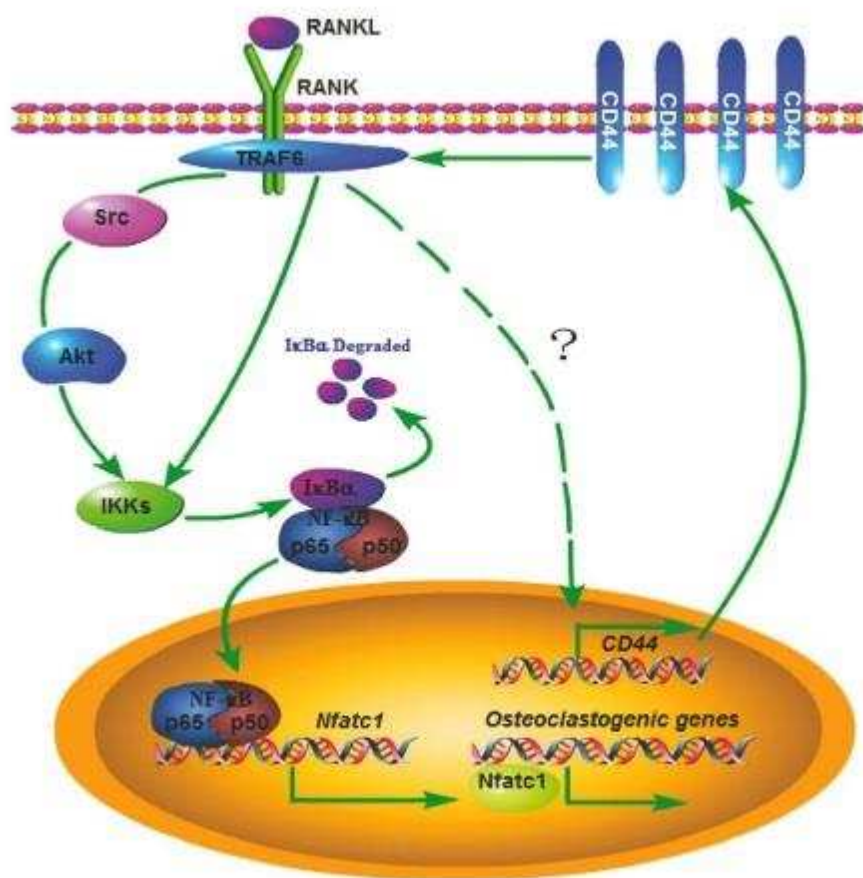


Figura 4: Participação do CD44 na osteoclastogênese (associação do receptor CD44 com a via de sinalização do RANKL). A Ligação do RANKL ao seu receptor culmina no aumento da produção de CD44. Este receptor de membrana, quando ativado, estimula a interação do fator-6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) e seu receptor, aumentando a atividade na via de sinalização do NF- κ B (Li et al, 2015).

Devido às suas características, o HY é amplamente estudado para aplicações clínicas, seja como substrato para regeneração osteoarticular, cardiovascular e neurológica (Schizas et al, 2014; Cavallo et al, 2013; Thierry et al, 2004) ou como veículo para medicamentos (Jiao et al, 2016; Wolf et al, 2001). Seu uso para auxiliar a regeneração óssea em procedimentos odontológicos já é uma realidade clínica (Baldini et al, 2010). Diversos estudos utilizam o HY isoladamente, associado a fatores de crescimento ou a outros substitutos ósseos para melhorar a consolidação (Nguyen & Lee, 2014; Kisiel et al, 2013; Patterson et al, 2010).

1.4 Estrôncio e nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio

É definido como nanomaterial aquele de ocorrência natural ou sintética que possua em sua formulação mais de 50% de partículas com dimensão entre 1 e 100 nm (Rauscher et al, 2013).

Nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio possuem estrutura similar aos cristais de apatita que constituem a fase mineral óssea. Por serem biocompatíveis, as nanopartículas de fosfato de cálcio são endocitadas pelas células e metabolizadas no ambiente ácido dos lisossomos (Canton & Battaglia, 2012). Isto, associado ao fato de possuírem boa adsorção de biomoléculas, fez das nanopartículas de fosfato de cálcio excelentes candidatas para uso como carreadoras de drogas e ácidos nucleicos (Dördelmann et al, 2014).

Os bifosfonatos são medicações antirreabsortivas utilizadas em pacientes com osteoporose. Alghamdi e colaboradores, em 2014, utilizaram nanopartículas de fosfato de cálcio contendo bifosfonato como revestimento de implante dentário em ratos osteoporóticos. Nesse estudo foi observado que a associação conseguiu aumentar a formação óssea peri-implante.

As nanopartículas de fosfato de cálcio podem ser utilizadas para transfecção celular de DNA e siRNA (Kovtun et al, 2009; Roy et al, 2003). Em 2013 Chernousova e colaboradores utilizaram as nanopartículas como carreadores de plasmídeos contendo sequência de VEGF ou BPM-7 para

transfecção de células epiteliais e MSC. Foi demonstrado que as nanopartículas com carga positiva conseguem maior taxa de transfecção.

Em 2010, Hanifi e colaboradores desenvolveram um grupo de nanopartículas contendo estrôncio. Após caracterização das nanopartículas, foi observado que elas possuíam menor taxa de cristalização, maior área de superfície, maior carga positiva e maior taxa de dissolução, tornando-as mais indicadas para transfecção celular.

O estrôncio é um mineral com similaridades químicas com o cálcio e magnésio. Esta semelhança faz com que o organismo o confunda com o cálcio na formação dos cristais de apatita em regiões com alto *turn over* (Boanini et al, 2010). Esse mineral é capaz de estimular a atividade osteoblástica e inibir os osteoclastos (Suganthi et al, 2011).

O estrôncio é o quarto elemento do grupo dos metais alcalinos terrosos, representado pelo símbolo Sr. Possui número atômico 38 e o seu núcleo possui tamanho similar ao do cálcio. Devido à suas similaridades o organismo pode utilizar o estrôncio como substituto ao cálcio na fase mineral óssea.

Diversos estudos *in-vitro* e *in-vivo* mostram que o estrôncio é capaz de estimular a atividade de osteoblastos e inibir a reabsorção óssea mediada por osteoclastos. O mecanismo de ação mais provável é pela sua interação com receptores sensíveis ao cálcio (Querido et al, 2016).

A droga ranelato de estrôncio é disponível para uso clínico em pacientes com osteoporose pós-menopausa grave, e o seu mecanismo de ação consiste no aumento da disponibilidade de estrôncio sérico. Desse modo o mineral é incluído nos cristais de apatita do tecido ósseo, e exerce seus efeitos nos osteoblastos e osteoclastos. O ranelato de estrôncio é considerado uma droga revolucionária no tratamento da osteoporose por possuir efeito anabólico e anti-catabólico no tecido ósseo (Reginster et al, 2015).

Assim, o uso de nanopartículas de fosfato de cálcio contendo estrôncio na engenharia tecidual óssea possui grande potencial de sucesso, considerando-se as suas características minerais e biológicas.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que o HY acelera o processo de consolidação óssea de alvéolos dentários e que a funcionalização de nanotubos de carbono (NTC) com HY é capaz de estabilizar essa molécula sem alterar suas funções biológicas, funcionando como *scaffold* para regeneração óssea (Mendes et al, 2008; Mendes et al, 2010). Utilizando cultura de osteoblastos, foi observado que o revestimento de uma superfície de titânio com HY ou NTC funcionalizados com HY aumenta a deposição mineral e que esse efeito é secundário à maior expressão de mRNA de colágeno e BMPs (Sá et al, 2016).

A utilização de materiais biocompatíveis e bioabsorvíveis é fundamental na engenharia tecidual. O desenvolvimento de nanopartículas para utilização médica é um amplo campo de pesquisa (Dorozhkin, 2010). Devido à sua alta bioatividade, biocompatibilidade, estabilidade química e atoxicidade, as NPC são utilizadas como carreadores de drogas em testes com antibióticos e quimioterápicos. Alvarenga e colaboradores utilizaram NPC contendo antimônio para direcionar a medicação para os macrófagos, diminuindo assim os efeitos sistêmicos da droga (Alvarenga et al, 2015).

Como um material biodegradável e biocompatível e por ser o principal componente dos ossos e dos dentes humanos, os diferentes tipos de fosfato de cálcio são amplamente utilizado e estudado em aplicações de reparação óssea e dentária. Além da sua utilização nesta área da medicina, as nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio também são candidatas atrativas para aplicações em distribuição de bioimagem e de terapêuticos.

Assim, no presente estudo avaliamos o comportamento das NPC contendo estrôncio isoladamente ou em associação ao HY na formação óssea em defeitos não críticos de tíbias de ratos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de NPC contendo estrôncio (NPC-Sr) isoladamente e associadas ao HY no reparo de tíbias de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a síntese e a caracterização físico-química das NPC-Sr;
- Avaliar histologicamente o processo de reparo ósseo 7 dias após a realização de defeito ósseo em tíbias de ratos tratados ou não com HY, NPC ou NPC/HY;
- Avaliar morfometricamente o percentual de trabéculas ósseas formadas 7 dias após a realização de defeito ósseo em tíbias de ratos tratados ou não com HY, NPC ou NPC/HY.

4. METODOLOGIA

4.1 Nanopartículas

As nanopartículas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior do Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.2 Síntese das nanopartículas baseadas em fosfato contendo estrôncio

Os processos de sínteses das NPC-Sr são apresentados e intelectualmente protegidos em dois registros de patentes sob os números: BR 102.012.032.493-8 e BR 102.013.032.731-0 disponível em www.inpi.gov.br. Resumidamente, foi utilizada uma mistura de soluções de sais em um sistema de precipitação controlada. Os sais utilizados na síntese foram: 7 mmol de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 H_2O (Cromoline, Brasil), 3mmol de KH_2PO_4 , 3 mmol de $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_8\text{SSr}_2$ (Cromoline, Brasil), 3,5mmol CaCl_2 2 H_2O e 3,5 mmol de MgCl_2 6 H_2O (Synth, Brasil), utilizando um sistema aquoso contendo membrana semipermeável (Spectrum Medical Industries, Inc). Após o período de síntese de 24 horas, a suspensão aquosa contendo nanopartículas de fosfato contendo estrôncio (NPC-Sr) foi centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos. O precipitado foi lavado três vezes com etanol absoluto (Merck, Brasil) e seco a 60 °C durante 48 horas. Alíquotas de 1 mg por frasco de cada NPC foram colocadas em microtubos de polipropileno cônicos e esterilizado com 25 kGy de irradiação gama no Laboratório de Irradiação Gama - LIG (CDTN-UFMG). Para todas as análises subsequentes, frações contendo 0,1 mg foram utilizadas.

4.3 Morfologia e composição elementar por microanálise de raio-X

Alíquotas de 10 μL de solução estoque de NPC-Sr (1 mg/mL em água mili-Q) foram depositadas sobre lamínula de carbono (Termanox®), secas ao ar, metalizadas a vácuo (10^{-5} mBar) com carbono no evaporador Hitachi modelo

HUS4G e analisadas nos microscópios de varredura com sistema de microanálise de raios-x integrado JEOL JSM 6360LV no Centro de Microscopia da UFMG. Foram adquiridas imagens por elétrons secundários utilizando-se magnificações entre 1.000 e 9.500x. Espectros de energia de raio-X dispersiva para a caracterização da composição elementar foram obtidos no mesmo equipamento operando a 15KeV, sendo os elementos químicos identificados através de seus picos característicos.

4.4 Distribuição de diâmetro

Para obtenção do diâmetro da nanopartícula foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern) do Laboratório de Biofísica Molecular (ICB-UFMG). Foram usados 20 µL da solução estoque de NPC-Sr (10 mg/mL em água mili-Q) adicionados a 2 mL de água destilada. As soluções resultantes foram inseridas nas cubetas do equipamento e as leituras efetuadas e registradas após a homogeneização e estabilização das amostras.

4.5 Procedimento cirúrgico

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade média de 3 meses, pesando entre 200 e 250 g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Os animais foram mantidos em biotério apropriado, com luminosidade e temperatura controladas, acondicionados em gaiolas plásticas contendo 2 animais em cada gaiola e com acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório. Esse trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (documento em anexo). Uma hora antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose de benzilpenicilina/estreptomicina (0,84 mg/100 g de peso corporal) via intramuscular.

Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1 mL/100g) e cloridrato de quetamina 10% (0,1 mL/100g). Após imobilização, foi feita a tricotomia e antissepsia da área. Na região anterior da pata esquerda foi

feita uma incisão com lâmina de bisturi no sentido longitudinal da tíbia. A musculatura foi afastada do periósteo e um defeito foi realizado no osso, utilizando broca helicoidal de 1,6 mm com baixa rotação.

A região foi irrigada com solução de cloreto de sódio 0,9% e a área do defeito foi lavada com a mesma solução. Foram realizados os diferentes tratamentos de acordo com os seguintes grupos experimentais (Tabela 1): (i) ~0,1 ml de carbopol; (ii) ~0,1 ml de HY (1%); (iii) ~0,1 ml do gel de NPC-Sr (0,5 mg/mL); e (iv) ~0,1 ml do gel de NPC-Sr/HY (0,5 mg/mL / 1%) nas tíbias esquerdas de modo que toda a cavidade ficasse preenchida com o gel. Foi realizada a sutura da pele. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose de flunixin meglumina (0,22 mg/100 g de peso corporal), via intramuscular.

Após 7 dias, os animais foram sacrificados por decapitação e as tíbias foram imediatamente removidas e fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FNT) 10% à temperatura ambiente por 48 horas.

Tabela 1: Grupos experimentais.

Grupo	Tratamento	Descrição	n
i	Carbopol	1%	5
ii	HY	1%	5
iii	NPC-Sr	0,5mg/mL	6
iv	HY + NPC-Sr	1% + 0,5mg/mL	7

4.6 Processamento histológico

Após a fixação, as tíbias foram submetidas à lavagem em água corrente para remoção do excesso de fixador e neutralização do ácido fórmico através de quatro banhos de 15 minutos. Em seguida, foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por um período de aproximadamente 21 dias.

Após a desmineralização, o material foi submetido ao seguinte processo de inclusão:

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

Foram obtidos de cada amostra cerca de 30 cortes semi-seriados de 6 µm de espessura montados em lâminas histológicas previamente silanizadas com silano 2%. As lâminas de cada amostra foram armazenadas para processamento em Tricrômico de Masson. Assim, para coloração das lâminas selecionadas, foi utilizado o seguinte protocolo:

- imersão seriada em banhos de xilol;
- imersão seriada em banhos de álcool etílico absoluto;
- imersão seriada em álcool etílico hidratado (90%, 80% e 70%);
- lavagem em água corrente por 20 minutos;
- imersão em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- lavagem em água corrente por 20 minutos;
- imersão em solução de Tricrômico de Masson por 8 minutos;
- 3 mergulhos rápidos em água corrente;
- imersão seriada em álcool etílico para desidratação (90%, 95% e absoluto);
- imersão seriada em banhos de xilol.

4.7 Análise histológica e morfométrica

Foram selecionados quatro cortes histológicos de cada amostra para análise. Dez imagens de cada corte, contemplando todo o defeito, foram

visualizadas através da objetiva de 40X e digitalizadas através da microcâmara JVC TK-1270/RGB.

A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foram previamente descritas na literatura (Caliari, 1997).

Para quantificação morfométrica da formação trabecular no defeito ósseo, foi considerado o percentual de trabéculas ósseas presentes no defeito em relação à área total ($18,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$). A área ocupada pelas trabéculas ósseas foi obtida através do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. Os pixels das trabéculas ósseas foram selecionados através da imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e obtenção da área em μm^2 .

O cálculo utilizado para obter a proporção trabecular é apresentado a seguir:

$$\% \text{ de trabéculas} = \frac{\sum \text{Área de trabéculas nas 10 imagens}}{\text{Área total das 10 imagens } (18,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2)}$$

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos na análise morfométrica foram expressos como média $\pm$ EPM e analisados através do teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls com o auxílio do programa GraphPad Prism 4. Foram considerados significativos valores com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das NPC-Sr quanto a morfologia e distribuição de diâmetro

A análise por microscopia de varredura demonstrou que as NPC-Sr apresentaram-se como agregados de nanopartículas com padrão de distribuição de diâmetro por espalhamento dinâmico de luz na forma de estruturas monodispersas com $\sim 402,1$ nm de diâmetro (Figura 5).

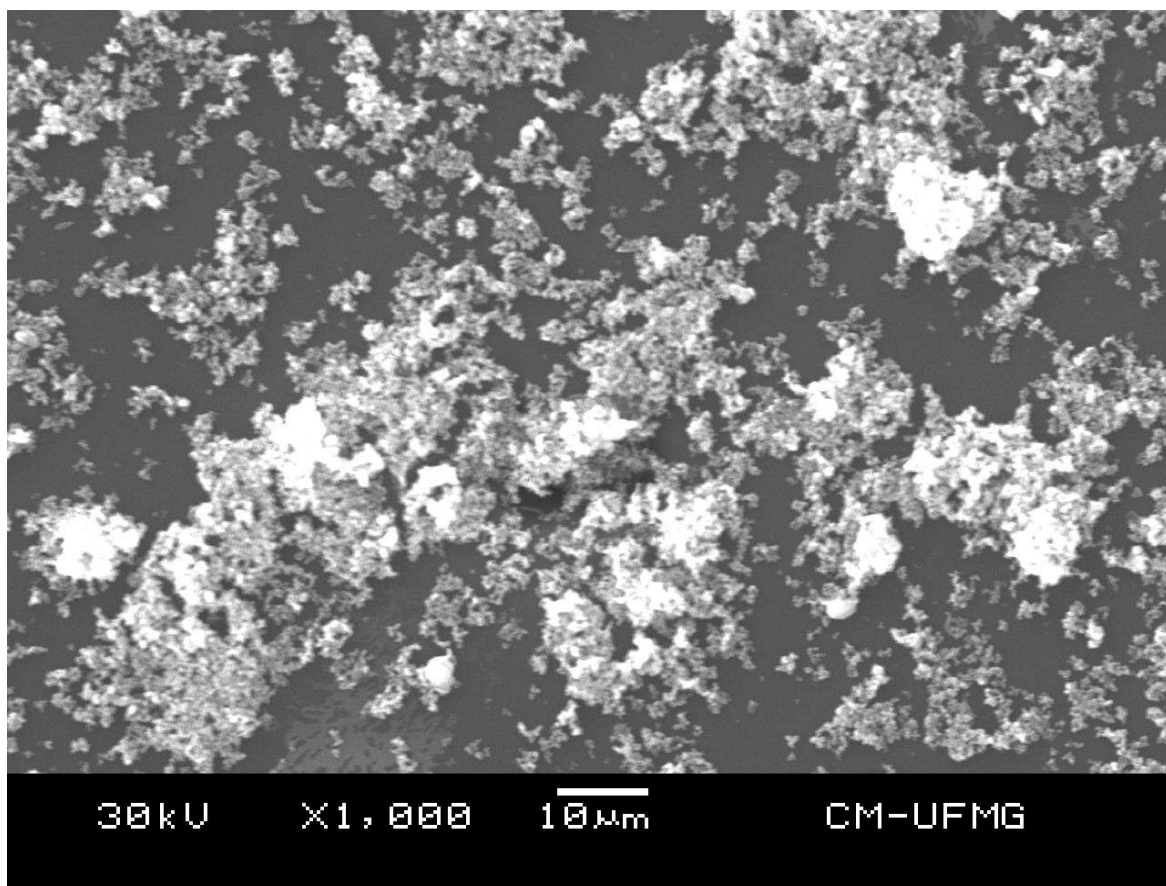


Figura 5: Imagem representativa de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a morfologia das NPC-Sr.

5.2 Composição elemental por microanálise de raio-x

Os espectros obtidos por microscopia eletrônica analítica dos NPC-Sr mostraram picos referentes aos elementos carbono, oxigênio, magnésio, estrôncio, fósforo e cálcio (Figura 6).

Os picos de carbono são sinais derivados do processo de metalização. Os demais picos de oxigênio, magnésio, estrôncio, fósforo e cálcio são constituintes elementares do NPC sintetizado e demonstram a presença significativa de estrôncio em sua composição.

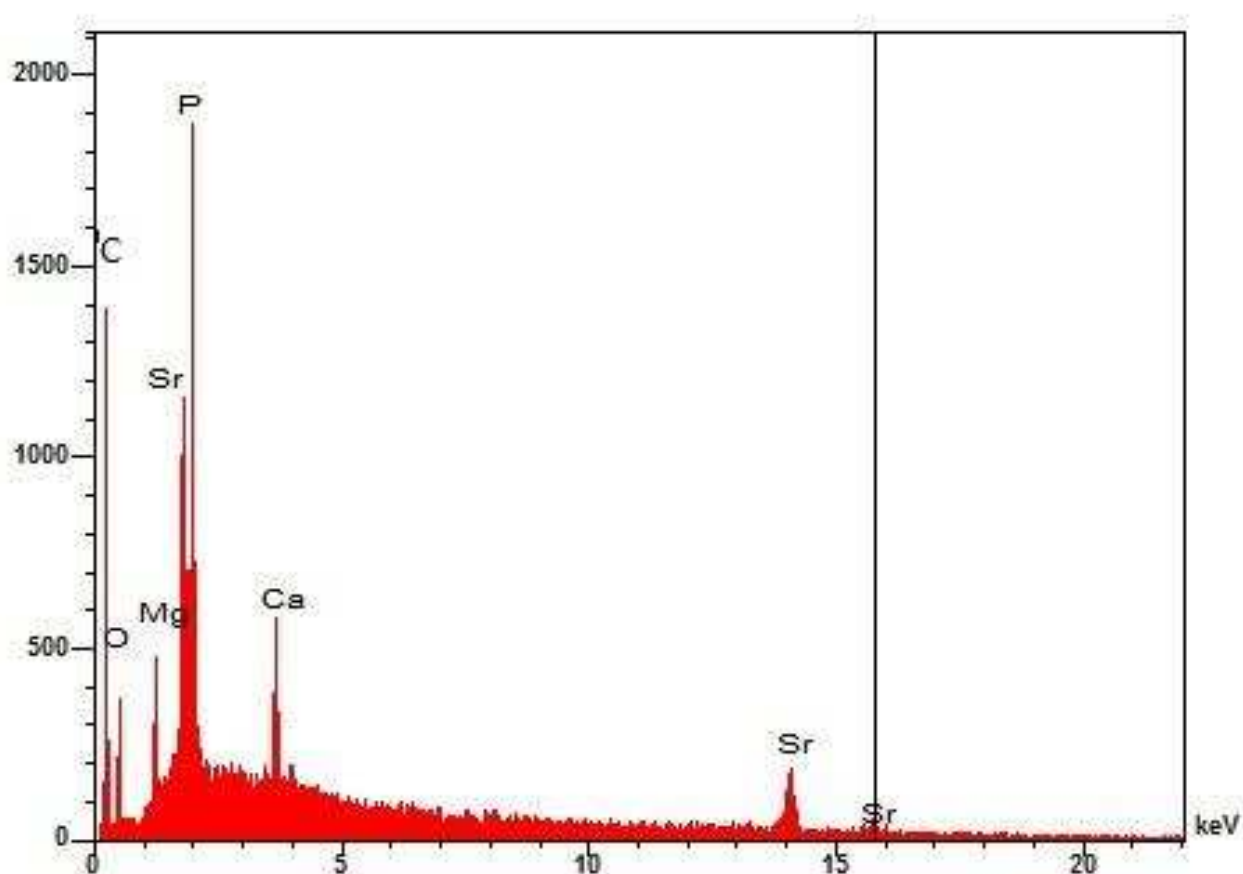


Figura 6: Composição elemental dos NPC-Sr obtida por microscopia eletrônica analítica.

5.3 Análise histológica

A análise histológica evidenciou nos animais controle a presença de escassas trabéculas ósseas na região periférica do defeito. Essas trabéculas aparentavam-se imaturas, com a presença de inúmeros osteoblastos e poucos osteócitos aprisionados. No centro da lesão predominava abundante quantidade de tecido de granulação com vasos neoformados (Figura 7A e B).

O tratamento com HY resultou no aumento na quantidade de trabéculas no centro do defeito tibial. Na região periférica as trabéculas apresentavam sinais de maturidade, mais espessas, organizadas e com maior presença de osteócitos. O espaço intertrabecular estava repleto de células do sistema hematopoiético (Figura 7C).

Nas amostras dos animais que receberam o tratamento com NPC-Sr a formação de trabéculas também foi maior, porém com distribuição diferente. No centro da lesão as trabéculas possuíam sinais de imaturidade, enquanto na periferia já era possível observar maior espessura das trabéculas, e poucos osteoclastos.(Figura 7E).

O tratamento com a associação do HY com as NPC-Sr resultou também em maior formação de trabéculas, com menor quantidade de tecido de granulação na periferia. A formação óssea apresentou sinais de remodelamento, com presença de osteoclastos em áreas de reabsorção de trabéculas periféricas (Figura 7G).

Dessa forma, a análise histológica qualitativa dos defeitos ósseos revelou que, independente do tratamento realizado, houve formação de trabeculado ósseo, indicando que a falha óssea é do tipo não-crítica. Ainda, o tratamento com HY, NPC-Sr ou HY+NPC-Sr resultou em aceleração do processo de reparo da lesão, com presença de trabéculas em maior quantidade e com aspecto mais avançado do processo de consolidação.

Figura 7: Fotomicrografias representativas das secções histológicas analisadas. Grupo carbopol: (A) objetiva de 4x e (B) objetiva de 20x; Grupo HY: (C) objetiva de 4x e (D) objetiva de 20x; Grupo NPC-Sr: (E) objetiva de 4x e (F) objetiva de 20x; e Grupo HY/NPC-Sr: (G) objetiva de 4x e (H) objetiva de 20x. Os animais controle apresentaram formação trabecular na periferia do defeito. O tratamento com HY, NPC-Sr ou HY+NPC-Sr tiveram efeito positivo na quantidade e na maturidade das trabéculas ósseas. Tricrômio de Masson.

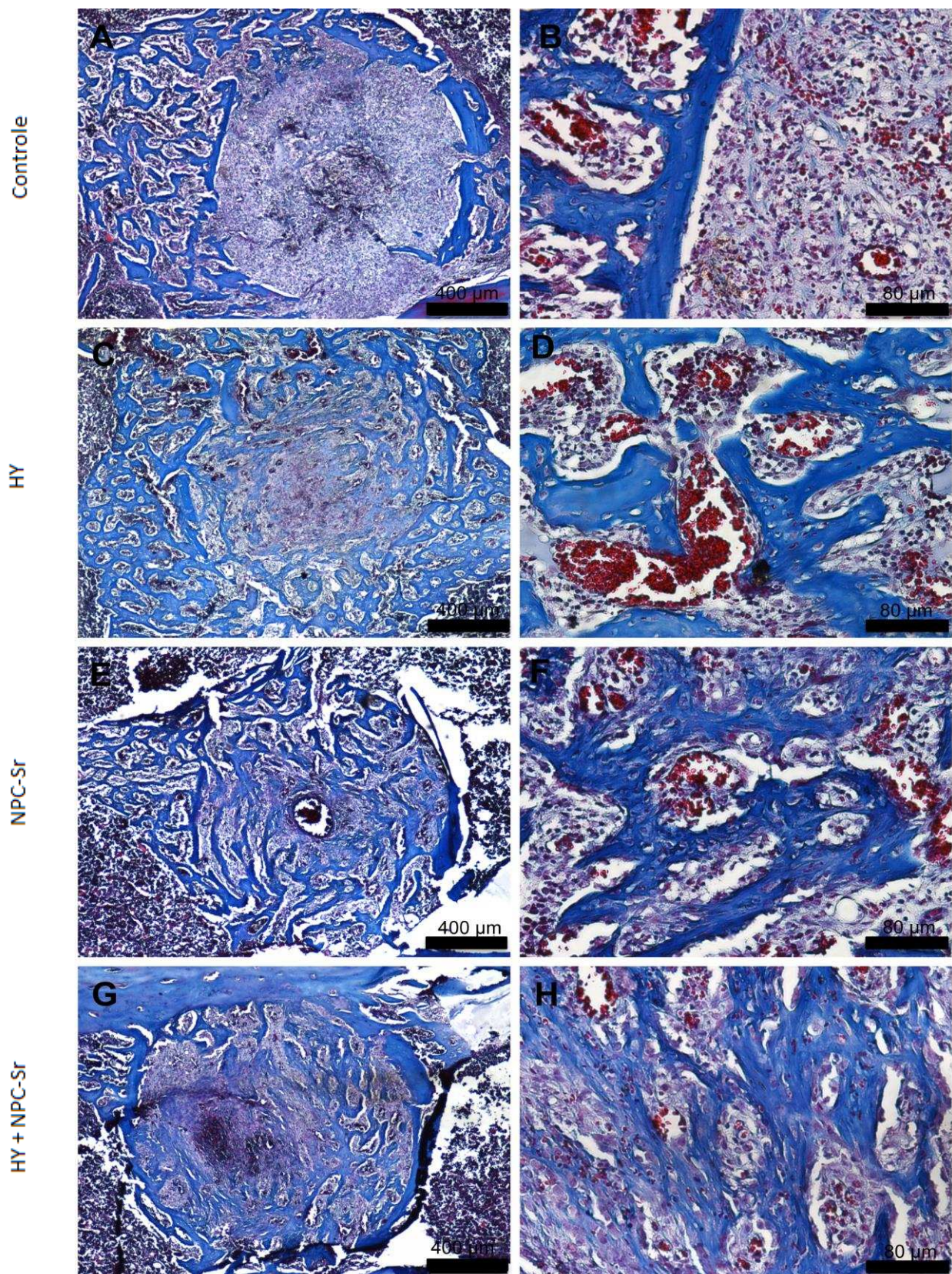


Figura 7

5.4 Análise morfométrica

A análise morfométrica da formação trabecular confirmou a observação histológica qualitativa quanto ao aumento na formação óssea com o uso de HY (21,9 ± 2,7%) quando comparado ao controle (13,5 ± 2,2%) (Figura 8).

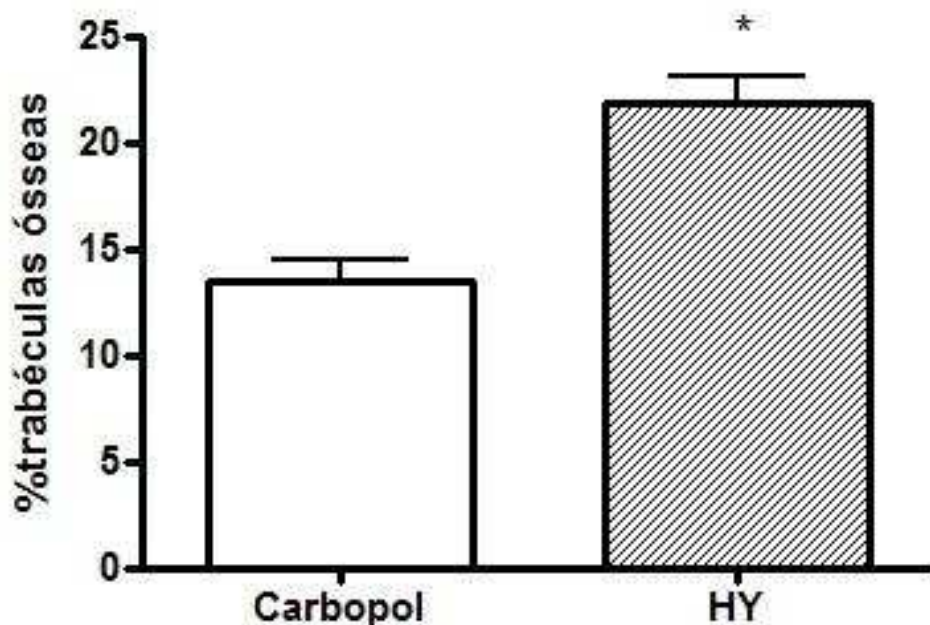


Figura 8: Quantificação da área de trabéculas ósseas em tíbias tratadas com HY. O HY aumentou a formação trabecular em relação aos animais controle (carbopol). Os dados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ (Teste t de Student).

A formação trabecular nos animais tratados com NPC-Sr foi significativamente maior quando comparada com animais controle. A análise morfométrica mostrou que a porcentagem da área ocupada por trabeculado ósseo após o tratamento com as NPC-Sr (20,4 ± 5,5%) foi superior ao controle (13,5 ± 2,2%) (Figura 9).

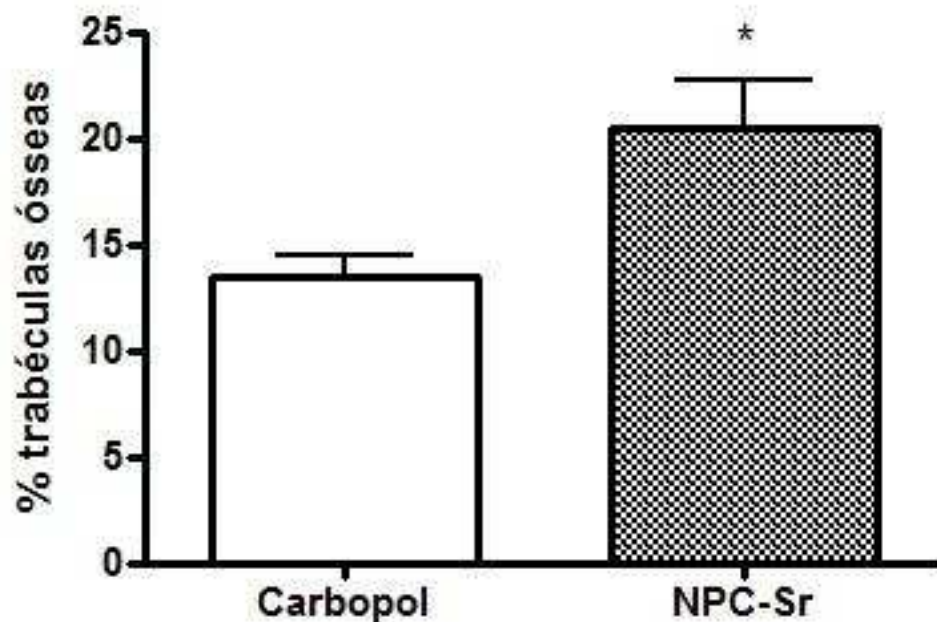


Figura 9: Quantificação da área de trabéculas ósseas em tíbias tratadas com NPC-Sr. As NPC-Sr aumentaram a formação trabecular em relação aos animais controle (carbopol). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (Teste t de Student).

A associação dos tratamentos (HY+NPC-Sr) foi eficaz em acelerar o processo de ossificação, apresentando à análise morfométrica maior área de trabeculado ósseo ($19,7 \pm 3,7\%$) quando comparado ao controle ($13,5 \pm 2,2\%$) (Figura 10).

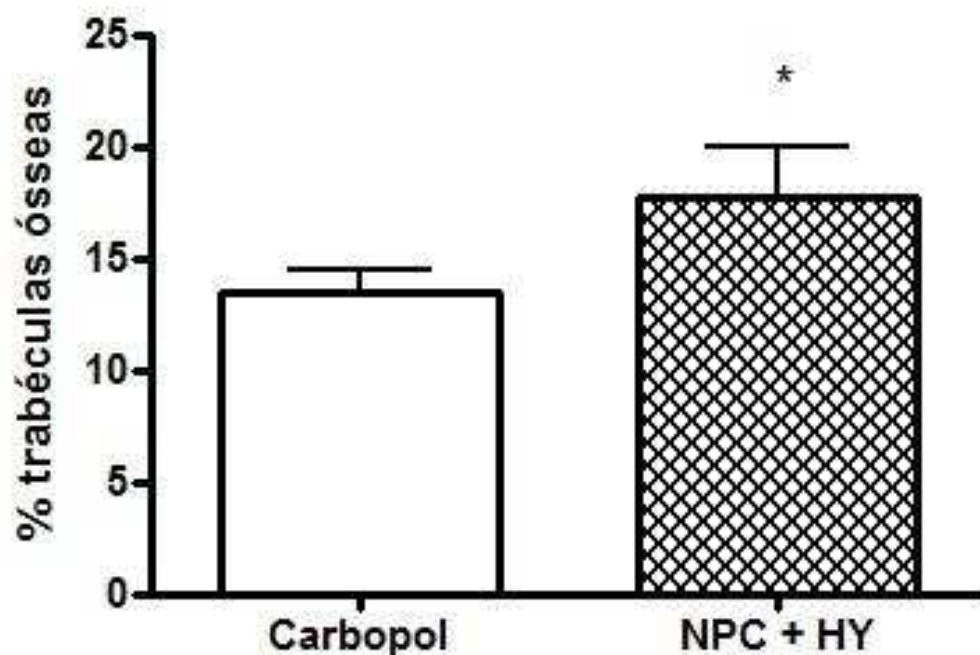


Figura 10: Quantificação da área de trabéculas ósseas em tíbias tratadas com HY+NPC-Sr. A associação HY+NPC-Sr aumentou a formação trabecular em relação aos animais controle (carbopol). Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (Teste t de Student).

Quando os três tratamentos foram comparados, observamos que eles induziram similar aumento na formação trabecular. Assim, não foi evidenciado nenhum efeito aditivo com o tratamento conjunto HY+NPC-Sr (Figura 11).

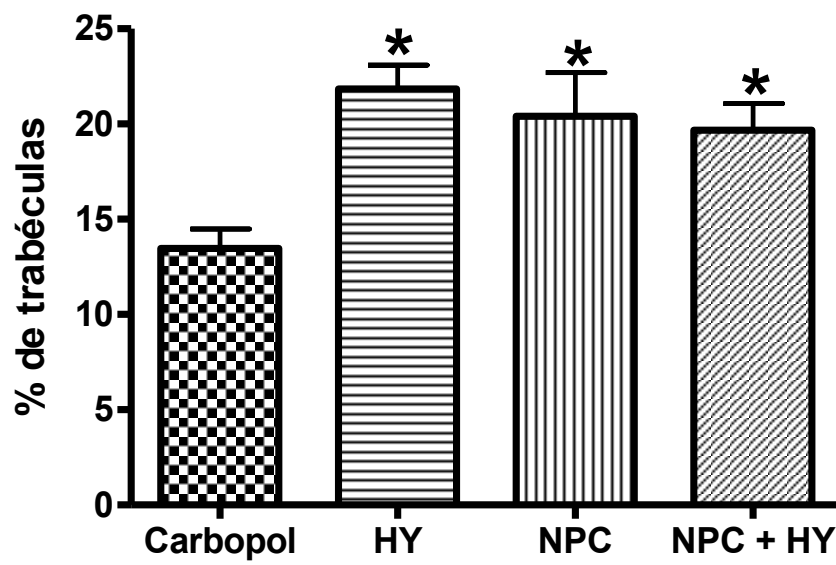


Figura 11: Quantificação da área de trabéculas ósseas nos três tratamentos (HY, NPC-Sr e HY+NPC-Sr). Todos os tratamentos aumentaram a formação trabecular em relação aos animais controle (carbopol), sem diferença significativa entre eles. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. carbopol (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-keuls).

6. DISCUSSÃO

O osso, apesar de aparentemente estático e rígido, é dotado de incrível capacidade de reparo e regeneração. Através de complexa integração entre os estímulos químicos e físicos é possível a reestruturação de sua matriz celular e reativação ou apoptose dos componentes celulares.

As lesões ósseas, sejam elas traumáticas ou tumorais, podem ocasionar perda de continuidade do tecido ósseo, incapacitando o mesmo de se regenerar espontaneamente.

Nos EUA, o uso de enxertos e substitutos ósseos movimenta mais de 2,5 bilhões de dólares em mais de 1,5 milhões de procedimentos ortopédicos anualmente (Desai, 2007).

Nosso trabalho utilizou um modelo de defeito ósseo não crítico em tíbias de ratos. Desse modo, objetivamos retirar o fator mecânico que poderia complicar a análise dos dados ao se utilizar um modelo de falha crítica (Hoerth et al, 2014).

Mendes e colaboradores utilizaram o carbopol, um gel inerte, em alvéolos dentários de ratos e comprovaram que este composto não interfere no processo de regeneração óssea (Mendes et al, 2008), permitindo que ele seja usado como veículo de biomateriais apresentados em forma de pó.

Nossos resultados corroboram a atuação do carbopol como um gel inerte e que a falha criada é do tipo não crítica. Nos animais que receberam apenas o gel de carbopol ocorreu a formação de trabéculas ósseas na periferia do defeito, com presença de tecido de granulação na região central. Esses achados são compatíveis com o processo de consolidação normal.

O uso do HY como ortobiológico com atuação na regeneração óssea é fonte de pesquisa em nosso laboratório. A atuação positiva do HY na regeneração óssea em alvéolos dentários, tíbias e cultura celular de osteoblastos, já foi demonstrada em estudos anteriores (Mendes et al, 2008; Mendes et al, 2010; Sá et al, 2013; Sá et al, 2016).

No presente trabalho, observamos que o tratamento com HY aumentou a formação trabecular no defeito de tíbias. Ainda, foram encontradas regiões de remodelamento ósseo, com aumento do espaço intertrabecular. Mendes

colaboradores, em 2008, observaram que o HY induz o aumento da formação trabecular óssea em alvéolos dentários de ratos e que esse aumento é acompanhado de maior expressão de BMP-2 e osteopontina.

O mecanismo pelo qual o HY causa a aceleração da regeneração óssea ainda não é completamente elucidado. Por ser uma GAG ubíqua no tecido conjuntivo, o HY pode atuar modulando a resposta inflamatória (Gómez-Aristizábal et al, 2016), aumentando a liberação de TGF- β da matriz por ação da MMP-9 (Yu & Stamenkovic, 2000) ou aumentando a remodelação óssea através da modulação da via RANKL pelo seu receptor CD44 (Li et al, 2015).

Além disso, esse trabalho demonstrou que o uso de NPC-Sr possui efeito positivo na regeneração óssea, aumentando a quantidade de trabéculas neoformadas em um defeito não crítico em tíbias de ratos. Esse resultado corrobora outros estudos que avaliaram o papel do estrôncio na terapêutica do tecido ósseo. Chung & Long observaram que implantes de titânio revestidos com HAp contendo estrôncio induzem maior adesão e proliferação de osteoblastos quando comparado à HAp isolada.

O modo de atuação do estrôncio no metabolismo ósseo não é bem esclarecido. Wornham e colaboradores observaram um efeito deletério do estrôncio em cultura de osteoblastos, diminuindo a mineralização óssea. Outro efeito observado foi a redução no número de osteoclastos na cultura. A diminuição do número de osteoclastos decorre da interferência no *cross-talk* entre os osteoblastos e osteoclastos, como relatado por Peng e colaboradores em 2011.

Os íons de estrôncio podem estimular receptores sensíveis à cálcio nos osteoclastos e osteócitos, ativando diversas vias de sinalização intracelular como a MAPK e Wnt. Com isso, drogas liberadoras de estrôncio podem modular a atividade celular óssea modificando a liberação de osteoprotegerina (OPG) e RANKL (Saidak & Marie, 2012).

Assim, nossos resultados obtidos com o uso das NPC-Sr podem ser justificados, pelo menos em parte, pela ação do estrôncio aumentando a atividade osteoblástica e inibindo os osteoclastos. Porém, a atuação das NPC-Sr também pode ser devida à ação do fosfato na mineralização. Para que tenha início a

mineralização da MEC, os osteoblastos liberam vesículas envolvidas por membranas semelhantes à membrana celular, conhecidas como vesículas de matriz, que posteriormente formarão os sítios de nucleação, com deposição mineral em seu interior. A liberação dessas vesículas de matriz necessárias à mineralização do osteoide é estimulada pelo fosfato (Chaudhary et al, 2016).

A associação de HY com NPC-Sr não mostrou efeito aditivo em relação ao tratamento isolado com cada composto. Esse achado é compatível com outros estudos comparando o efeito do HY com o dos NTC na regeneração óssea (Mendes et al, 2010). A ausência de acréscimo na formação óssea quando utilizamos HY+NPC-Sr pode ser justificada pelo fato de ambas as substâncias atuarem em uma mesma via de sinalização intracelular ou pela existência de um limite para o aumento na produção trabecular. Entretanto, ambas hipóteses necessitam de ser avaliadas futuramente com o objetivo de esclarecer esse achado.

7. CONCLUSÃO

Desta forma, concluímos que as NPC-Sr possui potencial na confecção de biomateriais para engenharia tecidual óssea. No presente estudo foi testada a ação direta das NPC-Sr na regeneração óssea, porém a mesma ainda deve ser avaliada como veículo para ortobiológicos. Assim, esse trabalho introduz a utilização das NPC-Sr no campo ortopédico, criando opções terapêuticas associando ou não o HY e as NPC-Sr. A avaliação das vias celulares e moleculares envolvidas na atividade das NPC-Sr ainda devem ser estudadas e serão foco de novos trabalhos em nosso laboratório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, et al. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J. Dent. Res.* 2008; 87: 107–118. [PubMed 18218835]

Alghamdi HS, Bosco R, Both SK, et al. Synergistic effects of bisphosphonate and calcium phosphate nanoparticles on peri-implant bone responses in osteoporotic rats. *Biomaterials.* 2014; 35(21): 5482-90. [PubMed 24731712]

Alvarenga BM, Melo MN, Frézard F, et al. Nanoparticle phosphate-based composites as vehicles for antimony delivery to macrophages: possible use in leishmaniasis. *J. Mater. Chem. B*, 2015; 3: 9250-9259.

Baldini A, Zaffe D, Nicolini G. Bone-defects healing by high-molecular hyaluronic acid: preliminary results. *Ann Stomatol.* 2010;1(1): 2-7 [PubMed 22238698]

Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia.* 2010; 6(6):1882-1894. [PubMed 20040384]

Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* 2011; 26: 229–238. [PubMed 21254230]

Boivin G, Bala Y, Doublier A, et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone.* 2008; 43(3): 532–538. [PubMed 18599391]

Busse JW, Bhandari M, Sprague S, et al. An economic analysis of management strategies for closed and open grade I tibial shaft fractures. *Acta Orthop.* 2005; 76(5): 705–712. [PubMed 16263619]

Caliari, M. V. *Princípios Básicos de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes.* Belo Horizonte: Ed. UFMG, 1997.

Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev.* 2012; 41(7): 2718-39. [PubMed 22389111]

Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, et al. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(1): 30-40. [PubMed 15619667]

Cavallo C, Desando G, Columbaro M, et al. Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hylauronan scaffold: rationale for its use in the treatment of cartilage lesions. *J. Biomed. Mater. Res.* 2013; 101; 1559–1570. [PubMed 23135955]

Chaudhary SC, Kuzynski M, Bottini M, et al. Phosphate induces formation of matrix vesicles during odontoblast-initiated mineralization in vitro. *Matrix Biol.* 2016; 52-54: 284-300. [PubMed 26883946]

Chellaiah MA. & Ma T. Membrane localization of membrane type 1 matrix metalloproteinase by CD44 regulates the activation of pro-matrix metalloproteinase 9 in osteoclasts. *Biomed Res Int* 2013; 302392. [PubMed 23984338]

Chernousova S, Klesing J, Soklakovaa N, et al. A genetically active nano-calcium phosphate paste for bone substitution, encoding the formation of BMP-7 and VEGF-A. *RSC Adv.* 2013; 3(28): 11155–11161.

Chung CJ, Long HY. Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses. *Acta Biomater.* 2011; 7(11): 4081-7. [PubMed 21784178]

Colnot , Thompson Z, Miclau T, et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development.* 2003; 130(17): 4123–4133. [PubMed 12874132]

Court-Brown CM, Heckman JD, McQueen M, et al. *Rockwood and Green's: Fractures in Adults.* 8^a edição. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2015.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, et al. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008; 61(5): 577-87. [PubMed 18441154]

Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.* 2005; 26:637–43. [PubMed: 16214414]

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 2005; 8(5): 739-50. [PubMed 15866164]

Desai BM. Osteobiologics. *Am J Orthop.* 2007; 36(4): 8-11. [PubMed 17547352].

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, et al. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury.* 2011; 42: S3-15. [PubMed 21704997]

Dördelmann G, Kozlova D, Karczewski S, et al. Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery. *J. Mater. Chem. B.* 2014; 2: 7250.

Dorozhkin SV. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater.* 2010; 6(3): 715-34. [PubMed 19861183]

Drosos GI, Touzopoulos P, Ververidis A, et al. Use of demineralized bone matrix in the extremities. *World J Orthop.* 2015; 6(2): 269-277. [PubMed 4363809]

Drosse I, Volkmer E, Capanna R, et al. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury.* 2008; 39 Suppl 2: S9-20. [PubMed 18804579]

Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995; 77(6): 940–956. [PubMed 7782368]

Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.* 1999; 87: 57—66. [PubMed 10495271]

Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, et al. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 84: 1-29. [PubMed 25236302]

Fowler BL, Dall BE, Rowe DE. Complications associated with harvesting autogenous iliac bone graft. *Am J Orthop.* 1995; 24(12): 895–903. [PubMed 8776079]

Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2006; 54(11): 1215–28. [PubMed: 16864894]

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2003; 88(5): 873–84. [PubMed: 12616527]

Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury.* 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6. [PubMed 18224731]

Gómez-Aristizábal A, Kim KP, Viswanathan S. A Systematic Study of the Effect of Different Molecular Weights of Hyaluronic Acid on Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunomodulation. *PLoS One.* 2016; 11(1): e0147868. [PubMed 26820314]

Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: A prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A(12): 2123–2134. [PubMed 12473698]

Hanifi A, Fathi MH, Mir Mohammad Sadeghi H. Effect of strontium ions substitution on gene delivery related properties of calcium phosphate nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21(9): 2601-9. [PubMed 20623176]

Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J. Cell. Sci.* 2009; 122: 159-63. [PubMed 19118207]

He X, Semenov M, Tamai K, et al. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development.* 2004; 131(8): 1663-77. [PubMed 15084453]

Hemshekhar M, Thushara RM, Chandranayaka S, et al. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Biol Macromol.* 2016; 86: 917-28. [PubMed 26893053]

Hernigou P, Beaujean F, Zilber F, et al. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian J Orthop.* 2009; 43(1): 40-5. [PubMed 19753178]

Hoerth RM, Seidt BM, Shah M, et al. Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. *Acta Biomater.* 2014; 10(9): 4009-19. [PubMed 24929204]

Ito H, Koefoed M, Tiyyapatanaputi P, et al. Remodeling of cortical bone allografts mediated by adherent rAAV-RANKL and VEGF gene therapy. *Nat Med.* 2005; 11(3): 291–297. [PubMed 15711561]

Jiao Y, Pang X, Zhai G. Advances in Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery Systems. *Curr Drug Targets.* 2016; 17(6): 720-30. [PubMed 26028046].

Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, et al. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88(7): 1431–1441. [PubMed 16818967]

Katagiri T & Tsukamoto S. The unique activity of bone morphogenetic proteins in bone: a critical role of the Smad signaling pathway. *Biol. Chem.* 2013; 394(6): 703–714. [PubMed 23324379]

Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury.* 2008; 39(Suppl 2): S45–57. [PubMed: 18804573]

Kim HP, Ji YH, Rhee SC, et al. Enhancement of bone regeneration using osteogenic-induced adipose- derived stem cells combined with demineralized bone matrix in a rat critically-sized calvarial defect model. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012; 7(3): 165–172. [PubMed 22329583]

Kisiel M, Klar AS, Ventura M, et al. Complexation and Sequestration of BMP-2 from an ECM Mimetic Hyaluronan Gel for Improved Bone Formation. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e78551. [PubMed 3805527]

Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Burger EH. Osteocyte and bone structure. *Curr Osteoporos Rep*. 2003; 1(1): 5–10. [PubMed: 16036059]

Koch S, Tugues S, Li X, et al. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2001; 437:169-183.

Komiya Y e Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008; 4:2: 68-75.

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*. 2001; 16: 1004–1014. [PubMed: 11393777]

Kovtun A, Heumann R, Eppler M. Calcium phosphate nanoparticles for the transfection of cells. *Biomed Mater Eng*. 2009; 19(2-3): 241-7. [PubMed 19581719]

Landis WJ, Silver FH. Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen. *Cells Tissues Organs* 2009; 189: 20–24. [PubMed 18703872]

Lara-Castillo N, Kim-Weroha NA, Kamel MA, et al. In vivo mechanical loading rapidly activates β -catenin signaling in osteocytes through a prostaglandin mediated mechanism. *Bone* 2015; 76: 58–66. [PubMed 25836764]

Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem*. 2003; 278(36): 34387-94. [PubMed 12815054]

Lees VC, Fan TP, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab Invest*. 1995; 73: 259–66. [PubMed: 7543630]

Li Y, Zhong G, Sun W, et al. CD44 deficiency inhibits unloading-induced cortical bone loss through downregulation of osteoclast activity. *Sci Rep*. 2015 Nov 4; 5: 16124. [PubMed 26530337]

Liu Y, Berendsen AD, Jia S, et al. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. : *J Clin Invest*. 2012;122(9):3101–3113. [PubMed 22886301]

Marsell R and Einhorn TA. The Biology of Fracture Healing. *Injury*. 2011; 42(6): 551–555. [PubMed 21489527]

Mendes R, Silva GA, Caliari M, et al. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sciences* 2010; 87: 215-222. [PubMed 20600151]

Mendes R, Silva GA, Lima M, et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in 70 tooth sockets of rats. *Archives of Oral Biology* 2008; 53: 1155-1162. [PubMed 18692778]

Meyer K, Palmer JW, E. The polysaccharides of vitreous humor and umbilical cord. *J Biol Chem.* 1936; 114: 689–703.

Morgan EF, Palomares KT, Gleason RE, et al. Correlations between Local Strains and Tissue Phenotypes in an Experimental Model of Skeletal Healing. *J Biomech.* 2010; 43(12): 2418–2424. [PubMed: 20546756]

Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous bone graft: Donor sites and techniques. *J Bone Joint Surg Am.* 2011; 93(23): 2227–2236. [PubMed 22159859]

Nakahama K. Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67: 4001–4009. [PubMed 20694737]

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44:structure, function and association with the malignant process. *Adv. Cancer. Res.* 1997; 71: 241–319. [PubMed 9111868]

Nguyen TBL, Lee B-T. A Combination of Biphasic Calcium Phosphate Scaffold with Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogel as a New Tool for Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part A.* 2014; 20(13-14): 1993-2004. [PubMed 4086789]

Nohe A, Keating E, Knaus P, et al. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal.* 2004; 16(3): 291-9. [PubMed 14687659]

Orgel JPRO, San Antonio JD, Antipova O. Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connect Tissue Research.* 2011; 52: 2–17. [PubMed 21182410]

Patterson J, Siew R, Herring S, et al. Hyaluronic Acid Hydrogels with Controlled Degradation Properties for Oriented Bone Regeneration. *Biomaterials.* 2010; 31(26): 6772-6781. [PubMed 2907529]

Peng S, Liu XS, Huang S, et al. The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment: involvement of osteoprotegerin. *Bone.* 2011; 49(6): 1290-8. [PubMed 21925296]

Querido W, Rossi AL, Farina M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron.* 2016; 80: 122-34 [PubMed 26546967]

Rahman S, Akhtar N, Jamil HM, et al. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research* 2015; (3), 15005. [Pub Med 26273537]

Rauscher H, Sokull-Klüttgen B, Stamm H. The European Commission's recommendation on the definition of nanomaterial makes an impact. *Nanotoxicology*. 2013; 7(7): 1195-7. [PubMed 22920756]

Reginster JY, Brandi ML, Cannata-Andía J, et al. The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2015; 26(6): 1667-71. [PubMed 25868510]

Ren L, Yang P, Wang Z, et al. Biomechanical and biophysical environment of bone from the macroscopic to the pericellular and molecular level. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015; 50: 104-22. [PubMed 26119589]

Rezwan K, Chena QZ, Blakera JJ, et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(18): 3413–3431. [PubMed 16504284]

Riddle RC, Khatri R, Schipani T, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in angiogenic–osteogenic coupling. *J Mol Med (Berl)*. 2009; 87(6): 583–590. [PubMed 19415227]

Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics. The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*. 2012; 8(4): 114–124. [PubMed 23247591]

Sá MA, Andrade VB, Mendes RM, et al. Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral Dis*. 2013; 19(5): 484-93. [PubMed 23107153]

Sá MA, Ribeiro HJ, Valverde TM, et al. Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization. *Braz J Med Biol Res*. 2016; 49(2): e4888. [PubMed 26648087]

Saidak Z, Le Henaff C, Azzi S, et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates osteoblast differentiation triggered by peptide-induced $\alpha 5 \beta 1$ integrin priming in mesenchymal skeletal cells. *J Biol Chem*. 2015; 290(11): 6903-12. [PubMed 25631051]

Saidak Z, Marie PJ. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacol Ther*. 2012; 136(2): 216-26. [PubMed 22820094]

Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, et al. Early activation of the b-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidyl inositol-3

kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; (391): 364–369. [PubMed 19913504]

Schizas N, Rojas R, Kootala S, et al. Hyaluronic acid-based hydrogel enhances neuronal survival in spinalcord slice cultures from postnatal mice. *J. Biomater. Appl.* 2014; 28: 825–836. [PubMed 23674184]

Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of Osterix in skeletal formation. *J cell biochem.* 2013; 114(5): 975-984. [PubMed 23225263]

Sohara Y, Ishiguro N, Machida K, et al. Hyaluronan activates cell motility of v-Src-transformed cells via Ras-mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase-Akt in a tumor-specific manner. *Mol Biol Cell.* 2001; 12: 1859–68. [PubMed 11408591]

Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40^a edição. London. Churchill Livingstone, 2008.

Suganthi RV, Elayaraja K, Joshy MIA, et al. Fibrous growth of strontium substituted hydroxyapatite and its drug release. *Materials Science and Engineering: C.* 2011; 31(3): 593-599.

Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88(6): 1258–1265. [PubMed 16757759]

Tan S, Zhang B, Zhu X, et al. Deregulation of bone forming cells in bone diseases and anabolic effects of Strontium-containing agents and biomaterials. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 814057. [PubMed 24800251]

Tempel C, Gilead A, Neeman M. Hyaluronic acid as an anti-angiogenic shield in the preovulatory rat follicle. *Biol Reprod.* 2000; 63:134–40. [PubMed: 10859252]

Thierry B, Winnik F.M., Merhi Y, et al. Radionuclides-hyaluronan-conjugate thromboresistant coatings to preventin-stent restenosis. *Biomaterials* 2004; 25: 3895–3905. [PubMed 15020166]

Xynos ID, Edgar AJ, BATTERY LDK, et al. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 461–5. [PubMed 11027497]

Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes. Dev.* 1999; 13: 35–48. [PubMed 9887098]

Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes. Dev.* 2000; 14: 163–76. [PubMed 10652271]

Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronansynthases. *J BiolChem.* 1997; 272: 13997–4000. [PubMed 9206724]

Wolf JE, Taylor JR, Tschen E, et al. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratosis. *Int. J. Dermatol.* 2001; 40; 709–713. [PubMed 11737438]

Wornham DP, Hajjawi MO, Orriss IR, et al. Strontium potently inhibits mineralisation in bone-forming primary rat osteoblast cultures and reduces numbers of osteoclasts in mouse marrow cultures. *Osteoporos Int.* 2014; 25(10): 2477-84. [PubMed 25048011]

Zouani OF, Chanseau C, Brouillaud B, et al. Altered nanofeature size dictates stem cell differentiation. *Journal of Cell Science* 2011; 125: 1217–1224. [PubMed 22302989]