



Avaliação do Hidrogel de Polivinil Álcool associado a duas  
diferentes Nanopartículas de Carbono implantados em  
defeitos osteocondrais de Ratos Wistar

**Ana Amélia Rodrigues**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia  
Elétrica e de Computação da Universidade  
Estadual de Campinas para a obtenção do  
Título de Doutor em Engenharia Elétrica

Orientador: Prof. Dr. Vitor Baranauskas

Co-Orientador: Prof. Dr. William Dias Belangero

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr. (UFABC/São Paulo)

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho (UNESP/ Presidente Prudente)

Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz (FEEC/UNICAMP/ Campinas)

Dr. Helder José Ceragioli (FEEC/UNICAMP/ Campinas)

Prof. Dr. Vitor Baranauskas (FEEC/UNICAMP/ Campinas)

Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica  
Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação  
Universidade Estadual de Campinas

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

R618a Rodrigues, Ana Amélia  
Avaliação do hidrogel de polivinil álcool associado a duas diferentes nanopartículas de carbono implantados em defeitos osteocondrais de ratos wistar / Ana Amélia Rodrigues. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Vitor Baranauskas, William Dias Belangero.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Nanotubos de carbono. 2. Polivinil álcool. 3. Cultura celular. 4. Biomateriais. I. Baranauskas, Vitor. II. Belangero, William Dias. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Título em Inglês: Evaluation of polyvinyl alcohol associated with two different carbon nanoparticles implanted in osteochondral defects of wistar rats

Palavras-chave em Inglês: Carbon nanotubes, Polyvinyl alcohol, Cell culture, Biomaterials

Área de concentração: Eletrônica, Microeletrônica e Optoeletrônica

Titulação: Doutor em Engenharia Elétrica

Banca examinadora: Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr, José Carlos Silva Camargo Filho, Helder José Ceragioli, Alfredo Carlos Peterlevitz

Data da defesa: 11/02/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Elétrica

## COMISSÃO JULGADORA - TESE DE DOUTORADO

**Candidata:** Ana Amélia Rodrigues

**Data da Defesa:** 11 de fevereiro de 2011

**Título da Tese:** "Avaliação do Hidrogel de Polivinil Álcool Associado a Duas Diferentes Nanopartículas de Carbono Implantados em Defeitos Osteocondrais de Ratos Wistar"

Prof. Dr. Vitor Baranauskas (Presidente): \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Carlos Silva Camargo Filho: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Alfredo Carlos Peterlevitz: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Helder José Ceragioli: \_\_\_\_\_



*Dedico este trabalho aos meus pais, Luis e Wilma, e ao meu marido Rodrigo, por todo apoio, compreensão e amor.*



## **Agradecimentos**

A todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Vitor Baranauskas e Prof. Dr. William Dias Belangero, o meu maior agradecimento pela orientação, confiança e incentivo.

À Nilza Alzira Batista e à Vanessa Petrilli Bavaresco, pela contribuição constante e principalmente pela amizade.

Ao Dr. José Ricardo Mariolani Lenzi, pelo apoio indispensável na realização dos ensaios mecânicos.

À Jaqueline Bisson, Noêmia S. B. Benatti, Edson V. Sanches Filho e Maria Jose S. Waldman, funcionários da FEEC, por toda atenção e auxílios prestados.

Aos meus pais pelo amor incondicional. Ao meu irmão, André, por todo carinho que sempre teve comigo. Ao meu marido, Rodrigo, pelo companheirismo e compreensão inesgotável durante a realização deste trabalho.

À Sônia das Dores Rodrigues, tia e referência profissional, que sempre me aconselhou e incentivou. Obrigada pelo exemplo, amor e atenção sem reservas.

Ao Laboratório de Nanoengenharia e Diamante, Laboratório de Biomateriais em Ortopedia, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron e ao Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro, pelos procedimentos metodológicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Projeto nº 485870/2007-0) pelo apoio financeiro.



## Resumo

O hidrogel de polivinil álcool puro e reforçado com duas diferentes nanopartículas de carbono, produzidas pelo método de deposição química a partir da fase vapor, foi avaliado por ensaios *in vitro* e *in vivo*, para verificar seu potencial de uso para tratamento de defeitos osteocondrais. A caracterização das nanopartículas foi feita por microscópio Raman, microscopia eletrônica por emissão de campo e microscopia eletrônica de alta transmissão. Foi avaliada a citotoxicidade dos materiais com células do Vero do tipo fibroblasto e células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos Wistar-kyoto por ensaios de viabilidade e análise citoquímica e a diferenciação osteogênica pela atividade da enzima fosfatase alcalina e corante vermelho de alizarina. Os materiais foram implantados por 3 e 12 semanas em defeitos osteocondrais de ratos Wistar e analisados por microscopia eletrônica de varredura, microscopia óptica, ensaio mecânico de indentação e espectrometria de fluorescência de raios X. Os resultados sugerem que os materiais não interferiram na viabilidade e morfologia de nenhum tipo celular. Foi identificada a atividade da enzima fosfatase alcalina e formação de matriz orgânica mineralizada. Após implante os materiais não apresentaram sinais de desgaste ou mudança de cor. A região de interface apresentou tecido conjuntivo denso e ósseo neoformado após 3 e 12 semanas. Foi observado aumento do módulo de fluência e maior concentração de cálcio nos materiais ao longo do tempo. Os resultados indicaram que os hidrogéis com nanopartículas de carbono não interferiram na atividade metabólica de ambas as células e na diferenciação osteogênica das células mesenquimais. O desempenho destes materiais pode ser considerado melhor que o hidrogel sem nanopartículas.

**Palavras chave:** nanopartículas de carbono, polivinil álcool, cultura celular, diferenciação osteogênica, biomateriais.



## Abstract

Poly(vinyl alcohol) hydrogel pure and reinforced with two different carbon nanoparticles, produced by hot-filament chemical vapor deposition method, was evaluated by *in vitro* and *in vivo* assays, to assess its potential employment for the treatment of osteochondral defects. Nanoparticles characterization was done by Raman microscope, field emission scanning electron microscopy and high-resolution transmission electron microscopy. It evaluated the cytotoxicity of the materials with Vero fibroblast-type cellular and mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Wistar-Kyoto rats by assays of viability and citochemistry analyses and osteogenic differentiation by alkaline phosphatase activity and alizarin red staining. The materials were implanted by 3 and 12 weeks in the osteochondral defects of Wistar rats and analyzed by scanning electron microscopy, optical microscopy, creep indentation and X-ray fluorescence spectroscopy. The results suggest that the materials didn't interfere in the viability and morphology of any cell type. Alkaline phosphatase activity and nodules of mineralized organic matrix formation was identified. After implantation the materials did not showed signs of wear or color change. The interface region showed connective dense tissue and bone tissue neoformed after 3 and 12 weeks. It was observed increased of creep module and more concentration of calcium of samples over time. The results indicate that the hydrogels with carbon nanoparticles not interfere in metabolic activity of both cells and osteogenic mesenchymal differentiation. The performance of these materials can be considered better than the hydrogel without nanoparticles.

**Key words:** carbon nanoparticles, polyvinyl alcohol, cell culture, osteogenic differentiation, biomaterials.



## *Conteúdo*

<i>Agradecimentos</i> .....	vii
<i>Resumo</i> .....	ix
<i>Abstract</i> .....	xi
<i>Lista de abreviaturas</i> .....	xvii
<i>Lista de figuras</i> .....	xxi
<i>Lista de tabelas</i> .....	xxix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Tecido cartilaginoso: considerações gerais.....	5
2.1.1 Tecido cartilaginoso: composição.....	5
2.1.1.1 Condrócitos.....	5
2.1.1.2 Colágeno.....	6
2.1.1.3 Proteoglicanos.....	7
2.1.2 Nutrição do tecido cartilaginoso.....	8
2.1.3 Processo de regeneração da cartilagem articular.....	9
2.1.4 Classificação das lesões da cartilagem articular.....	9
2.1.5 Tratamento das lesões cartilaginosas.....	10
2.1.6 Engenharia tecidual.....	11
2.2 Nanotubos de carbono.....	12
2.2.1 Classificação dos nanotubos de carbono.....	12
2.2.2 Métodos de obtenção dos nanotubos de carbono.....	13
2.2.3 Caracterização dos nanotubos de carbono.....	14
2.2.4 Aplicações biomédicas.....	15
2.3 Hidrogéis a base de polivinil álcool (PVAI) .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>

3.1	Objetivos específicos.....	18
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	Materiais.....	20
4.1.1	Nanopartículas de carbono.....	20
4.1.2	Hidrogel a base de polivinil álcool (PVAI).....	20
4.1.3	Cultura de linhagem celular.....	20
4.1.4	Células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO).....	21
4.1.5	Animais.....	21
4.2	Métodos.....	21
4.2.1	Nanopartículas de carbono.....	21
4.2.2	Hidrogel a base de polivinil álcool (PVAI).....	22
4.2.3	Hidrogel a base de polivinil álcool (PVAI) associado a nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT) e fibrosa (NPF).....	23
4.2.4	Caracterização das nanopartículas de carbono: espectroscopia Raman e microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão.....	24
4.2.5	Isolamento das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) de ratos da linhagem Wistar-kyoto.....	25
4.2.6	Avaliação da citotoxicidade: obtenção dos extratos.....	28
4.2.7	Avaliação da citotoxicidade Indireta: ensaio de viabilidade pelo método do MTT.....	28
4.2.8	Avaliação da citotoxicidade Indireta: ensaio de viabilidade pelo método da incorporação do vermelho neutro.....	29
4.2.9	Análise citoquímica.....	30
4.2.10	Investigação da morfologia das células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
4.2.11	Indução da diferenciação osteogênica das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO).....	32
4.2.12	Análise da diferenciação osteogênica: atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP).....	32
4.2.13	Análise da diferenciação osteogênica: vermelho de alizarina S (ARS).....	33
4.2.14	Quantificação das nanopartículas de carbono em cultura de células Vero e mesenquimais	

derivadas da medula óssea (MSC/MO) por citometria de fluxo.....	33
4.2.15 Procedimento cirúrgico.....	35
4.2.16 Grupos experimentais.....	38
4.2.17 Eutanásia.....	39
4.2.18 Avaliação macroscópica por estereomicroscópio.....	41
4.2.19 Microscopia eletrônica de varredura (MEV): superfície dos implantes.....	41
4.2.20 Microscopia óptica (MO).....	42
4.2.21 Ensaio mecânico de fluência e indentação (EMFI).....	42
4.2.22 Espectrometria de fluorescência de raios X (EFRX).....	44
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
5.1 Caracterização das nanopartículas de carbono: espectroscopia Raman e microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão.....	48
5.2 Avaliação da citotoxicidade indireta: ensaio de viabilidade pelo método do MTT.....	51
5.3 Avaliação da citotoxicidade Indireta: ensaio de viabilidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.....	54
5.4 Análise citoquímica.....	55
5.5 Investigação da morfologia das células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	58
5.6 Indução da diferenciação osteogênica das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO).....	60
5.6.1 Análise da diferenciação osteogênica: atividade da fosfatase alcalina (ALP).....	60
5.6.2 Análise da diferenciação osteogênica: vermelho de alizarina S (ARS).....	61
5.7 Quantificação das nanopartículas de carbono em cultura de células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por citometria de fluxo.....	63
5.8 Avaliação macroscópica por estereomicroscópio.....	68
5.9 Microscopia eletrônica de varredura: superfície dos implantes.....	75
5.10 Microscopia óptica (MO).....	81
5.11 Ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI).....	87

5.12	Espectrometria de fluorescência de Raios X (EFRX).....	91
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
6.1	Caracterização das nanopartículas de carbono (Raman, FESEM e HRTEM).....	98
6.2	Avaliação da citotoxicidade indireta: ensaio de viabilidade pelo método do MTT e incorporação do vermelho neutro.....	99
6.3	Análise citoquímica.....	101
6.4	Investigação da morfologia das células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	101
6.5	Análise da diferenciação osteogênica: atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e vermelho de alizarina S (ARS).....	102
6.6	Quantificação das nanopartículas de carbono por citometria de fluxo.....	103
6.7	Avaliação macroscópica por estereomicroscópio e microscopia eletrônica de varredura.....	104
6.8	Microscopia óptica (MO).....	105
6.9	Ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI).....	107
6.10	Espectrometria de fluorescência de Raios X (EFRX).....	108
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>113</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>10.</b>	<b>Anexo 1: Certificado da comissão de ética na experimentação animal (CEEA-IB-UNICAMP).....</b>	<b>131</b>

## Lista de Abreviaturas

**ALP:** fosfatase alcalina (do inglês: *alkaline phosphatase*)

**ARS:** vermelho de alizarina S (do inglês: *alizarin red S*)

**AT:** azul de toluidina

**Ca:** cálcio

**CC:** cultura controle

**CEEA:** Comitê de ética em experimentação animal

**CEMIB:** Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

**CNT:** controle negativo de toxicidade

**CPT:** controle positivo de toxicidade

**CVD:** deposição química na fase vapor (do inglês: *Chemical Vapor Deposition*)

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO:** Dimethyl Sulphoxide

**DSIF:** Departamento de Semicondutores Instrumentos e Fotônica

**EFRX:** Espectrometria de fluorescência de raios X

**EMFI:** Ensaio mecânico de fluência a indentação

**FCM:** Faculdade de Ciências Médicas

**FEEC:** Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

**FESEM:** Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (do inglês: *Field Emission Scanning Electron Microscopy*)

**GC:** grupo controle defeito vazio

**GCa:** grupo cartilagem articular normal

**HE:** hematoxilina e eosina

**HFCVD:** deposição química na fase vapor em reator de filamento quente (do inglês: *hot filament chemical vapor depositon*)

**hFOB:** células de osteoblastos fetal humano (do inglês: *human fetal osteoblastic cells*)

**HRTEM:** microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (do inglês: *High-resolution Transmission Electron Microscopy*)

**IB:** Instituto de Biologia

**IPEN:** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

**LABIMO:** Laboratório de Biomateriais em Ortopedia

**LNLS:** Laboratório Nacional de Luz Sincrotron

**MEM:** Meio mínimo essencial (do inglês: *Minimum Essential Medium*)

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**MO:** Microscopia Óptica

**MSC/MO:** Células-tronco Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea

**MSC:** Células-tronco Mesenquimais (do inglês: *mesenchymal stem cells*)

**MTT:** brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium)

**MWNT:** nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês: *multi-walled nanotubes*)

**NanoEng:** Laboratório de Nanoengenharia e Diamante

**NMCE:** Núcleo de medicina e cirurgia experimental

**NPF:** Nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa

**NPF-PKH26:** Nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa associada ao corante fluorescente PKH26

**NPT:** Nanopartículas de carbono com estrutura tubular

**NPT-PKH26:** Nanopartículas de carbono com estrutura tubular associada ao corante fluorescente PKH26

**NT:** nanotubos de carbono

**P:** fósforo

**PBS:** solução tampão fosfato salino (do inglês: *Phosphate buffer saline*)

**PKH26:** *red fluorescent cell ki Sigma*

**PS:** Penicilina e estreptomicina

**PVAI:** Polivinil álcool

**PVAI-NPF:** Polivinil álcool associado a nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa

**PVAI-NPT:** Polivinil álcool associado a nanopartículas de carbono com estrutura tubular

**S:** enxofre

**SFB:** soro fetal bovino

**SWNT:** nanotubos de carbono de parede simples (do inglês: *single walled nanotubes*)

**TM:** Tricrômico de masson

**UNICAMP:** Universidade Estadual de Campinas



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Esquema da estrutura da matriz extracelular da cartilagem hialina. O cerne protéico das proteoglicanos ligam-se ao ácido hialurônico e as cadeias de condroitina estabelecem ligações com as fibras de colágeno favorecendo a rigidez da matriz.....	<b>8</b>
<b>Figura 2</b>	A) membrana de PVAI e B) implante de PVAI com dimensões de 2mm x 1mm.....	<b>23</b>
<b>Figura 3</b>	Esquema do protocolo de obtenção das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) de ratos da linhagem Wistar-kyoto.....	<b>27</b>
<b>Figura 4</b>	Procedimento cirúrgico: A) tricotomia e assepsia com álcool iodado, B) incisão parapatelar, C) exposição do côndilo femoral, D) perfuração do defeito ósseo, E) implante do material com trefina, F) material implantado no defeito, G) sutura da patela e H) sutura da pele.....	<b>37</b>
<b>Figura 5</b>	Distribuição dos côndilos femorais para as diferentes análises adotadas.....	<b>40</b>
<b>Figura 6</b>	A) Máquina universal de ensaios mecânicos, B) Esquema do dispositivo utilizado no ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI).....	<b>43</b>
<b>Figura 7</b>	A) Espectros Raman das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT), B) Espectros Raman das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF)..	<b>49</b>
<b>Figura 8</b>	A) Imagem de microscopia eletrônica com emissão de campo (FESEM) e B) microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT).....	<b>50</b>

<b>Figura 9</b>	A) Imagem de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FESEM) e B) microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF).....	<b>51</b>
<b>Figura 10</b>	Análise de citotoxicidade indireta do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF avaliados pelo ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT com células Vero.....	<b>53</b>
<b>Figura 11</b>	Análise de citotoxicidade indireta do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF avaliados pelo ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT com células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO).....	<b>53</b>
<b>Figura 12</b>	Análise de citotoxicidade indireta do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF avaliados pelo ensaio de viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro com células Vero.....	<b>55</b>
<b>Figura 13</b>	Análise citoquímica das células Vero cultivadas em contato com: A) CNT, B) PVAI, C) PVAI-NPT e D) PVAI-NPF. Coloração de azul de toluidina (AT). Aumento de 200x.....	<b>56</b>
<b>Figura 14</b>	Análise citoquímica das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) cultivadas em contato com: A) CNT, B) PVAI, C) PVAI-NPT e D) PVAI-NPF. Coloração de azul de toluidina (AT). Aumento de 200x.....	<b>57</b>
<b>Figura 15</b>	Microscopia eletrônica de varredura da superfície: A) CC, B) PVAI, C) PVAI NPT e D) PVAI-NPF, nos quais foram cultivadas células Vero (A1, B1, C1 e D1) e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) (A2, B2, C2 e D2) por 24 horas.....	<b>59</b>
<b>Figura 16</b>	Quantificação da atividade da enzima fosfatase alcalina após 21 dias de indução	

	de diferenciação osteogênica em contato com a cultura controle (CC), PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF.....	<b>60</b>
<b>Figura 17</b>	Imagens das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após 21 dias de diferenciação osteogênica em contato com: A) CC, B) PVAI, C) PVAI-NPT e D) PVAI-NPF. Coloração de vermelho de alizarina S. Aumento de 200x.....	<b>62</b>
<b>Figura 18</b>	Quantificação da matriz mineralizada pela extração colorimétrica do vermelho de alizarina S para CC, PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF.....	<b>62</b>
<b>Figura 19</b>	Resultado da análise de citometria de fluxo das células Vero sem inoculação das nanopartículas de carbono (CC: cultura controle) e cultivo de 24 horas.....	<b>63</b>
<b>Figura 20</b>	Resultado da análise de citometria de fluxo das células Vero após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT) marcadas com corante fluorescente (NPT-PKH26) e cultivo de 24 horas.....	<b>64</b>
<b>Figura 21</b>	Análise de citometria de fluxo das células Vero após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF) marcadas com corante fluorescente (NPF-PKH26) e cultivo de 24 horas.....	<b>64</b>
<b>Figura 22</b>	Internalização média das nanopartículas de carbono marcadas com corante fluorescente PKH26 (NPT-PKH26 e NPF-PKH26) pelas células Vero após período de cultivo de 24 horas.....	<b>65</b>
<b>Figura 23</b>	Resultado da análise de citometria de fluxo das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) sem inoculação das nanopartículas de carbono (CC: cultura controle).....	<b>66</b>
<b>Figura 24</b>	Resultado da citometria de fluxo das células mesenquimais derivadas da medula	

	óssea (MSC/MO) após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT) marcadas com corante fluorescente (NPT-PKH26) e cultivo de 24 horas.....	<b>66</b>
<b>Figura 25</b>	Resultado da análise de citometria de fluxo das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF) marcadas com corante fluorescente (NPF-PKH26) e cultivo de 24 horas.....	<b>67</b>
<b>Figura 26</b>	Internalização média das nanopartículas de carbono marcadas com corante fluorescente PKH26 (NPT-PKH26 e NPF-PKH26) pelas células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após período de cultivo de 24 horas.....	<b>67</b>
<b>Figura 27</b>	Internalização média das nanopartículas de carbono marcadas com corante fluorescente PKH26 (NPT-PKH26 e NPF-PKH26) pelas células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após período de cultivo de 24 horas.....	<b>68</b>
<b>Figura 28</b>	Avaliação macroscópica da superfície dos implantes após 3 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).....	<b>70</b>
<b>Figura 29</b>	Avaliação macroscópica da superfície dos implantes após 12 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).....	<b>71</b>
<b>Figura 30</b>	Avaliação macroscópica da superfície das patelas após 3 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).....	<b>73</b>

<b>Figura 31</b>	Avaliação macroscópica da superfície das patelas após 12 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).....	<b>74</b>
<b>Figura 32</b>	Microscopia eletrônica de varredura da superfície: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 3 semanas de implante. De A1 a C1 aumento de 40x. De A2 a C2 aumento de 300x.....	<b>76</b>
<b>Figura 33</b>	Microscopia eletrônica de varredura da superfície: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 12 semanas de implante. De A1 a C1 aumento de 40x. De A2 a C2 aumento de 300x.....	<b>77</b>
<b>Figura 34</b>	Microscopia eletrônica de varredura da superfície das patelas: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 3 semanas de implante. De A1 a C1 aumento de 40x. De A2 a C2 aumento de 300x.....	<b>78</b>
<b>Figura 35</b>	Microscopia eletrônica de varredura da superfície das patelas: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 12 semanas de implante.....	<b>79</b>
<b>Figura 36</b>	Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos: A1) cômulo e A2) patela do grupo controle com 3 semanas de seguimento, B1) cômulo e B2) patela do grupo controle com 12 semanas de seguimento. Aumento de 40x.....	<b>80</b>
<b>Figura 37</b>	Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 3 semanas de seguimento. Tecido conjuntivo denso (seta). De A1 a D1 aumento de 50x. De A2 a D2 aumento de 200x. Coloração HE.....	<b>83</b>
<b>Figura 38</b>	Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 3 semanas de seguimento. Tecido conjuntivo denso (seta).	

	De A1 a C1 aumento de 50x. De A2 a C2 aumento de 100x. Coloração TM.....	<b>84</b>
<b>Figura 39</b>	Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 12 semanas de seguimento. Tecido conjuntivo denso (seta) e ósseo (asterisco). De A1 a D1 aumento de 50x. De A2 a D2 aumento de 100x. Coloração HE.....	<b>85</b>
<b>Figura 40</b>	Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 12 semanas de seguimento. De A1 a C1 aumento de 50x. De A2 a C2 aumento de 100x. Coloração TM.....	<b>86</b>
<b>Figura 41</b>	Ensaio mecânico de fluência a indentação: curva de penetração em função do tempo de ensaio para a amostra de PVAI com tempo de seguimento de 3 e 12 semanas.....	<b>87</b>
<b>Figura 42</b>	Ensaio mecânico de fluência a indentação: curva de penetração em função do tempo de ensaio para a amostra de PVAI-NPT com tempo de seguimento de 3 e 12 semanas.....	<b>88</b>
<b>Figura 43</b>	Ensaio mecânico de fluência a indentação: curva de penetração em função do tempo de ensaio para a amostra de PVAI-NPF com tempo de seguimento de 3 e 12 semanas.....	<b>88</b>
<b>Figura 44</b>	Gráfico de penetração média em função do tempo de seguimento para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 3 e 12 semanas de implante e cartilagem articular normal (GCa).....	<b>90</b>
<b>Figura 45</b>	Gráfico do módulo médio de fluência à indentação em função do tempo de seguimento para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 3 e 12	

	semanas de implante e cartilagem articular normal (GCa).....	<b>90</b>
<b>Figura 46</b>	Gráfico do teor médio de cálcio para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF dos grupos controle (GC: amostras não implantadas), 3 e 12 semanas de implante.....	<b>95</b>
<b>Figura 47</b>	Gráfico do teor médio de fósforo para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF dos grupos controle (GC: amostras não implantadas), 3 e 12 semanas de implante.....	<b>95</b>
<b>Figura 48</b>	Gráfico do teor médio de enxofre para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF dos grupos controle (GC: amostras não implantadas), 3 e 12 semanas de implante.....	<b>96</b>



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Descrição dos grupos experimentais em função dos materiais implantados e tempo de seguimento.....	<b>38</b>
<b>Tabela 2</b>	Descrição dos grupos experimentais em função das análises adotadas.....	<b>39</b>
<b>Tabela 3</b>	Dados do ensaio de citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular com método do MTT para as amostras de PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF com células Vero (nível de significância 0,05).....	<b>52</b>
<b>Tabela 4</b>	Dados do ensaio de citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular com método do MTT para as amostras de PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF com células mesenquimais derivadas da medula óssea (nível de significância 0,05).....	<b>52</b>
<b>Tabela 5</b>	Dados do ensaio de citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro para as amostras de PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF com células Vero (nível de significância 0,05).....	<b>54</b>
<b>Tabela 6</b>	Penetração do indentador após 180 segundos para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após período de seguimento de 3 e 12 semanas.....	<b>89</b>
<b>Tabela 7</b>	Módulo de fluência a indentação para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após período de implante de 3 e 12 semanas.....	<b>89</b>
<b>Tabela 8</b>	Teores dos elementos Ca, P e S obtidos para cada amostra de PVAI, com as respectivas médias e desvios padrão por tempo de seguimento.....	<b>92</b>
<b>Tabela 9</b>	Teores dos elementos Ca, P e S obtidos para cada amostra de PVAI-NPT, com as respectivas médias e desvios padrão por tempo de seguimento.....	<b>93</b>

**Tabela 10** Teores dos elementos Ca, P e S obtidos para cada amostra de PVAI-NPF, com as respectivas médias e desvios padrão por tempo de seguimento..... **94**

## **1. Introdução**

As lesões que acometem a cartilagem articular representam um grande desafio para a medicina devido ao limitado potencial de regeneração deste tecido. Devido a sua condição avascular o processo de regeneração de lesões articulares não segue as fases de necrose, inflamação e reparo assim como ocorre em outros tecidos [1 -3].

Devido a limitação regenerativa do tecido cartilaginoso há um grande interesse no desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos que envolvem sua regeneração tecidual pois, se mais eficiente, restabeleceria as propriedades dos tecidos lesados e ofereceria aos pacientes uma abordagem terapêutica mais eficiente [4].

Atualmente as lesões do tecido cartilaginoso têm sido tratadas cirurgicamente por microfraturas, artroplastia por desbridamento e abrasão e enxertos osteocondrais autólogos [2, 5-8]. As técnicas cirúrgicas utilizadas resultam na deposição de um tecido conjuntivo fibroso no local da lesão com baixa resistência a forças de cisalhamento [2, 5, 6]. Já os enxertos osteocondrais autólogos apesar de não causarem rejeição imunológica ao paciente apresentam como principais desvantagens a sua quantidade limitada, a pouca estabilidade mecânica e morbidade produzida na área doadora [2, 5,7, 8].

Diante do exposto, pode-se depreender que há necessidade de se desenvolver métodos alternativos para o tratamento das lesões cartilaginosas. Devido a limitada capacidade regenerativa, inúmeros pesquisadores têm desenvolvido estudos em busca de novos métodos e materiais para potencializar a regeneração tecidual [9-11].

Neste sentido, a engenharia tecidual tem sinalizado a aplicação de células-tronco mesenquimais (do inglês: *mesenchymal stem cells* - MSCs) para se obter uma regeneração tecidual mais rápida e eficaz, podendo ser esta uma excelente alternativa terapêutica [11]. As principais fontes de MSCs conhecidas são: a medula óssea, o tecido adiposo, o sangue periférico e o sangue do cordão umbilical [11, 12]. Estas células quando estimuladas por

sinais específicos são induzidas a diferenciação, podendo-se obter diferentes tipos celulares com funções especializadas [11-14]. Inúmeros estudos têm demonstrado que as MSCs derivadas da medula óssea (MSC/MO) têm capacidade para se diferenciarem em células das linhagens mesodérmica, endodérmica e ectodérmica [13,15, 16].

Desta forma, a engenharia tecidual tem focado sua atenção principalmente na utilização de materiais que permitam a adesão e crescimento destas células, assim como no desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos de indução da diferenciação [17-21]. Porém, o sucesso destes métodos está sujeito ao melhor entendimento dos mecanismos de interações celulares, bem como no seu potencial de diferenciação sobre diferentes materiais [17-21].

O material carbônico sob a forma de nanotubos são estruturas compostas exclusivamente por átomos de carbono dispostos em uma série de anéis benzeno laminados formando uma estrutura tubular [22-25]. De acordo com a literatura, existem diferentes processos de síntese dos nanotubos de carbono (NTs) onde podem ser utilizados ou não catalisadores da reação com a finalidade de modular a estrutura morfológica do material de acordo com a sua aplicação. Devido a estas variações os NTs são classificados de acordo com a sua estrutura morfológica: nanotubos de parede simples (do inglês: *single walled nanotubes* – SWNT) e nanotubos de paredes múltiplas (do inglês: *multi-walled nanotubes* – MWNT). Os SWNT são constituídos por uma única camada cilíndrica de grafeno. Já os MWNT são formados por diversas folhas de grafeno concêntricas [24, 26, 27].

De modo geral, estes materiais apresentam alta resistência mecânica, peso ultraleve, alta condutividade térmica e elétrica, sendo que a combinação destas propriedades tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas em diversos seguimentos [28, 29]. Pesquisas

recentes tem investigado a utilização dos NTs como reforços de diferentes materiais, dentre eles polímeros [28-30].

A associação de NTs a hidrogéis poliméricos poderá resultar na modulação das propriedades mecânicas e estruturais dos hidrogéis obtendo-se materiais com melhor desempenho mecânico e condutividade elétrica [31]. Dentre as diversas classes de hidrogéis poliméricos pesquisados para aplicações biomédicas o polivinil álcool (PVAI) tem merecido destaque devido a suas características físico-químicas, propriedades mecânicas e propriedades visco elásticas [31, 32].

Neste estudo foram produzidas amostras de nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT) e fibrosa (NPF) associadas à solução de hidrogel à base de PVAI (PVAI-NPT e PVAI-NPF). O PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF foram avaliados por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Nestes ensaios os materiais foram utilizados como suporte para cultura de células Vero e MSC/MO e como reparo de defeitos osteocondrais.

O objetivo foi verificar a citotoxicidade *in vitro* dos materiais frente à cultura de células Vero, uma linhagem celular do tipo fibroblasto, e MSC/MO. Foram avaliados os seguintes parâmetros nos testes *in vitro*: viabilidade celular pelo ensaio com MTT (*brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium*) e vermelho neutro, morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura, atividade celular por análise citoquímica e diferenciação osteogênica pela atividade da fosfatase alcalina e vermelho de alizarina. Nos testes *in vivo* os materiais foram implantados em defeitos osteocondrais na região intercondiliana de ratos Wistar W- H e após 3 e 12 semanas de seguimento foram submetidos à análise macroscópica, microscopia eletrônica de varredura (MEV),

microscopia óptica (MO), ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI) e espectrometria de fluorescência de Raios X (EFRX).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Tecido cartilaginoso: considerações gerais**

O tecido cartilaginoso, ou cartilagem, é um tipo de tecido conjuntivo altamente especializado com diversas funções pré e pós-natal. No embrião a cartilagem atua como um modelo para o desenvolvimento endocondral dos ossos. Na fase pós-natal promove o crescimento dos ossos e reveste a superfície articular, onde diminui o atrito durante o movimento articular, atuando como um mecanismo de absorção e distribuição da carga [33-35].

Em geral, a cartilagem apresenta consistência semi-rígida, superfície lisa e ligeiramente elástica que favorece o deslizamento entre as articulações sem atrito. Possui coloração branco-azulada, translúcida e apresenta espessuras que variam de acordo com o sexo, o peso corporal do indivíduo e a carga exercida no local [33-35]. A cartilagem é composta basicamente por condrócitos e matriz extracelular constituída por colágeno do tipo II, elastina e macromoléculas de proteoglicanos (proteínas e glicosaminoglicanos) [9].

#### **2.1.1 Tecido cartilaginoso: composição**

##### *2.1.1.1 Condrócitos*

Os condrócitos são células especializadas do tecido cartilaginoso e encontram-se isolados em pequenas lacunas presentes na matriz cartilaginosa. A morfologia dos condrócitos varia de acordo com sua localização na matriz: na zona superficial apresentam

células fusiformes, na zona intermediária células arredondadas e dispostas em colunas e na zona profunda tendem a hipertrofiar e degenerar [9].

Sua principal função é produzir e manter o equilíbrio dos elementos que compõem a matriz extracelular. Possuem retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvido, que são organelas típicas de células secretoras [33, 34]. Os condrócitos podem secretar matrizes com diferentes composições que variam de acordo com a localização e função da cartilagem [33-35]. Estas variações na concentração dos elementos da matriz conferem propriedades distintas para os diferentes tipos de cartilagens presentes no organismo.

#### *2.1.1.2 Colágeno*

O colágeno corresponde a mais da metade do total de proteínas de um organismo adulto e é encontrado principalmente na matriz extracelular dos tecidos em geral [9, 36]. A estrutura e as principais propriedades da molécula de colágeno são determinadas pela sua configuração em tripla hélice, que compõe mais de 95% da molécula [35]. O colágeno apresenta heterogeneidade, ou seja, existem diferentes tipos de colágeno para diferentes tecidos. Estas diferenças estão relacionadas à composição em aminoácidos e aos tipos de cadeias alfa que compõem a tripla hélice, pois cada uma delas é codificada por um gene, o que dá origem a diversos tipos de colágeno, formando assim uma série de estruturas diferentes [35].

Vinte e dois tipos diferentes de colágeno foram descritos [37]. Dentre eles, os mais comuns são os do tipo I, II, III, seguidos pelos tipos V e XI que formam as fibrilas presentes na maioria dos tecidos conjuntivos. Os outros tipos de colágeno estão presentes

em menor quantidade e desempenham a função de conectores entre os constituintes do tecido conjuntivo [35, 36].

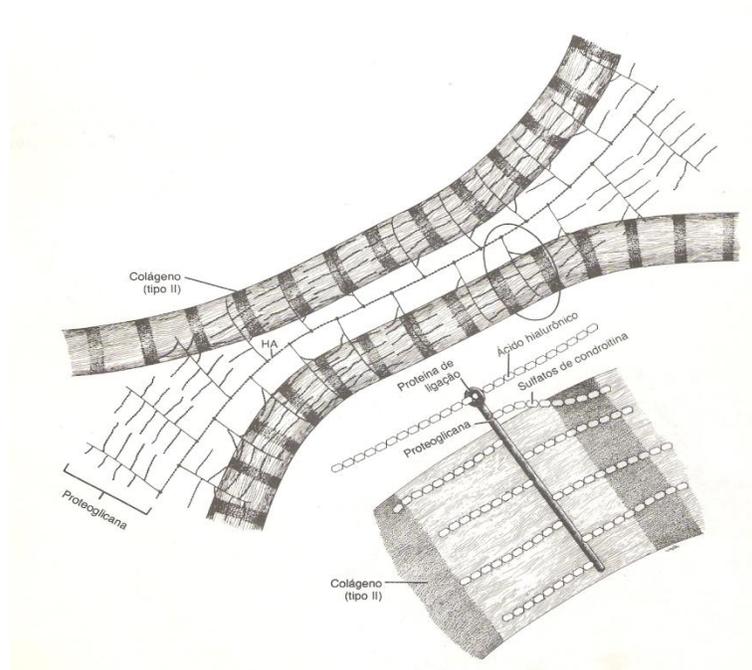
Na cartilagem o colágeno mais freqüente é o colágeno do tipo II, que corresponde a cerca de 48% a 62% do colágeno presente na cartilagem, podendo também ser encontrados colágenos do tipo VI, IX, X e XI em menores concentrações [38]. O colágeno presente na cartilagem encontra-se intimamente associado a macromoléculas altamente hidrofílica de proteoglicanos [35].

#### *2.1.1.3 Proteoglicanos*

Os proteoglicanos são macromoléculas complexas compostos por proteínas e glicosaminoglicanos sulfatados (condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato e queratan sulfato) e constituem um importante componente da matriz extracelular. São encontrados em quase todos os tecidos, tendo maior concentração nos tecidos conjuntivos que têm função mecânica [9, 33-36, 38]. Os proteoglicanos são compostos por uma parte central protéica de onde se irradiam várias moléculas de glicosaminoglicanos. A matriz cartilaginosa é composta por 38% de proteoglicanos e estas macromoléculas presente nas cartilagens são capazes de formar enormes agregados com o ácido hialurônico e com as fibrilas colágenas formando uma rede tridimensional na matriz extracelular [35].

Estes agregados, por sua vez, podem reter grande quantidade de água devido a alta densidade de cargas negativas das cadeias de glicosaminoglicanos. Essa estrutura gera pressão osmótica e entumescimento da cartilagem hialina, que é contida pelas fibrilas de

colágeno, fazendo com que o tecido tenha resistência às forças de compressão e cisalhamento produzidas durante o movimento articular (Figura 1) [33-35].



**Figura 1:** Esquema da estrutura da matriz extracelular da cartilagem hialina. O cerne protéico das proteoglicanas liga-se ao ácido hialurônico e as cadeias de condroitina estabelecem ligações com as fibras de colágeno favorecendo a rigidez da matriz (Modificado de Junqueira e Carneiro, 1990).

### 2.1.2 Nutrição do tecido cartilaginoso

A cartilagem é desprovida de vasos sanguíneos e por ser um tecido avascular sua nutrição ocorre através dos vasos sanguíneos epifisários, metafisários e pericondrais. Estes vasos fornecem nutrição a diferentes regiões da cartilagem através do osso subcondral e periosteio [35, 39].

Outra importante fonte de nutrição do tecido cartilaginoso ocorre através da difusão do líquido sinovial presente nas articulações para a matriz cartilaginosa. Este líquido, produzido por células especializadas presente na membrana sinovial, tem como função levar nutrientes ao tecido cartilaginoso. Outra importante função do líquido sinovial é eliminar os metabólitos presentes na matriz e lubrificar a extremidade das articulações para facilitar o deslizamento e conseqüentemente diminuir o atrito [40].

### **2.1.3 Processo de regeneração da cartilagem articular**

Os fatores desencadeados em resposta aos danos causados no tecido conjuntivo variam de acordo com o local e extensão da lesão [41]. A cartilagem, devido a sua condição avascular apresenta baixa atividade metabólica, baixo potencial de regeneração e quando lesada regenera-se com dificuldade ou de modo incompleto [1, 3-5, 9, 35]. De acordo com a literatura as lesões podem ser reparadas por um tecido conjuntivo fibroso neoformado com pouca estabilidade mecânica [1-3, 42]. A deposição deste tecido no local da lesão não é suficiente para restaurar a estrutura da cartilagem, bem como sua função.

As lesões que acometem a cartilagem freqüentemente resultam de alterações cartilaginosas ocasionadas pelo envelhecimento, doenças degenerativas como artrite e artrose ou em conseqüência de traumas mecânicos como fraturas.

### **2.1.4 Classificação das lesões da cartilagem articular**

As lesões que acometem a cartilagem articular são classificadas de acordo com a profundidade da lesão [43]. Segundo OUTERBRIDGE (1961) as lesões são classificadas em graus que variam de 0 a IV. Lesões de grau 0 apresentam cartilagem normal; grau I apresenta lesão articular branda; grau II fragmentação com fissuras que não atingem o osso

subcondral (<1.5 cm de diâmetro); grau III fragmentação com fissuras que atingem o osso subcondral (>1.5 cm de diâmetro) e grau IV lesão com exposição do osso subcondral.

### **2.1.5 Tratamentos das lesões cartilagosas**

Atualmente as lesões da cartilagem articular têm sido tratadas cirurgicamente por diferentes técnicas; dentre os métodos utilizados destacam-se os procedimentos de estímulo da medula do osso subcondral: microfraturas, artroplastia por desbridamento e abrasão [2, 5-8]. Estas técnicas têm em comum a formação de um coágulo obtido a partir de perfurações feitas no osso subcondral até atingir a zona de vascularização. O coágulo de fibrina formado no local da lesão contém células pluripotentes que se diferenciam em fibrocartilagem e reparam a área da lesão [2, 5-8]. No entanto, o tecido neoformado obtido por estas técnicas não possuem as mesmas propriedades mecânicas da cartilagem íntegra e/ou normal. Geralmente a fibrocartilagem depositada no local da lesão apresenta pouca resistência mecânica [1-3, 42]. No caso dos enxertos osteocondrais autólogos, ou seja, do próprio paciente, estes apresentam como principal vantagem a ausência de rejeição imunológica [2, 5, 7, 8, 44]. Por outro lado, apresentam uma série de desvantagens como: quantidade limitada, pouca estabilidade mecânica e morbidade produzida na área doadora [45-48].

Diante das limitações apresentadas pelas técnicas utilizadas na prática clínica há a necessidade de se desenvolver métodos alternativos e mais eficientes para o tratamento e reparo das lesões que acometem a cartilagem. Neste sentido, a engenharia tecidual pode oferecer soluções promissoras aos atuais problemas vinculados ao tratamento e reparo das lesões cartilagosas [9-10].

### **2.1.6 Engenharia tecidual**

A Engenharia Tecidual voltada para a regeneração tecidual aponta para a aplicação de MSCs associadas a matrizes tridimensionais, comumente denominadas arcabouços, para o reparo de defeitos osteocondrais [11, 17-20]. A eficácia da utilização de MSCs associadas à arcabouços tem sido alvo de inúmeros estudos que buscam esclarecer os mecanismos de isolamento, manutenção das células em cultura, interação das células sobre diferentes arcabouços e métodos de indução da diferenciação [11-21].

Os métodos oferecidos pela engenharia tecidual ampliam a capacidade natural de regeneração dos tecidos e na área ortopédica, com a aplicação de MSCs associadas a arcabouços, podem ser utilizados para se obter o reparo e preenchimento de lesões cartilaginosas de forma mais eficaz [9, 18-21]. As MSCs correspondem a um grupo de células-tronco adultas indiferenciadas e podem ser isoladas por diversas fontes (medula óssea, o sangue periférico e o sangue do cordão umbilical) [12]. Estudos recentes têm demonstrado que as MSC/MO podem ser induzidas a diferenciar-se em células do tecido ósseo, tecido cartilaginoso, tecido muscular e adiposo [13, 17, 21, 49-50].

A capacidade de proliferação e diferenciação das MSC/MO associadas a arcabouços que ofereçam uma superfície adequada a adesão, crescimento e diferenciação celular podem oferecer um tratamento mais adequado para as lesões que acometem a cartilagem [17-21]. Estes arcabouços não devem apenas preencher as lesões, mas também mimetizar as propriedades do tecido cartilaginoso a fim de substituir estruturalmente e funcionalmente a cartilagem natural. Neste sentido, a alta resistência mecânica, peso ultraleve e alta condutividade dos NTs associados as propriedades mecânicas e visco elásticas do hidrogel

a base de PVAI podem oferecer um substrato mais adequado para o reparo e regeneração da cartilagem lesada.

## **2.2 Nanotubos de carbono**

Os NTs são estruturas nanométricas compostas exclusivamente por átomos de carbono dispostos em uma série de anéis benzeno laminados e dispostos em uma estrutura tubular [22-24]. Este material foi descoberto por Iijima (1991) e despertou grande interesse devido a suas características físico-químicas, dentre elas: alta resistência a tensão mecânica, alta resistência térmica, alta condutividade elétrica, peso ultraleve, comportamento metálico ou semicondutor [22].

### **2.2.1 Classificação dos nanotubos de carbono**

Os NTs apresentam variações em sua estrutura sendo estas variações moduladas durante sua síntese. Devido a estas diferenças morfológicas os NTs são divididos em duas categorias: SWNT que são constituídos por uma única camada cilíndrica de grafeno e MWNT que são formados por diversas folhas de grafeno concêntricas com espaçamento entre as folhas de 0,34 a 0,36 nm [24, 26-27, 51]. Ambos, SWNT e MWNT, são formados a partir de uma camada de grafeno que se enrola gerando cilindros perfeitos [52].

Em relação a dimensão dos NTs, o diâmetro do SWNT varia entre 0,4 a 2,0 nm e o comprimento pode variar entre 20 nm a 1000 nm. Já os MWNT possuem diâmetro entre 1,4 nm a 100 nm e comprimento de 1nm a vários micrômetros [53-54].

### 2.2.2 Métodos de obtenção dos nanotubos de carbono

Os NTs pertencem à família dos fulerenos assim como o grafite e são obtidos por diferentes métodos: descarga em arco, ablação a laser e deposição química na fase vapor (do inglês: *Chemical Vapor Deposition*, CVD) [26, 55-56].

No método de descarga em arco uma corrente de alta intensidade é aplicada a dois eletrodos (catodo e anodo) aquecidos a uma temperatura aproximada de 3700°C. O processo ocorre em reator de descarga em arco com atmosfera controlada onde o grafite, submetido à alta temperatura, condensa e se deposita na forma de fuligem que contém os NTs [55]. No método de ablação a laser o processo ocorre a uma temperatura de 3.000°C a 4.000°C onde o grafite no interior de um tubo de quartzo é vaporizado por irradiação laser na presença de gás inerte [56]. Ambos os métodos produzem SWNT e MWNT.

Já o método CVD, adotado neste estudo, consiste na deposição química de precursores voláteis e solventes, tais como metano e etileno, por meio de tratamento específico [26]. Gases como o metano e o etileno (compostos por átomos de hidrogênio e de carbono) são utilizados no processo de síntese dos NTs e atuam como fornecedores de átomos de carbono. A reação é desencadeada na presença de um catalizador (ferro, níquel ou cobalto) que decompõe o hidrocarboneto em átomos de carbono e hidrogênio. Ambos são aquecidos até aproximadamente 900°C e os átomos de carbono provenientes do gás se associam às nanopartículas do metal dissolvido dando origem aos NTs [26].

Dentre os procedimentos descritos, o método CVD vem sendo amplamente utilizado para a obtenção de NTs, tanto SWNT quanto MWNT. Um dos pontos positivos deste método é o maior controle sobre os parâmetros utilizados no processo (pressão, temperatura do gás, temperatura do substrato e quantidade do precursor do carbono) [26]. O maior controle das variáveis do processo resulta na produção de NTs de alta pureza devido a

ausência de estruturas amorfas, sendo este considerado um método limpo quando comparado com as técnicas de descarga por arco e ablação a laser [57]. Por outro lado, a menor temperatura empregada no método CVD tende a produzir NTs com alterações estruturais em suas pontas e paredes. De acordo com a literatura, o aquecimento do substrato a uma temperatura em torno de 1000°C poderia solucionar os eventuais problemas desta técnica [57].

### **2.2.3 Caracterização dos nanotubos de carbono**

Os NTs obtidos a partir dos diferentes métodos podem ter sua composição analisada e caracterizada a partir do uso de espectros Raman e microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (do inglês: *Field Emission Scanning Electron Microscopy*, FESEM) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (do inglês: *High-resolution Transmission Electron Microscopy*, HRTEM) [58-60].

A espectroscopia Raman é uma ferramenta muito utilizada na caracterização dos NTs, pois fornece informações sobre os parâmetros estruturais do material por meio de espectros produzidos pela dispersão da luz espalhada sobre as moléculas do material analisado. Os espectros obtidos caracterizam o espalhamento que ocorre durante a troca de energia entre fótons (partículas de luz) e átomos que formam o material [58-59].

As imagens de FESEM e HRTEM são utilizadas para obter informações estruturais dos NTs. Informações como aspecto superficial, número de paredes, diâmetro externo e diâmetro interno dos NTs podem ser obtidos a partir de imagens de FESEM e HRTEM, respectivamente [60].

#### **2.2.4 Aplicações biomédicas**

A partir da descoberta dos NTs inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de aplicá-los em diversos seguimentos devido a suas propriedades elétricas, magnéticas, ópticas e mecânicas. Devido ao grande potencial de uso os NTs têm sido objeto de estudos em praticamente todas as áreas. Atualmente os NTs têm sido utilizados em dispositivos ópticos, sensores, supercondutores, fios elétricos, suporte para catalisadores, nanopinças e como aditivos para polímeros [23-25, 27-30].

As inúmeras propriedades apresentadas pelos NTs têm indicado grande potencial de uso destes materiais na área biomédica [53, 58, 60, 61]. Nas áreas de engenharia tecidual e biocompósitos os NTs podem vir a ser utilizados na síntese de polímeros condutores e substratos para engenharia tecidual com capacidade de fornecer estimulação elétrica [62-63]. Utilizados desta forma, os NTs podem atuar como reforço de materiais poliméricos para melhorar as propriedades físicas e mecânicas, criando nanocompósitos [29-30].

#### **2.3 Hidrogéis à base de polivinil álcool (PVAI)**

Os hidrogéis a base de PVAI são polímeros não-iônicos, biocompatíveis, caracterizados quimicamente como polihidróxidos sintéticos. Obtido em 1924 por Hermann e Haehnel, o PVAI vem sendo objeto de inúmeros estudos desde a sua descoberta [64-66].

Estes materiais quando reticulados tornam-se insolúveis em água, sendo esta característica adequada para materiais utilizados como reparo e preenchimento de cartilagens [31-32]. A reticulação do PVAI pode ser obtida por diferentes métodos, dentre eles podemos citar: métodos químicos, por luz ultravioleta, tratamento térmico, por radiação gama ou ionizante [31-32]. O método de reticulação via radiação ionizante é um dos mais utilizados para obtenção de hidrogéis de PVAI para aplicação médica [67-70].

Este método possibilita o controle da concentração de sítios de reticulação no hidrogel, um parâmetro que influencia a capacidade de absorção de água, propriedades mecânicas e a formação dos poros da rede polimérica [71]. O processo de radiação ionizante por feixe de elétrons promove a formação de redes tridimensionais, denominadas cadeias reticuladas, por meio de interações do tipo ponte de hidrogênio, sendo estas cadeias reticuladas conectadas umas às outras por meio de ligações fortes do tipo covalente [71].

A melhora em suas propriedades mecânicas e a alta capacidade de absorção de água tornam os hidrogéis a base de PVAI, reticulados via radiação ionizante, mecanicamente e funcionalmente semelhante a cartilagem articular. O PVAI reticulado quando submetidos à força de compressão deformam e exsudam o fluido presente em seu interior. Esta capacidade de deformação mimetiza a cartilagem e torna o PVAI objeto de inúmeros estudos voltados para o preenchimento e substituição do tecido cartilaginoso lesado [67-71].

Neste estudo os hidrogéis a base de PVAI foram associados a duas diferentes nanopartículas de carbono (PVAI-NPT e PVAI-NPF) e em seguida submetidos à radiação ionizante por feixe de elétrons. O procedimento de radiação teve como objetivo, além da obtenção de materiais com propriedades físico-química, mecânica e visco elástica mais adequada, a esterilização dos materiais, sendo esta etapa de fundamental importância, já que estes foram posteriormente implantados em defeitos osteocondrais provocados na região intercondiliana de ratos da linhagem Wistar W- H.

### **3. Objetivos**

Avaliar o hidrogel a base de PVAI associado à nanopartículas de carbono com estrutura tubular (PVAI-NPT) e fibrosa (PVAI-NPF) por meio de testes *in vitro* e *in vivo*.

### **3.1 Objetivos específicos**

- Caracterizar as nanopartículas de carbono por espectroscopia Raman e microscopias eletrônicas (FESEM e HRTEM);
- Obter MSC/MO de ratos da linhagem Wistar-kyoto, induzi-las a diferenciação osteogênica e avaliar os efeitos do PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF sobre o potencial de diferenciação por meio da atividade da enzima fosfatase alcalina e impregnação do corante vermelho de alizarina S;
- Avaliar a citotoxicidade do PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF em contato com células Vero e MSC/MO indiferenciadas;
- Implantar os materiais em defeitos osteocondrais produzidos na região intercondiliana de ratos da linhagem Wistar W-H;
- Após 3 e 12 semanas de seguimento avaliar: a superfície dos implantes por estereomicroscópio e MEV; a região de interface implante-osso por MO; o módulo de fluência dos materiais por meio de EMFI e a calcificação dos materiais após implante por EFRX.

## **4. Materiais e Métodos**

## **4.1 Materiais**

### **4.1.1 Nanopartículas de carbono**

As nanopartículas foram produzidas pelo processo de deposição química a partir da fase vapor em um reator assistido por filamento quente (do inglês: *Hot Filament Chemical Vapor Deposition*, HFCVD) no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng) do Departamento de Semicondutores Instrumentos e Fotônica (DSIF) da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Foram obtidos dois diferentes tipos de nanopartículas de carbono: com estrutura tubular (NPT) e estrutura fibrosa (NPF).

### **4.1.2 Hidrogel a base de polivinil álcool (PVAI)**

As membranas de hidrogéis de PVAI (Sigma Aldrich Mw 89000-98000 g/mol, 99% hidrolisado) foram produzidas no Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (LABIMO) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

### **4.1.3 Cultura de linhagem celular**

Foram utilizadas células Vero, uma linhagem celular do tipo fibroblastos originária de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. Esta linhagem celular foi adotada por ser uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais [72-75].

As células Vero foram cultivadas em meio Ham F-12 (Nutricell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco) e 1% de penicilina e estreptomicina (PS, Gibco).

As células foram mantidas a 37°C em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> (Sanyo Scientific, USA) disponível no LABIMO da FCM da UNICAMP.

#### **4.1.4 Células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO)**

Foram utilizadas MSCs obtidas a partir da medula óssea de 2 ratos da linhagem Wistar-kyoto. As MSC/MO foram cultivadas em meio DMEM (do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) com baixa concentração de glicose suplementado com 10% de SFB, 1% de PS e mantidas a 37°C. Os procedimentos de obtenção, isolamento e manutenção em cultura das MSC/MO foram realizados no LABIMO da FCM da UNICAMP.

#### **4.1.5 Animais**

Foram utilizados 83 ratos machos brancos da linhagem Wistar W-H fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, com 12 semanas de idade e peso aproximado de 330 g.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Nanopartículas de carbono**

As amostras de NPT foram produzidas sobre um substrato de cobre recoberto com um filme de um polímero condutor chamado polianilina. O filme de polianilina, após ser colocado sobre o cobre foi seco em chapa quente a uma temperatura de 100°C. Sobre o filme de polianilina seco foi colocado 0,2 ml de uma solução de 2 mg / ml de nitrato de níquel (Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) diluído em acetona, onde o níquel é o catalisador para o crescimento das

nanopartículas de carbono. Após secar em temperatura ambiente o filme de polianilina foi colocado no reator HFCVD em atmosfera de nitrogênio a temperatura de 450°C, pressão de 26 mbar e tempo de crescimento de 30 minutos. Foi utilizada como fonte de carbono uma mistura de cânfora diluída em acetona, borbulhando no gás hidrogênio.

Para a síntese das amostras de NPF foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, exceto pela ausência do catalisador para o crescimento das nanopartículas de carbono.

A partir dos métodos acima descritos foram obtidas amostras com estruturas diferenciadas. As amostras de NPT apresentam paredes múltiplas formadas pela deposição do carbono dando origem a uma estrutura tubular. As amostras de NPF apresentam estrutura fibrosa composta por tubos compactos.

#### **4.2.2 Hidrogel a base de polivinil álcool (PVAI)**

Inicialmente foi sintetizada uma solução aquosa de PVAI na concentração de 10% (p/p). O polímero foi pesado, colocado em balão volumétrico e em seguida foi adicionada água destilada até completar o volume para se obter a solução na concentração de 10%. A solução foi homogeneizada a 60°C por um período de 1 hora em agitador magnético e em seguida foi resfriada e armazenada a 4°C.

Foram vertidos 20 ml da solução aquosa de PVAI em placas de Petri com 10 cm de diâmetro e as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 7 dias para se obter a evaporação da água. Após este período, as membranas foram desmoldadas e imersas em solução de acetalização composta por 60 g de formaldeído, 50 g de ácido sulfúrico, 300 g de sulfato de sódio anidro e mantidas por 24 horas a 60°C. Em seguida as membranas

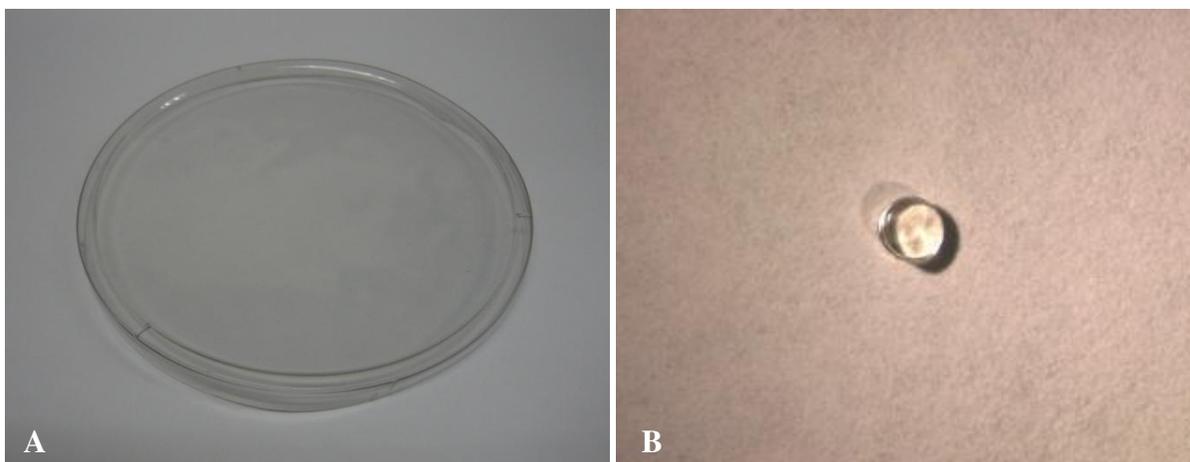
foram lavadas em água destilada corrente por 24 horas para remoção de resíduos presentes na solução de acetalização.

#### **4.2.3 Hidrogel a base de polivinil álcool (PVAI) associado a nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT) e fibrosa (NPF)**

As nanopartículas produzidas foram diluídas na proporção de 2,5 mg/ 10 ml de etanol. Em seguida, esta solução foi adicionada a 10 ml da solução de PVAI e homogeneizada a 60°C por um período de 1 hora em agitador magnético.

Após a homogeneização a solução foi vertida em placas de Petri obtendo-se membranas de PVAI associadas a NPT (PVAI-NPT) e NPF (PVAI-NPF). Como controle foi utilizado o hidrogel de PVAI sem adição de nanopartículas de carbono.

As membranas foram cortadas com cortador para biópsia n° 2 para obtenção de implantes com dimensões de 2 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade (Figura 2A, 2B).



**Figura 2:** A) membrana de PVAI e B) implante de PVAI com dimensões de 2 mm x 1 mm.

Os implantes foram mantidos a 4°C até a realização do procedimento de reticulação e esterilização por meio de radiação ionizante com feixe de elétrons a 25 kGy emitido por acelerador de elétrons Dynamiton (Radiation Dynamics, Inc.) em ambiente livre de oxigênio disponível no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo-SP). O procedimento de reticulação tem por finalidade modificar as propriedades físicas e químicas dos hidrogéis melhorando sua resistência mecânica devido à formação de ligações por ponte de hidrogênio [71].

Após a reticulação e esterilização os implantes de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF foram mantidos em embalagens plásticas fechadas a vácuo. Estas foram armazenadas em local seco e arejado em temperatura ambiente até o início dos testes *in vivo* e *in vitro*. No momento de ambos os testes foram adotados procedimentos para a desinfecção das embalagens com álcool 70% e exposição à luz germicida por 15 minutos em fluxo laminar a fim de se evitar contaminações. Os implantes de PVAI foram transferidos para placas de Petri estéreis com água destilada e hidratados por 48 horas a 4°C.

#### **4.2.4 Caracterização das nanopartículas de carbono: espectroscopia Raman e microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão**

A caracterização das amostras de NPT e NPF foi feita por espectroscopia Raman. Os espectros das nanopartículas de carbono (NPT e NPF) foram adquiridos através de um microscópio de modelo Renishaw Raman Microscope Invia Model, disponível no NanoEng da FEEC da UNICAMP. As amostras foram excitadas por um laser de argônio de comprimento de onda ( $\lambda = 514,5$  nm) e potência de aproximadamente 6 mW.

A caracterização morfológica das nanopartículas foi realizada por FESEM por meio de um microscópio modelo JEOL JSM 6330F disponível no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS). Foram também obtidas imagens por HRTEM por meio de um microscópio modelo JEOL 3010 disponível no LNLS.

#### **4.2.5 Isolamento das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) de ratos da linhagem Wistar-kyoto**

Para obtenção das células MSC/MO, dois ratos da linhagem Wistar-kyoto foram sacrificados e banhados com álcool 70%. Em seguida os fêmures, as tíbias e os úmeros foram desarticulados e dissecados com auxílio de bisturi. Os ossos obtidos foram imediatamente imersos em solução tampão fosfato salino (do inglês: *phosphate buffer saline*, PBS) em placas de Petri estéreis acondicionadas em caixa de isopor com gelo.

No fluxo laminar as epífises foram cortadas com auxílio de alicate cirúrgico e imediatamente descartadas. Os ossos foram depositados em tubos de coleta de sangue de 5 ml. Estes tubos, previamente perfurados com broca de 2 mm de diâmetro, foram utilizados para acondicionar os ossos durante a centrifugação com a finalidade de reter fragmentos ósseos e grandes coágulos. Três tubos de coleta de sangue foram colocados em um tubo Falcon de 50 ml e centrifugados a 400g por 10 minutos a 20°C.

No final da centrifugação os tubos de coleta de sangue foram descartados e o material precipitado foi homogeneizado com solução de PBS/EDTA (2 ml PBS/EDTA por osso). A suspensão obtida foi filtrada por filtro ultrafino de 20 µm, cuidadosamente colocada sobre 15 ml de Ficoll-Hypaque® e centrifugada a 300g por 25 minutos. Após a centrifugação a camada de células mononucleares foi coletada com pipeta Pasteur estéril e

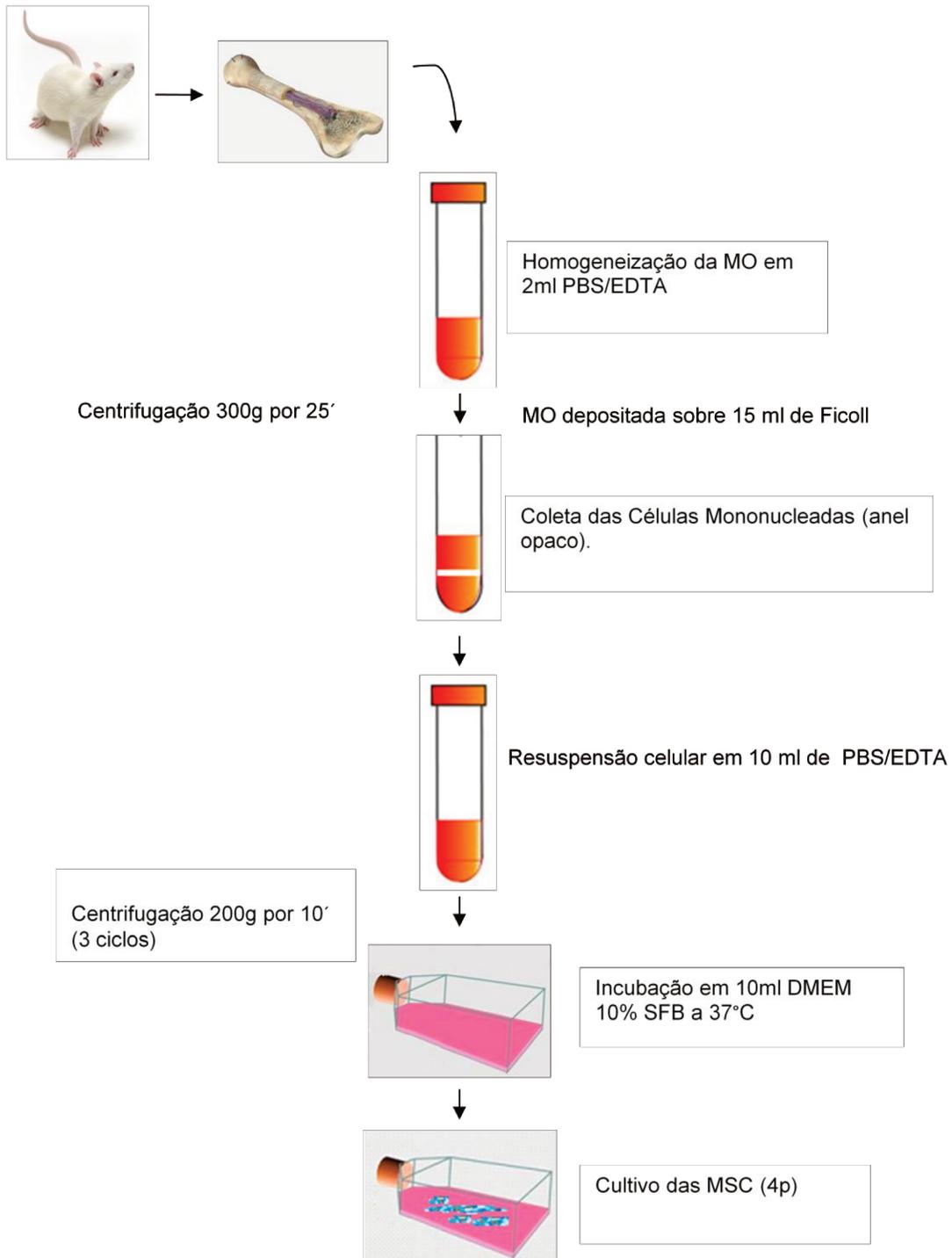
centrifugado por 10 minutos a 200g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado homogeneizado em 10 ml de PBS/EDTA. A suspensão obtida foi lavada em três ciclos de centrifugação a 200g por 10 minutos.

No último ciclo foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer. Para isto, uma alíquota (20 µl) foi aplicada a câmara de Neubauer para contagem do número de células viáveis na suspensão. Em seguida, as células foram inoculadas em garrafas de cultura com 10 ml de meio DMEM com baixa concentração de glicose, suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> na atmosfera até atingir a confluência celular.

Na fase de confluência as células foram submetidas à subcultura. Nesta fase o meio de cultura foi removido, a garrafa foi lavada com 3 ml de PBS/EDTA pH 7.4. Após a lavagem foram adicionados 3 ml de tripsina EDTA 0,25% (Gibco) para soltura das células. Para obtenção da suspensão celular foram adicionados 3 ml de meio DMEM com baixa concentração de glicose suplementado com 10% de SFB e a suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 15 ml e centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi homogeneizado em meio DMEM e inoculado em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>. As células foram incubadas a 37°C e cultivadas até atingir novamente a fase de confluência celular. O procedimento de subcultura foi repetido até a quarta passagem, quando foi dado início aos ensaios *in vitro*.

Na figura 3 encontram-se descritas as etapas de isolamento, obtenção e cultivo das células mesenquimais.

### Obtenção das células mesenquimais



**Figura 3:** Esquema do protocolo de obtenção das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) de ratos da linhagem Wistar-kyoto.

#### **4.2.6 Avaliação da citotoxicidade: obtenção dos extratos**

Os testes *in vitro* adotados são recomendados como padrão para avaliação da citotoxicidade de biomateriais de acordo com normas internacionais vigentes [72, 73, 75].

Os extratos do PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF foram obtidos através da incubação de 0,2 g de material por ml de meio Ham F-12 com 10% de SFB a 37°C por 48 horas sem agitação. Transcorrido esse período o meio foi recolhido, permitindo desta forma, avaliar o efeito de possíveis substâncias tóxicas liberadas pelos materiais no meio de cultura.

#### **4.2.7 Avaliação da citotoxicidade indireta: ensaio de viabilidade pelo método do MTT**

Foi avaliada a citotoxicidade de células Vero e MSC/MO frente ao extrato obtido do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF. Para isto, foi adotado o ensaio de viabilidade celular por uma variação do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium descrito por MOSMANN et al [76].

Foi inoculada em placa de cultura de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) uma suspensão celular na concentração de  $3 \times 10^6$  células/ml em placa de 96 poços (n=5) e esta foi incubada a 37°C por 24 horas. Após este período, o meio de cultura presente na placa foi substituído pelo extrato dos materiais. As células foram cultivadas nestas condições por mais 24 horas a 37°C.

Foi utilizada como controle positivo de toxidade (CPT) uma solução de meio Ham F-12 com 10% de fenol e como controle negativo de toxidade (CNT) o extrato de poliestireno.

Decorrido o período de incubação o extrato foi retirado e os poços foram lavados com 200 µl de PBS. Foram adicionados 200 µl de meio Ham-F12 com 10 mM de tampão HEPES e 50 µl de MTT Sigma (5 µg MTT / 1 ml PBS) e a placa foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C.

Após 4 horas o meio com o MTT foi removido e em seguida foram adicionados 200µl de Dimethyl Sulphoxide (DMSO). A placa foi mantida em agitação por 30 minutos. Foi feita leitura de absorbância em leitor de Microplacas (Microplate Reader DNM 9602, Beijing Perlong New Technology Co, Ltd.) em comprimento de onda de 540 nm.

A análise estatística foi feita usando One Way Anova, com nível de significância de 0,05.

#### **4.2.8 Avaliação da citotoxicidade indireta: ensaio de viabilidade pelo método da incorporação do vermelho neutro**

Neste ensaio foi avaliada a viabilidade de células Vero frente ao extrato dos materiais por meio da incorporação do vermelho neutro. Foi inoculada uma suspensão celular na concentração de  $3 \times 10^6$  células/ml em placa de cultura de 96 poços (n=5). A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Foi utilizada como controle a solução de meio Ham F-12 com 10% de fenol (CPT) e o extrato de poliestireno (CNT).

Após 24 horas o meio de cultura presente na placa foi substituído pelo extrato dos materiais e a placa foi incubada por um período de 24 horas. Decorrido o período de incubação o extrato foi desprezado e foram adicionados em cada poço 200 µl de meio

MEM (do inglês: *Minimum Essential Medium*) contendo 50 µg de vermelho neutro por mililitro.

Após 3 horas o meio foi removido e os poços foram lavados com 200 µl de PBS, seguido de outra lavagem com solução de cloreto de cálcio em formaldeído (1% de cloreto de cálcio em formaldeído 0,5%). Foram adicionados 200 µl de ácido acético em etanol (1% de ácido acético em etanol 50%). A placa foi mantida em agitação por 10 minutos em temperatura ambiente.

Foi feita leitura de absorbância em leitor de Microplacas (Microplate Reader DNM 9602, Beijing Perlong New Technology Co, Ltd.) em comprimento de onda de 540 nm. A análise estatística foi feita usando One Way Anova, com nível de significância de 0,05.

#### **4.2.9 Análise citoquímica**

Este ensaio visa à observação dos possíveis efeitos deletérios sobre as células a partir do contato das mesmas com a superfície do PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF. Para esta análise células Vero e MSC/MO foram cultivadas sobre a superfície dos materiais em meio Ham F-12 com 10% de SFB a 37° por 24 horas.

Nesta análise foi inoculada uma suspensão celular na concentração de  $3 \times 10^6$  células/ml placa de cultura de 24 poços (n=4). A placa foi cultivada por 24 horas a 37°C e após o período de cultivo o meio contido nas placas foi removido e as células fixadas em formaldeído 10% por 24 horas. As células foram coradas com azul de toluidina (AT) em pH 4,0 para detecção de ácidos nucléicos e glicosaminoglicanos [77].

#### **4.2.10 Investigação da morfologia das células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para analisar a morfologia, crescimento e espalhamento, as células Vero e MCS/MO foram inoculadas e cultivadas sobre o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF e posteriormente observadas por MEV.

Para isto, os materiais foram colocados em placas de cultura de 24 poços. Em seguida, foi inoculada uma suspensão celular na concentração de  $3 \times 10^6$  células/ml e a placa incubada por 24 horas a 37°C.

Após o período de incubação, os materiais foram fixados por 2 horas em temperatura ambiente em solução de paraformaldeído a 2,5%, glutaraldeído a 2,5% (Sigma, St Louis, MO, USA) dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4. Em seguida os materiais foram lavados em três banhos com solução de PBS por 15 minutos, pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% (Sigma, St Louis, MO, USA) em geladeira por 15 minutos, lavados em três banhos com água por 15 minutos e desidratados em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%).

Os materiais foram secos em equipamento de Ponto Crítico (Balzers, CTD-030), submetidos à metalização a ouro (Balzers, CTD-050) e observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, 5900) disponível no LNLS.

#### **4.2.11 Indução da diferenciação osteogênica das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO)**

Após a quarta passagem as MSC/MO foram estimuladas, mediante protocolo específico, a se diferenciarem em osteoblastos. O protocolo de diferenciação celular utilizado baseou-se em NEUHUBER et al [78]. Para a indução de diferenciação osteogênica foi utilizada placa de cultura de 24 poços contendo MSC/MO numa densidade de 3000 células/cm<sup>2</sup>. Dois dias após a inoculação celular os materiais foram adicionados nos poços e o meio de cultura foi substituído pelo meio de indução osteogênica, constituído por DMEM com baixa concentração de glicose acrescido de 15% de SFB, 1% de PS, 100 nM de dexametasona, 50µM de ascorbato-2-fosfato e 10 mM de glicerol-fosfato. O meio de indução osteogênica foi substituído a cada 3 dias por um período de 21 dias.

#### **4.2.12 Análise da diferenciação osteogênica: atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP)**

Foi feita a quantificação da atividade da fosfatase alcalina (do inglês: *alkaline phosphatase*, ALP). A atividade da enzima ALP foi avaliada por kit Sigma específico (*Sigma Fast p-Nitrophenyl phosphatase Tablets NPNT1891*) onde 50 µl do meio de indução de diferenciação contido na placa em diferenciação foram transferidos para placa de 96 poços e a mesma foi mantida por 2 horas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período foram adicionados 200 µl da solução substrato de ALP preparada conforme recomendações do fabricante e a placa mantida no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi feita leitura de absorvância em comprimento de onda de 405 nm.

#### **4.2.13 Análise da diferenciação osteogênica: vermelho de alizarina S (ARS)**

A análise da diferenciação osteogênica foi feita por meio da coloração com vermelho de alizarina S (do inglês: *Alizarin Red S*, ARS). Para isto, o meio de indução da diferenciação osteogênica foi removido e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 20 minutos, seguido da coloração com ARS por 10 minutos. As imagens foram obtidas em microscópio óptico DMLB Leica.

A quantificação da coloração de ARS foi avaliada pelo método colorimétrico descrito por GREGORY et al. [79]. Foram adicionados 280 µl de ácido acético 10% em cada poço corado com ARS e a placa foi mantida em agitador por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos *ependorf*, aquecidos a 85°C por 10 minutos e em seguida resfriados em recipiente com gelo por 5 minutos. Os tubos *ependorf* foram centrifugados a 16.000g por 20 minutos e 100 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 40 µl de hidróxido de amônia a 10%. A solução final (140 µl) foi transferida para placa de 96 poços para leitura de absorbância em comprimento de onda de 405 nm.

#### **4.2.14 Quantificação das nanopartículas de carbono em cultura de células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por citometria de fluxo**

Foi inoculada uma suspensão de células Vero e MSC/MO, ambas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml de meio DMEM com 10% de SFB e 1% de PS em placas de cultura de 24 poços. Foi inoculado 1 ml da suspensão celular por poço (n=3) e as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C.

As nanopartículas de carbono (NPT e NPF) foram diluídas em PBS (1 mg nanopartículas / 1 ml PBS) e esta solução foi homogeneizada em agitador de tubos vortex durante 5 minutos. Foram adicionados 2 µl do corante PKH26 (*Red Fluorescent Cell Kit* Sigma) e a solução foi novamente homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. Decorrido este período a solução foi acondicionada em tubos específicos para ultra centrífuga e estes foram centrifugados a 37.000 rpm por 3 horas.

Após a centrifugação os precipitados de NPT-PKH26 e NPF-PKH26 foram lavados e ressuspenso em 1 ml de 1x PBS. A solução foi homogeneizada e 10 µl desta solução contendo NPT-PKH26 e NPF-PKH26 foram adicionados aos poços das placas de cultura com as células Vero e MSC/MO e as placas incubadas por 24 horas a 37°C. Nos poços referentes a cultura controle (CC) não foram adicionadas as nanopartículas de carbono.

Decorrido o período de cultura, o meio foi descartado e os poços foram lavados com 200 µl de 1x PBS por 5 minutos. Este procedimento foi repetido por 5 vezes. Em seguida foram adicionados 100 µl de tripsina nos poços e a placa foi incubada a 37°C por mais 5 minutos. Após a soltura das células foram adicionados 100 µl de meio DMEM com 10% de SFB e 1% de PS e as células transferidas para tubos *ependorf* e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. As células precipitadas foram homogeneizadas em 200 µl de PBS e colocadas em tubos específicos para citometria de fluxo.

A leitura foi feita em citômetro de fluxo Scalibur da BD Biosystems no Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro da UNICAMP.

#### **4.2.15 Procedimento cirúrgico**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados segundo normas propostas pelo Comitê Brasileiro de Proteção Animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, protocolo n° 2240-1 (Anexo 1).

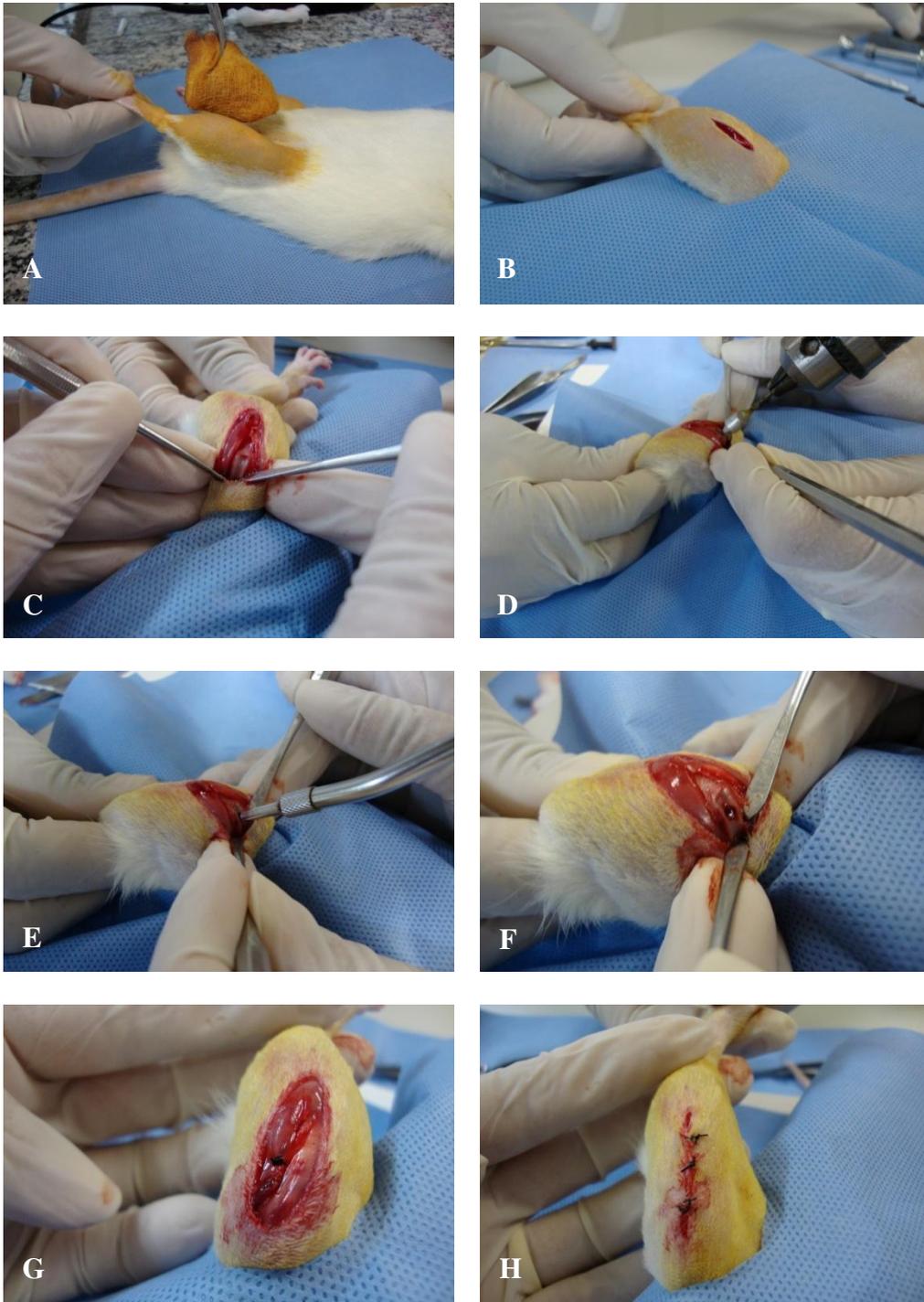
Os animais foram anestesiados via endovenosa caudal com pentobarbital sódico na concentração de 25 mg/ 100 g. Foi realizada tricotomia e assepsia com solução alcoólica de iodo dos membros posteriores direito e esquerdo (Figura 4A). Em decúbito dorsal, com os membros posteriores em abdução foi feita uma incisão parapatelar lateral de aproximadamente um centímetro para luxação da patela e exposição dos côndilos femorais (Figura 4B, 4C).

Em seguida foi provocado um defeito na região intercondiliana com auxílio de furadeira de baixa rotação e broca helicoidal de 2 mm de diâmetro com limitador de 1 mm de profundidade (Figura 4D). O defeito produzido foi irrigado abundantemente com solução salina, para a retirada de fragmentos ósseos e em seguida foi implantado com auxílio de trefina o PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF com as mesmas dimensões do defeito (Figura 4E, 4F).

Após o implante a patela foi reposicionada e suturada com fio ethycon<sup>R</sup> mononylon 3.0 (Figura 4G). Em seguida, a pele foi suturada com pontos separados (Figura 4H). Logo após o procedimento cirúrgico foi administrada solução analgésica de paracetamol<sup>®</sup> 25mg/kg/ l diluído em água durante 48 horas.

No grupo controle (GC) o defeito permaneceu vazio já nos animais pertencentes ao grupo cartilagem articular normal (GCa) não foi realizado procedimento cirúrgico.

Os animais foram mantidos em gaiolas convencionais com maravalha, água e ração industrializada, onde foi permitido apoio imediato dos membros posteriores. As gaiolas foram acondicionadas em área restrita a animais em experimentação no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da FCM da UNICAMP.



**Figura 4:** Procedimento cirúrgico: A) tricotomia e assepsia com álcool iodado, B) incisão parapatelar, C) exposição do côndilo femoral, D) perfuração do defeito ósseo, E) implante do material com trefina, F) material implantado no defeito, G) sutura da patela e H) sutura da pele.

#### 4.2.16 Grupos experimentais

Os 83 animais foram distribuídos randomicamente em 9 grupos, sendo 6 grupos experimentais e 3 grupos controles. Nos grupos experimentais foram implantados PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF. Nos grupos: GC os defeitos permaneceram vazios e no GCa foi avaliada a cartilagem íntegra (Tabela 1). Após o procedimento cirúrgico os animais foram subdivididos aleatoriamente de acordo com os tempos de seguimento adotados (3 e 12 semanas) e análises propostas (Tabela 2).

**Tabela 1:** Descrição dos grupos experimentais em função dos materiais implantados e tempo de seguimento.

<b>Grupos</b>	<b>Material</b>	<b>Tempo de Seguimento (semanas)</b>	<b>n° de animais/grupo</b>
1	PVAI	3	10
2		12	10
3	PVAI-NPT	3	10
4		12	10
5	PVAI-NPF	3	10
6		12	10
7	Defeito vazio (GC)	3	10
8		12	10
9	Cartilagem articular (GCa)	-	03

**Tabela 2:** Descrição dos grupos experimentais em função das análises adotadas.

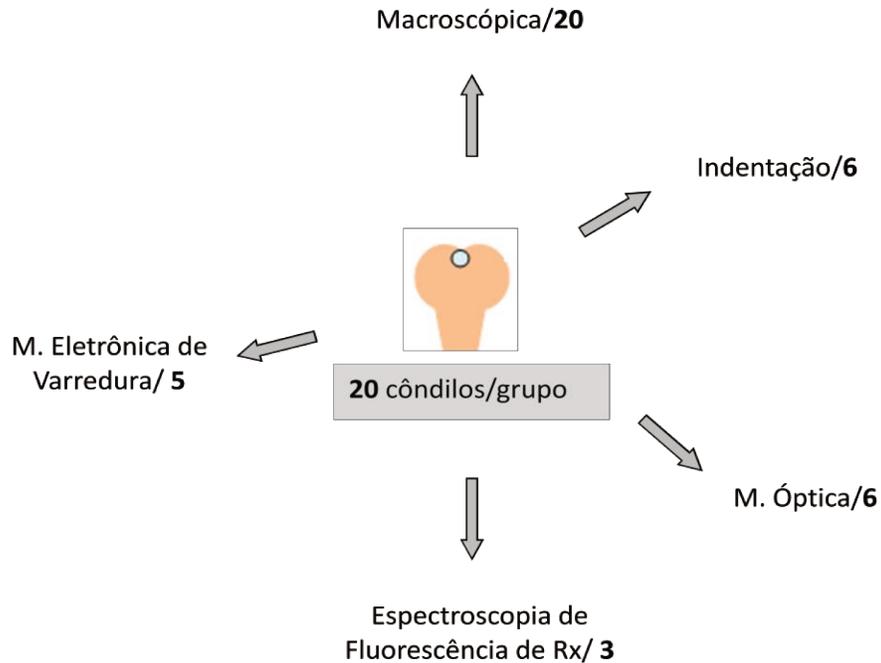
Análises	Grupos Experimentais	n° cõndilos analisados/grupo
Macroscópica	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8	20
Ensaio Mecânico de fluência a Indentação	1, 2, 3, 4, 5, 6, e 9	6
Microscopia óptica	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8	6
Microscopia eletrônica de Varredura	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8	5
Espectroscopia de fluorescência de Raios X	1, 2, 3, 4, 5 e 6	3

#### **4.2.17 Eutanásia**

Após período de seguimento os animais foram pesados e submetidos à eutanásia por meio do aprofundamento do anestésico tiopental sódico, via endovenosa caudal. Para retirada dos cõndilos foi desarticulada a região proximal e distal do fêmur com auxílio de bisturi.

Todos os 166 cõndilos obtidos foram colocados em solução fisiológica em temperatura ambiente e imediatamente observados e fotografados em estereomicroscópio Leica MZ 7.5 com objetivas de 8 e 10x.

Em seguida os cõndilos femorais foram distribuídos de acordo com as análises adotadas, conforme descrito na figura 5.



**Figura 5:** Distribuiç&otilde;o dos c&ocedililos femorais para as diferentes análises adotadas

Ap&ocedils a distribuiç&otilde;o aleatória os c&ocedililos foram processados de acordo com as análises adotadas. Para a realizaç&otilde;o da análise macrosc&ocedipica, EMFI e EFRX os c&ocedililos foram mantidos em soluç&otilde;o fisiológica a 4°C e imediatamente submetidos aos ensaios. Para a MO e MEV os c&ocedililos foram submetidos &agrave; fixaç&otilde;o e posteriormente processados de acordo com cada uma das análises.

#### **4.2.18 Avaliação macroscópica por estereomicroscópio**

Logo após o sacrifício todos os cêndilos e patelas obtidos foram observados e fotografados com objetivas de 8 e 10x em estereomicroscópio Leica. As imagens obtidas foram processadas em programa específico para aquisição de imagens (*Software Auto-Montage Pro Syncroscopy*).

Os parâmetros considerados para avaliação macroscópica foram aspectos da coloração dos tecidos adjacentes e aparência geral dos implantes tais como: transparência, brilho, posicionamento e possíveis sinais de abrasão e/ou arrancamento na superfície dos implantes.

#### **4.2.19 Microscopia eletrônica de varredura (MEV): superfície dos implantes**

Foram considerados nesta análise o aspecto da superfície do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF e GC e suas respectivas patelas após períodos de seguimento de 3 e 12 semanas por meio de MEV.

Os cêndilos e as patelas foram fixados, secos em equipamento de Ponto Crítico (Balzers, CTD-030), submetidos à metalização a ouro (Balzers, CTD-050) e observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, 5900) disponível no LNLS.

Por meio desta análise foi possível observar além da superfície dos diferentes materiais estudados, adesão tecidual, a presença ou não de mecanismos de desgaste da superfície e a presença de fragmentos dos hidrogéis.

#### **4.2.20 Microscopia óptica (MO)**

Os côneilos foram fixados em solução de formaldeído a 10% por 24 horas, descalcificados em ácido nítrico a 7% durante 15 dias e submetidos a desidratação progressiva, que consiste em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%).

Após a desidratação o etanol foi substituído por xilol e os côneilos foram posteriormente incluídos em parafina fundida a 60°C. Os blocos obtidos foram seccionados com 4 µm de espessura em micrótomo Leica modelo RM 2155 e os cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM).

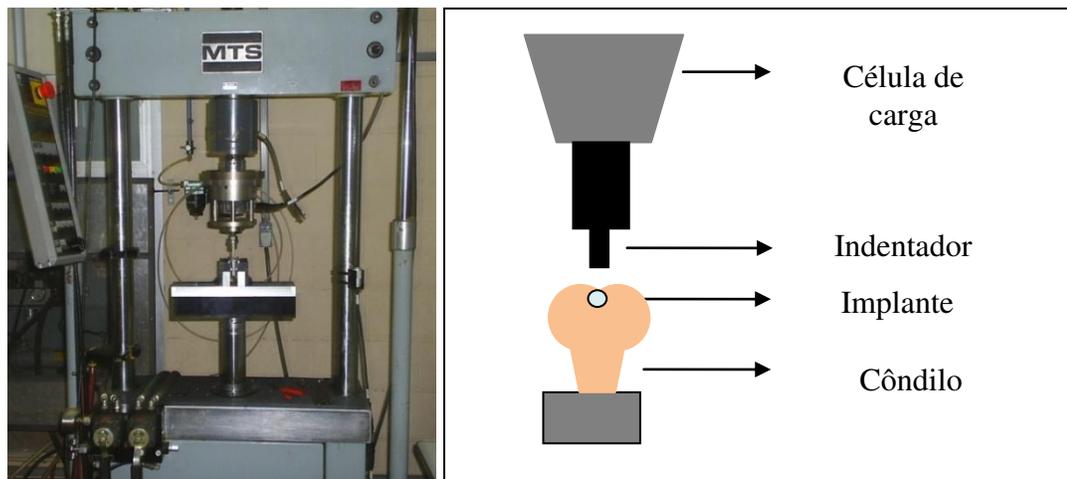
As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Leica modelo DM500 com programa para captura e análise de imagem (*Software Leica Qwin*) disponível no LABIMO localizado no NMCE da FCM da UNICAMP.

#### **4.2.21 Ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI)**

Esta análise foi realizada para caracterizar o comportamento mecânico (fluência) do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF no local do implante [80-81]. Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de ensaios mecânico MTS<sup>®</sup> modelo 810, com o emprego de uma célula de carga com capacidade para 100 N e um indentador com uma ponta esférica de diâmetro igual a 1,6 mm (Figura 6A). Os ensaios foram realizados da seguinte forma: inicialmente o indentador era posicionado imediatamente acima da superfície do PVAI, PVAI-NPT ou PVAI-NPF implantados no defeito ósseo (Figura 6B), com o eixo central do indentador coincidindo com o eixo do cilindro de hidrogel. Após o posicionamento do

indentador conforme esquema apresentado na Figura 6B iniciava-se a aplicação de uma força de compressão deste sobre o hidrogel até que a mesma atingisse o valor de 4, 935 N (0,5 kgf.). A partir deste ponto, a força era mantida por 180 segundos. A velocidade de deslocamento do indentador durante a fase de elevação da força era de 0,1 mm/s.

O mesmo procedimento foi adotado para o GCa a fim de se obter dados referentes ao comportamento mecânico da cartilagem sem qualquer tipo de dano. Neste grupo o indentador foi posicionado sobre a região intercondiliana íntegra.



**Figura 6:** A) Máquina universal de ensaios mecânicos, B) esquema do dispositivo utilizado no ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI).

Os dados referentes a distância de penetração, a força aplicada e ao tempo foram registrados por meio de programa específico (*Software TESC<sup>®</sup> versão 3.04*), o qual gerava ao final do ensaio um gráfico da altura de penetração do indentador (h) em função do tempo (t). A partir do valor de h obtido após 180 segundos de aplicação da carga pode ser calculado o módulo de fluência à indentação (dureza), utilizando-se a seguinte equação:

$$E = \frac{9 \cdot 10^4 \cdot p}{16 \cdot \sqrt{r}} \left[ \frac{1 - e^{\left(\frac{-0.42e}{a}\right)}}{h} \right]^{\frac{3}{2}}$$

Equação 1: Fórmula do Módulo de fluência a indentação.

Onde:

**E** = módulo de fluência [kgf / m<sup>2</sup>];

**p** = carga aplicada [kgf];

**r** = raio do indentador [cm];

**e** = espessura da amostra [cm];

**h** = altura de indentação (penetração do indentador) [cm]

$(a) = \sqrt{(2 \cdot r \cdot h - h_2)}$  [cm]

#### 4.2.22 Espectrometria de fluorescência de raios X (EFRX)

Foi realizada a EFRX para verificar a presença de cálcio (Ca) nos materiais de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 3 e 12 semanas de seguimento. Nesta análise os materiais foram removidos cuidadosamente do local de implante e submetidos à EFRX.

Após a remoção os implantes secos foram depositados em celas específicas de polietileno Chemplex<sup>®</sup> e submetidos à irradiação utilizando equipamento de espectrômetro de fluorescência de raios-X por dispersão em energia Shimadzu<sup>®</sup> EDX 700, equipado com tubo de raios-X de Ródio e detector semiconductor de Si (Li), com resolução de energia de 165 eV (linha Mn Ka).

As condições selecionadas no momento da irradiação foram: 3 mm de colimação do feixe incidente, voltagem aplicada ao tubo de raios-X de 15 kV, por 100 segundos de

irradiação e 25 % de tempo morto do detector [82-83]. Para as determinações quantitativas dos componentes analisados, as intensidades das linhas características dos elementos foram usadas para correlações com as concentrações, utilizando-se o método de análise por parâmetros fundamentais: distribuição espectral primária (fonte), coeficiente de absorção (fotoelétrico e de massa) e rendimento de fluorescência.

O coeficiente de absorção ( $\mu$ ) é uma constante que relaciona a perda de intensidade de fluorescência quando a radiação atravessa uma amostra, dividido pela espessura da mesma. No entanto, o coeficiente de absorção de massa ( $\mu_m$ ) é uma função de  $\mu$  dividido pela densidade do material (elemento), sendo uma constante mais útil [84-85]. A equação 2 mostra a aplicação do processo de parâmetros fundamentais, considerando-se a excitação da amostra através de uma radiação monocromática.

Equação 2:

$$I_L = I_0 \cdot \omega_A \cdot g_L \cdot \frac{r_a - 1}{r_a} \cdot \frac{d\Omega}{4\pi} \cdot \frac{C_A \cdot \mu_A \cdot (\lambda_{prim}) \cdot \text{cossec } \varphi}{\mu_M \cdot (\lambda_{prim}) \cdot \text{cossec } \varphi + \mu_M \cdot (\lambda_L) \cdot \text{cossec } \psi} m$$

Onde:

$I_L$  = intensidade da linha do analito;

A;  $I_0$ , = intensidade do feixe primário no comprimento de onda efetivo;

$\lambda_{prim}$ ;  $\lambda_{prim}$  = comprimento de onda efetivo do raio X primário;

$\lambda_L$ , = comprimento de onda da linha do analito A;

$\omega_A$  = rendimento de fluorescência do elemento A;

$g_L$  = valor fracional da linha L do analito em sua série;

$r_A$  = razão da borda de absorção do elemento A;

$d\Omega/4\pi$  = valor fracional do raio X fluorescente dirigido ao detector;

$C_A$  = concentração do elemento A;

$\mu_A(\lambda_{prim})$  = coeficiente de absorção de massa de A para  $\lambda_{prim}$ ;

$\mu_M(\lambda_{prim})$  = coeficiente de absorção de massa da matriz para  $\lambda_{prim}$ ;

$\mu_M(\lambda_L)$  = coeficiente de absorção de massa da matriz para  $\lambda_L$ ;

$\varphi$  = ângulo de incidência do feixe primário;

$\psi$  = ângulo de saída do feixe fluorescente.

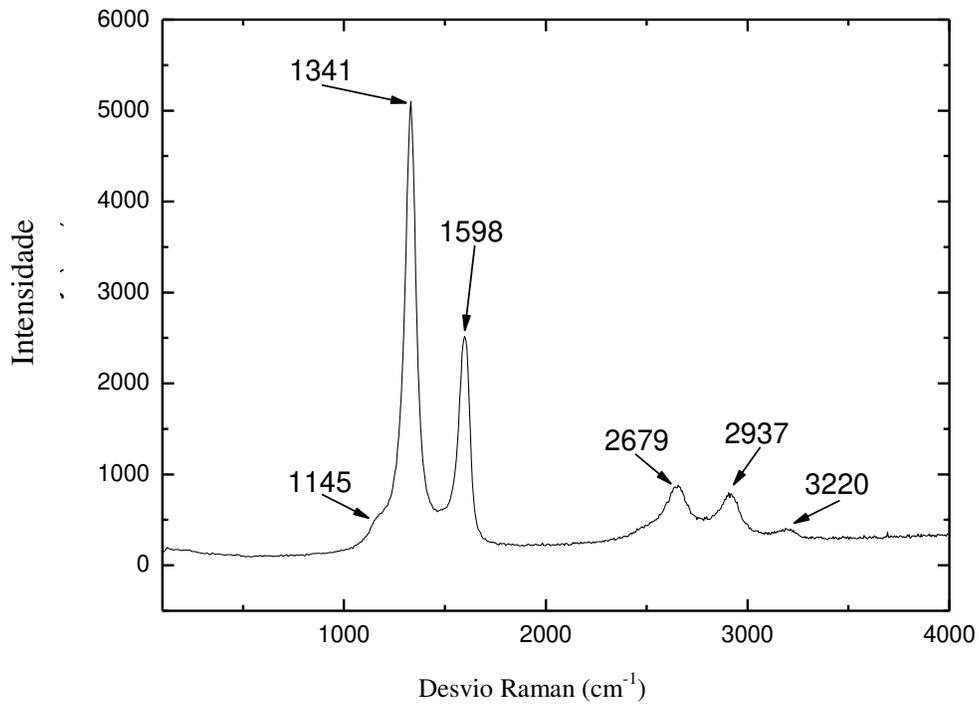
## **5. Resultados**

## 5.1 Caracterização das nanopartículas de carbono: espectroscopia Raman e microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão

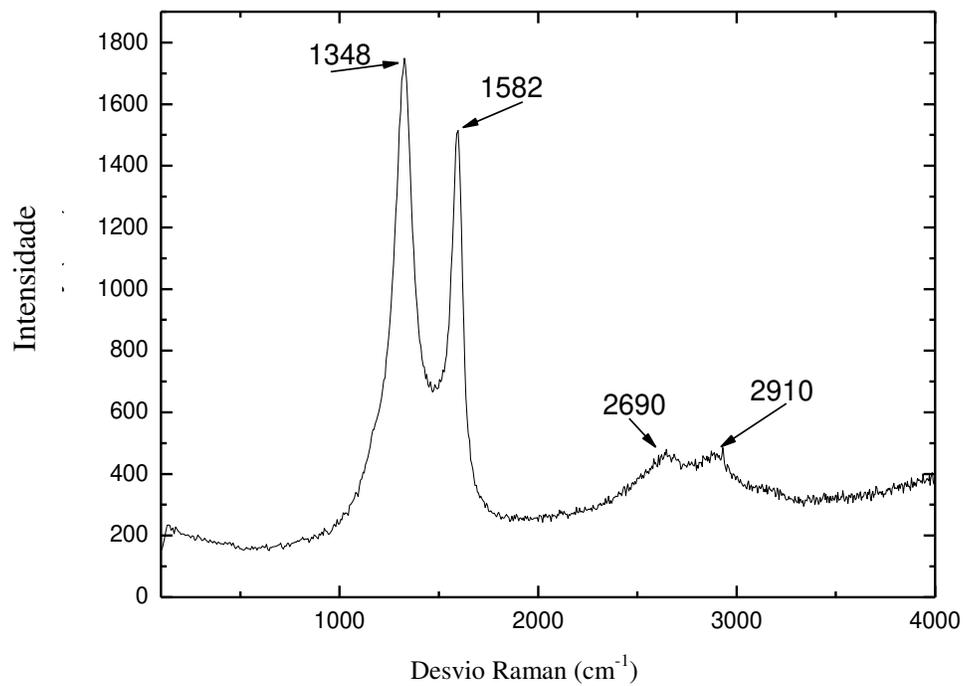
A figura 7 apresenta os espectros Raman obtidos das amostras de NPT (Figura 7A) e NPF (Figura 7B). O espectro correspondente à amostra NPT apresentam picos em 1341  $\text{cm}^{-1}$ , 1598  $\text{cm}^{-1}$ , 1145  $\text{cm}^{-1}$  (apenas cotovelo), 2679  $\text{cm}^{-1}$ , 2937  $\text{cm}^{-1}$  e 3220  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto o espectro da amostra NPF mostra picos em 1348  $\text{cm}^{-1}$ , 1582  $\text{cm}^{-1}$ , 2690  $\text{cm}^{-1}$  e 2910  $\text{cm}^{-1}$ . Ambos são típicos de materiais carbonosos grafíticos, com os picos mais intensos nas regiões de 1000  $\text{cm}^{-1}$  a 2000  $\text{cm}^{-1}$ , região em que os picos apresentam-se com dispersão relativamente pequena em suas posições e, em geral, com intensidades relativas semelhantes.

Ambas as amostras apresentaram na região de primeira ordem dois picos intensos em torno de 1350  $\text{cm}^{-1}$  e 1580  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao pico de desordem  $\text{sp}^2$  (linha D) e ao pico de grafite altamente orientada  $E_{2g}$   $\text{sp}^2$  (linha G). Na região de segunda ordem há picos em 2679  $\text{cm}^{-1}$  (espectro 1A) e em 2690  $\text{cm}^{-1}$  (espectro 1B) que correspondem ao segundo harmônico da linha D (2 x D). Picos em 2937  $\text{cm}^{-1}$  (espectro 1A) e em 2910  $\text{cm}^{-1}$  (espectro 1B) correspondem à soma das frequências das linhas D e G (D + G), e finalmente um pequeno pico em 3220  $\text{cm}^{-1}$  (espectro 1A) que corresponde ao segundo harmônico da linha G (2 x G).

A maior diferença entre estes espectros está nos picos menos intensos, mas com o desvio Raman maior. A razão principal destas diferenças reflete o aspecto tubular externo das nanopartículas. Isto pode ser visto nas figuras 8 e 9, que apresentam imagens de microscopia eletrônica referentes às amostras dos tipos de NPT e de NPF.



**Figura 7A:** Espectro Raman das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT).

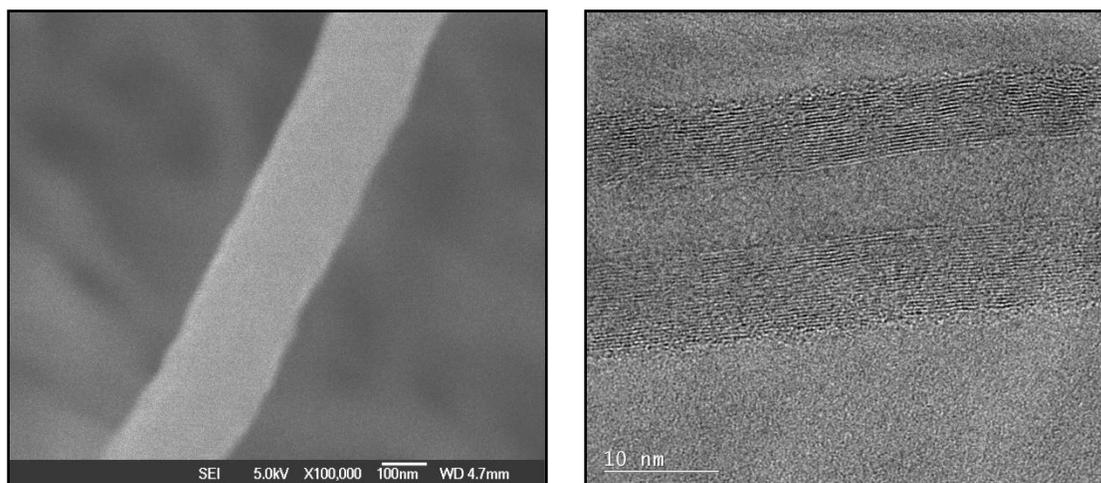


**Figura 7B:** Espectro Raman das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF).

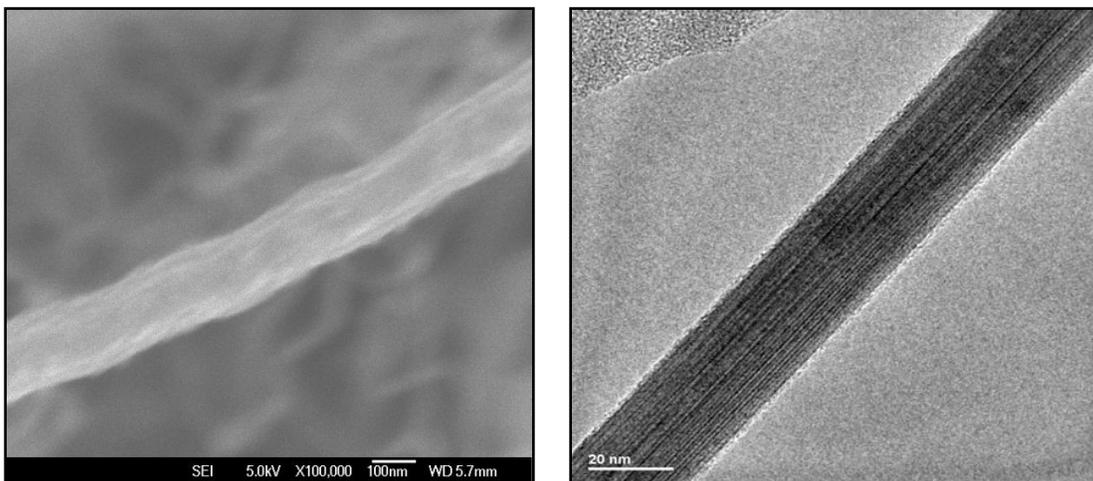
As figuras de 8 e 9 apresentam as imagens de microscopia eletrônica das amostras de NPT e NPF. Nas figuras 8A e 9A é possível observar as imagens obtidas por FESEM. Já as figuras 8B e 9B apresentam as imagens obtidas por HRTEM.

Na figura 8A pode-se ver o aspecto tubular externo da amostra do tipo NPT. A mesma amostra, na figura 8B, analisada por HRTEM e com ampliação maior, evidencia a presença de traços, na direção longitudinal, que correspondem às paredes do nanotubo, constituído de paredes múltiplas, que compõem a amostra de NPT.

A figura 9A apresenta o aspecto superficial tubular externo da amostra do tipo NPF. Diferentemente da amostra do tipo NPT, a amostra do tipo NPF forma um tubo compacto, como se pode ver pela imagem da HRTEM apresentada na figura 9B.



**Figura 8:** A) Imagem de Microscopia Eletrônica com Emissão de Campo (FESEM) e B) imagem de microscopia eletrônica de alta transmissão (HRTEM) das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT).



**Figura 9:** A) Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FESEM) e B) imagem de microscopia eletrônica de alta transmissão (HRTEM) das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF).

## 5.2 Avaliação da citotoxicidade indireta: ensaio de viabilidade pelo método do MTT

A partir dos valores obtidos pelo ensaio de viabilidade celular das células Vero e MSC/MO cultivadas na presença dos extratos do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF foi possível acessar o número de células metabolicamente ativas para cada amostra e compará-las ao CNT. O número de células viáveis foi determinado a partir da quantificação da concentração do sal de MTT na matriz mitocondrial de células ativas por meio da leitura de absorbância.

De acordo com os dados quantificados pela leitura de absorbância não foram observadas variações estatisticamente significativas do PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF quando comparados ao CNT tanto das células Vero quanto das MSC/MO (Tabelas 3 e 4).

Os resultados obtidos indicam que os extratos dos materiais não interferiram na proliferação, crescimento e viabilidade das células Vero e MSC/MO, pois as amostras apresentaram resultados semelhantes ao CNT (Figuras 10 e 11). Estes resultados

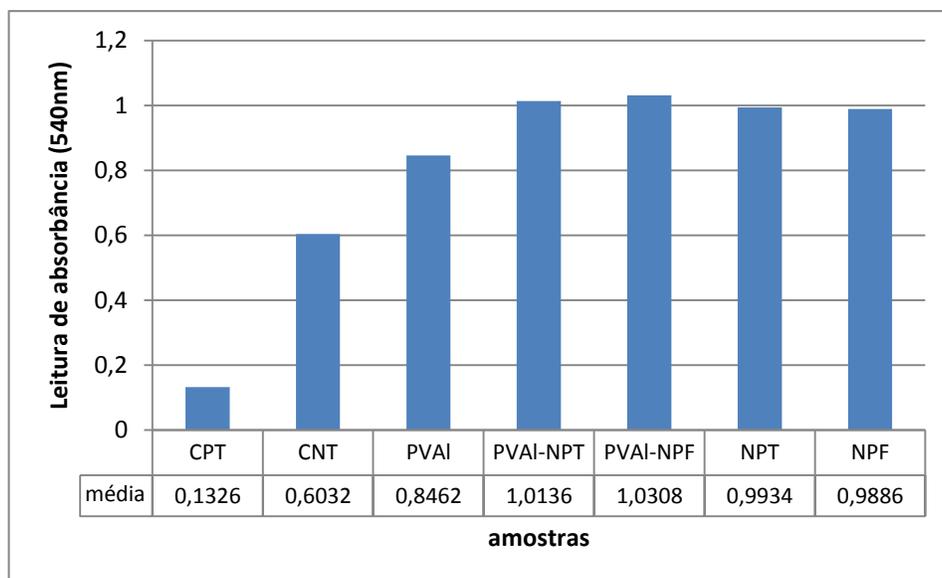
demonstram que as amostras não liberaram elementos tóxicos no meio de cultura devido ao comportamento semelhante ao CNT, atóxico.

**Tabela 3:** Dados da citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular com método do MTT para as amostras de PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF com células Vero (nível de significância 0,05).

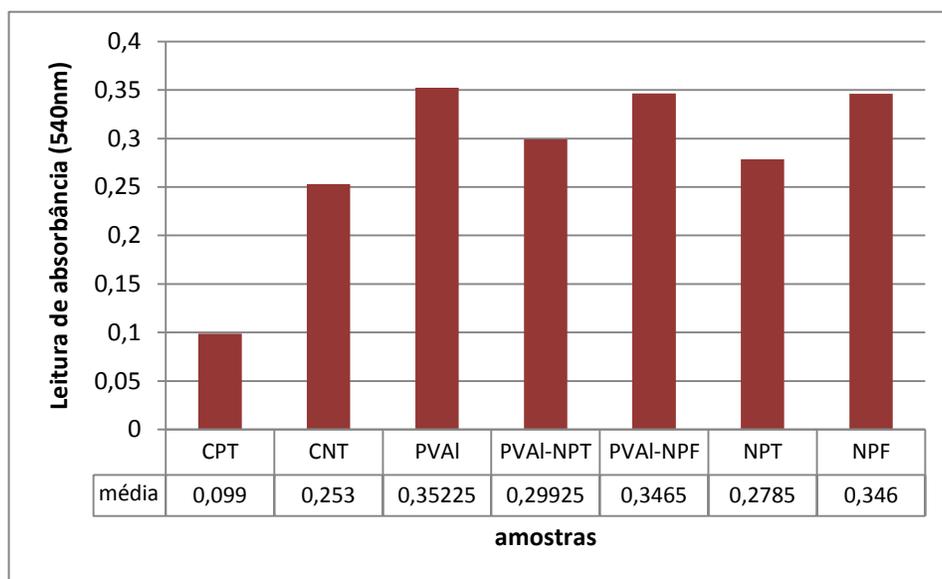
<b>Amostras</b>	<b>Leitura de absorbância</b>					<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
CPT	0,125	0,117	0,127	0,145	0,149	0,132	0,013
CNT	0,619	0,687	0,697	0,347	0,666	0,603	0,146
PVAI	0,876	0,991	0,796	0,548	1,020	0,846	0,189
PVAI-NPT	1,132	1,193	1,123	0,534	1,086	1,013	0,270
PVAI-NPF	1,044	1,270	1,142	0,588	1,110	1,030	0,260
NPT	0,930	1,127	0,947	0,730	1,233	0,993	0,194
NPF	1,075	1,170	1,086	0,549	1,063	0,988	0,249

**Tabela 4:** Dados da citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular com método do MTT para as amostras de PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF com células mesenquimais derivadas da medula óssea (nível de significância 0,05).

<b>Amostras</b>	<b>Leitura de absorbância</b>					<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
CPT	0,101	0,101	0,105	0,089	0,099	0,099	0,006
CNT	0,236	0,247	0,211	0,318	0,253	0,253	0,045
PVAI	0,386	0,460	0,224	0,339	0,352	0,352	0,098
PVAI-NPT	0,339	0,354	0,191	0,313	0,299	0,299	0,074
PVAI-NPF	0,381	0,383	0,230	0,392	0,346	0,346	0,077
NPT	0,343	0,335	0,223	0,213	0,278	0,278	0,070
NPF	0,406	0,447	0,249	0,282	0,346	0,346	0,095



**Figura 10:** Análise de citotoxicidade indireta do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF avaliados pelo ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT com células Vero.



**Figura 11:** Análise de citotoxicidade indireta do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF avaliados pelo ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT com células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO).

### 5.3 Avaliação da citotoxicidade indireta: ensaio de viabilidade pelo método de incorporação do vermelho neutro

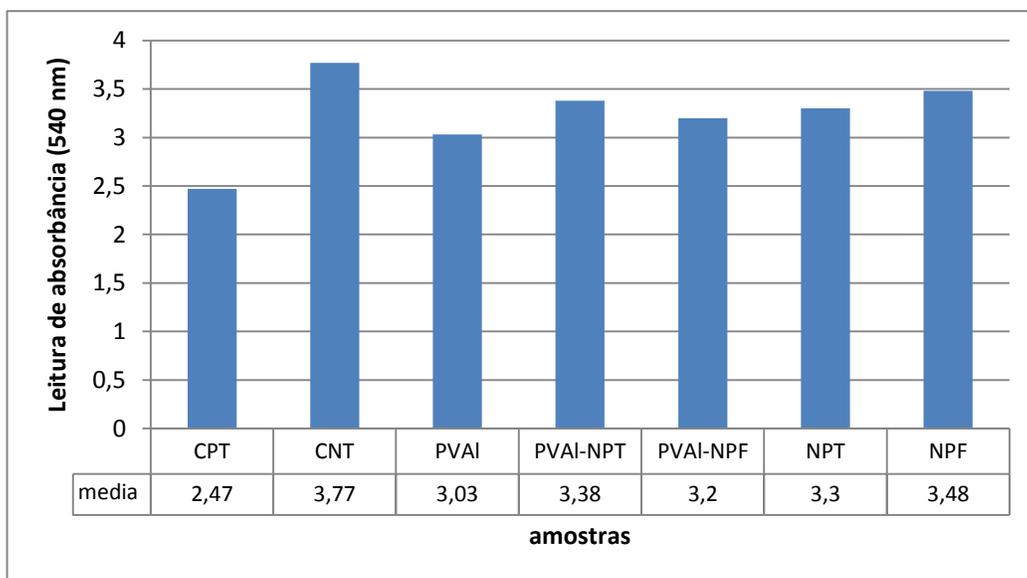
A partir do método de incorporação do vermelho neutro foi possível acessar a concentração do corante na matriz lisosomal e conseqüentemente determinar pela leitura de absorbância o número de células metabolicamente ativas.

Os dados obtidos pela leitura de absorbância indicam que as células Vero em contato com o extrato dos materiais apresentaram comportamento semelhante ao CNT, não interferindo no crescimento e viabilidade celular. Não foram observadas variações estatisticamente significativas dos materiais quando comparados ao CNT (Tabela 5).

Os resultados demonstraram que as amostras de PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF não liberaram substâncias nocivas em concentrações significativas, mantendo o mesmo padrão do CNT, atóxico (Figura 12).

**Tabela 5:** Dados da citotoxicidade indireta pelo ensaio de viabilidade celular com método de incorporação do vermelho neutro para as amostras de PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF com células Vero (nível de significância 0,05).

Amostras	Leitura de absorbância					Média	Desvio padrão
CPT	2,225	1,800	2,069	2,827	3,473	2,478	0,671
CNT	3,627	3,810	3,781	3,886	3,763	3,773	0,094
PVAI-NPT	2,296	3,322		3,897	4,005	3,380	0,782
PVAI-NPF	2,981	3,847	3,780	2,347	3,079	3,206	0,621
PVAI		3,995	1,457	3,816	2,877	3,036	1,161
NPT	2,800	3,224	2,606	4,845	3,049	3,304	0,892
NPF	4,802	3,050	3,490	2,048	4,049	3,4878	1,037



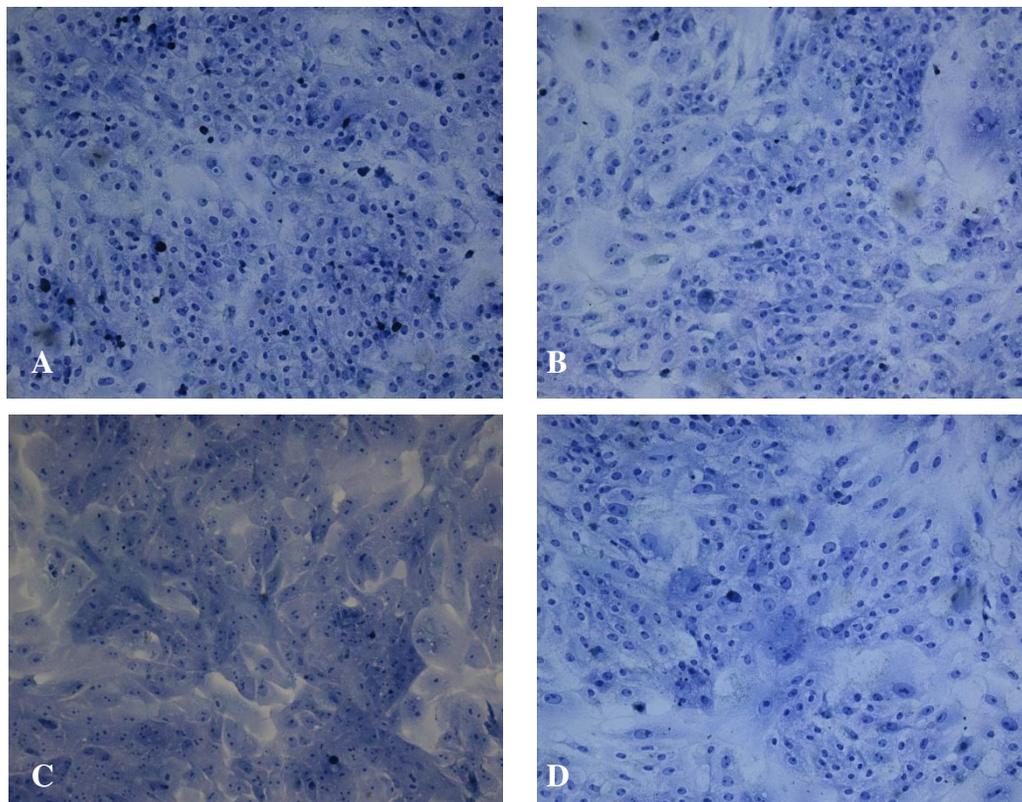
**Figura 12:** Análise de citotoxicidade indireta do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF, NPT e NPF avaliados pelo ensaio de viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro com células Vero.

#### 5.4 Análise citoquímica

Por meio da análise citoquímica das células Vero foi possível observar a morfologia, adesão e espalhamento celular. Na figura 13 é possível observar as imagens das células Vero após 24 horas de cultivo sobre o PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF e CNT. As imagens apresentam células bem aderidas e espalhadas (Figura 13B, 13C e 13D) e com o mesmo padrão de crescimento apresentado pelo CNT (Figura 13A). Estes resultados indicam que as amostras não interferiram nos estágios de crescimento e espalhamento celular. Nestas imagens é possível observar a presença de células fortemente basófilas, com núcleo evidente e levemente metacromático corados pelo AT. É possível observar

nitidamente a formação de monocamada celular composta por células íntegras, sem alterações morfológicas com aspecto semelhante ao CNT (Figura 13).

Analisadas em conjunto, estas características indicam atividade celular adequada, sem interferência nas fases crescimento e espalhamento celular.

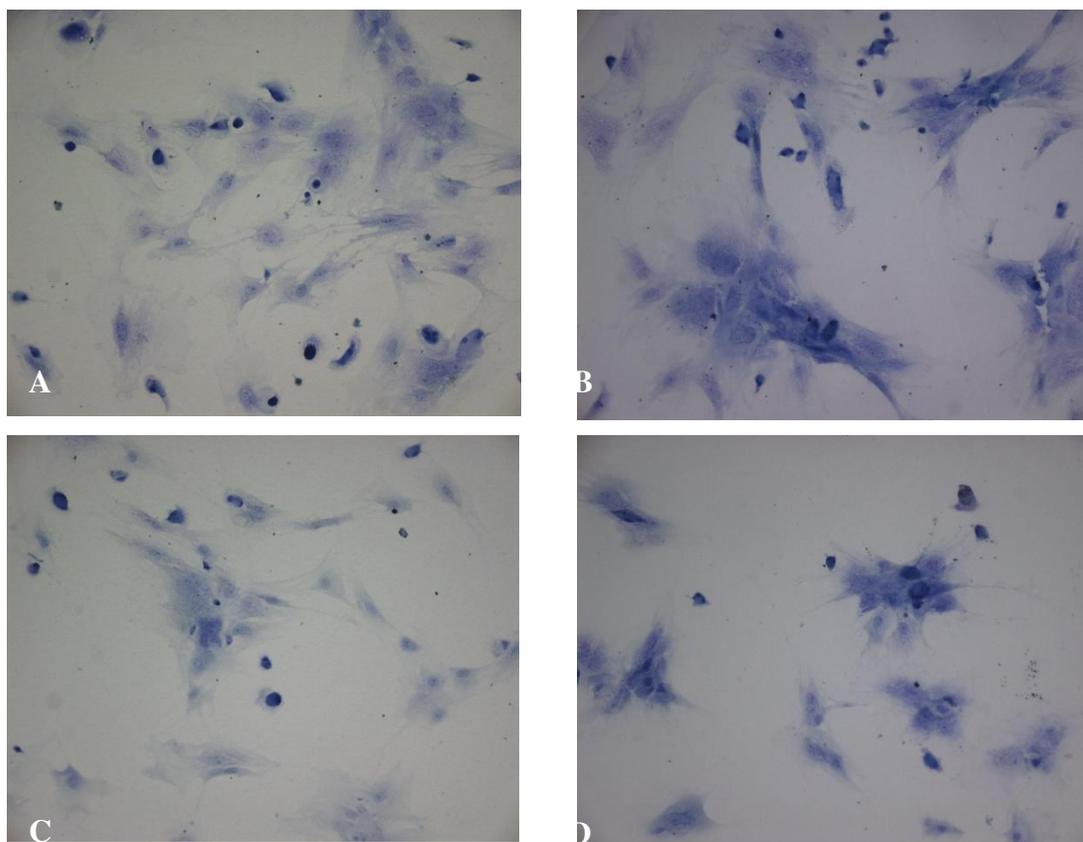


**Figura 13:** Análise citoquímica das células Vero cultivadas em contato com: A) CNT, B) PVAI, C) PVAI-NPT e D) PVAI-NPF. Coloração de azul de toluidina (AT). Aumento de 200x.

Na análise citoquímica das MSC/MO foram adotados os mesmos critérios de avaliação utilizados para as células Vero. Desta forma, após 24 horas de cultivo foram avaliados os aspectos referente à morfologia, padrão de crescimento e coloração.

Na figura 14 é possível observar as MCS/MO cultivadas em contato com o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF e coradas pelo AT. Nestas imagens podemos notar células basófilas, com nucléolo evidente e levemente metacromático.

Não foram observadas variações morfológicas das células cultivadas com os diferentes materiais (Figura 14B, 14C e 14D), mantendo aspecto semelhante ao CNT (Figura 14A). Este resultado indica que os materiais não interferiram nos estágios de crescimento e espalhamento celular frente análise citoquímica.



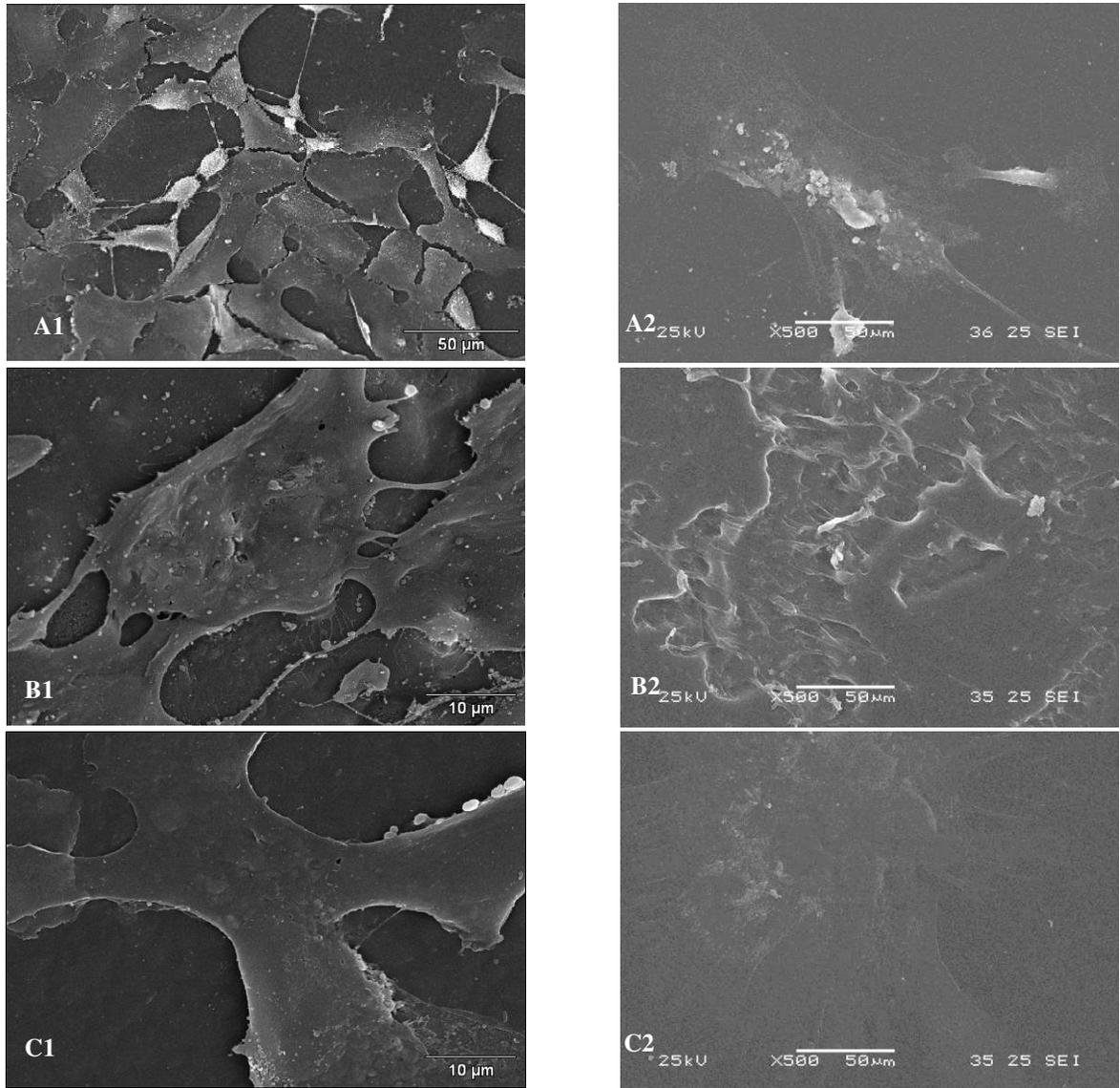
**Figura 14:** Análise citoquímica das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) cultivadas em contato com: A) CNT, B) PVAI, C) PVAI-NPT e D) PVAI-NPF. Coloração de azul de toluidina (AT). Aumento de 200x.

## **5.5 Investigação da morfologia das células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A partir das imagens obtidas por meio da MEV foi possível investigar a morfologia das células Vero e MSC/MO sobre o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 24 horas de cultivo (Figura 15).

Nas micrografias eletrônicas das células Vero é possível observar o aspecto fibroblastóide característico das células Vero aderidas sobre o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF (Figuras 15A1, 15B1 e 15C1). Nestas imagens é possível observar a presença de pontes citoplasmáticas entre as células e material filamentosos. Em relação à amostra de PVAI-NPF, observamos células achatadas com morfologia irregular (Figura 15C1).

Nas figuras 15A2, 15B2, e 15C2 é possível observar as imagens das MSC/MO cultivadas por 24 horas sobre as amostras. Sobre o PVAI e PVAI-NPF observamos células bem aderidas, espalhadas com morfologia levemente estrelada e alongada (Figuras 15A2 e 15C2). Nestas imagens é possível observar a presença de finos prolongamentos celulares a partir das bordas e em diferentes regiões da célula. Em algumas imagens é possível observar prolongamentos maiores, sugerindo migração celular (Figura 15C2). Sobre o PVAI-NPT observamos células com morfologia irregular (Figura 15B2).



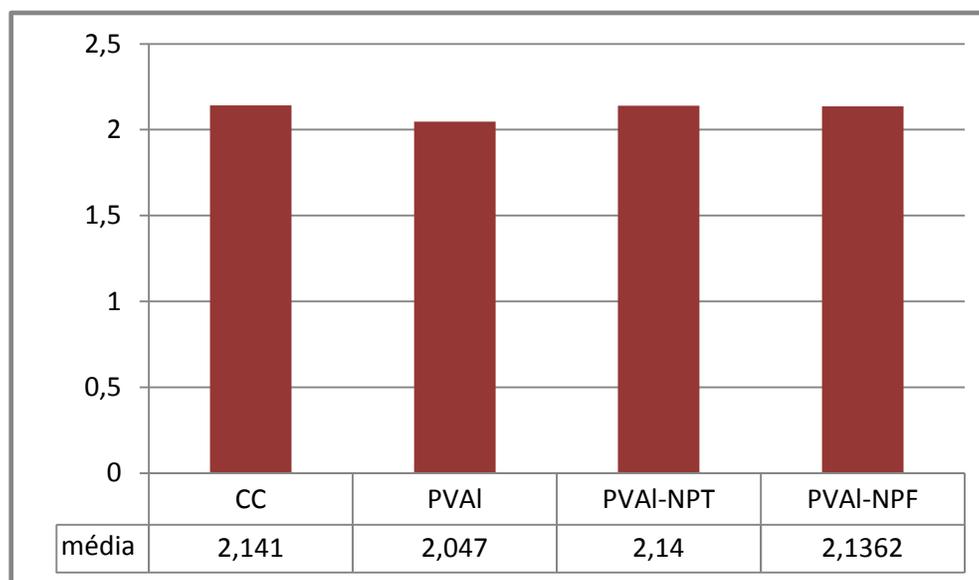
**Figura 15:** Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície: A) CC, B) PVAI, C) PVAI-NPT e D) PVAI-NPF, nos quais foram cultivadas células Vero (A1, B1, C1 e D1) e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) (A2, B2, C2 e D2) por 24 horas.

## 5.6 Indução da diferenciação osteogênica das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO)

### 5.6.1 Análise da diferenciação osteogênica: atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A análise semi-quantitativa da ALP encontra-se apresentada na figura 16. De acordo com os resultados obtidos foi possível identificar e quantificar a produção média da enzima ALP na CC e em contato com o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 21 dias de indução de diferenciação osteogênica.

Os resultados obtidos revelaram semelhança na concentração média de APL (valores em absorbância entre parênteses) após período de diferenciação em contato com: CC (2,14), PVAI (2,04), PVAI-NPT (2,14) e PVAI-NPF (2,13).



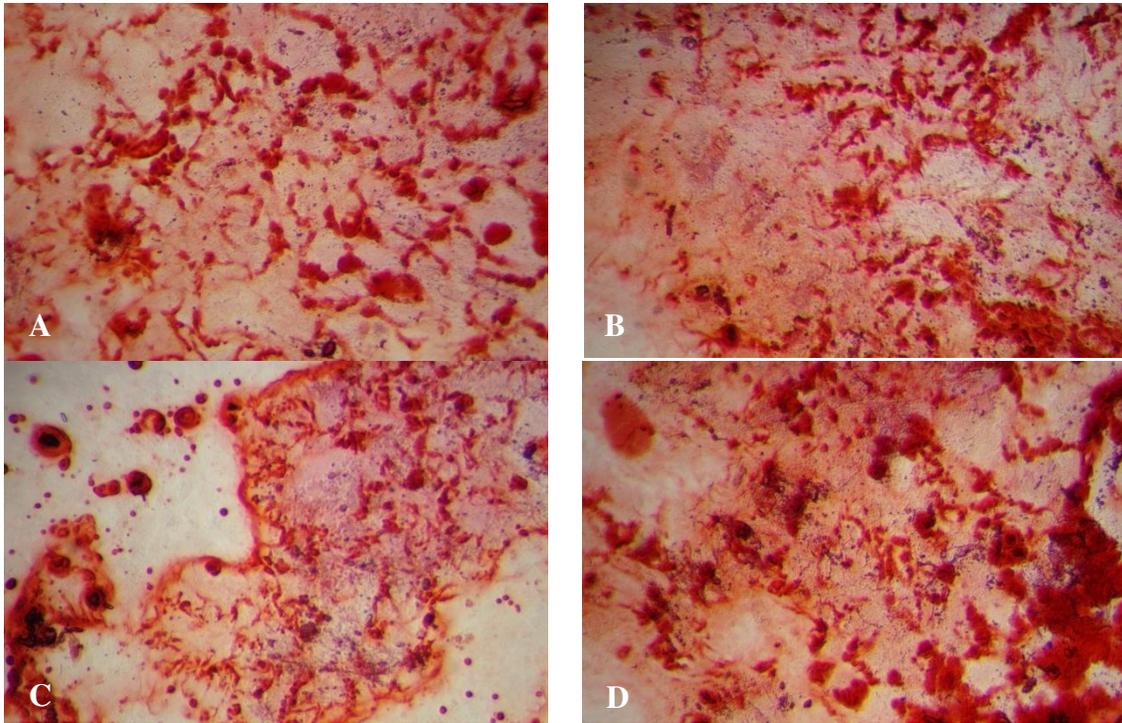
**Figura 16:** Quantificação da atividade da enzima fosfatase alcalina após 21 dias de indução de diferenciação osteogênica em contato com a cultura controle (CC), PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF.

### 5.6.2 Análise da diferenciação osteogênica: vermelho de alizarina S (ARS)

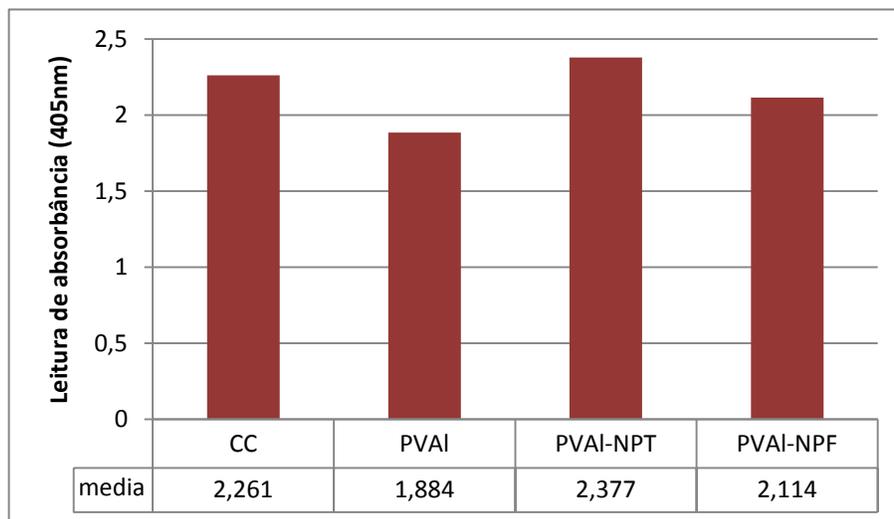
A análise da diferenciação osteogênica por meio do corante ARS nos permitiu detectar a deposição de matriz óssea mineralizada. A formação de nódulos mineralizados foi avaliada pela incorporação da coloração de ARS após 21 dias de diferenciação osteogênica em contato com a CC, PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF.

Na figura 17 é possível observar a incorporação do corante pela matriz óssea mineralizada das células em contato com as amostras. Observamos a formação de nódulos de mineralização nas culturas induzidas a diferenciação em contato com o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF (Figuras 17B, 17C e 17D). Foi observado o mesmo padrão de deposição da matriz mineralizada para CC (Figura 17A).

A análise semi-quantitativa da matriz mineralizada pela extração colorimétrica do ARS revelou os seguintes resultados para a cultura controle e materiais analisados constam na figura 18 (valores em absorvância entre parênteses): CC (2,26), PVAI (1,88), PVAI-NPT (2,37) e PVAI-NPF (2,11).



**Figura 17:** Imagens das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após 21 dias de diferenciação osteogênica em contato com: A) CC, B) PVAI, C) PVAI-NPT e D) PVAI-NPF. Coloração de vermelho de alizarina S. Aumento de 200x.



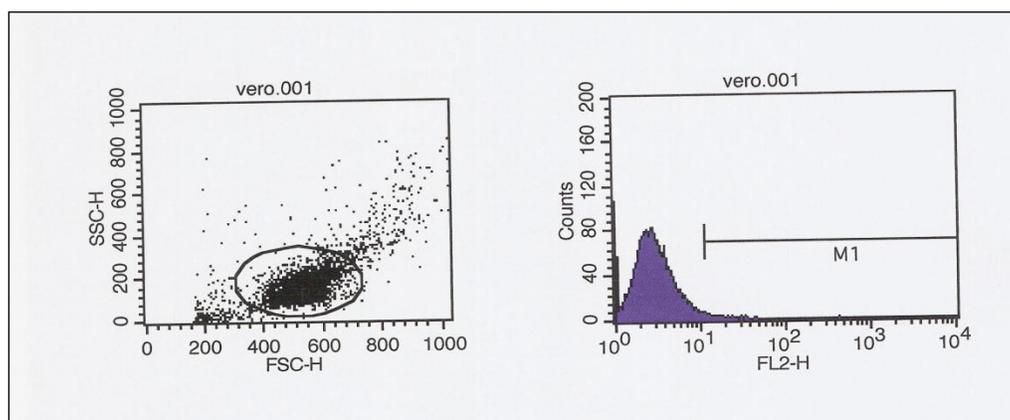
**Figura 18:** Quantificação da matriz mineralizada pela extração colorimétrica do vermelho de alizarina S para a cultura controle (CC), PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF.

## 5.7 Quantificação das nanopartículas de carbono em cultura de células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por citometria de fluxo

Por meio da citometria de fluxo foi possível determinar a porcentagem de NPT-PKH26 e NPF-PKH26 internalizadas nas células Vero e MSC/MO.

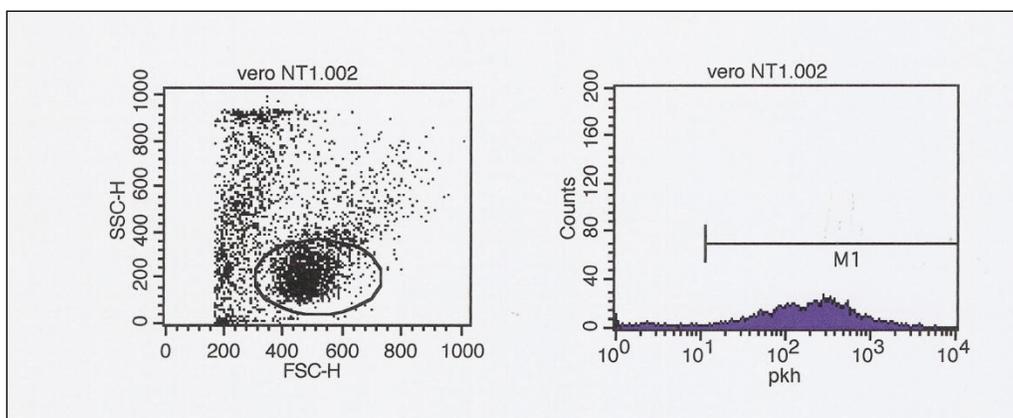
Encontram-se descritos nas figuras 19, 20 e 21 os dados obtidos pela citometria de fluxo para as células Vero cultivadas por 24 horas nas condições experimentais: cultura controle (CC) sem inoculação de nanopartículas e com a inoculação de NPT-PKH26 e NPF-PKH26, respectivamente.

A concentração média obtida nas diferentes condições experimentais cultivadas com as células Vero foi de: CC (1.13%), NPT-PKH26 (43.94) e NPF-PKH26 (67.78), conforme pode ser observado na Figura 22.



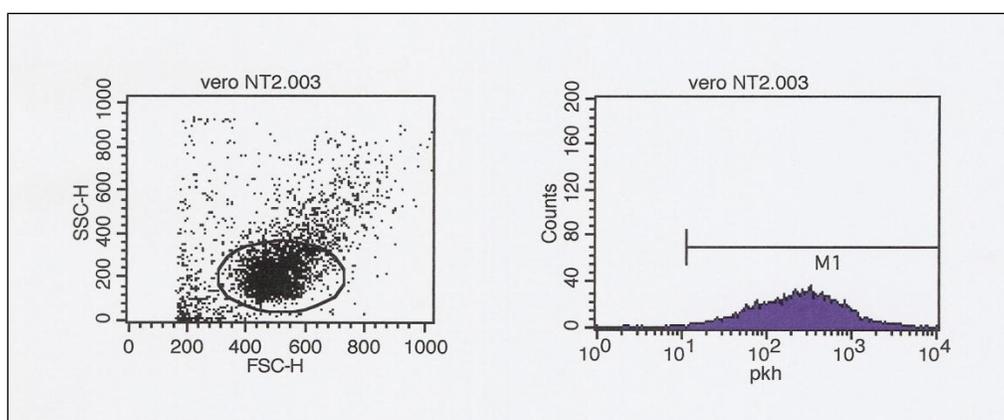
	Área (%)	Partículas	Partículas (%)	Média
Área Total	100.00	8401	84.01	3.35
Área demarcada (M1)	1.35	113	1.13	20.15

**Figura 19:** Resultado da análise de citometria de fluxo das células Vero sem inoculação das nanopartículas de carbono (CC: cultura controle) e cultivo de 24 horas.



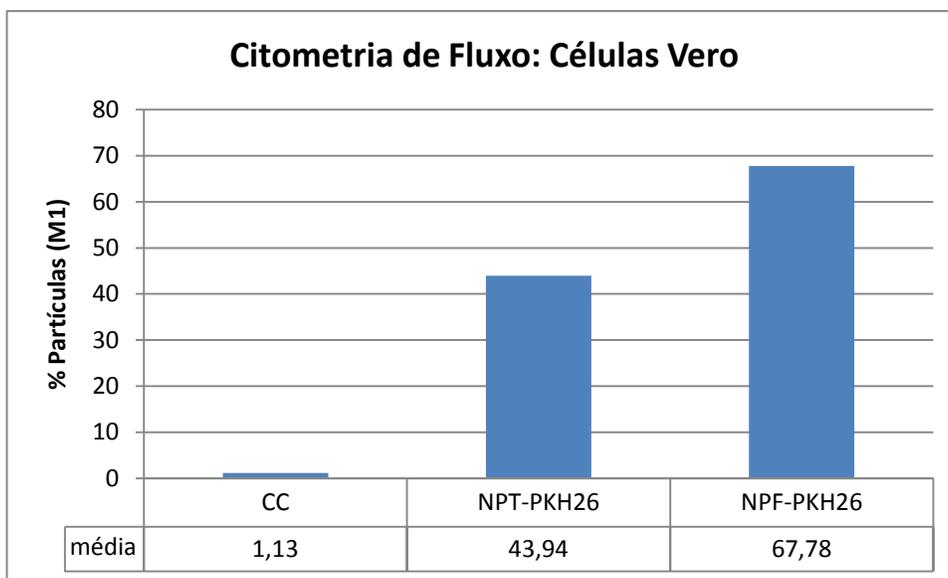
	Área (%)	Partículas	Partículas (%)	Média
Área Total	100.00	4533	45.33	294.50
Área demarcada (M1)	96.93	4394	43.94	303.71

**Figura 20:** Resultado da análise de citometria de fluxo das células Vero após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT) marcadas com corante fluorescente (NPT-PKH26) e cultivo de 24 horas.



	Área (%)	Partículas	Partículas (%)	Média
Área Total	100.00	6802	68.02	369.39
Área demarcada (M1)	99.65	6778	67.78	370.67

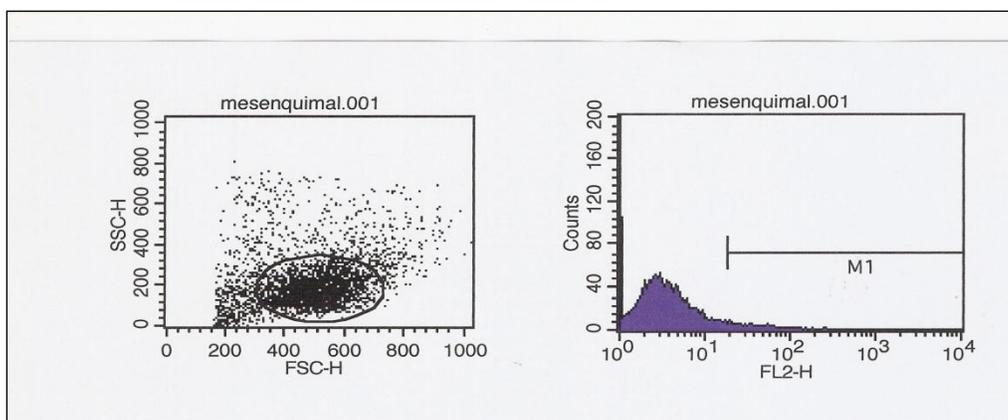
**Figura 21:** Resultado da análise de citometria de fluxo das células Vero após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF) marcadas com corante fluorescente (NPF-PKH26) e cultivo de 24 horas.



**Figura 22:** Internalização média das nanopartículas de carbono marcadas com corante fluorescente PKH26 (NPT-PKH26 e NPF-PKH26) pelas células Vero após período de cultivo de 24 horas.

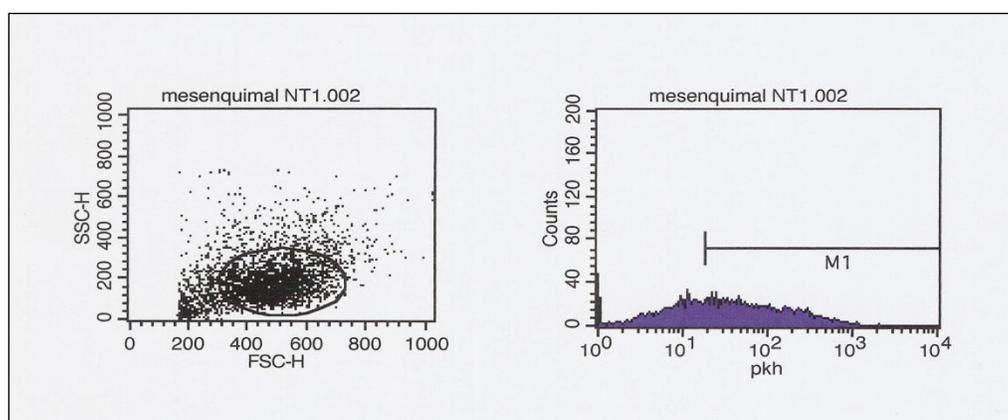
Nas figuras 23, 24 e 25 encontram-se ilustrados os dados obtidos para a cultura de MSC/MO cultivadas por 24 horas nas condições experimentais: cultura controle (CC) sem inoculação de nanopartículas, com a inoculação de NPT-PKH26 e com a inoculação de NPF-PKH26, respectivamente.

A concentração média obtida nas diferentes condições experimentais cultivadas com as MSC/MO foi de: CC (2.66%), NPT-PKH26 (43.63%) e NPF-PKH26 (40.60%) (Figura 26).



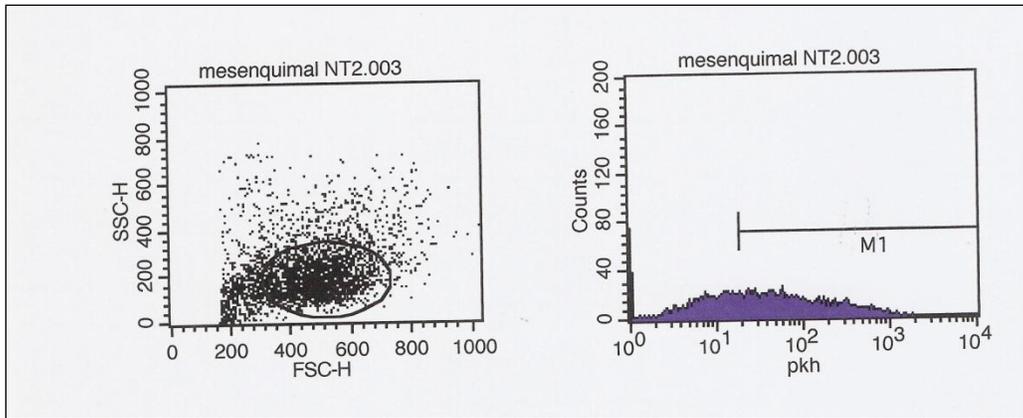
	Área (%)	Partículas	Partículas (%)	Média
Área Total	100.00	6821	68.21	5.40
Área demarcada (M1)	3.90	266	2.66	40.04

**Figura 23:** Resultado da análise de citometria de fluxo das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) sem inoculação das nanopartículas de carbono (CC: cultura controle).



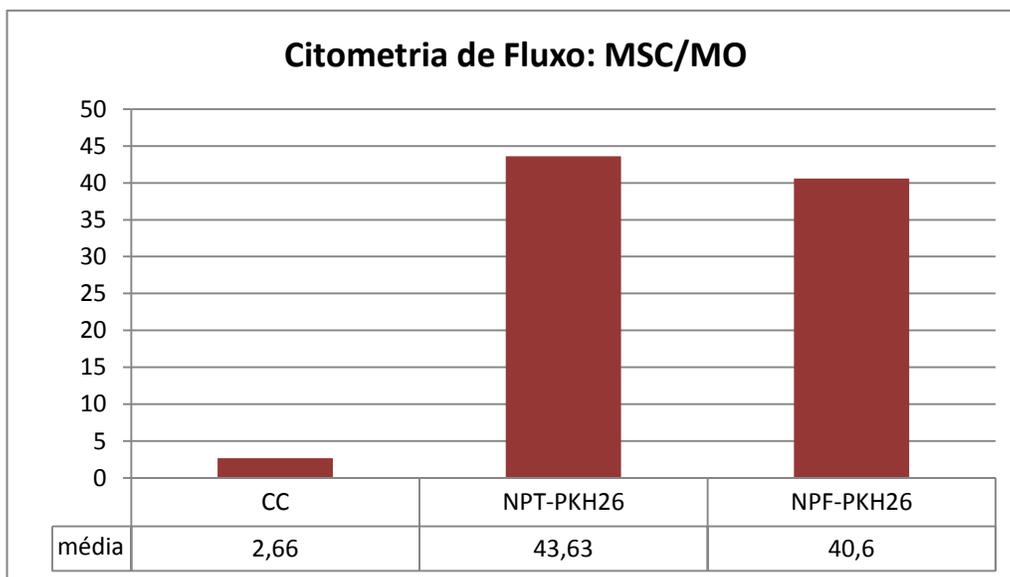
	Área (%)	Partículas	Partículas (%)	Média
Área Total	100.00	7045	70.45	76.17
Área demarcada (M1)	61.93	4363	43.63	117.30

**Figura 24:** Resultado da citometria de fluxo das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura tubular (NPT) marcadas com corante fluorescente (NPT-PKH26) e cultivo de 24 horas.



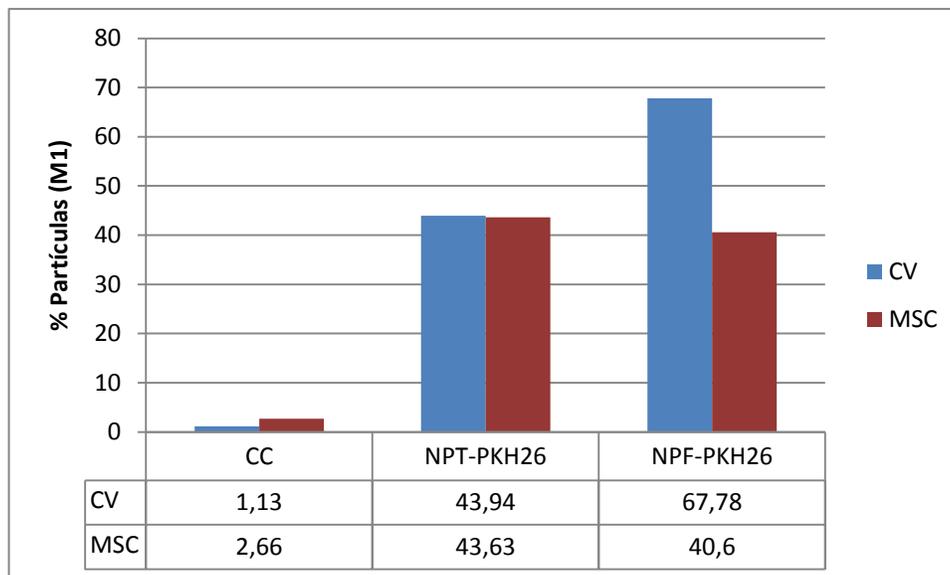
	Área (%)	Partículas	Partículas (%)	Média
Área Total	100.00	6599	65.99	84.14
Área demarcada (M1)	61.52	4060	40.60	131.16

**Figura 25:** Resultado da análise de citometria de fluxo das células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após inoculação das nanopartículas de carbono com estrutura fibrosa (NPF) marcadas com corante fluorescente (NPF-PKH26) e cultivo de 24 horas.



**Figura 26:** Internalização média das nanopartículas de carbono marcadas com corante fluorescente PKH26 (NPT-PKH26 e NPF-PKH26) pelas células mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após período de cultivo de 24 horas.

A partir dos resultados obtidos foi possível evidenciar uma internalização expressiva do NPF-PKH26 (67,78%) pelas células Vero. O mesmo resultado não foi obtido pelo NPT-PKH26 (43,94%) com o mesmo tipo celular. Por outro lado, as MSC/MO obtiveram internalização média regular: NPT-PKH26 (43,63%) e NPF-PKH26 (40,60%). Estes dados podem ser observados na figura 27.



**Figura 27:** Internalização média das nanopartículas de carbono marcadas com corante fluorescente PKH26 (NPT-PKH26 e NPF-PKH26) pelas células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) após período de cultivo de 24 horas.

### 5.8 Avaliação macroscópica por estereomicroscópio

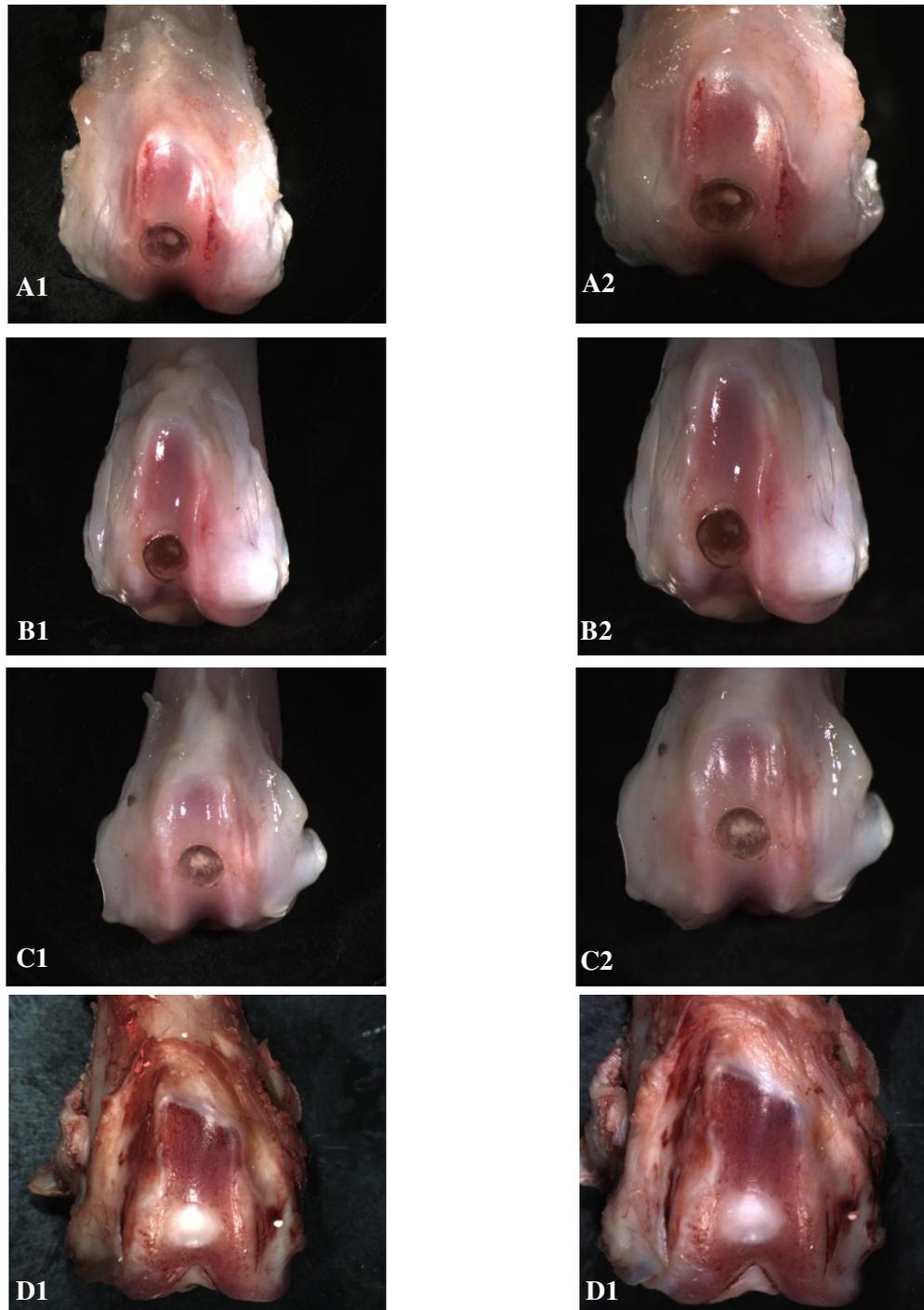
Os côneilos femurais pertencentes aos grupos com períodos de seguimento de 3 e 12 semanas apresentaram, sem exceção, no momento do sacrifício ótima cicatrização do tecido epitelial e ausência de processo inflamatório nos tecidos adjacentes. O PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF permaneceram no local de implante não sendo registrada nenhuma intercorrência, como por exemplo, migração das amostras.

A análise macroscópica por estereomicroscópio permitiu avaliar a superfície do PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF no local do defeito. Também foi possível avaliar o aspecto dos tecidos ao redor dos implantes e patelas.

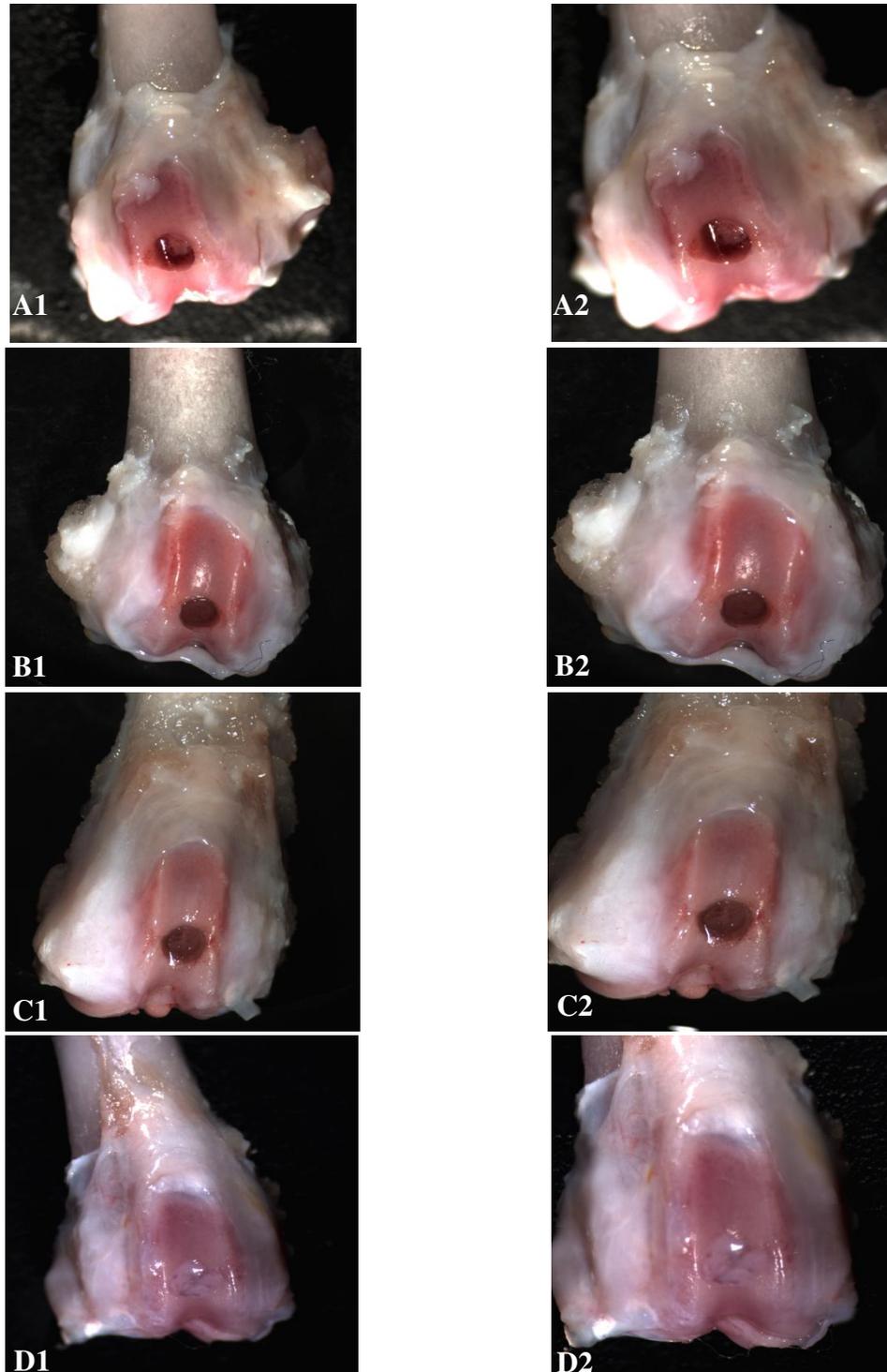
O aspecto superficial dos cêndilos femurais pertencentes aos grupos experimentais, nos quais foram implantados o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF durante 3 semanas de seguimento, pode ser observado na figura 28. Foi possível constatar que os tecidos adjacentes em todos os grupos experimentais mantiveram o aspecto superficial e coloração normal (Figura 28A, 28B e 28C). Na superfície dos materiais não foram observados sinais de deslocamento, adesão e/ou crescimento de tecido, desgaste e/ou abrasão. Estas características sinalizam uma interface material-osso propícia.

Em relação aos cêndilos e materiais implantados por 12 semanas, o aspecto dos tecidos adjacentes e superfície dos implantes apresentaram as mesmas características observadas no grupo de 3 semanas, conforme pode ser observado nas figuras 29A, 29B e 29C.

Já nos cêndilos pertencentes aos grupos GC com 3 e 12 semanas de seguimento, foi observado o preenchimento completo do defeito ósseo por tecido conjuntivo denso neoformado (Figuras 28D e 29D).



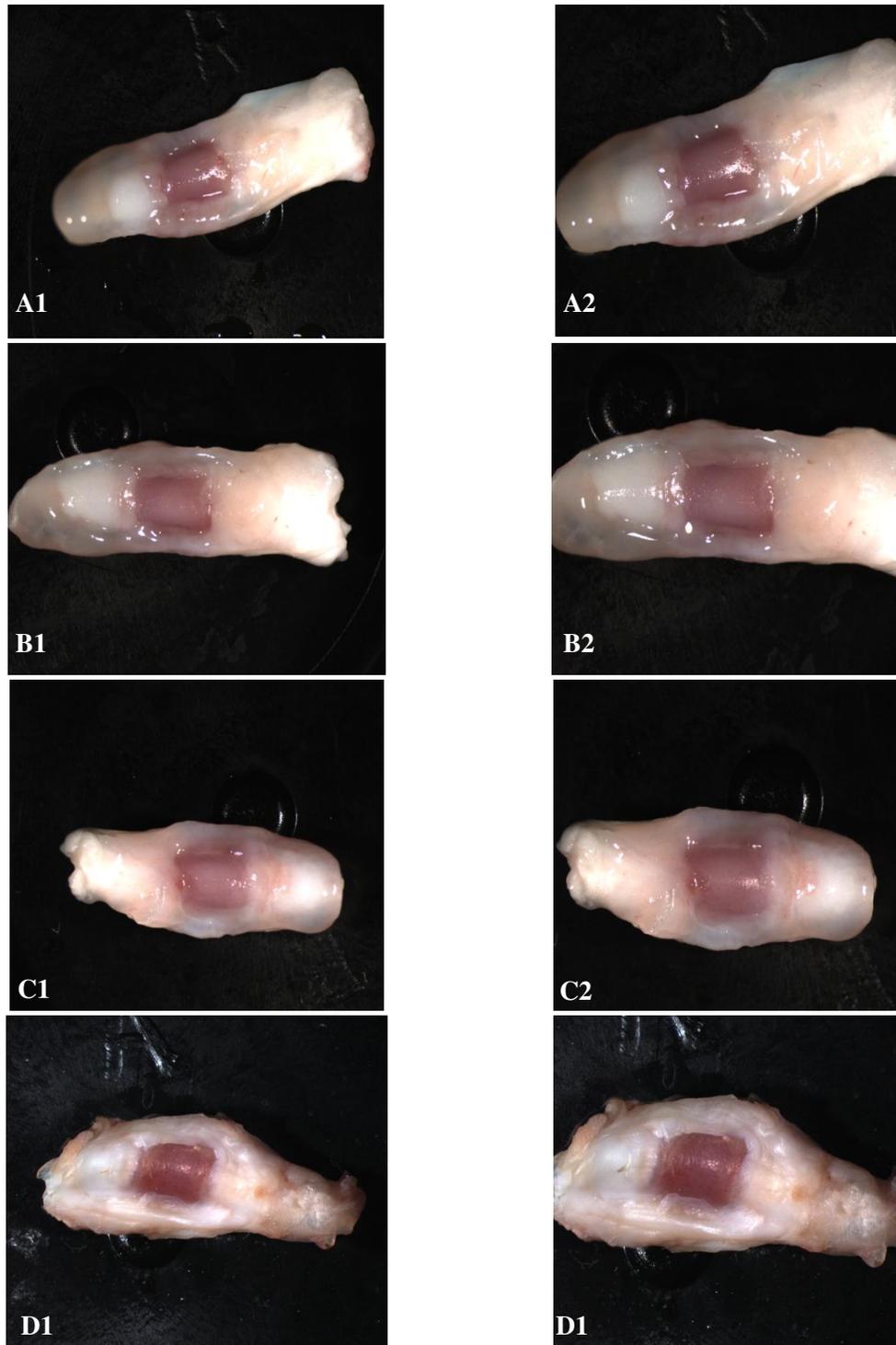
**Figura 28:** Avaliação macroscópica da superfície dos implantes após 3 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).



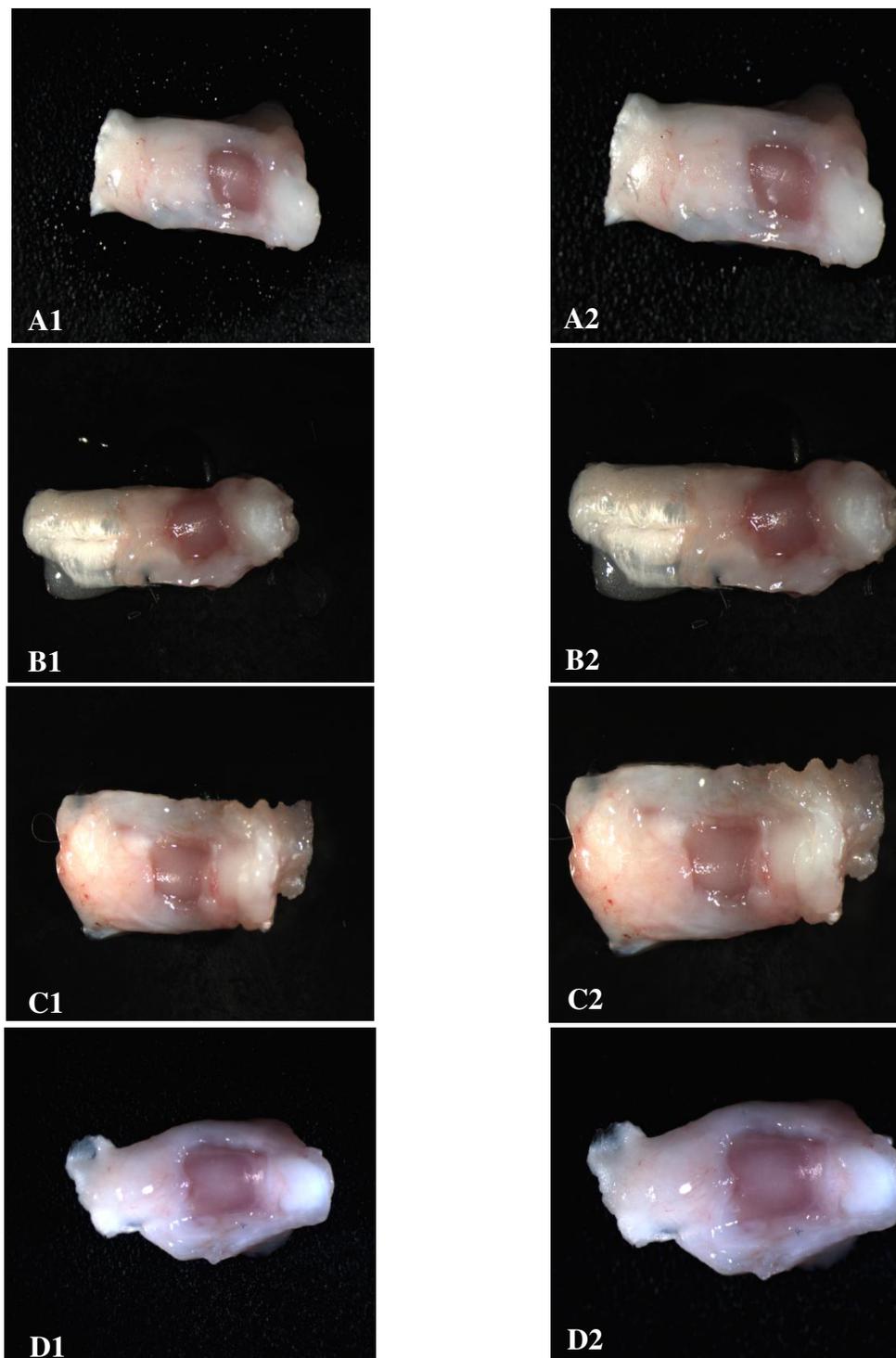
**Figura 29:** Avaliação macroscópica da superfície dos implantes após 12 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).

A análise do aspecto superficial das patelas teve por objetivo verificar a presença ou não de sinais de desgaste ou abrasão. As patelas foram selecionadas para esta análise devido ao seu íntimo contato com a superfície dos materiais. Como sua função consiste basicamente em deslizar sobre a região intercondiliana atuando sobre a articulação do joelho durante a marcha, este movimento constante e em contato com a superfície dos materiais durante o período de implante poderia resultar em desgaste ou abrasão do tecido patelar.

De acordo com as imagens obtidas não foram observados sinais de desgaste ou abrasão nas patelas dos grupos experimentais nos quais foram implantados o PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF e GC após 3 e 12 semanas de seguimento (Figuras 30 e 31). Não foram observadas diferenças significativas entre as patelas pertencentes aos grupos experimentais e grupos controles. A semelhança do aspecto superficial das patelas nos permite afirmar que as mesmas, após período de 3 e 12 semanas de contato com a superfície dos materiais, não apresentaram sinais de desgaste e/ou atrito.



**Figura 30:** Avaliação macroscópica da superfície das patelas após 3 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).



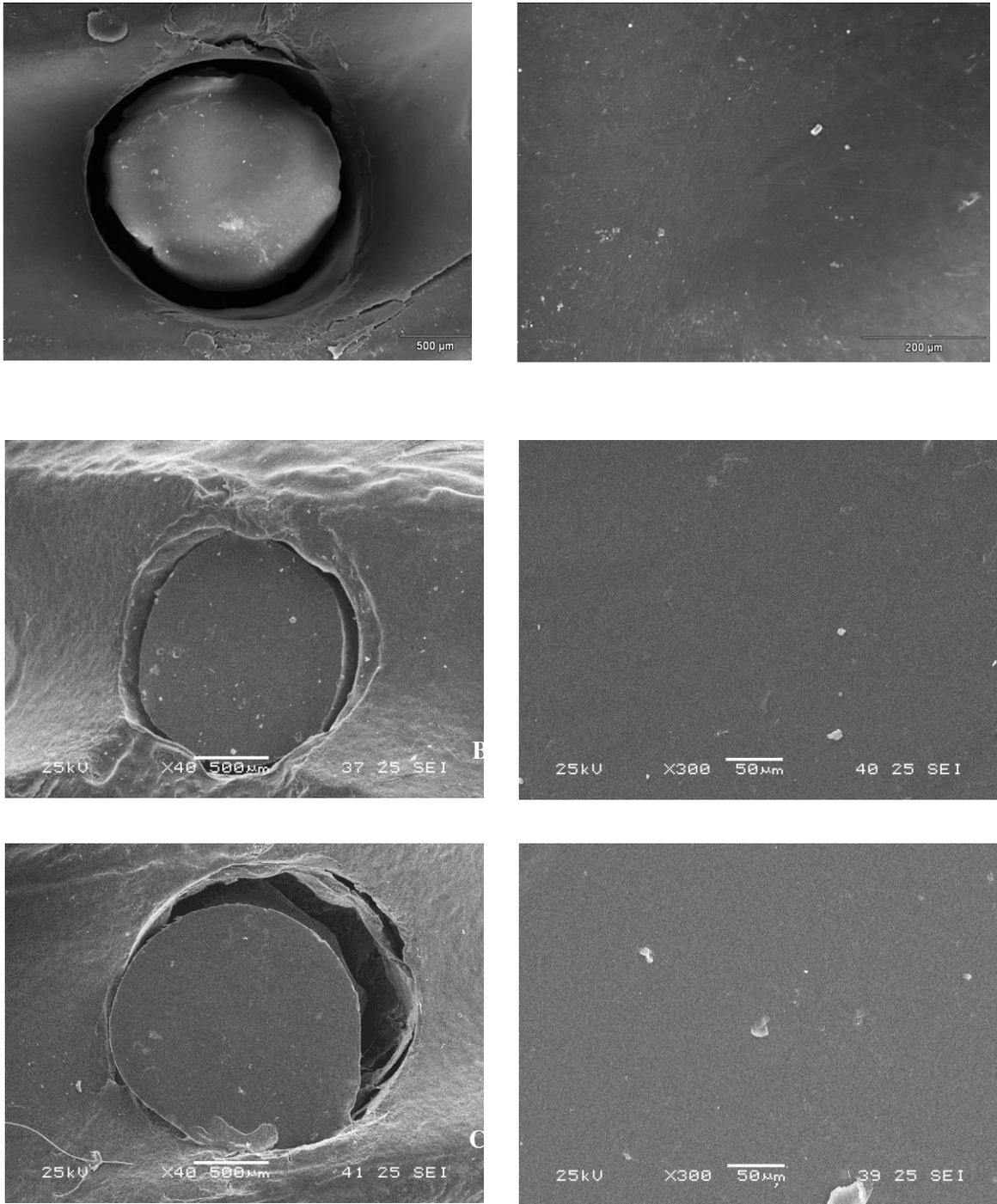
**Figura 31:** Avaliação macroscópica da superfície das patelas após 12 semanas de seguimento: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (grupo defeito vazio). Aumento de 8x (de A1 a D1) e 10x (de A2 a D2).

## **5.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV): superfície dos implantes**

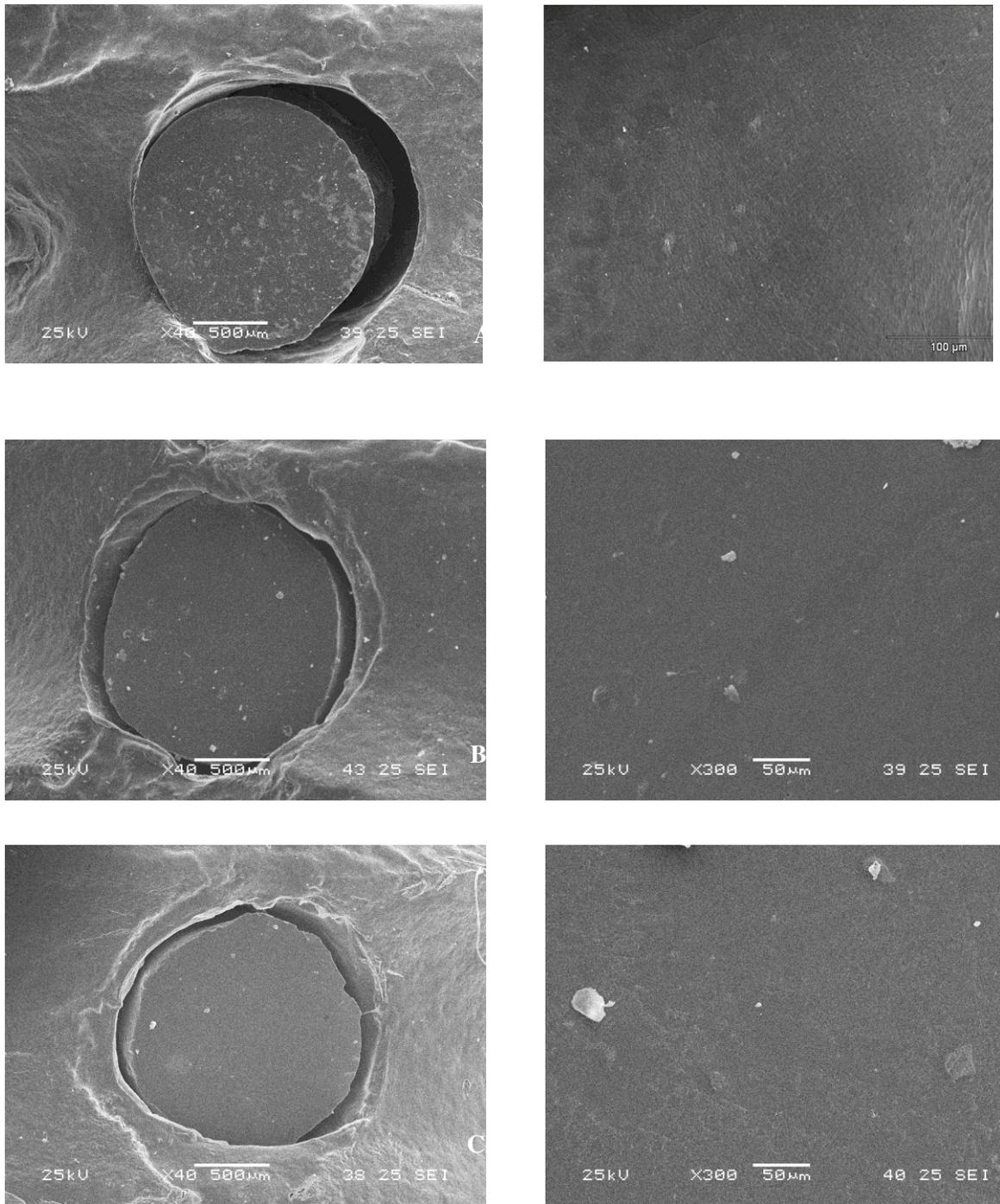
Através das imagens obtidas por MEV observou-se o aspecto da superfície do PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após períodos de implante (Figuras 32 e 33). A partir destas imagens verificou-se que não houve formação, bem como adesão de tecidos sobre a superfície dos materiais analisados após 3 semanas (Figura 32) e 12 semanas (Figura 33) de seguimento. Não foram observados sinais de abrasão, desgaste, arrancamento ou formação de debris sobre a superfície dos materiais.

Nas figuras 34 e 35 podemos observar o aspecto característico da superfície das patelas após de implante de 3 e 12 semanas, respectivamente. De acordo com estas imagens não foram observados sinais de abrasão no tecido patelar de nenhum dos animais pertencentes a estes grupos após contato com o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF implantados no defeito ósseo. Não foram observadas diferenças significativas no aspecto superficial das patelas em contato com os diferentes materiais e tempos de seguimento adotados. Estes achados sugerem que os materiais analisados não interferiram na contra superfície de contato tornando os materiais promissores como substitutos da cartilagem hialina.

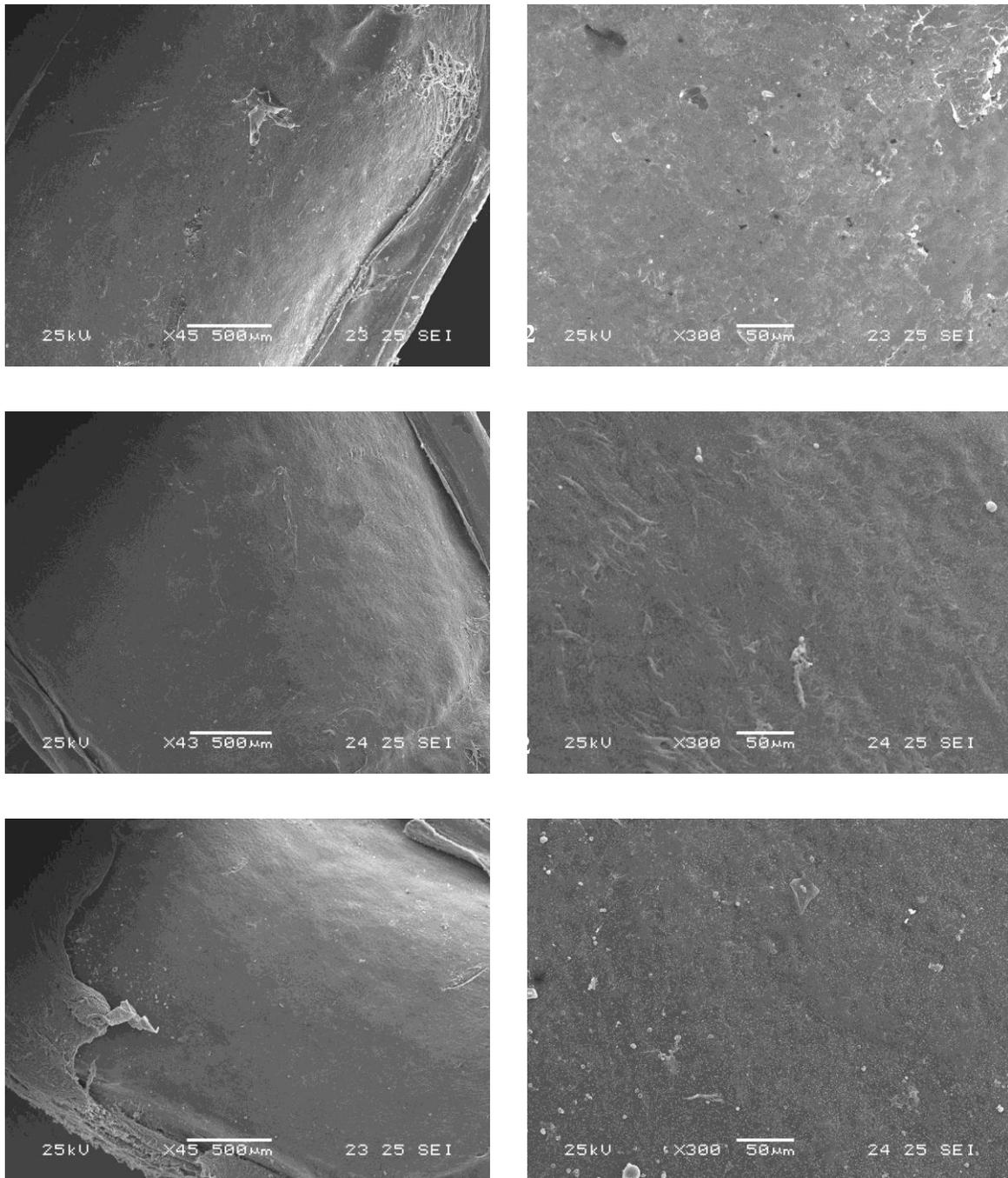
A Figura 36 apresenta as imagens dos cêndilos e patelas pertencentes ao GC, onde o defeito foi mantido vazio. Nesta figura é possível observar que após 3 e 12 semanas de seguimento o defeito foi preenchido por tecido neoformado e não foram observados sinais de desgaste ou abrasão sobre este tecido (36A1 e 36B1). Da mesma forma não foram observados sinais de desgaste na patela (36A2 e 36B2). Em todos os casos, os cêndilos e patelas do GC não apresentaram sinais de desgaste sobre o a região do defeito e patelas assim como observado nos grupos experimentais.



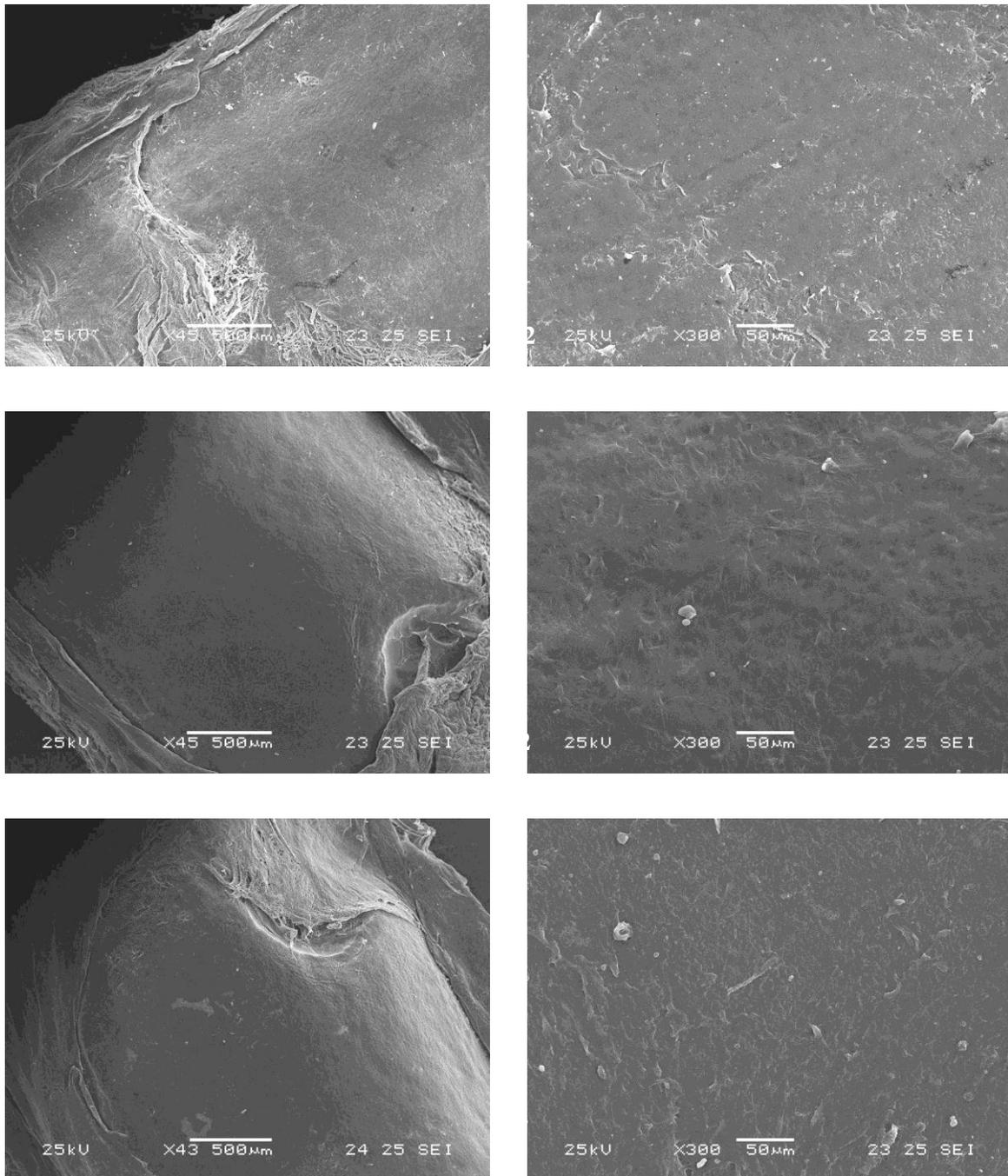
**Figura 32:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 3 semanas de implante. De A1 a C1 aumento de 40x. De A2 a C2 aumento de 300x.



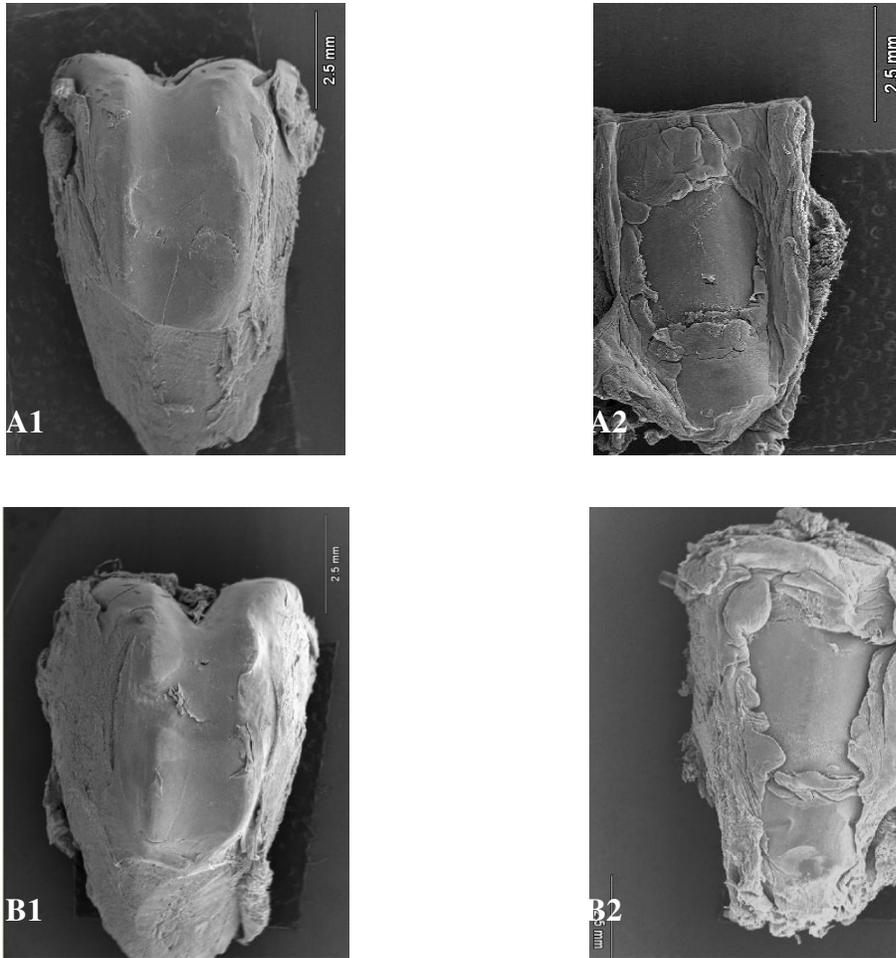
**Figura 33:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 12 semanas de implante. De A1 a C1 aumento de 40x. De A2 a C2 aumento de 300x.



**Figura 34:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície das patelas: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 3 semanas de implante. De A1 a C1 aumento de 40x. De A2 a C2 aumento de 300x.



**Figura 35:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície das patelas: A) PVAI, B) PVAI-NPT e C) PVAI-NPF após 12 semanas de implante. De A1 a C1 aumento de 40x. De A2 a C2 aumento de 300x.



**Figura 36:** Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície do: A1) cõndilo e A2) patela do grupo controle com 3 semanas de seguimento, B1) cõndilo e B2) patela do grupo controle com 12 semanas de seguimento. Aumento de 40x.

## **5.10 Microscopia óptica (MO)**

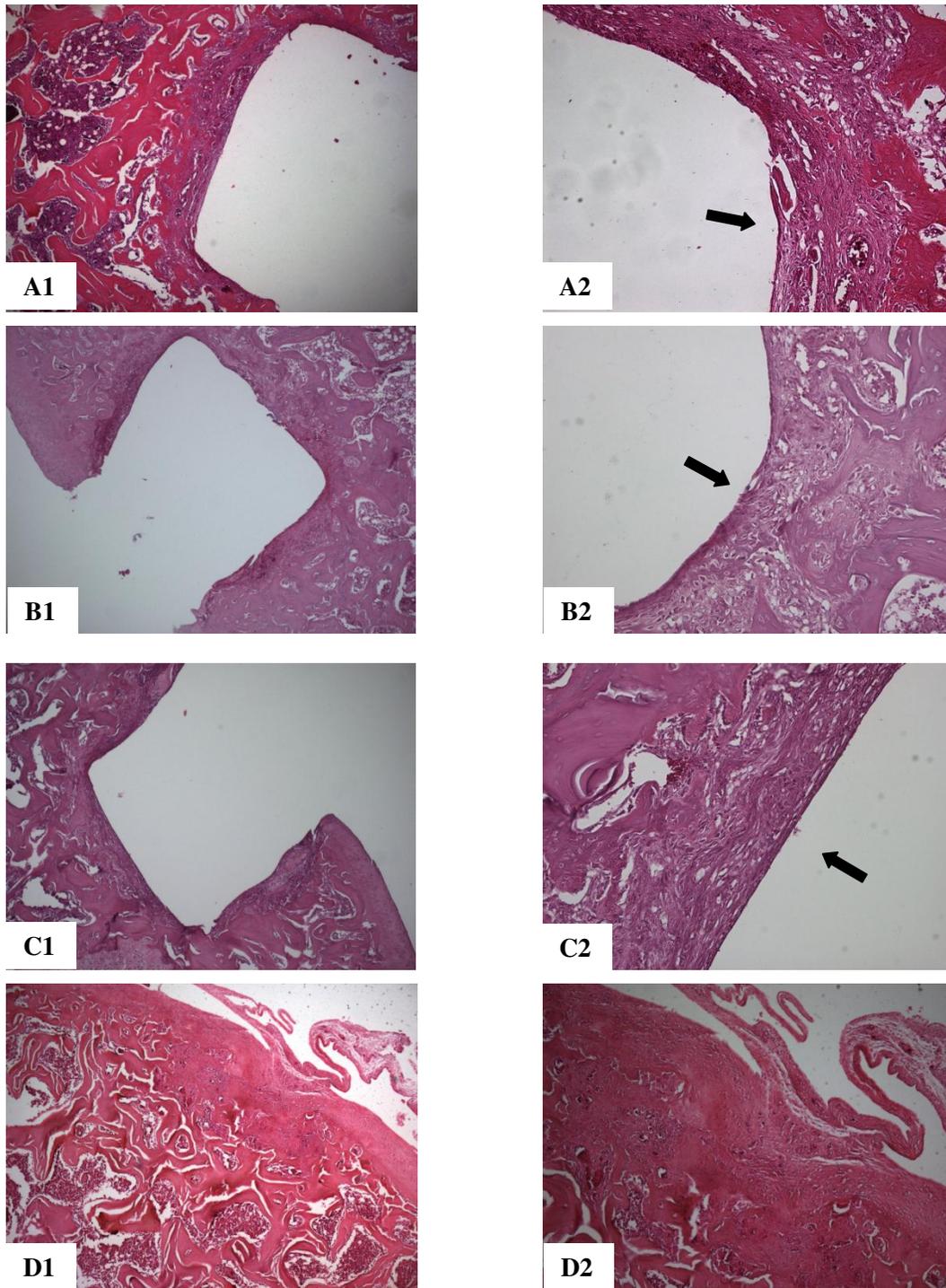
Através da MO pode-se observar o crescimento tecidual na região de interface implante-osso e caracterizá-lo de acordo com tempo de seguimento e material implantado, conforme pode ser observado nas figuras 37, 38, 39 e 40. Nas figuras 37 e 38 podem ser observadas a região de interface do PVAI, PVAI-NPT, PVAI-NPF e GC após 3 semanas de implante coradas com HE e TM, respectivamente. Já nas figuras 39 e 40 encontram-se ilustradas a região de interface dos materiais referidos e GC após 12 semanas de implante coradas com HE e TM, respectivamente.

Nos grupos com PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF implantados e período de seguimento de 3 semanas notou-se na região de interface a presença de tecido conjuntivo denso. De acordo com as figuras 37 e 38 pôde-se observar a semelhança do tecido conjuntivo denso neoformado na presença dos diferentes materiais implantados. Estas imagens sugerem que os materiais apresentaram comportamento semelhante após 3 semanas em contato com o local de implante, já que não foi observado em nenhum dos grupos analisados a presença de células gigantes, processo inflamatório significativo e/ou espessamento do tecido fibroso neoformado.

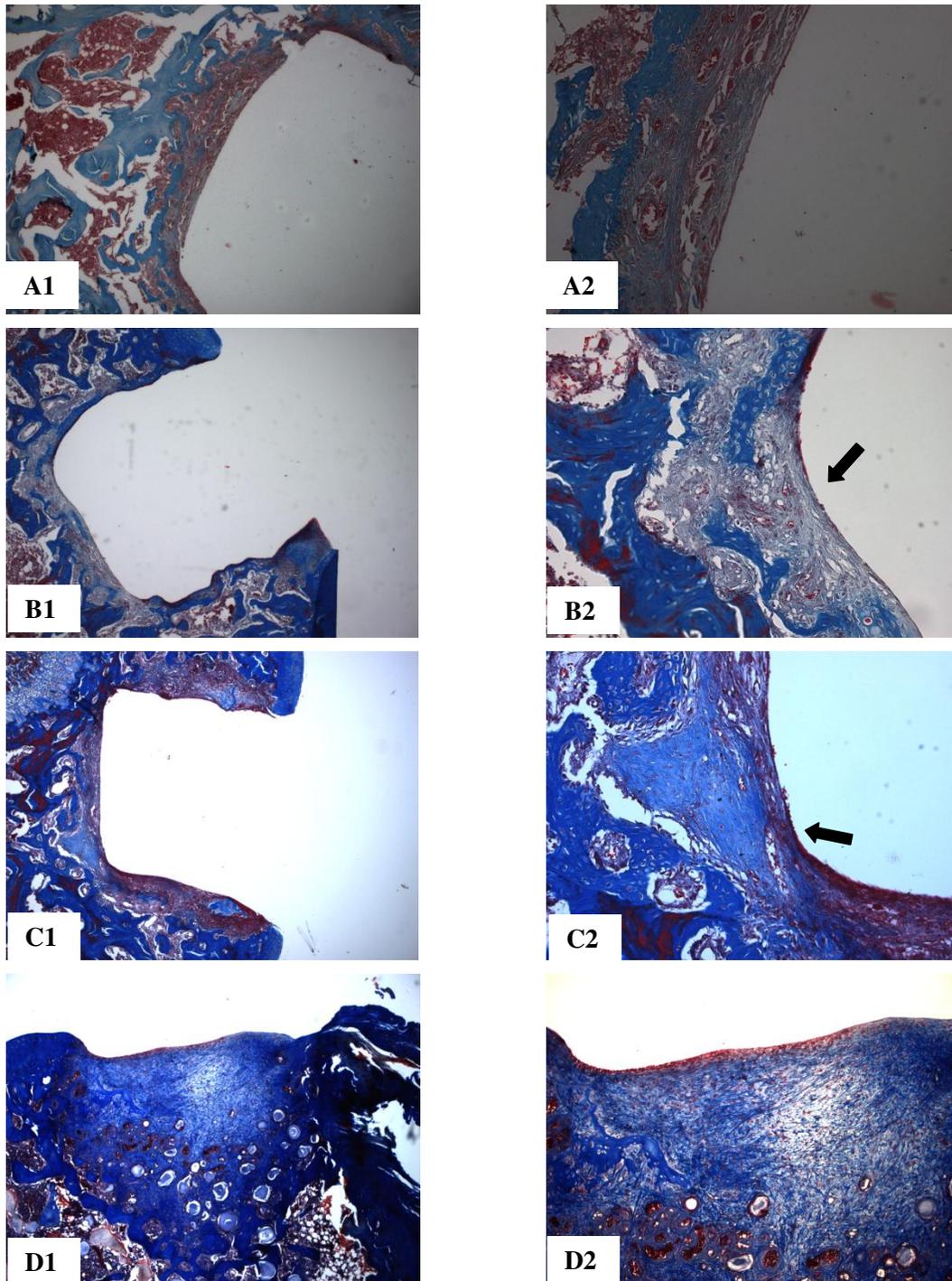
Nos grupos com PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF implantados e período de seguimento de 12 semanas notou-se a presença de tecido ósseo neoformado, conforme pode ser observado nas figuras 39 e 40. Nestas imagens pode-se observar a presença de tecido conjuntivo denso apenas no grupo com PVAI implantado (Figuras 39A e 40A). O mesmo não foi observado nos grupos com PVAI-NPT e PVAI-NPF com o mesmo período de implante (Figuras 39B, 39C, 40B e 40C).

Outro aspecto importante observado na região de interface do PVAI-NPT e PVAI-NPF foi a permanência dos materiais no local de implante após o processamento histológico das amostras e corte em micrótomo. Todas as amostras de PVAI-NPT e PVAI-NPF mantiveram-se no local, sendo possível observar a íntima associação destes materiais com o tecido ósseo neoformado (Figuras 39B, 39C, 40B e 40C). Nestas imagens notou-se a formação contínua, bem definida e aderida do tecido ósseo neoformado com o PVAI-NPT e PVAI-NPF. O mesmo aspecto não foi observado no grupo com o PVAI, que se soltava facilmente do local de implante durante a obtenção dos cortes em micrótomo.

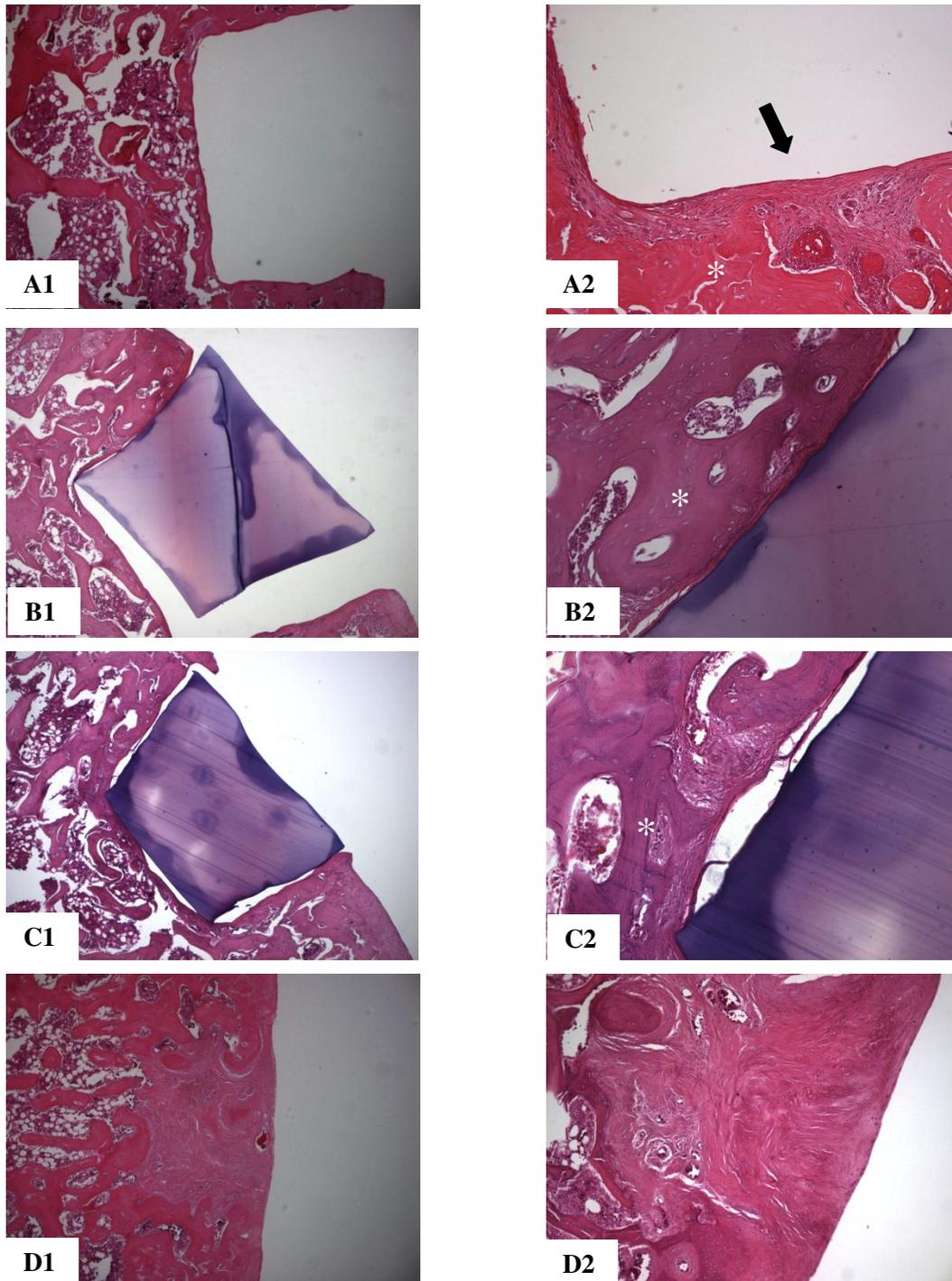
No GC foi observado após 3 e 12 semanas de seguimento a deposição de tecido conjuntivo denso neoformado preenchendo o defeito ósseo (Figuras 37D, 38D, 39D e 40D).



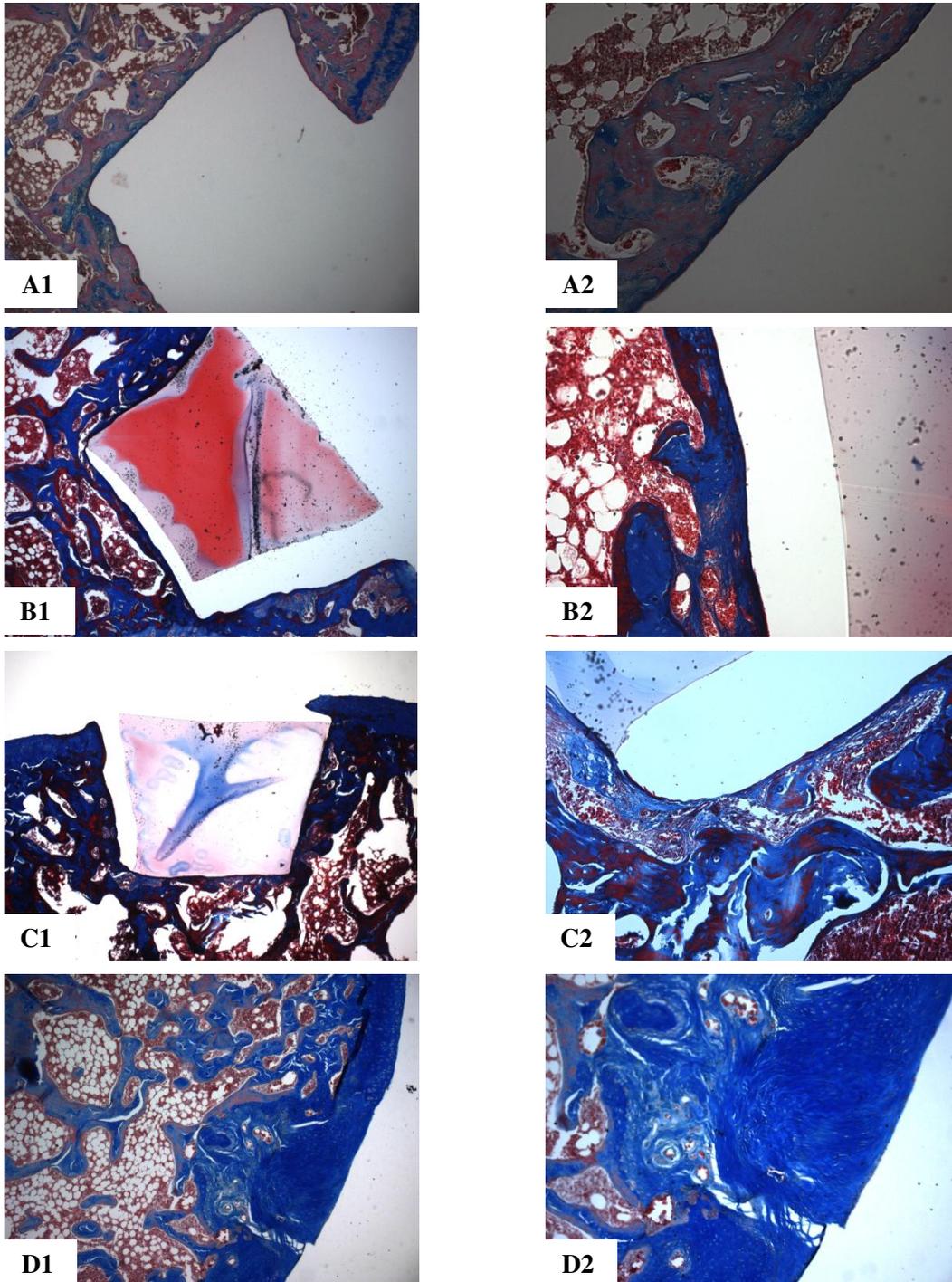
**Figura 37:** Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 3 semanas de seguimento. Tecido conjuntivo denso (seta). De A1 a D1 aumento de 50x. De A2 a D2 aumento de 200x. Coloração HE.



**Figura 38:** Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 3 semanas de seguimento. Tecido conjuntivo denso (seta). De A1 a C1 aumento de 50x. De A2 a C2 aumento de 100x. Coloração TM.



**Figura 39:** Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 12 semanas de seguimento. Tecido conjuntivo denso (seta) e ósseo (asterisco). De A1 a D1 aumento de 50x. De A2 a D2 aumento de 100x. Coloração HE.

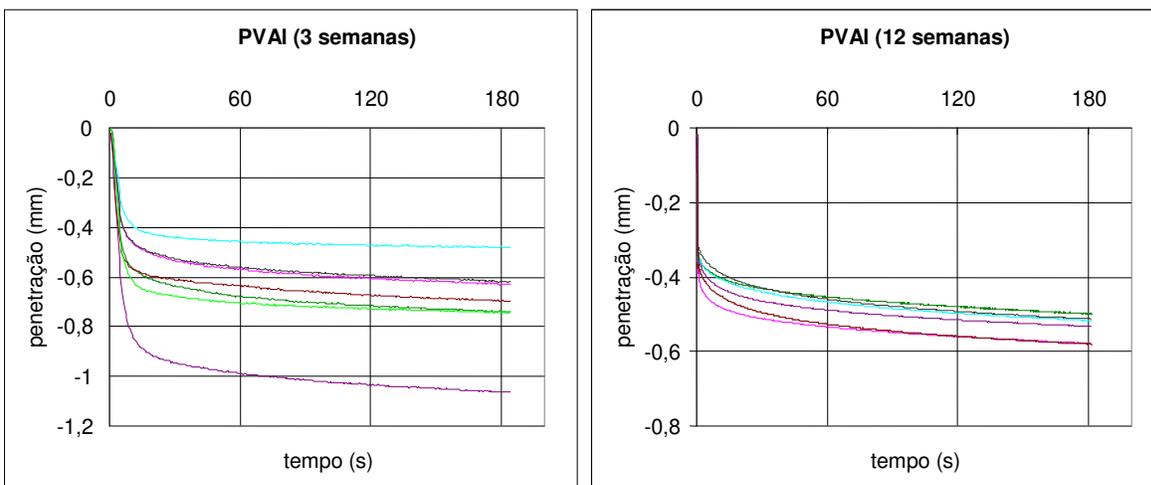


**Figura 40:** Imagens de microscopia óptica: A) PVAI, B) PVAI-NPT, C) PVAI-NPF e D) GC (defeito vazio) após 12 semanas de seguimento. De A1 a C1 aumento de 50x. De A2 a C2 aumento de 100x. Coloração TM.

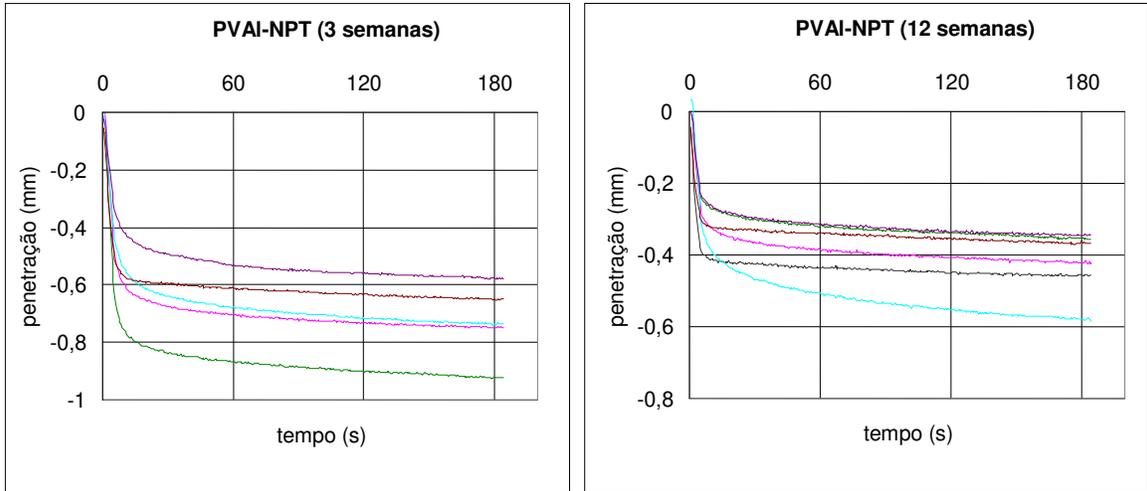
### 5.11 Ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI)

A partir do EMFI foram obtidas curvas de penetração do indentador em função do tempo de aplicação da força. Essas curvas podem ser observadas nas figuras 41, 42 e 43. Com base no valor da penetração do indentador após 180 segundos de aplicação da carga calculou-se, de acordo com a Equação 1 (descrita em materiais e métodos) o módulo de fluência à indentação para cada amostra testada. A tabela 6 apresenta os valores de penetração do indentador em 180 segundos e os valores médios para cada tipo de amostra e tempo de seguimento, enquanto que a tabela 7 apresenta os valores dos módulos de fluência à indentação calculados para cada amostra, bem como os valores médios para cada tipo de amostra e tempo de seguimento.

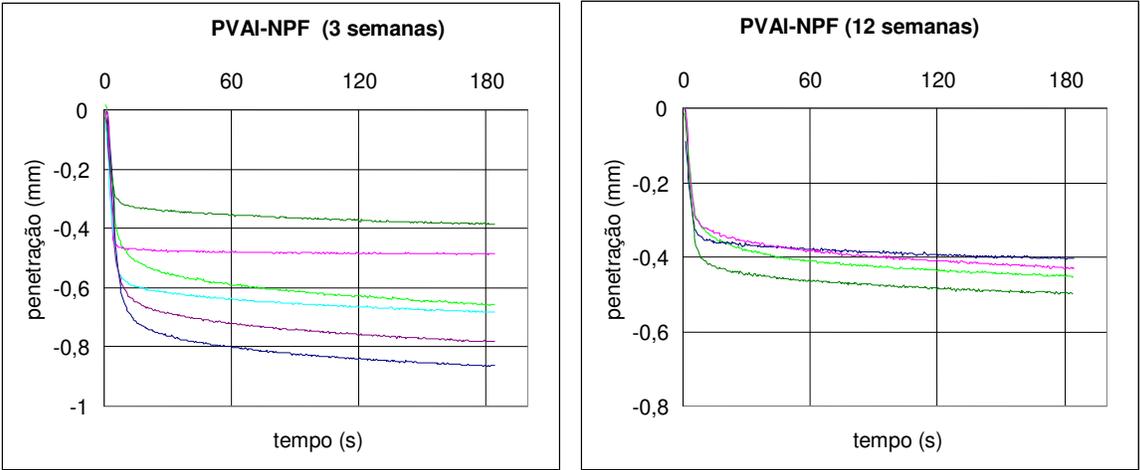
As figuras 44 e 45 apresentam graficamente os valores médios da penetração do indentador e do módulo de fluência, respectivamente, em função do tipo de implante e do tempo de seguimento.



**Figura 41:** Ensaio mecânico de fluência a indentação: curva de penetração em função do tempo de ensaio para a amostra de PVAI com tempo de seguimento de 3 e 12 semanas.



**Figura 42:** Ensaio mecânico de fluência a indentação: curva de penetração em função do tempo de ensaio para a amostra de PVAI-NPT com tempo de seguimento de 3 e 12 semanas.



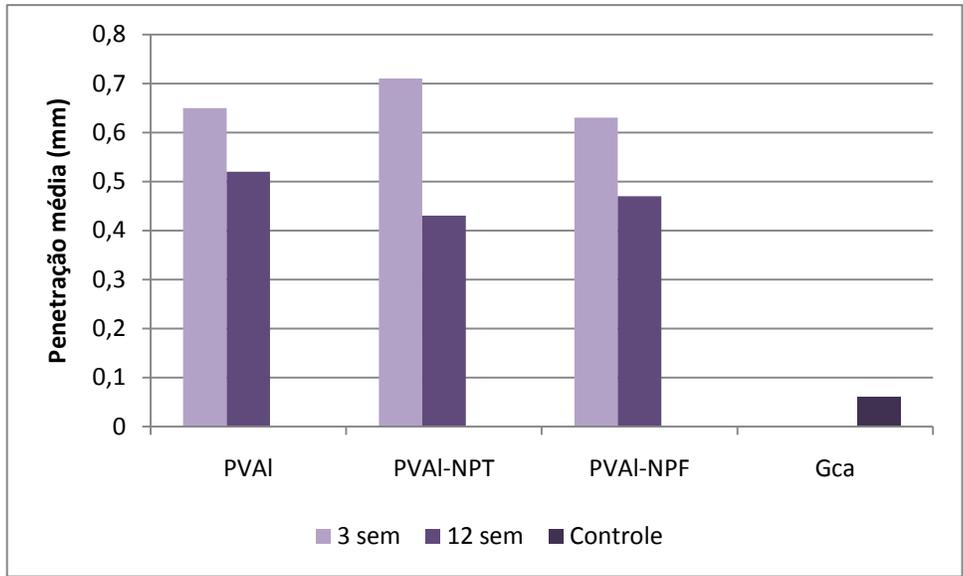
**Figura 43:** Ensaio mecânico de fluência a indentação: curva de penetração em função do tempo de ensaio para a amostra de PVAI-NPF com tempo de seguimento de 3 e 12 semanas.

**Tabela 6:** Penetração do indentador após 180 segundos para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após período de seguimento de 3 e 12 semanas.

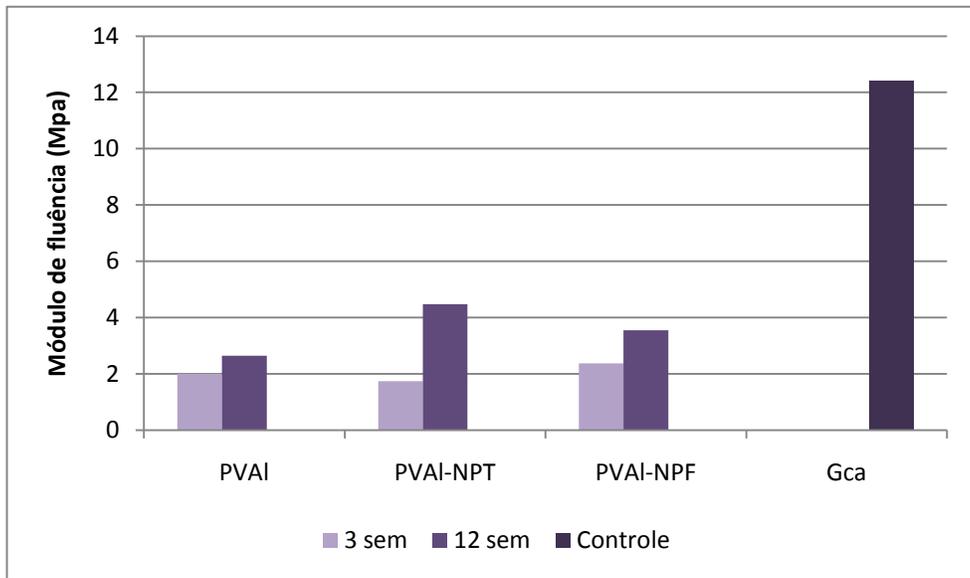
Penetração do indentador (mm)						
Implante	PVAI		PVAI-NPT		PVAI-NPF	
Tempo de seguimento	3 sem	12 sem	3 sem	12 sem	3 sem	12 sem
Amostras	0,073	0,049	0,922	0,355	0,657	0,451
	0,062	0,057	0,748	0,421	0,864	0,403
	0,061	0,051	0,649	0,457	0,486	0,428
	0,047	0,051	0,736	0,579	0,385	0,497
	0,069	0,053	0,576	0,346	0,682	0,412
	0,074	0,058	0,650	0,367	0,782	0,588
Média	0,064	0,053	0,714	0,421	0,643	0,463
Desvio padrão	0,010	0,003	0,120	0,089	0,180	0,070

**Tabela 7:** Módulo de fluência a indentação para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após período de implante de 3 e 12 semanas.

Material	E (kgf/m <sup>2</sup> )		Desvio padrão	
	3 semanas	12 semanas	3 semanas	12 semanas
PVAI	1,9.10 <sup>5</sup>	2,6.10 <sup>5</sup>	0,6. 10 <sup>5</sup>	0,3.10 <sup>5</sup>
PVAI-NPT	1,7.10 <sup>5</sup>	4,5.10 <sup>5</sup>	0,4.10 <sup>5</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>
PVAI-NPF	2,4.10 <sup>5</sup>	3,6.10 <sup>5</sup>	1,3.10 <sup>5</sup>	0,8.10 <sup>5</sup>



**Figura 44:** Gráfico de penetração média em função do tempo de seguimento para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 3 e 12 semanas de implante e cartilagem articular normal (GCa).



**Figura 45:** Gráfico do módulo médio de fluência à indentação em função do tempo de seguimento para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 3 e 12 semanas de implante e cartilagem articular normal (GCa).

### **5.12 Espectrometria de fluorescência de raios X (EFRX)**

Por meio da EFRX foi possível quantificar as concentrações médias de Ca presente nas amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 3 e 12 semanas de seguimento e foram comparados estes valores com o grupo controle (sem implantação). Foi também identificada a presença de Fósforo (P) e Enxofre (S) nas amostras.

As tabelas 8, 9 e 10 apresentam os valores de Ca, P e S obtidos para cada amostra, juntamente com a média e o desvio padrão para cada período de seguimento, para o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF, respectivamente. As figuras 46, 47 e 48 apresentam graficamente os valores médios dos teores de Ca, P e S respectivamente, segundo o tempo de seguimento e o tipo de implante.

**Tabela 8:** Teores dos elementos Ca, P e S obtidos para cada amostra de PVAI, com as respectivas médias e desvios padrão por tempo de seguimento.

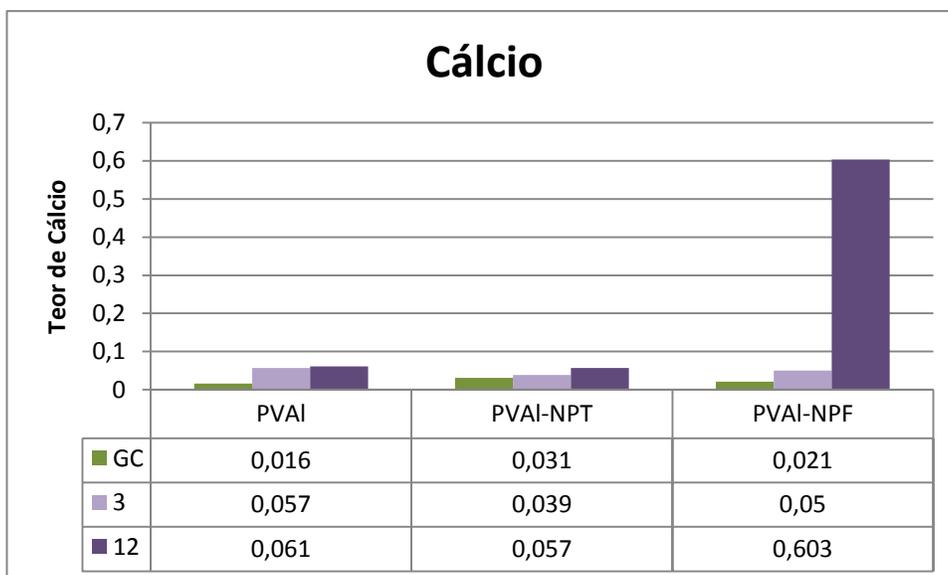
<b>Tempo de seguimento</b>	<b>Elemento</b>	<b>%Ca</b>	<b>%P</b>	<b>%S</b>
Grupo Controle (sem implantação)		0,016	0,03	0,043
	Amostras	0,016	0,027	0,03
		0,018	0,027	0,055
	Média	0,016	0,028	0,040
	Desv. pad.	0,001	0,001	0,012
3 semanas		0,127	0,092	0,046
	Amostras	0,031	0,04	0,053
		0,014	0,026	0,053
	Média	0,057	0,053	0,051
	Desv. pad.	0,060	0,034	0,004
12 semanas		0,015	0,027	0,045
	Amostras	0,1	0,088	0,055
		0,068	0,048	0,034
	Média	0,061	0,054	0,045
	Desv. pad.	0,043	0,031	0,011

**Tabela 9:** Teores dos elementos Ca, P e S obtidos para cada amostra de PVAI-NPT, com as respectivas médias e desvios padrão por tempo de seguimento.

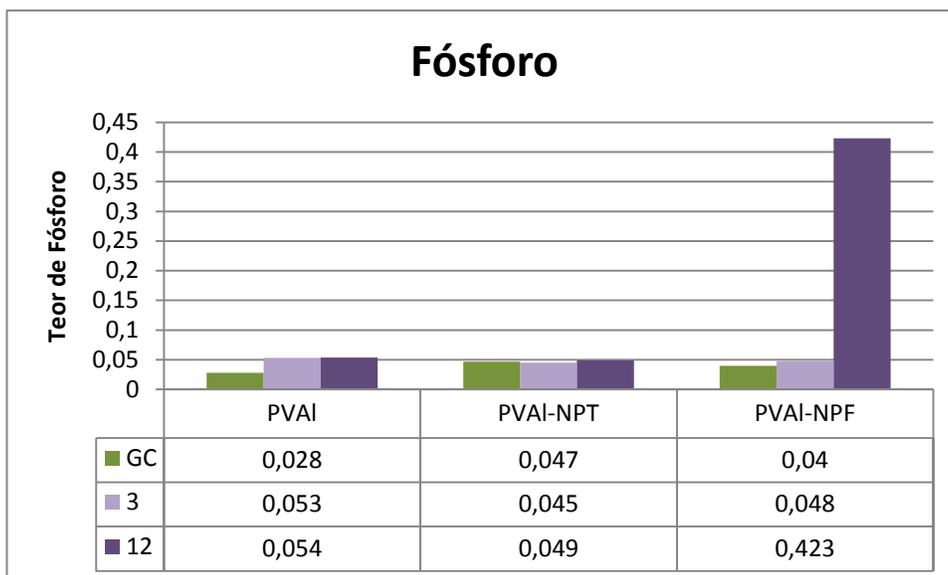
<b>Tempo de seguimento</b>	<b>Elemento</b>	<b>%Ca</b>	<b>%P</b>	<b>%S</b>
Grupo Controle (sem implantação)		0,027	0,075	0,090
	Amostras	0,023	0,027	0,045
		0,042	0,038	0,051
	Média	0,031	0,047	0,062
	Desv. pad.	0,010	0,025	0,024
3 semanas		0,033	0,040	0,048
	Amostras	0,058	0,058	0,071
		0,026	0,037	0,035
	Média	0,039	0,045	0,051
	Desv. pad.	0,017	0,011	0,018
12 semanas		0,025	0,030	0,040
	Amostras	0,130	0,089	0,035
		0,015	0,028	0,040
	Média	0,057	0,049	0,038
	Desv. pad.	0,064	0,035	0,029

**Tabela 10:** Teores dos elementos Ca, P e S obtidos para cada amostra de PVAI-NPF, com as respectivas médias e desvios padrão por tempo de seguimento.

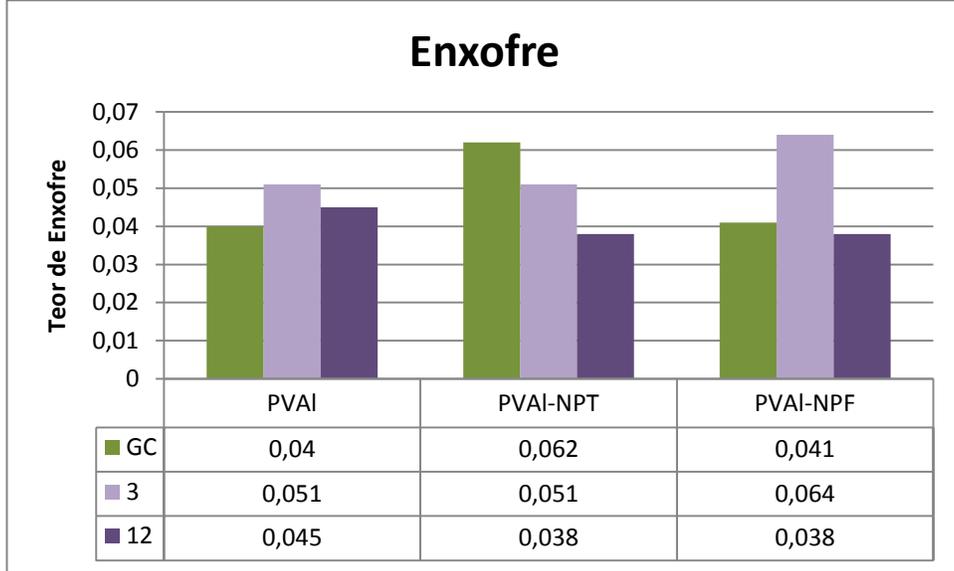
<b>Tempo de seguimento</b>	<b>Elemento</b>	<b>%Ca</b>	<b>%P</b>	<b>%S</b>
Grupo Controle (sem implantação)		0,020	0,042	0,038
	Amostras	0,017	0,027	0,026
		0,026	0,050	0,060
	Média	0,021	0,040	0,041
	Desv. pad.	0,005	0,012	0,017
3 semanas		0,048	0,039	0,077
	Amostras	0,025	0,025	0,045
		0,076	0,079	0,069
	Média	0,050	0,048	0,064
	Desv. pad.	0,026	0,028	0,017
12 semanas		0,640	0,500	0,040
	Amostras	0,780	0,580	0,035
		0,390	0,190	0,040
	Média	0,603	0,423	0,038
	Desv. pad.	0,198	0,206	0,029



**Figura 46:** Gráfico do teor médio de cálcio para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF dos grupos controle (GC: amostras não implantadas), 3 e 12 semanas de implante.



**Figura 47:** Gráfico do teor médio de fósforo para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF dos grupos controle (GC: amostras não implantadas), 3 e 12 semanas de implante.



**Figura 48:** Gráfico do teor médio de enxofre para as amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF dos grupos controle (GC: amostras não implantadas), 3 e 12 semanas de implante.

## **6. Discussão**

## 6.1 Caracterização das nanopartículas de carbono (Raman, FESEM e HRTEM)

Atualmente, a espectroscopia Raman, FESEM e HRTEM são as principais ferramentas indicadas para caracterização da composição e morfologia dos materiais carbonosos grafíticos sintetizados pelos diferentes métodos disponíveis [58-60]. A espectroscopia Raman fornece informações sobre os parâmetros estruturais por meio de espectros que identificam a dispersão da luz espalhada sobre as moléculas do material [58, 59]. Já as imagens de FESEM e HRTEM são indicadas para se obter informações estruturais tais como: aspecto superficial, número de paredes, diâmetro interno e diâmetro externo [60].

Neste estudo as amostras de NPT e NPF foram caracterizadas por Espectroscopia Raman, FESEM e HRTEM. O espectro Raman obtido para as amostras de NPT apresentou picos em  $1341\text{ cm}^{-1}$ ,  $1598\text{ cm}^{-1}$ ,  $1145\text{ cm}^{-1}$ ,  $2679\text{ cm}^{-1}$ ,  $2937\text{ cm}^{-1}$  e o espectro obtido para a amostra de NPF apresentou picos em  $1348\text{ cm}^{-1}$ ,  $1582\text{ cm}^{-1}$ ,  $2690\text{ cm}^{-1}$  e  $2910\text{ cm}^{-1}$ . Autores descrevem na literatura que os espectros Raman de todos os materiais carbonosos exibem picos típicos nas regiões de  $1000\text{ cm}^{-1}$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  [59, 60, 86-88]. Os espectros obtidos das amostras de NPT e NPF apresentaram picos característicos nas regiões de  $1000\text{ cm}^{-1}$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$  e estão de acordo com o comportamento dos espectros de materiais carbonosos descritos por estes autores [59, 60, 86-88]. Os picos menos intensos presentes nos espectros tanto das amostras de NPT quanto das amostras de NPF refletem a morfologia superficial tubular das amostras [87]. Neste sentido, as imagens de FESEM obtidas para as NPT e NPF confirmaram o aspecto tubular externo de ambas as amostras. As imagens de HRTEM das amostras de NPT indicaram a presença de traços paralelos e longitudinais que correspondem às paredes múltiplas do nanotubo que compõem esta

amostra. Já as imagens das amostras de NPF evidenciaram a forma de um tubo compacto. Os resultados apresentados pela HRTEM caracterizaram morfológicamente as amostras de NPT e NPF, identificando-as como nanotubos e nanofibras de carbono, respectivamente. Devido a estas diferenças estruturais evidenciadas pela HRTEM as amostras utilizadas neste estudo foram denominadas como nanopartículas compostas por carbono, ao invés de NTs. Analisados em conjunto, os resultados obtidos por meio da espectroscopia Raman, FESEM e HRTEM para as amostras de NPT e NPF estão de acordo com os aspectos estruturais e morfológicas dos NTs e/ou materiais carbonosos grafíticos descritos na literatura [56, 57, 59, 60, 86-88].

## **6.2 Avaliação da citotoxicidade indireta: ensaio de viabilidade pelo método do MTT e incorporação do vermelho neutro**

Os testes *in vitro* têm sido propostos como uma avaliação rápida dos biomateriais usados como implantes. Estes testes representam a fase que antecede os ensaios *in vivo* fazendo a pré-seleção de novos materiais a serem utilizados em animais de experimentação [72-75]. No presente estudo os ensaios de citotoxicidade celular mostraram que não houve toxicidade das amostras frente às células Vero e MSC/MO. Ambos os ensaios de citotoxicidade adotados, MTT e vermelho neutro, não indicaram interferência dos materiais no crescimento e viabilidade das células estudadas. Foi adotado o teste estatístico *One Way Anova*, com nível de significância 0,05. De acordo com a análise estatística verificamos que os dois tipos celulares não apresentaram variações significativas após contato com o extrato dos materiais apresentando resultado estatisticamente semelhante ao CNT. Estes resultados

indicam que os materiais não liberaram substâncias tóxicas nocivas ao crescimento e viabilidade celular, podendo ser considerados materiais não tóxicos. Nossos achados vão de encontro com os descritos por diferentes grupos que avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de NTs e de hidrogéis associado a NTs frente a cultura de células de osteoblastos, fibroblastos e condrócitos. [89-93].

BHATTACHARYA et al [89] avaliaram os efeitos de partículas de NTs em cultura de células de osteoblastos fetal humano (do inglês: *human fetal osteoblastic cells*, hFOB). Foi utilizado como controle disco de titânio comercial com 22 mm de diâmetro. Segundo os autores a viabilidade e proliferação obtida pelas células cultivadas com os NTs foi semelhante a viabilidade obtida pelas células cultivadas com o material controle. Os autores concluíram que os NTs apresentam comportamento semelhante ao titânio e podem ser considerados materiais promissores para reparo de tecidos ósseos e substratos para engenharia tecidual. Outros pesquisadores demonstraram alta proliferação de células hFOB cultivadas sobre NTs, particularmente SWNT [90-92].

CHEN et al [93] avaliaram os efeitos de hidrogéis a base de PVAI, polietileno glicol (PEG) e alginato em cultura de células de fibroblastos e condrócitos. Foram produzidos 4 diferentes hidrogéis com as seguintes composições: (1) PVAI 10%, (2) PVAI 10% e PEG 2%, (3) PVAI 5%, alginato 3% e PEG 1% e (4) PVAI 5%, alginato 3% e PEG 1% e NTs (0,01mg/ml). Os resultados indicaram um aumento da adesão e viabilidade celular dos fibroblastos e condrócitos em contato com o compósito composto por PVAI e NTs (4), o mesmo comportamento não foi observado nas células cultivadas com hidrogéis sem adição de NTs. Os autores atribuem este resultado diferenciado à presença de NTs. Segundo os autores, os NTs podem aumentar a energia de superfície dos compósitos de hidrogel e desta

forma promover a adesão e viabilidade, os autores afirmam que este tipo de arcabouço poderá ser utilizado como reparo de cartilagem e estimular a diferenciação condrogênica.

### **6.3 Análise citoquímica**

A partir da análise citoquímica não foram observadas variações nas células Vero e MSC/MO que cresceram por 24 horas em contato com o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF. De maneira geral, foram observadas células com basofilia intensa, com núcleos ligeiramente metacromáticos e nucléolos evidentes, indicando atividade celular [77]. A identificação de células metabolicamente ativas evidenciada pela coloração de AT esta de acordo com dados obtidos por estudos prévios sobre diferentes polímeros [94, 95]. Estes resultados indicam que os materiais não interferiram no processo de espalhamento e viabilidade celular confirmando os resultados obtidos pelos ensaios de viabilidade celular pelo MTT e vermelho neutro.

### **6.4 Investigação da morfologia das células Vero e mesenquimais derivadas da medula óssea (MSC/MO) por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia das células Vero e MSC/MO cultivadas sobre o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF foram avaliadas por MEV. As células Vero não apresentaram alterações morfológicas indicando que os materiais permitiram a adesão e espalhamento celular sobre sua superfície. Da mesma forma, as MSC/MO apresentaram padrão morfológico típico com células estreladas e bem espalhadas. Em contrapartida, quando comparadas às células Vero, as MSC/MO foram observadas em pequenas quantidades sobre os materiais, sendo este

resultado já esperado, pois estas células apresentam uma cinética de adesão e divisão celular mais lenta quando comparadas às células Vero [11-14, 96]. A manutenção do padrão morfológico e espalhamento celular das células Vero e MSC/MO indicam que os materiais não interferiram nas fases iniciais de ancoragem celular bem como nas etapas subsequentes e podem ser considerados substratos adequados para engenharia tecidual.

### **6.5 Análise da diferenciação osteogênica: atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e vermelho de alizarina S (ARS)**

Para comprovar o isolamento e potencial de diferenciação osteogênica das MSC/MO foram adotados critérios recomendados pela Associação Internacional de Terapia Celular. De acordo com normas internacionais a identificação das MSC/MO não está baseada somente em suas características morfológicas ou fenotípicas, mas também na sua capacidade em se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

Para isto as MSC/MO foram induzidas a diferenciação osteogênica mediante protocolo específico [78]. Após 21 dias de indução foram dosadas a concentração da ALP e a formação de nódulos mineralizados por meio da impregnação do ARS. Os resultados obtidos indicaram atividade da enzima ALP e a presença de nódulos mineralizados confirmando a diferenciação osteogênica. A deposição da matriz orgânica mineralizada foi identificada pela impregnação do corante vermelho de alizarina e foram obtidos a partir da extração colorimétrica os valores médios da matriz mineralizada. Estes resultados comprovam que nenhuma das amostras interferiu no potencial de diferenciação osteogênica já que não foram identificados pela quantificação da ALP e extração da coloração de vermelho de alizarina alterações significativas entre as amostras.

A ALP é utilizada como marcador da diferenciação osteogênica e vem sendo usada por muitos grupos com tal finalidade [97-99]. Já a coloração de ARS vem sendo amplamente adotada para identificar o produto da diferenciação osteogênica, a matriz mineralizada [99-103] e também para quantificar a deposição de nódulos inorgânicos pela análise da extração colorimétrica descrita por GREGORY et al [79]. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com relatos descritos na literatura [97-106].

CHEN et al. [104] analisaram células germinativas dentárias obtidas de ratos neonatos cultivadas em contato com o PVAI e constataram a síntese da enzima fosfatase alcalina, além da presença de nodulos de mineralização. TAY et al. [105] constataram que nanotubos de carbono influenciaram positivamente a adesão e diferenciação de MSCs. Segundo estes autores, os nanotubos de carbono modularam o crescimento e diferenciação das MSCs devido a maior taxa de adesão e espalhamento celular. PEÑALVER et al. [106] confirmaram que filmes de nanotubos de carbono incitaram maior taxa de adesão de células MSCs e não interferiram no processo de diferenciação osteogênica.

## **6.6 Quantificação das nanopartículas de carbono por citometria de fluxo**

Muitos estudos têm reportado os efeitos dos NTs sobre as funções de diferentes tipos celulares [89-93, 104-106]. Apesar das inúmeras publicações, poucos pesquisadores têm esclarecido os mecanismos de internalização dos NTs pelas células [107-108]. A análise por citometria de fluxo é uma ferramenta amplamente utilizada para se determinar alterações ou manutenção de uma população celular [109-110]. Desta forma, a análise por citometria de fluxo permitiu verificar se os NTs foram internalizados e se alteraram e/ou

estimularam a população das células Vero e MSC/MO após 24 horas de cultivo *in vitro*. A internalização média obtida de NPT-PKH26 e NPF-PKH26 (entre parênteses) foi de: 43,94% (67,78%) na suspensão de células Vero e 43,63% (40,60%) na suspensão de MSC/MO. Os resultados evidenciaram uma maior internalização de células Vero cultivadas com o NPF-PKH26. Já as células Vero cultivadas com o NPT-PKH26 e MSC cultivadas com o NPT-PKH26 e NPF-PKH26 não apresentaram variações significativas.

### **6.7 Avaliação macroscópica por estereomicroscópio e microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As análises por estereomicroscópio e MEV permitiram avaliar: a superfície dos materiais no local do defeito, o aspecto dos tecidos adjacentes e aspecto superficial das patelas após 3 e 12 semanas de implante. As patelas foram selecionadas para esta avaliação devido a sua função biomecânica, que permite o movimento articular, e sua proximidade com a superfície dos implantes [33]. O movimento constante da patela durante a marcha e seu íntimo contato com a superfície dos implantes poderia resultar em desgaste ou abrasão do tecido patelar. De acordo com as imagens obtidas por estereomicroscópio e MEV não foram observados nos tecidos adjacentes, superfície dos materiais e patelas sinais de desgaste, abrasão ou adesão de tecidos sobre os materiais. Nos GC (defeito vazio) não foram observadas alterações nos tecidos adjacentes ao defeito ou processo abrasivo na superfície das patelas após 3 e 12 semanas.

Os resultados apresentados indicam que os materiais não sofreram desgaste ou abrasão e não foram observados sinais de aderências teciduais sobre os materiais. A

ausência de adesão tecidual pode ser justificada com base em estudos prévios [111,112]. Segundo SAILAJA et al [111] a natureza hidrofílica do PVAI pode estar associada a baixa adesão e crescimento celular sobre a superfície destes materiais. Neste estudo amostras de PVAI foram cultivadas em culturas de células *in vitro* e foi constatada a baixa adesão celular sobre as amostras, confirmando a baixa afinidade das células com a superfície do PVAI. De acordo com estes resultados os autores sugerem que este comportamento torne o PVAI um material adequado para aplicações onde aderências não são desejadas. Neste sentido, OLIVEIRA [113] avaliou em sua pesquisa o uso de membranas de PVAI para reconstrução do pericárdio de ratos Wistar W- H. De acordo com os resultados obtidos pelo autor, as membranas de PVAI se comportaram de maneira adequada ao local de aplicação não sendo observados sinais de aderência.

## **6.8 Microscopia óptica (MO)**

Pela MO notou-se na região interface implante-osso após 3 semanas de seguimento a presença de tecido conjuntivo denso nos grupos com PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF implantados. Após 12 semanas de seguimento foi observada a presença de tecido ósseo neoformado na região de interface de todos os grupos. No grupo com PVAI foram observados além da formação de tecido ósseo, resquílios de tecido conjuntivo denso, sendo que a permanência deste tecido não foi observada nos grupos com PVAI-N1 e PVAI-NPF com o mesmo tempo de seguimento. Curiosamente, notamos nas lâminas com 12 semanas de seguimento, a permanência dos implantes de PVAI-NPT e PVAI-NPF no local do defeito. Nestes grupos, todos os materiais mantiveram-se no defeito ósseo após o

processamento histológico e corte em micrótomo. O mesmo não foi observado em nenhuma das amostras de PVAI com mesmo período de seguimento. O comportamento diferenciado do PVAI-NPT e PVAI-NPF sugere que estes materiais ofereceram, de certa forma, uma superfície propícia às interações celulares na região de interface, interagindo de forma mais intensa com a região implante-osso. A partir deste resultado podemos indicar um padrão de comportamento diferenciado dos hidrogéis de PVAI quando associados a NPT e NPF.

Conforme citado anteriormente [111-113], os hidrogéis à base de PVAI, apesar de biocompatíveis, não estimulam o crescimento celular devido à alta concentração de água em sua composição. Devido a esta característica inúmeros estudos têm sido reportados ao longo dos anos para tornar a superfície do PVAI mais propícia ao crescimento celular [29-32, 67, 68, 93, 114-116]. Estes estudos sugerem a utilização de diferentes métodos para alterar as propriedades de superfície dos materiais e, dentre os métodos citados, destaca-se o uso de NTs para se obter uma superfície mais adequada [93, 116]. SANGRAM et al [116] avaliaram matrizes poliméricas de PVAI reforçadas com NTs. Os autores caracterizaram as amostras térmica e morfologicamente e, mediante as análises adotadas, observaram uma melhora no desempenho dos materiais com NTs. Segundo os autores, estes resultados indicam que os NTs, quando adicionadas ao PVAI, produzem materiais com melhor condutividade térmica, mecânica e elétrica. Os autores sugerem ainda que estas alterações influenciam positivamente o crescimento celular e tornam os NTs materiais indicados para melhorar as propriedades superficiais e podem ser utilizados pela engenharia de tecidos para regeneração de tecidos.

## **6.9 Ensaio mecânico de fluência a indentação (EMFI)**

Empregando-se a técnica do EMFI caracterizou-se o comportamento mecânico das amostras após 3 e 12 semanas de implante [80-81]. Pelos resultados obtidos foi possível observar em todas as amostras o aumento no módulo de fluência após 12 semanas de implante. Em contrapartida, a penetração média diminuiu com o mesmo período de seguimento. O aumento do módulo médio de fluência e a diminuição da média obtida para a penetração observada nos materiais que permaneceram implantados por um período de seguimento de 12 semanas podem estar associados com o adensamento do tecido ósseo no fundo do defeito. A presença de tecido ósseo neoformado evidenciado pela MO após 12 semanas de seguimento pode ter alterado as propriedades mecânicas do fundo do defeito oferecendo, desta forma, um substrato mais consistente aos implantes que resistiram à força aplicada pelo indentador durante o ensaio.

É sabido que, de acordo com a dimensão da lesão, os defeitos osteocondrais podem ser reparados ao longo do tempo [42]. Com base nestas evidências e de acordo com as imagens apresentadas pela MO, podemos sugerir que o aumento do módulo de fluência e diminuição da penetração apresentada pelo EMFI pode ser resultado da deposição de tecido neoformado no fundo do defeito. Neste sentido, o EMFI adotado se mostrou adequado para identificar alterações no módulo de fluência dos materiais alocados no defeito ósseo. De acordo com a literatura, o método mais comumente utilizado para avaliar o comportamento mecânico de materiais e da própria cartilagem articular tem sido o EMFI [80-81].

KEMPSON et al [80] demonstraram com sucesso a eficácia do método de caracterização mecânica por meio do EMFI. Neste estudo os autores padronizaram o ensaio

mecânico, semelhante ao utilizado neste estudo, para determinar o módulo de fluência para a cartilagem articular de fêmur humano.

MALMONGE et al [81] avaliaram em seu estudo as propriedades mecânicas de hidrogéis de poli(2 hidróxi etil metacrilato) (poliHEMA) com aumento na concentração do agente de reticulação. Os autores utilizaram para a determinação do módulo de fluência dos materiais o teste de indentação descrito por KEMPSON et al [80]. Segundo os autores o teste adotado se mostrou eficiente para determinar o módulo de fluência de cada composição e, a partir disto, selecionar amostras com comportamento mecânico semelhante a cartilagem articular.

#### **6.10 Espectroscopia de fluorescência de raios X (EFRX)**

A EFRX foi adotada para identificar e quantificar a presença de cálcio (Ca) nas amostras após diferentes períodos de implante [82-83]. Como os hidrogéis à base de PVAI são porosos, estes permitem a difusão dos líquidos extracelulares em seu interior e podem reter cálcio [65-67, 69, 35]. Para isto, a análise de EFRX foi adotada a fim de verificar a presença de cálcio e/ou uma possível calcificação das mesmas. Os resultados obtidos indicaram um aumento do teor médio de Ca nas amostras de PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF após 12 semanas de implante. Foi observado nas amostras de PVAI-NPF com o mesmo período de seguimento um aumento significativo na concentração média de Ca (Figura 46). Curiosamente, foi identificada nas amostras a presença de S e P. Foi observada uma maior concentração média de P nas amostras de PVAI-NPF com tempo de seguimento de 12 semanas, conforme pode ser observado na figura 47. A figura 48 apresenta uma leve

diminuição dos teores S de todas as amostras com tempo de seguimento igual a 12 semanas. A presença de S e P pode estar associada ao processo de acetalação das amostras onde, possivelmente, resíduos destes elementos permaneceram nas amostras.

De certa forma, os resultados apresentados tanto pelo EMFI quanto pelo EFRX apontam para uma maior concentração de Ca após 12 semanas de seguimento. No caso do EMFI depositado no fundo do defeito e na EFRX absorvidos ao longo do tempo pelos poros presentes nas amostras.

Analisados em conjunto, os resultados apresentados por todas as análises adotadas para avaliar o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF, indicaram que nenhum dos materiais interferiu na viabilidade e morfologia das células Vero, MSC/MO e células induzidas à diferenciação osteogênica. Em todas as condições as células Vero, MSC/MO e células osteogênicas mantiveram sua respectiva morfologia e padrão de crescimento. Nos ensaios *in vivo* após 3 e 12 semanas os materiais mantiveram o mesmo aspecto inicial, sem desgaste por abrasão ou mudança de cor, houve aumento do módulo de fluência ao longo do tempo, justificado pela deposição do tecido ósseo no fundo do defeito.



## **7. Conclusões**

Com os ensaios *in vitro* e *in vivo* concluímos que:

- nenhum dos materiais interferiram na viabilidade, espalhamento, morfologia celular, bem como na indução da diferenciação osteogênica das MSC/MO;
- MSC/MO induzidas a diferenciação osteogênica em contato com PVAI-NPT e PVAI-NPF apresentaram maior atividade da ALP e impregnação do corante ARS quando comparadas ao PVAI;

Com os ensaios *in vivo* concluímos que:

- os materiais mantiveram o mesmo aspecto inicial, sem deslocamento do implante, desgaste por abrasão ou mudança de cor após 3 e 12 semanas de seguimento;
- houve deposição de tecido ósseo neoformado no fundo do defeito frente as todas amostras após 12 semanas de seguimento;
- o PVAI-NPT e PVAI-NPF interagiram de forma mais intensa com o local de implante permanecendo no defeito ósseo após etapas da MO;
- houve maior migração de Ca para as amostras de PVAI-NPF e aumento do módulo de fluência para todas as amostras devido a deposição de tecido ósseo no fundo do defeito após 12 semanas.

Podemos concluir que os hidrogéis com nanopartículas de carbono apresentaram melhor resultados quando comparados ao PVA puro, tornando-os promissores como substitutos da cartilagem articular.

## **8. Sugestões para trabalhos futuros**

Demonstramos através dos ensaios adotados neste estudo as interações das nanopartículas de carbono associadas ao hidrogel a base de PVAI em contato com células Vero e MSC/MO e implantados em defeitos osteocondrais de ratos da linhagem Wistar W-H. Frente aos ensaios *in vitro* e *in vivo* os materiais foram caracterizados como compatíveis, pois apresentaram ótima interação frente aos dois tipos celulares e tecidos associados aos implantes.

Devido aos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* sugerimos para trabalhos futuros o desenvolvimento de análises para verificar o comportamento do PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF frente a cultura de células de osteoblastos. Quanto ao estudo dos materiais frente a células mesenquimais, sugerimos a indução da diferenciação condrogênica já que estas células se encontram presentes abundantemente no local de implante. Estas análises permitirão avaliar o efeito das nanopartículas de carbono, utilizadas como reforço do hidrogel a base de PVAI, sobre o potencial de diferenciação condrogênica, sendo este dado de fundamental importância para se determinar o uso destes materiais para reparo e preenchimento da cartilagem articular.

Diante dos resultados obtidos por meio do ensaio *in vivo* propomos o desenvolvimento de estudos que avaliem o atrito e desgaste do PVAI-NPT e PVAI-NPF ao longo do tempo. Os valores de atrito e a quantificação do desgaste dos materiais podem ser obtidos por meio de ensaios tribológicos que simulam o contato do par-tribológico, ou seja, de duas superfícies distintas. Esta análise tem como função reproduzir as condições do local de implante, tais como regiões de contato e fluidos corpóreos, a fim de caracterizar o comportamento dos materiais ao atrito e desgaste a que estarão sujeitos ao longo do período de implante.

Outra análise que se faz necessária é a avaliação *in vivo* dos materiais como arcabouço para cultura de células mesenquimais. Neste caso, os materiais serão utilizados como substrato para adesão e crescimento de células mesenquimais indiferenciadas para posterior implantação *in vivo*. Em nosso estudo foram avaliadas apenas as interações das MSC/MO sobre o PVAI, PVAI-NPT e PVAI-NPF *in vitro*.

Gostaria que estas sugestões para trabalhos futuros estimulassem outros pesquisadores a se dedicarem ao desenvolvimento de estudos voltados a esta área, mas não poderia deixar de agradecer aqui aos pesquisadores e professores que me auxiliaram a chegar até estes resultados.



## **9. Referências Bibliográficas**

- [1] Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr Cartil* (10): 432-463, 2002.
- [2] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* (79A): 612-632, 1997.
- [3] Messner K, Gillquist J. Cartilage repair. A critical review. *Acta Orthop Scand* (67): 532-539, 1996.
- [4] Hunziker EB. Articular cartilage repair: are intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cart* (7): 15-28, 1999.
- [5] Chen F, Frenkel S, Di CP. Repair of articular cartilage defects: part II. Treatment options. *Am J Orthop* (28): 88-96, 1999.
- [6] Baumgaertner MR, Cannon WD, Vittori JM, Schmidt ES, Maurer RC. Arthroscopic debridement of the arthritic knee. *Clin Orthop* (253): 197-202, 1990.
- [7] Bayne O, Langer F, Pritzker KP, Gross AE. Osteochondral allografts in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Orthop Clin North Amer* (16): 727-740, 1985.
- [8] Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic defects in the knee. A survivorship analysis. *J Bone and Joint Surg* (74B): 105-110, 1992.
- [9] Temmenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* (21): 423-440, 2000.
- [10] Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD. Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop Related Res* (379) S214-219, 2000.
- [11] Guillot P, Cui W, Fisk NM. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications and tissue engineering. *J Cell Mol Med* (5): 935-944, 2007.

- [12] Chamberlain G, Fox J, Aston B. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* (25): 2739-2749, 2007.
- [13] Chiu RC. Bone marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail Rev* (8): 247-251, 2003.
- [14] Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther* (15): 109-16, 2008.
- [15] Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biom Engineering* (32): 136-147, 2004.
- [16] Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Dev* (17): 909-916, 2008.
- [17] Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(L-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res* (36): 1-8, 1997.
- [18] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* (21): 2529-2543, 2000.
- [19] Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* (17): 205-213, 1999.
- [20] Thomas RC, Wake MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv Polym Sci* (122): 245-274, 1995.

- [21] Butnariu-Epharat M, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clin Orthop Rel Res* (330): 234-243, 1996.
- [22] Iijima S. Helical microtubes of graphitic carbon. *Nature* 1991; 354: 56 -58.
- [23] Li WZ, Xie SS, Qian LX, Chang BH, Zou BS, Wang G. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Science* (274): 1701-1703, 1996.
- [24] Sinnott SB, Andrews R. Carbon Nanotubes: synthesis, properties and applications. *Crit Rev Solid State Mater Sci* (26): 145-249, 2001.
- [25] Dai H. Carbon nanotubes: opportunities and challenges. *Surface Sci* (500): 218-241, 2002.
- [26] Kong J, Cassel AM, Dai H. Chemical vapor deposition of methane for single-walled carbon nanotubes. *Chem Phys Lett* (292): 567-574, 1998.
- [27] Mater R, Schmidt T, Shea HR, Hertel T. Single and multi-wall carbon nanotubes field-effect transistors. *Applied Phys Letters* (73): 2447-2449, 1998.
- [28] Makar J, Margeson J, Luh J. Carbon nanotube/cement composites - early results and potential applications. *National Res Council* (22): 1-10, 2005.
- [29] Koerner H, Price G, Pearce NA, Alexandre M, Vaia RA. Remotely actuated polymer nanocomposites-stress-recovery of carbon nanotube filled thermoplastic elastomers. *Nature Mater* (3): 115-120, 2004.
- [30] Sen R, Zhao B, Perea D. Preparation of single-walled carbon nanotube reinforced polystyrene and polyurethane nano-fibers and membranes by electrospinning. *Nano Lett* (4): 459-464, 2004.
- [31] Bodugoz H, Pekel N, Guven O. Preparation of poly (vinyl alcohol) hydrogels with radiation grafted citric and succinic acid groups. *Rad Phys Chem* (55): 667-671, 1999.

- [32] Krumova M, Lopes D, Benavente R, Mijangos C, Perena JM. Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly (viny alcohol). *Polymer* (41): 9265-9272, 2000.
- [33] Guyton AC, Hall JE, Tratado de fisiologia Medica. 9<sup>o</sup>ed Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan, 1997.
- [34] Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the cell*. Second edition, Garland Publishing, New York & Lonmdon, 1994.
- [35] Junqueira LC, Carneiro J. Tecidos Conjuntivos e Cartilagosos. In: *Histologia Básica*, p.46-87 e p.94-100, 1990.
- [36] Linsenmayer TF. Collagen. In: HAY, E.D. (ed) *Cell biology of Extracellular Matrix* Plenum Press, NY, 1983.
- [37] Yang C, Hillas PJ, Báez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, Spiro R, Polarek JW. The application of recombinant human collagen in Tissue Engineering. *Biodrugs* (18): 103-119, 2004.
- [38] Angel MJ, Razzano P, Grande DA. Defining the challenge. The basic science of articular cartilage repair and response of injury. *Sports Med Arthro* (11): 168-181, 2003.
- [39] Schott PCM, Gameiro VC. Fraturas e lesões epifisárias. *Ortopedia e Traumatologia Principios e Prática*, Porto Alegre ArtMed Editora 2<sup>o</sup> Ed: 896-899, 2003.
- [40] Ghandially FN. Fine structure of sinovial joint. Butterworth 80-102, 1983.
- [41] Houck JC. Chemistry of inflammation. *Ann NY Acad Sci* (105): 765-812, 1963.
- [42] D'Lima DD, Colwell CW. Clinical objects for cartilage repair. *Clin Orthop Related Res* (391S): 402-405, 2001.

- [43] Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone and Joint Surgery* 43B (4):752-757, 1961.
- [44] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human bone marrow. *Bone* (13): 81-88, 1992.
- [45] Mark DE, Hollinger JO, Hastings CJr, Chen G, Marden LJ, Reddi AH. Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone inductive protein. *Plast. Reconstr. Surg* (86): 623-630, 1990.
- [46] Younger EM, Chapman MN. Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma* (3): 192-195, 1989.
- [47] *Brown MD, Mailinin TI, David PB. A roentgenographic evaluation of frozen allografts versus autografts in anterior cervical spine fusions. Clin Orthop (119): 231-236, 1976.*
- [48] Rish BL, Mcfadden JT, Penix JO. Anterior cervical fusion using homologous bone grafts. A comparative study. *Surg Neurol* (5): 119-121, 1976.
- [49] Kato T, Hattori K, Katsube Y, Matsumoto T, Ohgushi H, Numabe Y. Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament. *J Tissue Eng Regen Med* (12): 2011.
- [50] Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biom Engineering* (32): 136-147, 2004.
- [51] Rao CNR, Satishkumar BC, Govindaraj A, Nath M. Nanotubes. *ChemPhyschem* (2):78-105, 2001.
- [52] Ajayam PM. Nanotubes from carbon. *Chem Rev* (99): 1787-1789, 1999.
- [53] Bianco A, Kostarelos K, Partidos CD, Prato M. Biomedical applications of functionalized carbon nanotubos. *Chem Commun* (5): 571-577, 2005.

- [54] Dresselhaus M, Dresselhaus G, Eklund P, Saito R. Carbon nanotubes. *Phys World* (13): 33-38, 1998.
- [55] Journet C, Bernier P. Production of carbon nanotubes. *Appl Phys A* (67): 1-9, 1998.
- [56] Guo T, Nikolaev P, Thess A, Colbert DT, Smalley RE. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chem Phys Letter* (243):49-54, 1995.
- [57] Andrews R, Jaques D, Qian D, Dickey EC. Purification and structural annealing of carbon nanotubes at graphitization temperatures *Carbon* (39):1681-1690, 2001.
- [58] Foldvari M, Bagonlri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicine: part I. Pharmaceutical properties. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (4): 173-182, 2008.
- [59] Dresselhaus M, Dresselhaus G, Jorio A, Filho AGS, Pimento MA, Saito R. Single nanotube raman spectroscopy. *Acc Chem Res* (35): 1070-1078, 2002.
- [60] Amit KJ, Vaibhav D, Neelesh KM, Neeraj Lodhi, Manoj N. Carbohydrate-conjugated multiwalled carbon nanotubes: development and characterization. *Nanotechnology, Biology and Medicine* (5): 432-442, 2009.
- [61] Martin CR, Kholi P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nature Reviews Drug Discovery* (2): 29-37, 2003.
- [62] Grunlun JC, Mehrabi AR, Bannon MV, Bahr JL. Water-based single-walled-nanotube-filled polymer composite with an exceptionally low percolation threshold. *Advanced Mater* (16): 150-153, 2004.

- [63] Supronowicz PR, Ajayan PM, Ulman KR, Arulanandam BP, Metzger DW, Bizios R. Novel-current conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating. *J Biomed Mater Res (59A)*: 499-506, 2002.
- [64] Haehnel W, Herrmann WO. German Pat 450.286, 1924.
- [65] Peppas NA. Development of semi-crystalline polyvinyl alcohol hydrogels for biomedical applications. *J Biomed Mater Res (11)*: 423-34, 1977.
- [66] Peppas NA, Kormsmeier RW. *Hydrogels in medicine and pharmacology*. Boca Raton: CRC Press; 1987.
- [67] Bichara DA, Xing Z, Hwang NS, Bodugoz-Snturk H, Yaremchuck MJ, Randolph MA, Muratoglu OK. Porous poly(vinyl alcohol)-alginate gel hybrid construct for neocartilage formation using human nasoseptal cells. *J Surg Res (163)*: 331-336, 2010.
- [68] Holloway JL, Lowman A, Palmese GR. Mechanical evaluation of poly(vinyl alcohol)-based fibrous composites as biomaterials for meniscal tissue replacement. *Acta Biomater (12)*: 4716-4724, 2010.
- [69] Bichara DA, Xing Z, Bodugoz-Snturk H, Ballyns FP, Oral E, Bonassar LJ, Gill TJ, Muratoglu OK. Porous Poly(Vinyl Alcohol)-Hydrogel Matrix-Engineered Biosynthetic Cartilage. *Tissue Eng Part A* DOI: 10.1089/tem.tea.2010.0322, 2010.
- [70] Adebisi G, Sotoudeh A, Soleymani M, Shafiee A, Mortazavi P, Aflatoonian MR. A Collagen-Poly(vinyl alcohol) Nanofiber Scaffold for Cartilage Repair. *J Biomater Sci Polym*. DOI: 10.1163/092050610X540503, 2010.

[71] Bavaresco VP. Estudo tribológico de hidrogéis poliméricos para serem utilizados como cartilagem articular artificial. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.

[72] ISO 10993-5 I (E) Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, 1992.

[73] ISO 10993-5 I (E) Biological evaluation of medical devices. Part 1: Evaluation and testing, 1992.

[74] Kirkpatrick CJ. Biological testing of materials and medical devices. A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. Regulatory Affairs (4): 13-32, 1992.

[75] NBR ISSO 10993 - ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Avaliação Biológica de produtos para saúde. Parte 1 Avaliação e Ensaio, 1999.

[76] Mossman TJ. A rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods (65): 55-63, 1983.

[77] Lison L. Histochemie et Cytochemie Animales – Principes et Methodes. Gauthier Villars, Paris, France. 1960.

[78] Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. Exp Hematol 36(9): 1176-1185, 2008.

- [79] Gregory CA, Gun WD, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* (329): 77-84, 2004.
- [80] Kempson GE, Freeman MAR, Swanson SAV. The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head. *J Biomechanics* (4): 239-245, 1971.
- [81] Malmonge SM, Zavaglia CAC. Hidrogéis de PoliHEMA para Reparo de Defeitos da Cartilagem articular. 1 - Síntese e Caracterização Mecânica. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 22-30, 1997.
- [82] Jekkins R, De Vries JL. *Practical X-Ray Spectrometry*, 2<sup>nd</sup> ed., Springer-Verlag: New York, 1970.
- [83] Scooger DA, Holler FJ, Nilman TA. *Princípios da Análise Instrumental*, 5<sup>a</sup> ed., Ed. Bookman: Porto Alegre, 2002.
- [84] Nagata N, Bueno MIMS, Peralta-Zamora PG. Métodos Matemáticos para Correção de Interferências Espectrais e Efeitos Interelementos na Análise Quantitativa por Fluorescência de Raios-X. *Quim Nova* (24) 531- 539, 2001.
- [85] Criss JW, Birks LS. Calculation methods for fluorescent X-ray spectrometry. Empirical coefficients vs. fundamental parameters. *Anal Chem* (40) 1080-1086, 1968.
- [86] Thomsem C, Reich S. Double resonant Raman scattering in graphite. *Physical Review Letters* (85) 5214-5217, 2000.
- [87] Lobo AO, Martin AA, Antunes EF, Trava-Airoldi VJ, Corat EJ. Caracterização de materiais carbonosos por espectroscopia raman. *Rev Bras Aplic Vác* (24) 98-103, 2005.

- [88] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* (354) 56-58, 1991.
- [89] Bhattacharya M, Wutticharoenmongkol-Thitiwongsawet P, Hamamoto DT, Lee D, Cui T, Prasad S, Ahmad M. Bone formation on carbon nanotube composite. *Journal of Biomedical Materials Research A* (96) 75:82, 2011.
- [90] Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett* (6):562–567, 2006.
- [91] Aoki N, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A. Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions. *Dent Mater J* (26):178–185, 2007.
- [92] Li X, Gao H, Uo M, Sato Y, Akasaka T, Feng Q, Cui F, Liu X, Watari F. Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro. *J Biomed Mater Res A* (91):132–139, 2009.
- [93] Chen Y, Bahar Bilgen BS, Pareta RA, Myles AJ, Fenniri, Aaron RK, Webster TJ. Self-Assembled Rosette Nanotube/Hydrogel Composites for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C* (16): 1233-1244, 2010.
- [94] Santos Jr AR, Barbanti SH, Duek EAR, Wada MLF. Analysis of the growth pattern of Vero cells cultured on dense and porous poly(l-lactic acid) scaffolds. *Mater Res* (12): 257-263, 2009.
- [95] Lombello CB, Malmonge SM, Wada MLF. Morphology of fibroblastic cells cultured on poly(HEMA-co-AA) substrates. *Cytobios* (101): 115-122, 2000.
- [96] Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hemat Hemo* (31): 25-35, 2009.
- [97] Calvert JW, Marra KG, Cook L, Kumta PN, Weiss LE. Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow Stromal cells on various polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* (52): 279-284, 2000.

- [98] Meredith JC, Sormana JL, Keselowsky BG, Garcia AG, Tona A, Karim A, Amis EJ. Combinatorial characterization of cell interactions with polymer surfaces. *J Biomed Mater Res (66A)*: 483–490, 2003.
- [99] Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. *In vitro* osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells photoencapsulated in PEG hydrogels. *J Biomed Mater Res (68A)*: 773–782, 2004.
- [100] Petrie C, Tholpady S, Ogle R, Botchwey E. Proliferative capacity and osteogenic potential of novel dura mater stem cells on poly-lactic-co-glycolic acid. *J Biomed Mater Res (85A)*: 61–71, 2008.
- [101] Gough JE, Notingher I, Hench LL. Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. *J Biomed Mater Res (68A)*: 640–650, 2004.
- [102] Fu H, Doll B, McNelis T, Hollinger JO. Osteoblast differentiation in vitro and in vivo promoted by Osterix. *J Biomed Mater Res (83A)*: 770–778, 2007.
- [103] Rousseau M, Boulzaguet H, Biagianti H, Duplat D, Milet C, Lopez E, Be´douet L. Low molecular weight molecules of oyster nacre induce mineralization of the MC3T3-E1 cells. *J Biomed Mater Res (85A)*: 487–497, 2008.
- [104] Chen RS, Chen MH, Young TH. Induction of differentiation and mineralization in rat tooth germ cells on PVA through inhibition of ERK1/2. *Biomaterials (30)*: 541-547, 2009.
- [105] Tay CY, Gu H, Leong WS, Yu H, Li HQ, Heng BC, Tantang H, Loo SCJ, Li LJ, Tan LP. Cellular behavior of human mesenchymal stem cells cultured on single-walled carbon nanotube film. *Carbon (48)*: 1095-1104, 2010.

- [106] Penãlver JL, Linares-Fernández JL, Farías VA, López-Ramón MV, Tassi M, Oliver FJ, Moreno-Castilla C, Almodóvar JMR. Activated carbon cloth as support for mesenchymal stem cell growth and differentiation to osteocytes. *Carbon* (47): 3574-3584, 2009.
- [107] Duggal R, Pasquali M. Dynamics of individual single-walled carbon nanotubes in water by real-time visualization. *Phys Rev Lett* (24): 246104-1, 2006.
- [108] Babak K, Handel MV, Zhang L, Bronokowski MJ, Manohara H. Internalization of MWCNTs by microglia: possible applications in immunotherapy of brain tumors. *NeuroImage* (37): S9-S17, 2007.
- [109] Howard MS. *Practical flow cytometry*. John Willey & Sons Publications Fourth Edition, p. 18, 2003.
- [110] Connor JE, Callaghan RC, Escudero M, Herrera G, Martinez A, Monteiro MD, Montoliu H. The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *Life* 51(4):231-9, 2001.
- [111] Sailaja GS, Sreenivasan K, Yokogawa Y, Kumary TV, Varma HK. Bioinspired mineralization and cell adhesion on surface functionalized poly(vinyl alcohol) films. *Acta Biomater* (5):1647–55, 2009.
- [112] Padavan DT, Hamilton AM, Millon LE, Boughner DR, Wana W. Synthesis, characterization and in vitro cell compatibility study of a poly(amic acid) graft/cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Acta Biomaterialia* (7): 258–267, 2011.
- [113] Oliveira PPM. *Uso de membranas de poli (álcool vinílico) - PVAI como substituto de pericárdio*. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2008.

[114] Gang WU, Wenguang Z, Chengtao W. Tribological Properties of Polyvinyl Alcohol Hydrogel Reinforced with Nanometer Hydroxy Apatite. *Journal of Wuhan University of Technology Mater Sci* (23): 47-49, 2008.

[115] Mook SL, Heang S, Lee HH, Yuk SH, Lee JH. Dual growth factor-releasing nanoparticle/hydrogel system for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med* (21): 2593–2600, 2010.

[116] Sangram KS, Fernandes EG, Chiellini F, Chiellini E. Thermal analysis of PVA/CNTs 2D membrane. *J Therm Anal Calorim* (97):859–864, 2009.

## Anexo 1



CEUA/Unicamp

### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

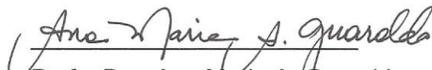
#### CERTIFICADO

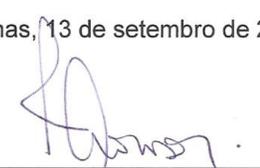
Certificamos que o Protocolo nº 2240-1, sobre "Avaliação de membranas a base de hidrogel de Polivinil Alcool (PVA-I) associadas a nanopartículas de carbono implantadas em defeitos osteocondrais de ratos Wistar. Ensaios "in vitro" e "in vivo"", sob a responsabilidade de Prof. Dr. William Dias Belangero / Ana Amelia Rodrigues, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 13 de setembro de 2010.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2240-1, entitled "\_\_\_\_\_", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 13, 2010.

Campinas, 13 de setembro de 2010.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>