

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Filipe de Assis Gonzaga

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS BIOMATERIAIS BIO-OSS® E CERASORB® NA
EXPRESSÃO DE MEDIADORES ASSOCIADOS À REMODELAÇÃO
ÓSSEA EM MONÓCITOS HUMANOS**

Belo Horizonte

2015

Filipe de Assis Gonzaga

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS BIOMATERIAIS BIO-OSS® E CERASORB® NA
EXPRESSÃO DE MEDIADORES ASSOCIADOS À REMODELAÇÃO
ÓSSEA EM MONÓCITOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Martinho Campolina
Rebello Horta

Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Eduardo
Alencar de Souza e Prof. Dra. Tatiana Teixeira
de Miranda

Belo Horizonte

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

G642a Gonzaga, Filipe de Assis
Avaliação do efeito dos biomateriais bio-oss® e cerasorb® na expressão de mediadores associados à remodelação óssea em monócitos humanos / Filipe de Assis Gonzaga. Belo Horizonte, 2015.
75 f. : il.

Orientador: Martinho Campolina Rebello Horta

Coorientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Coorientadora: Tatiana Teixeira de Miranda

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Monócitos. 2. Citocinas. 3. Materiais biomédicos. 4. Doença periodontal. I. Horta, Martinho Campolina Rebello. II. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. III. Miranda, Tatiana Teixeira de. IV. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. V. Título.

Filipe de Assis Gonzaga

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS BIOMATERIAIS BIO-OSS® E CERASORB® NA EXPRESSÃO DE MEDIADORES ASSOCIADOS À REMODELAÇÃO ÓSSEA EM MONÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Profa. Dra. Jeane de Fátima Correia Silva Alves – Newton Paiva
- 2- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 31 de agosto de 2015

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 12 de novembro de 2015

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia

AGRADECIMENTOS

A Deus, Autor da vida, pelo infinito amor e cuidado.

Aos meus pais, pela força e constante incentivo.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Martinho e Prof. Dr. Paulo, pelos ensinamentos, orientações e esforços para que este projeto se tornasse possível.

A Coorientadora Prof. Dra. Tatiana, pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento desta dissertação.

A todos os professores do mestrado, que fizeram dos atendimentos clínicos momentos de ótimo convívio e muito aprendizado.

Aos meus colegas de mestrado. Obrigado pela companhia, amizade e momentos memoráveis!

A Luisa Magalhães e demais alunos do laboratório de Interações Celulares do ICB/UFMG, pela paciência e dedicação na condução dos experimentos.

Aos pacientes, principal motivo pelo qual nos empenhamos em crescer profissionalmente.

RESUMO

Constantemente, o cirurgião-dentista envolvido na área de reabilitação oral se depara com situações onde a instalação de implantes ósseo-integrados se encontra dificultada, principalmente devido a atrofia óssea. Para viabilizar a instalação de implantes dentais em áreas de atrofia do rebordo alveolar, diferentes técnicas para reconstrução óssea envolvendo biomateriais podem ser empregadas. Atualmente, existem diversas opções de materiais alternativos ao enxerto autógeno, como os aloenxertos, xenoenxertos e enxertos aloplásticos. Tendo em vista os riscos da manipulação tecidual, o conhecimento dos mecanismos moleculares e celulares da fisiologia óssea, bem como o processo de remodelação óssea associado aos biomateriais é de suma importância para a sua adequada utilização. Neste contexto, o objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar *in vitro* o efeito dos materiais Geistlich Bio-Oss® e Cerasorb M Dental® na expressão de mediadores associados à remodelação óssea em células mononucleares humanas. Os biomateriais foram incubados com meio de cultura e o sobrenadante adicionado a células mononucleares de sangue periférico humano com e sem estímulo de *Porphyromonas gingivalis*. As frequências de monócitos totais e monócitos CD14⁺ produtores das citocinas interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-10, IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram determinadas por imunomarcagem e citometria de fluxo. O teste ANOVA um critério com repetição seguido pelo teste *post hoc* de Tukey mostrou que a estimulação com *P. gingivalis* alterou a expressão de IL-6, IL-8 e TNF- α em relação ao grupo controle negativo (meio de cultura). A adição do sobrenadante dos biomateriais não afetou significativamente a expressão de nenhuma das citocinas avaliadas, tanto na ausência quanto na presença de estímulo bacteriano. Nossos dados sugerem que Bio-Oss® e Cerasorb M Dental® não estimulam a produção de citocinas por monócitos humanos e não interferem nos mecanismos de comunicação celular mediado pelas citocinas avaliadas durante estimulação com *P. gingivalis*.

Palavras-chave: Monócitos. Citocinas. Bio-Oss. Cerasorb. Biomateriais. *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Often, the dentist involved in oral rehabilitation area are faced with situations where the installation of bone-integrated implants is difficult, mainly due to bone atrophy. In order to facilitate the installation of dental implants in areas of atrophy of the alveolar ridge, different techniques for bone reconstruction involving biomaterials can be employed. Nowadays, there are several options of alternative materials to autograft, like allografts, xenografts, and alloplastic grafts. Given the risks of tissue manipulation, knowledge of the molecular and cellular mechanisms of bone physiology, as well as the process of bone remodeling associated with biomaterials is very important for its proper use. In this context, the aim of this study was to evaluate *in vitro* the effect of bone graft materials in the expression of mediators associated with bone remodeling in human mononuclear cells. Biomaterials Geistlich Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® were incubated with culture medium and the supernatant added to human peripheral mononuclear blood cells with and without stimulation of *Porphyromonas gingivalis*. The frequencies of total monocytes and CD14⁺ monocytes producing the interleukin-6 cytokine (IL-6), IL-8, IL-10, IL-12 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were determined by immunostaining and flow cytometry. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test showed that stimulation with *P. gingivalis* altered the expression of IL-6, IL-8 and TNF- α in the control group. The addition of the supernatant of biomaterials did not significantly affect the expression of any of the cytokines evaluated, both in the absence and in the presence of bacterial stimulus. Our data suggest that Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® do not stimulate cytokine production by human monocytes and do not interfere with cellular communication mechanisms mediated by stimulation with cytokines measured for *P. gingivalis*.

Keywords: Monocytes. Cytokines. Bio-Oss. Cerasorb. Biomaterials. *Porphyromonas gingivalis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Materiais de enxertia óssea.....	15
1.1.1 Cerasorb.....	17
1.1.2 Bio-Oss.....	20
1.2 Papel das citocinas na remodelação óssea.....	23
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 ARTIGO	31
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP	73

1 INTRODUÇÃO

Constantemente, o cirurgião-dentista envolvido na área de reabilitação oral se depara com situações onde a instalação de implantes ósseo-integrados se encontra dificultada, principalmente devido a atrofia óssea. Um dos principais desafios para este profissional consiste na reconstrução destes defeitos ósseos, que podem ser causados por trauma, infecção, neoplasias (ZHANG et al., 2012), cárie, doença periodontal (NEWMAN; CARRANZA, 2007). Outra causa muito comum desta atrofia é a perda dentária. Um estudo demonstrou que a perda óssea média pode variar de 40% a 60% do volume ósseo em um período relativamente curto de 2 a 3 anos após a extração (DUTTENHOEFER et al., 2013).

Com o avanço das técnicas reconstrutivas, diferentes materiais se encontram à disposição do profissional: osso autógeno, aloenxertos, xenoenxertos, proteínas morfogenéticas e enxertos aloplásticos. Vários estudos apontam taxas de sucesso satisfatórias quando da utilização desses materiais, inclusive a longo-prazo (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009; ALOY-PROSPER et al., 2015; BOWLER; DYM, 2015). O osso autógeno ainda é considerado padrão-ouro, devido às suas propriedades singulares: osteocondução, osteoindução e características osteogênicas (GALINDO-MORENO et al., 2011). No entanto, este material também apresenta desvantagens: tratamento mais invasivo pela necessidade de um sítio doador e conseqüente morbidade; produção de complicações pós-operatórias para a área doadora; intensa remodelação óssea levando a reabsorção excessiva do enxerto; quantidade limitada de material (KURZ; GARFIN; BOOTH, 1989; GALINDO-MORENO et al., 2011; BOWLER; DYM, 2015).

Estas desvantagens estimularam pesquisadores a desenvolverem outros materiais para substituição óssea (GREENWALD et al., 2001), que facilitam a redução do tempo cirúrgico pela obtenção descomplicada de material (virtualmente ilimitada), além de eliminar a necessidade de um sítio doador (SCHILLING et al., 2004). Dentre estes materiais, pode-se relacionar como opções o Cerasorb M Dental® (Riemser Inc., Research Triangle Park, North Carolina, USA) e Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Switzerland), que serão os produtos utilizados na presente pesquisa.

Já foi demonstrado na literatura que o Cerasorb M Dental®, material constituído por β -tricálcio fosfato (β -TCP), é conhecido pela sua alta

biocompatibilidade, e propriedades favoráveis quanto à osteocondutividade e de reabsorção (XIN et al., 2005; HORCH et al., 2006). Quando comparados a outros substitutos ósseos, β -TCP possui excelentes propriedades físico-químicas, como sua uniformidade quanto à composição e alta pureza, conferindo a este material uma boa confiabilidade quando analisadas as reações fisiológicas provocadas (HORCH et al., 2006). Já o Bio-Oss® é obtido através de um processo de desproteinização e esterilização de osso bovino, e é bastante semelhante ao osso humano sob o ponto de vista químico e físico (HALLMAN; LUNDGREN; SENNERBY, 2001). Sua área de superfície permite que fatores angiogênicos atuem, formando um arcabouço para osteogênese, sob um índice muito baixo de reabsorção (YOU, T.-M. et al., 2007). Este biomaterial é utilizado com sucesso significativo no ganho vertical através da elevação do soalho de seio maxilar, comprovado em estudo com longo acompanhamento (SARTORI, STEFANO et al., 2003).

Entretanto, existe o risco de problemas de biocompatibilidade, além do potencial para transmissão de doenças infecciosas (SCHILLING et al., 2004). O contato destes biomateriais pode gerar uma reação de corpo estranho por parte do sistema imune, levando a liberação de citocinas e recrutamento das células de defesa, que em última análise levaria a reabsorção e perda do biomaterial (LANGE et al., 2009). Isto embasa a importância de se compreender a fisiologia do tecido ósseo, e particularmente a osteoclastogênese (ZHANG et al., 2012). Contudo, ainda são escassos na literatura artigos que avaliam os aspectos celulares, estruturais e particularmente moleculares do osso alveolar quando exposto a materiais de enxertia.

Sabe-se que a interação entre bactérias anaeróbias periodontopatógenas (dentre elas, a *Porphyromonas gingivalis*) com as células epiteliais do hospedeiro, é fundamental na iniciação e progressão da degradação óssea, observada na doença periodontal e perda de enxerto devido à infecção. Este processo é modulado através do aumento na produção de RANKL, como também na maior liberação de citocinas pró-inflamatórias para o meio, dentre elas a IL-6 e a IL-8 (YEE et al., 2014). Estas bactérias produzem fatores de virulência importantes, como lipopolissacarídeo (LPS, um componente da parede celular das bactérias gram-negativas), além de proteases capazes de degradar matéria proteica do hospedeiro (SCHERES et al., 2011). Estes

mesmos autores, em um estudo *in vitro*, demonstraram que *P. gingivalis* estimulam a neoformação de osteoclastos de forma direta e indireta.

Devido à compreensão limitada, sob o ponto de vista molecular, quanto ao papel de diferentes materiais utilizados na reconstrução de rebordos alveolares atróficos e seus efeitos na fisiologia e fisiopatologia óssea, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dos materiais para enxerto ósseo Geistlich Bio-Oss® e Cerasorb M Dental® na expressão de citocinas associadas à remodelação óssea em monócitos humanos com e sem estimulação por periodontopatógeno.

1.1 Materiais de enxertia óssea

Atualmente, a prótese sobre implante é considerada a primeira escolha na terapia de reabilitação em pacientes parcialmente ou totalmente edêntulos, tanto por parte do profissional quanto pelo próprio paciente (BOWLER; DYM, 2015). Esta modalidade de prótese já se tornou consagrada na odontologia, pois já foi extensivamente estudada, apresentando altas taxas de sucesso inclusive em longos períodos de acompanhamento (BUSER et al., 1997; LEKHOLM et al., 1999; BECKTOR; ISAKSSON; SENNERBY, 2004). Entretanto, a atrofia volumétrica do rebordo ósseo alveolar é um dos fatores que impedem a instalação de implantes dentários, ou permitem que estes sejam inseridos apenas em uma posição incorreta, do ponto de vista estético e funcional (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009). Para que esta situação fosse resolvida, várias técnicas de reconstrução alveolar foram desenvolvidas, onde diferentes materiais possam ser escolhidos para atingir tal objetivo.

Chiapasco, Casentini e Zaniboni (2009) relatam que cinco métodos já foram descritos na literatura para aumento do volume ósseo: osteoindução, através do uso devido de fatores de crescimento; osteocondução, pela utilização de materiais de enxerto que assumiriam o papel na formação de um arcabouço na neoformação óssea; distração osteogênica, onde um dispositivo é instalado cirurgicamente, e separa lentamente dois fragmentos ósseos do próprio paciente, com formação espontânea de tecido ósseo entre eles; regeneração óssea guiada (ROG), na qual uma membrana é utilizada como barreira em um espaço em que se espera que ocorra preenchimento ósseo; enxertos vascularizados, onde um segmento ósseo vital contendo células viáveis (potencial osteogênico) é removido do paciente e

imediatamente ligado a um suprimento sanguíneo no leito receptor, o que exclui a necessidade de remodelamento e substituição óssea (SOUTAR; MCGREGOR, 1986; REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987; DAHLIN et al., 1988; ILIZAROV, 1989).

O material ideal para enxertia óssea deve possuir algumas características: similaridade com a estrutura óssea humana, biocompatibilidade, osteocondutividade (contato direto osso-biomaterial), completa ausência de antigenicidade, servir de suporte mecânico para regeneração tecidual, na qual o material será remodelado em um osso neoformado (ARTZI et al., 2004; ZHANG et al., 2012). O enxerto autógeno ainda é considerado o padrão ouro. Por mais de 100 anos o enxerto autógeno é utilizado, com a vantagem de possuir propriedades osteocondutivas (atua como um arcabouço físico na qual o osso pode proliferar), osteogênicas (fonte de células precursoras e células ósseas diferenciadas para promoção da neoformação óssea) e também osteoindutivas (estimula a formação óssea através de sinais bioquímicos), sem provocar respostas imunológicas indesejadas (ARAUJO et al., 2002; SEN; MICLAU, 2007; SCHUCKERT; JOPP; OSADNIK, 2010; MARKEL et al., 2012). Entretanto, este material apresenta algumas desvantagens: necessidade de um sítio doador e conseqüente aumento da morbidade cirúrgica, alta reabsorção óssea (pode haver uma redução de até 40% em volume), aumento do tempo de cirurgia, além da quantidade limitada de biomaterial que pode ser obtido (SCHLEGEL et al., 2003; ABUKAWA et al., 2006; BROWAEYS; BOUVRY; DE BRUYN, 2007; NKENKE; STELZLE, 2009; MARKEL et al., 2012). Devido a estas características, pesquisadores se empenharam no desenvolvimento de materiais que pudessem vir a substituir esta modalidade de tratamento.

Biomateriais alternativos apresentam como vantagens: fácil obtenção de material necessário para o ganho planejado; quantidade virtualmente ilimitada; exclusão de um sítio doador; redução do tempo cirúrgico (STEVENS et al., 2008; MORDENFELD et al., 2010). Como desvantagens, os enxertos xenógenos e aloplásticos necessitam de um tempo maior para formação óssea quando comparados aos enxertos autógenos: de 5 a 9 meses (HANDSCHEL et al., 2009). Além disto, podem desencadear uma reação de corpo estranho por parte do hospedeiro, inflamação e formação de tecido de granulação (FIGUEIREDO et al., 2013). Devido à extensa gama de opções existentes no mercado, a escolha do profissional exige o conhecimento dos complexos eventos que compõem a fisiologia

óssea, bem como as reações que estes biomateriais causam quando em contato com os tecidos receptores.

Nenhum biomaterial é biologicamente inerte, ou seja, todos induzem algum grau de reação inflamatória (MARKEL et al., 2012). Pesquisas já foram conduzidas na tentativa de aumentar o número de células potencialmente osteogênicas nas enxertias realizadas com biomateriais de origem não autógenas. Se este objetivo fosse alcançado, seria possível reduzir a morbidade pós-operatória através da remoção de um menor fragmento ósseo, completando-se o volume desejado com o biomaterial alternativo. Conduziu-se então um estudo *in vitro* seguindo esses moldes, e este experimento indicou que quando esta mistura é feita não há aumento significativo da neoformação óssea (SIMUNEK et al., 2008).

A integração óssea de materiais substitutos ósseos (MSO) depende da atividade das células que os circundam no leito receptor. A migração e diferenciação das células responsáveis pela neoformação óssea, os osteoblastos, é influenciada pelas interações entre a sua membrana celular com a superfície dos MSO (CORNELL, 1999). Estas células são responsáveis pela produção de um amplo espectro de moléculas, que exercem diferentes papéis da fisiologia óssea: fatores de crescimento, de proliferação e migração de osteoblastos, proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), cálcio para deposição na matriz óssea, e também pequenas proteínas chamadas citocinas. Estas estabelecem comunicações entre células de diferentes regiões, regulando o processo inflamatório, a proliferação e reações imunológicas (KNOTHE TATE et al., 2004), além de modular a inflamação na perda óssea após intervenções cirúrgicas e destruição dos tecidos na doença periodontal (GRAVES, 2008).

1.1.1 Cerasorb

Tricálcio fosfatos (TCPs) são substitutos ósseos aloplásticos conhecidos pela sua osteocondutividade, alta biocompatibilidade e propriedades de reabsorção favoráveis (KOEPP et al., 2004). Há cerca de 40 anos, são utilizados em larga escala em cirurgias por dentistas e ortopedistas (DOROZHKIN; EPPLE, 2002), com excelentes resultados clínicos (JAFFE; SCOTT, 1996; KNOP et al., 2006). Os TCPs existem em duas formulações diferentes: uma que é produzida em temperaturas

acima de 1125°C (α -TCP), e outra formulação chamada de beta tricálcio fosfato de fase pura (β -TCP), produzida abaixo desta temperatura.

O Cerasorb® se encontra no mercado desde 1997, e possui algumas semelhanças com o osso humano, como composição química, aspectos físicos, porosidade e cristalinidade (HORCH et al., 2006). Ele é composto por beta tricálcio fosfato de fase pura (β -TCP), e se caracteriza pela sua alta uniformidade física, com grânulos que variam de 1000 a 2000 μ m em tamanho (com porosidade variando de 45% a 50%), excelente nível de uniformidade química, altamente puro, além de induzir uma reação de reabsorção mais lenta do que outros TCPs e promover um efeito osteocondutor no sítio receptor (ZERBO et al., 2004; HORCH et al., 2006). Sabe-se que este biomaterial atua como um agente para manter o volume durante o período de remodelação (BREITBART et al., 1995), já que após 2 anos de 90 a 95% das partículas já foram reabsorvidas (MERTEN et al., 2001; ARTZI et al., 2004). Em um experimento utilizando cães, verificou-se que a neoformação óssea acontece no sentido centrípeto em relação às bordas do defeito ósseo (ARTZI et al., 2004). Outros estudos demonstram que o β -TCP está associado a atividade osteoclástica e ativação de macrófagos (KNABE et al., 2000; NAITO et al., 2010). Estes macrófagos também são ativados pela IL-1, seguida pela produção de IL-4, que é uma citocina antiinflamatória, capaz de reduzir a expressão de TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 (RAMAN; PAPE; GIANNOUDIS, 2003; NARAYAN et al., 2011).

Em um estudo *in vitro* realizado por Lange et al. (2009), comparou-se o potencial inflamatório da hidroxiapatita (HA) e β -TCP, quando em contato com células mononucleares. Num período de incubação pequeno de 6 horas, não houve aumento significativo das citocinas investigadas (TNF- α , IL-1 β ou IL-8). Porém, após um período maior de incubação (18h), houve um aumento significativo das três citocinas para os dois biomateriais. Isto ocorreu devido a diminuição na produção de citocinas do grupo controle, pois existe uma perpetuação do estímulo inflamatório por parte das amostras contendo biomaterial. Através da análise do potencial de osteoclastogênese pelo aumento na expressão de fator de fator nuclear kappa B (RANKL) e fator estimulador de colônias de macrófagos e monócitos (GM-CSF). Concluíram que β -TCP possui uma chance menor de conduzir os eventos inflamatórios, a osteoclastogênese e a osteólise, pois este biomaterial não induz a expressão de RANLK, ao contrário da HA.

GM-CSF é fundamental no processo de diferenciação das células dendríticas, responsáveis pela fagocitose de partículas e iniciação do processo inflamatório, após apresentar tais partículas para as células T (LEBRE; TAK, 2008). Além disso, as células dendríticas sob a ação do receptor ativador do RANKL podem se transdiferenciar em osteoclastos, de forma até mais eficiente do processo quando estas células são originadas a partir de precursoras indiferenciadas (RIVOLLIER et al., 2004). Os resultados dos estudos *in vitro* de Lange et al. (2009) corroboram com os encontrados por Zerbo et al. (2005), que verificaram a pouca expressão de RANKL nas amostras contendo β -TCP quando comparadas a amostras com hidroxiapatita. Neste experimento, após 6 meses da inserção de β -TCP em seios maxilares, foram observados osteoblastos, mas não osteoclastos.

Lange et al. (2009) investigaram a influência do tamanho das partículas de β -TCP na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-8. Observou que partículas maiores que 32 μ m tendem a induzir maior expressão destas citocinas. Isto embasa a afirmação feita pelos mesmos autores em um experimento anterior a este, onde observou-se que partículas pequenas de β -TCP induzem a inflamação de forma leve, e conseqüentemente menor potencial osteoclastogênico (LANGE et al., 2009). Segundo os pesquisadores, isto ocorre porque há uma tendência de potencialização do processo inflamatório na ausência ou ineficácia do processo de fagocitose causado pelo tamanho da partícula do biomaterial.

A biodegradação de β -TCP pode acontecer de duas formas: fagocitose de partículas não apenas por osteoclastos, mas também pelos macrófagos; dissolução pelo aumento da solubilidade do biomaterial, devido a redução do pH do meio pela atividade osteoclástica (XIA et al., 2006; DUARTE CAMPOS et al., 2014). Após a dissolução, foi investigado e sabe-se que os íons de cálcio possuem um papel importante na adesão e proliferação celular, enquanto os íons de fosfato atuam na manutenção dos osteoblastos (TAKEICHI, 1977; BELLOWS; HEERSCHE; AUBIN, 1992; DVORAK et al., 2004). A taxa de degradação do β -TCP pode ser controlada, através de modificações no processo de sinterização, alterações no tamanho e número de porosidades, tamanho da partícula, de forma diretamente proporcional à sua permanência nos tecidos receptores (GHANAATI et al., 2010).

A ativação de macrófagos pode acontecer quando microrganismos expressam lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana celular de bactérias gram-negativas (GORDON, 2003). Tal ativação também pode ocorrer por

vias alternativas, como pela produção de IL-1 e IL-4 pelos macrófagos quando em contato com β -TCP (MCNALLY; ANDERSON, 1995; NARAYAN et al., 2011). Entretanto, quando há a presença de IL-4 em excesso, esta citocina pode induzir a apoptose dos macrófagos pelo aumento da secreção de IL-1 (NARAYAN et al., 2011). Macrófagos ativados pela IL-4 possuem uma capacidade de fagocitose reduzida quando comparados aos osteoclastos (DUARTE CAMPOS et al., 2014).

Tai et al. (2014), em um experimento no qual β -TCP foi injetado via subcutânea em camundongos, verificaram que o biomaterial promove um aumento significativo da migração de células do sistema imune ao redor da área da injeção (inicialmente neutrófilos, seguidos por linfócitos, macrófagos, fibroblastos, finalizando com células gigantes multinucleadas). Neste mesmo estudo, β -TCP foi incubado com células da linhagem de monócitos e macrófagos, e apurou-se o aumento dos níveis de produção de citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1 α). Estes fenômenos podem explicar o aumento das células inflamatórias no experimento *in vivo*. A MIP-1 α é conhecida por recrutar diversas células do sistema imune e é sintetizada por macrófagos, células epiteliais e fibroblastos (TAI et al., 2014).

1.1.2 Bio-Oss

Bio-Oss® é um material altamente osseocondutivo à base de hidroxiapatita, obtido através de um processo de desproteinização, remoção de toda a matéria orgânica, seguida de esterilização do osso de origem bovina (AYBAR et al., 2004). É bastante semelhante à fase mineral do osso esponjoso humano sob o ponto de vista químico e físico (HALLMAN; LUNDGREN; SENNERBY, 2001; TADJOEDIN et al., 2003; PALMIERI et al., 2010; BERNHARDT et al., 2011). Composto por grânulos com tamanho médio de 1500 μ m, sua área de superfície alcança em média 100 m²/g, e permite a organização de um arcabouço favorável à osteogênese, no qual haverá proliferação e migração de osteoblastos, além de angiogênese, com um índice muito baixo de reabsorção (YILDIRIM et al., 2000; MAIORANA et al., 2003; TADJOEDIN et al., 2003; ARTZI et al., 2004; YOU, T. M. et al., 2007; MATSUSHIMA et al., 2009). Este biomaterial é biocompatível e possui diversos estudos que evidenciam sucesso em vários procedimentos para correção de defeitos alveolares e perimplantares (SPECTOR, 1994; ARTZI; NEMCOVSKY; TAL, 2001), preservação de alvéolos pós-

extração (ARTZI; NEMCOVSKY; TAL, 2001; ARAUJO; LINDHE, 2009; AZIZI; MOGHADAM, 2009; AVILA-ORTIZ et al., 2014) e, especialmente, no ganho vertical em região posterior de maxila, por meio da elevação do soalho de seio maxilar (FUKUTA et al., 1992; ARTZI; NEMCOVSKY; TAL, 2001; SARTORI, S. et al., 2003; ABUSHAHBA et al., 2008; CORDARO et al., 2008).

Um experimento demonstrou que Bio-Oss® induz a neoformação óssea devido a presença de fator de crescimento β (TGF- β), o que levanta a hipótese de este biomaterial possui alguma proteína residual decorrente do processo de fabricação (SCHWARTZ et al., 2000). Entretanto, em uma investigação conduzida por Benke, Olah e Mohler (2001), não havia qualquer evidência de proteína nas amostras analisadas.

Estudos com enfoque histológico evidenciaram que a maior parte do Bio-Oss®, após um período de maturação, se encontra rodeado de osso neoformado, maduro, compacto, composto por ósteons bem organizados (PIATTELLI et al., 1999; MAIORANA et al., 2003). A reabsorção deste material acontece de forma muito lenta e contínua, fato esse verificado em estudo com acompanhamento de 10 anos realizado por Sartori et al. (2003). Esses autores apontaram que a taxa de absorção é de 3.6 % ao ano nos dois primeiros anos, seguido por uma redução do processo a partir deste período, a uma taxa de 0.58% ao mês. Um experimento *in vitro* comparando Bio-Oss® e osso autógeno, onde avaliou-se a expressão de citocinas quimiotáticas para células precursoras de osteoblastos, não se verificou diferença entre as duas condições (CHAVES et al., 2012). Pesquisadores investigaram materiais de diferentes origens e seus efeitos na osteoclastogênese, e observaram que um biomaterial com formulação e origem semelhante ao Bio-Oss® (Tutobone® - Tutogen Medical, Neunkirchen, Alemanha) não aumenta a formação de osteoclastos maduros (KELLER et al., 2012). Carinci et al. (2006) investigaram as alterações que Bio-Oss® causa na expressão de genes relacionados aos osteoblastos e reportaram que este biomaterial simula de forma quase idêntica a matriz óssea do próprio indivíduo, quanto ao processo de migração celular, adesão e diferenciação de células precursoras em osteoblastos.

Amerio et al. (2010) avaliaram, *in vitro*, a influência do Bio-Oss® na expressão de RNAm de fatores de crescimento e outros genes relacionados formação de osteoblastos e citocinas envolvidas na inflamação, osteogênese e remodelação óssea. Observaram que o biomaterial não influencia a expressão de osteonectina

(proteína secretada pelos osteoblastos, responsável pela mineralização inicial do osso). Neste estudo, verificou-se que dentre as proteínas morfogenéticas do osso avaliadas (BMPs), houve menor expressão de BMP-2, que é um dos mais potentes agentes de formação óssea. Os autores inferiram que este fato pode explicar a menor proliferação e diferenciação das células em contato com Bio-Oss®, quando comparadas a outros biomateriais. Entretanto, os principais resultados encontrados neste estudo envolvem citocinas pró-inflamatórias. Demonstrou-se que este biomaterial xenógeno possui uma forte tendência a diminuir a expressão de TNF- α e IL-6. A baixa produção de citocinas pró-inflamatórias levaram os autores a recomendarem a utilização de Bio-Oss® em pacientes portadores de doenças autoimunes que acometem o tecido conjuntivo e ósseo (artrite reumatóide, por exemplo). Arzti et al. (2004), utilizando cães, compararam áreas enxertadas com β -TCP e Bio-Oss®. Verificaram que no período de maturação tardia do enxerto (6 a 12 meses), havia maior neoformação óssea nas áreas enxertadas com osso bovino quando comparadas às áreas que receberam β -TCP. Este mesmo estudo constatou que após 24 meses, todo beta-tricálcio fosfato havia sido reabsorvido e substituído por osso, inclusive mais organizado do que o que havia sido formado em qualquer período do enxerto de origem bovina. Neste, o osso esponjoso neoformado era permeado por uma quantidade substancial de biomaterial. Discutiu-se que o Bio-Oss® é sim totalmente reabsorvido pelo tecido nativo, porém em uma taxa muito baixa. Isto acaba por aumentar a densidade do tecido ósseo neoformado para futura instalação de um implante ósseo integrado, o que é bastante vantajoso. Outros autores também corroboram com as conclusões do estudo de Arzti et al. (2004), de que este biomaterial permanece por grandes períodos nas áreas enxertadas (SCHLEGEL; DONATH, 1998; SCHLEGEL et al., 2003).

Em um estudo realizado em calvária de camundongos para investigação da relação de células osteoprogenitoras e Bio-Oss®, Trentz et al. (1998) concluíram que o biomaterial influencia de forma negativa a proliferação e diferenciação de osteoblastos. Verificou-se resultado semelhante em outras pesquisas, na qual Bio-Oss® foi incubado com estas células (TURHANI et al., 2005; WIEDMANN-AL-AHMAD et al., 2005).

Em um outro experimento executado em calvária de coelhos, comparando o padrão de formação óssea entre Bio-Oss® e β -TCP, os autores observaram que o tecido ósseo prolifera de forma mais rápida com xenoenxerto de origem bovina,

porém à longo prazo há mais osso neoformado nas áreas enxertadas com β -TCP do que Bio-Oss® (MARTINEZ et al., 2015).

Em uma análise de biocompatibilidade do Bio-Oss®, observou-se que houve menor proliferação celular nas amostras contendo este biomaterial. Entretanto, os autores enfatizaram que não se verificaram efeitos citotóxicos (TURHANI et al., 2005). Kübler et al. (2004) e Handschel et al. (2009) avaliaram, *in vitro*, a viabilidade celular após o contato de diferentes materiais de enxerto, e verificaram uma menor proliferação e diferenciação osteoblástica quando cultivadas com Bio-Oss®. Sabe-se também que há uma menor adesão de células que estão em contato com este xenoenxerto (ASTI et al., 2008). Há algumas evidências científicas que afirmam que o Bio-Oss® pode atrasar ou até mesmo obstruir a formação óssea *in vivo* (BELOTI et al., 2008; ARAUJO; LINDHE, 2009).

Dentre os substitutos encontrados no mercado, Bio-Oss® e Cerasorb® já são consagrados pela literatura científica (JAFFE; SCOTT, 1996; KNOP et al., 2006; YOU et al., 2007; MATSUSHIMA et al., 2009), e são utilizados com sucesso principalmente em cirurgias de levantamento de soalho do seio maxilar (ZERBO et al., 2005). Entretanto, são escassos na literatura trabalhos que avaliam o potencial inflamatório destes biomateriais sob uma ótica molecular, avaliando as citocinas envolvidas no processo. A compreensão dos eventos envolvidos na remodelação óssea é importante, em especial a osteoclastogênese, a fim de se entender melhor problemas como a perda do material de reconstrução óssea ou do implante ali inserido, ou até mesmo reabsorção de parte do leito receptor após reconstrução.

1.2 Papel das citocinas na remodelação óssea

A remodelação óssea possui fortes semelhanças com o processo inflamatório e de reparo, quando analisados os aspectos celulares e moleculares (SODEK; MCKEE, 2000). Sob controle de uma cascata de eventos celulares (envolvendo diferentes citocinas, hormônios e fatores de crescimento) as células-tronco começam a se diferenciar e a produzir fatores osteogênicos (SODEK; MCKEE, 2000). Além disso, fatores de crescimento secretados por osteoblastos modulam a diferenciação osteoclástica, e conseqüente atividade de reabsorção óssea (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000).

A formação óssea é regulada por fatores que afetam tanto a produção de células osteoblásticas como a atividade das mesmas. Muitos destes fatores afetam a reabsorção óssea direta ou indiretamente. Dos diferentes fatores que influenciam a neoformação óssea, as proteínas morfogenéticas do osso são aqueles que as afetam de maneira mais profunda (WOZNEY, 1992). Estas citocinas, que pertencem à família TGF- β , induzem a diferenciação osteogênica e condrogênica das células mesenquimais indiferenciadas (REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987).

A reabsorção de tecidos mineralizados requer o recrutamento de células especializadas, os osteoclastos, que são produzidas na linhagem de macrófagos e monócitos das células hematopoéticas, que ocorre no interior da medula óssea (BARON, 1995). Os osteoclastos se desenvolvem a partir de uma célula precursora mononuclear indiferenciada, que é estimulada a se diferenciar sob a influência de vários agentes, como o fator estimulador de colônias de macrófagos, fatores de crescimento, hormônios sistêmicos, e até os próprios osteoblastos. Estudos elucidaram o papel que o gene c-Fos possui na diferenciação dos osteoclastos (BOYCE et al., 1999). Receptor ativador de fator nuclear kappa B ligante (RANKL, ou osteoprotegerina ligante) se liga nos receptores ativador de fator nuclear kappa B (RANK), localizados na superfície dos pré-osteoclastos, induzindo a diferenciação destes em osteoclastos. Este processo é regulado pela osteoprotegerina (OPG), que compete com o RANKL, bloqueando a sinalização e consequentemente a diferenciação de novos osteoclastos. No local onde acontecerá a reabsorção óssea, os pré-osteoclastos se fundem, e o receptor CD44 é fundamental neste evento (STERLING; SAGINARIO; VIGNERY, 1998). Ocorre a polarização dos osteoclastos e enrugamento das suas bordas, local este onde acontecerá a reabsorção óssea (BLAIR, 1998). Após a reabsorção, os osteoclastos sofrem apoptose, o que ativa um mecanismo que interrompe a atividade absorviva (HUGHES et al., 1995). A manutenção dessas células pode ser influenciada por fatores como estrógeno, TGF- β , e bifosfonatos, os quais induzem a apoptose. Por outro lado, outros fatores como o hormônio paratireoideano e a interleucina 1 (IL-1) inibem a apoptose (SODEK; MCKEE, 2000).

Dentre os fatores que estimulam a diferenciação osteoclástica e reabsorção óssea, encontram-se: hormônio paratireoideano, vitamina D₃, IL-1, IL-6, TNF- α e TGF- α . Aqueles que geram um estímulo contrário, ou seja, de inibição da reabsorção óssea, incluem: calcitonina, TGF- β , estrógeno e interferon- γ (SODEK;

MCKEE, 2000). As citocinas podem atuar no eixo regulador OPG/OPGL/RANK, afetando a diferenciação e atividade dos osteoclastos (HORWOOD et al., 1998).

A comunicação entre as células por meio de citocinas é diferente daquelas reguladas por hormônios endócrinos, que promovem a homeostase de todo o organismo à grandes distâncias. Citocinas normalmente agem apenas no sítio inflamatório, e a composição de quais citocinas estão presentes no local irá determinar se haverá perda óssea ou não (SCHETT, 2011; RAEBURN et al., 2002). A compreensão das citocinas e seus mecanismos envolvidos no processo de remodelação óssea pode auxiliar na determinação do melhor tratamento de perda óssea após enxertia realizada em pacientes com doenças auto-imunes, nos quais estas moléculas já se encontram em excesso (LAMAZZA et al., 2009).

A presença de partículas estranhas ao organismo induz o recrutamento de células mononucleares e fagócitos. Ocorre então o englobamento de fragmentos do biomaterial, e subsequente produção de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na diferenciação e atividade osteoclástica, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a IL-1, IL-4 e IL-6, e isto pode culminar na reabsorção do enxerto e falha do implante (AL SAFFAR; REVELL, 1994; GOODMAN et al., 1997; KAJI et al., 2001; LANGE et al., 2009). Além disto, existe a hipótese de que a própria degradação física e celular destes biomateriais pode levar a respostas imunológicas indesejadas, pelo mesmo processo envolvendo recrutamento de células e liberação de mediadores pró-inflamatórios (JIRANEK et al., 1993; AL SAFFAR; REVELL, 1994; LANGE et al., 2009).

As primeiras células fagocitárias a colonizar o sítio inflamatório são os monócitos, e são responsáveis por sintetizar metaloproteinases (que degradam a matriz óssea extracelular) e citocinas como TNF- α e IL-6, que estão associadas a atividade osteoclástica (VAES, 1988; JIRANEK et al, 1993). Já outras citocinas possuem um caráter anti-inflamatório, dentre as quais a IL-10, que inibe a atividade de citocinas pró-inflamatórias e auxilia na regeneração tecidual (TRINDADE et al., 2001). As características físicas dos biomateriais (topografia tridimensional e aspectos físico-químicos) parecem influenciar na resposta celular e na produção de citocinas (LAQUERRIERE et al., 2003). Inclusive, para partículas maiores e mais irregulares, a produção de citocinas anti-inflamatórias parece ser menor (HARADA et al., 1996; LAQUERRIERE et al., 2003).

Numerosos fatores de crescimento e citocinas controlam a taxa de reabsorção do tecido ósseo por macrófagos e osteoclastos. Neste cenário, TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias mais estudadas, sendo responsável pelo recrutamento direto e indireto de um amplo espectro de células do sistema imune no sítio inflamado, estimulando a expressão de fatores quimiotáticos para monócitos e neutrófilos e a fagocitose. As células do endotélio também sofrem alterações no seu citoesqueleto sob a influência do TNF- α , culminando em vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (CAMUSSI et al., 1991). Estudos *in vitro*, concluíram que TNF- α estimula a reabsorção óssea, além inibir a atividade osteoblástica (BERTOLINI et al., 1986; TANI-ISHII et al., 1999). Outros autores afirmaram que TNF- α estimula de maneira direta a formação de osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea, e está relacionado aos danos causados pela inflamação nos quadros de peri-implantite (KONTTINEN et al., 2006). Esta citocina também possui a capacidade de ativação de osteoclastos de maneira semelhante a IL-1 (CURRAN; GALLAGHER; HUNT, 2005). Novas alternativas de tratamento de doenças caracterizadas por destruição e remodelação óssea pelo aumento de TNF- α , como artrite reumatóide e artrite psoriática, são tratadas com sucesso com anticorpos anti-TNF- α (PATIL et al., 2008).

Já a IL-1, cuja fonte principal são os macrófagos e células do endotélio, além da já citada atividade sinérgica ao TNF- α , é um agente pró-inflamatório pirógeno endógeno, e sua síntese também é estimulada pela indução de TNF- α , ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível – iNOS. A IL-8 se encontra ao lado destas citocinas com papel pró-inflamatório. Esta citocina é produzida principalmente pelos macrófagos e é um importante fator quimiotático para recrutamento e ativação de neutrófilos (RAEBURN et al., 2002).

Osteoclastos quando ativados liberam para o meio algumas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-6 (GONZALEZ; SMITH; GOODMAN, 1996). Entretanto, estudos indicam que a IL-6 possui um efeito paradoxal. Esta citocina pode ter uma função na inflamação clínica após o enxerto, na remodelação óssea, e na homeostase dos osteoblastos (PATIL et al., 2008). IL-6 estimula as células mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos, além de ser um potente agente anti-apoptótico para estas células (TAGUCHI et al., 1998). Porém, o efeito direto desta citocina em osteoclastos é inibitório (YOSHITAKE et al., 2008), enquanto o efeito indireto é de estimulação da osteoclastogênese através da ativação de

diferentes vias, por exemplo da IL-1 e do TNF- α (KURIHARA et al., 1990; TAMURA et al., 1993).

Quando monócitos estão em atividade fagocitária, estes liberam IL-10 para o meio. Esta é uma potente citocina antiinflamatória, sintetizada também por linfócitos T, capaz de inibir a produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β (FIORENTINO et al., 1991; TRINDADE et al., 2001; RAEBURN et al., 2002), aumentar os efeitos de glicocorticóides (RAMAN; PAPE; GIANNOUDIS, 2003), além de estimular a degradação de citocinas pró-inflamatórias (ADIB-CONQUY et al., 1999).

Em um estudo realizado em camundongos, pesquisadores avaliaram o papel da IL-12 na formação de osteoclastos, e os tipos celulares envolvidos no processo. Afirmaram que esta citocina expressa por células dendríticas é capaz de inibir a osteoclastogênese *in vitro*, estimulando a diferenciação de linfócitos T de forma sinérgica com a IL-18 (HORWOOD et al., 1998; SCHETT, 2011). IL-12 também é capaz de promover a ativação de neutrófilos, síntese de citocinas pró e antiinflamatórias (função reguladora) e produção de interferon gama (IFN- γ) por células *natural killer*, o que estimula o combate aos patógenos por meio da fagocitose (HORWOOD et al., 1998; RAMAN; PAPE; GIANNOUDIS, 2003).

A fim de elucidar o comportamento que materiais provocam nos tecidos *in vivo*, a biologia molecular tem sido uma importante ferramenta, no intuito de identificar quais genes e moléculas que participam na diferenciação e síntese das células ósseas. Entretanto, são escassos na literatura os trabalhos que correlacionam estes eventos com o processo da osteoclastogênese. Uma melhor compreensão deste processo poderia auxiliar na identificação de fatores que resultam na reabsorção destes materiais de enxerto e parte do sítio receptor, o que possibilita o desenvolvimento de novas formas de tratamento mais efetivas contra estes problemas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos materiais para enxerto ósseo Geistlich Bio-Oss® e Cerasorb M Dental® na expressão de citocinas envolvidas na remodelação óssea em monócitos humanos.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar o efeito dos biomateriais na percentagem de monócitos produtores das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α ;
- b) avaliar o efeito dos biomateriais na percentagem de monócitos produtores das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α , após estímulo com *Porphyromonas gingivalis*;
- c) comparar o efeito na produção das citocinas entre os dois biomateriais avaliados, na ausência e presença do periodontopatógeno.

3 ARTIGO

Evaluation of the effect of Bio-Oss® and Cerasorb® biomaterials on the expression of mediators of bone remodeling in human monocytes

Os resultados desse trabalho foram compilados na forma de artigo a ser submetido à revista **Journal of Biomedical Materials Research Part A** (Qualis A2).

De acordo com as normas do periódico, que podem ser acessadas em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)15524965/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)15524965/homepage/ForAuthors.html)

Evaluation of the effect of Bio-Oss® and Cerasorb® biomaterials on the expression of mediators of bone remodeling in human monocytes

Filipe de Assis Gonzaga^a, Tatiana Teixeira de Miranda^a, Luisa Mourão Dias Magalhães^b, Walderez Ornelas Dutra^b, Kenneth John Gollob^c, Paulo Eduardo Alencar de Souza^a, Martinho Campolina Rebello Horta^a

^a Graduate Program in Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^b Department of Morphology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^c Graduate Program in Medicine and Biomedicine, Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author:

Martinho Campolina Rebello Horta.

Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Avenida Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101, Coração Eucarístico

Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP: 30535-901

Phone number: +55 31 3319-4414

Telefax number: +55 31 3319-4415

E-mail: martinhohorta@pucminas.br

ABSTRACT

In contemporary Dentistry, several techniques have been employed for bone reconstruction using biomaterials. This study aimed to evaluate the effect of the bone grafting materials Geistlich Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® on the expression of cytokines associated to bone remodeling by human monocytes in vitro. Geistlich Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® were incubated in culture medium and the supernatant added to mononuclear cells of human peripheral blood with and without the stimulation with *Porphyromonas gingivalis*. Frequencies of total monocytes and CD14+ monocytes producing cytokines interleukin 6 (IL-6), IL-8, IL-10, IL-12 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were determined by flow cytometry. The repeated measurements ANOVA followed by Tukey's post hoc test has shown that stimulation with *P. gingivalis* changed the expression of IL-6, IL-8 and TNF- α when compared to the control group. Adding biomaterial supernatants has not affected significantly the expression of any cytokine evaluated, both in the absence and in the presence of bacterial stimulation. Our data suggest that Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® have not stimulated the production of cytokines by human monocytes and do not interfere with the mechanisms of cell communication mediated by the evaluated cytokines during stimulation with *P. gingivalis*.

Key Words: monocytes, cytokines, bio-oss, cerasorb, biomaterials.

INTRODUCTION

Dental surgeons, involved in the area of oral rehabilitation, are constantly faced with situations where the installation of bone-integrated implants is difficult, mainly because of bone atrophy. One of the main challenges for this professional is the reconstruction of these bone defects, which may be caused by trauma, infection, neoplasms and periodontal disease.^{1,2} The autogenous bone is still regarded as gold-standard, due to its unique properties: osteoconduction, osteoinduction, osteogenic features, and a relatively fast time of revascularization.³ However, this material has important disadvantages: more invasive treatment due to the need of a donor site and consequent morbidity; development of postoperative complications for the donor site; intense bone remodeling leading to an excessive reabsorption of the graft; limited amount of material.³⁻⁵

Due to these disadvantages, alternative materials to the autogenous bone graft have been developed, presenting facilities such as the reduction of surgical time by easily obtaining the material, eliminating the need for a donor site and reduction of the surgical time.⁶⁻⁸ Among these materials, we may mention beta-tricalcium phosphate ceramics and particulate bovine bone.

Cerasorb M Dental ® (Riemser Inc., Research Triangle Park, North Carolina, USA) is a material consisting of β -tricalcium phosphate (β -TCP) known for its high biocompatibility and favorable properties as for osteoconductivity and reabsorption.^{9,10} Its use is described in several bone surgeries both in Dentistry and in Medical Orthopedics.¹¹ Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Switzerland) is another widely used biomaterial in surgical procedures of osseous graft in maxillary bones, with significant success in vertical gain in techniques to lift the maxillary sinus floor, verified in a study with a long follow-up.¹² It is obtained from a process of

deproteinization and sterilization of the bovine bone, and it is very similar to the human bone from the chemical physical point of view.^{13,14}

In sites of bone grafting, particles of biomaterials are primarily involved by a blood clot, which is dissolved by inflammatory cells recruited from the blood. Macrophages colonize the inflammatory site and synthesize metalloproteinases, enzymes that degrade extracellular matrix, and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 and IL-6, which are associated to osteoclastic activity and increased inflammatory infiltrate.¹⁵⁻¹⁷ Other cytokines also secreted by monocytes/macrophages are IL-8, with an important chemotactic activity for neutrophils, and IL-12 also involved in the regulation of bone remodeling and mainly in the activation of mechanisms of acquired immunity during microbial infection.^{18,19} Among anti-inflammatory cytokines, IL-10 reduces the activation of monocytes/macrophages, the secretion of pro-inflammatory cytokines and helps in the tissue regeneration.²⁰ Physicochemical characteristics of biomaterials, such as tridimensional topography, size of particles and chemical composition seem to influence the cell response and the production of cytokines.^{21,22}

Bacterial infection by periodontopathogens is frequent in maxillary bone sites submitted to the establishing of osseointegrated dental implants, causing periimplantitis.²³ Mechanisms to combat these microorganisms, as well as to destroy peri-implant tissues involve immunocompetent cells and cell communication, mainly mediated by cytokines.²⁴ Due to limited understanding, with a molecular perspective, as for the role of different materials used in the reconstruction of atrophic alveolar ridges and their effects on bone physiology and physiopathology, the objective of the present study was to evaluate the effect of bone grafting materials Geistlich Bio-

Oss® and Cerasorb M Dental ® on the expression of cytokines associated to bone remodeling by human monocytes with and without stimulus by a periodontopathogen.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of biomaterials

Portions of Cerasorb M Dental® (Curasan, Frankfurt/Main, Germany) and BioOss® (Geistlich Pharma AG, Wohlhusen, Switzerland) were placed in wells of a 96-well plate, in equal volumes and then they were weighed. The amount of each biomaterial was determined by a fixed volume, so that the biomaterial was enough to occupy the whole volume of a well of a 96-well plate. Thus, the final values were achieved: 0.136g of Bio-Oss and 0.230g of Cerasorb M Dental®. Each biomaterial was transferred to a culture flask and incubated for 72 hours with 20mL of medium, Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich), containing 100UI/ml of penicillin G potassium and 100 µg/ml of streptomycin, in an incubator at 37°C, 5% of CO₂, relative humidity of 95%. The supernatant was collected to be used in the experiments, so it would simulate events of biomaterial dissolution, which occur in clinical practice.

Preparation of inactivated *Porphyromonas gingivalis*

Colonies of *Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277) were grown in Brucella agar supplemented with 5% blood, 5% yeast extract and hemin/menadione 0.1%, by means of incubation in anaerobic jars containing a gas mixture of 90% N₂ and 10% CO₂, at 37°C, for 48h. Then, in order to verify the absence of contamination of bacterial colonies, a smear was prepared in glass slide for Gram staining.

For bacterial inactivation by means of inhibiting their metabolism, bacteria were heated for 30 minutes at 100°C, following a protocol similar to that described by Jia et al.²⁵ Then, bacteria were frozen at -20°C to be used in experiments.

Obtaining peripheral blood mononuclear cells

This study was approved by the Ethics Committee in Research of PUC Minas (CAAE 42680115.6.0000.5137) and was conducted according to current regulations. In order to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), 10 health individuals were selected (6 males and 4 females, 28.2±4.6 years of age). Exclusion criteria were: conditions that might influence the immune response to periodontopathogens (periodontitis, diabetes, acquired immunodeficiency syndrome), as well as the use of immunosuppressive and anti-inflammatory drugs.

About 20mL of blood was obtained by puncture of peripheral vein, and stored in tubes containing heparin (Becton Dickinson Vacutainer®, New Jersey, USA). Afterwards, blood was diluted in the same volume of phosphate buffered saline (PBS) solution. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were then separated from the other components of the blood by centrifugation in Ficoll-Paque gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 200g, for 40 min at 20°C. PBMCs were washed by centrifugation, twice with PBS, counted in the hemocytometer chamber and resuspended in complete RPMI medium (2mM of L-glutamine, 5% of normal human serum, 100µg/ml of streptomycin and 100UI/ml of penicillin G potassium).

Stimulation of PBMC with biomaterials and *P. gingivalis*

PBMCs of each patient, at a final concentration of 1X10⁶ cells/mL, were submitted to 6 experimental conditions in 96-well plates:

- 1) Control (PBMCs incubated only with complete RPMI medium);
- 2) Bio-Oss (PBMCs incubated with 1.02mg/mL of Bio-Oss);
- 3) Cerasorb (PBMCs incubated with 1.725mg/mL of Cerasorb M Dental®);
- 4) Pg (PBMCs incubated with 1x10⁸ UFC of *P. gingivalis*/mL);
- 5) Bio-Oss + Pg (PBMCs incubated with 1.02mg/mL of Bio-Oss + 1x10⁸ UFC of *P.gingivalis*/mL);
- 6) Cerasorb + Pg (PBMC incubated with 1.725mg/mL of Cerasorb M Dental® + 1x10⁸ UFC of *P. gingivalis*/mL).

For the control group, PBMCs were incubated only with half of the whole RPMI. In groups Bio-Oss and Cerasorb, the supernatants of the biomaterials were added in the proportion corresponding to 1.02mg/mL and 1.725mg/mL, respectively, maintaining the proportion initially obtained of weight/volume of each biomaterial. In the Pg group, *P. gingivalis* inactivated by the heat were added in the proportion of 100UFC/PBMC, according to Kinane et al.²⁶. In Bio-Oss + Pg and Cerasorb + Pg groups, in addition to the supernatant of biomaterials, inactivated *P. gingivalis* were added, in the same proportions described for the previous groups. In these groups, the bacterial stimulus was added 1 hour before adding the supernatant of the biomaterial. The plate was incubated in an incubator (37°C, 5% CO₂, relative humidity of 95%) for 20 hours. In order to avoid that cytokines were secreted by other cells and so they would remain concentrated in intracytoplasmic vesicles, each well received 10µL of Brefeldina A (1µg/ml) solution (E Bioscience, San Diego, USA), four hours before the end of the incubation.

Reactions of immunofluorescence and cytometric analysis

After 20 hours of incubation, PBMCs were centrifuged (1400 RPM, 4°C, 8 min) and the supernatant was discarded. For the reaction of immunofluorescence, a similar protocol to that described by Souza et al.²⁷ was adopted. After that, 20µL of a solution of anti-CD14 monoclonal antibody, APC or FITC conjugate (clone M5E2, BioLegend, San Diego, USA) diluted in PBS with 0.2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA), and the plate was incubated at 4°C, for 15 min. Then, cells were washed with PBS and fixed with formaldehyde at 2%. For the intracytoplasmic labeling, cells were incubated with saponin solution at 0.5%, for 20 minutes at room temperature and then, they were incubated with a solution containing com monoclonal antibodies diluted in saponin buffer: anti-IL-6 APC conjugate (clone HQ2-13A5, Biolegend); anti-IL-8 PE conjugate (clone 6217, RD Systems); anti-IL-10 PeCy7 conjugate (clone JES3-9D7, Biolegend); anti-IL-12 PE conjugate (clone eBioHP4O, E-bioscience); anti-TNF- α APC conjugate (clone Mab11, Biolegend). After 30 minutes of incubation at room temperature, cells were washed and resuspended in buffer PBS/BSA so that flow cytometry might be read. Isotype controls (negative controls) were used conjugated with the same fluorochromes used in all reactions of immunofluorescence.

In order to quantify immunolabelings, flow cytometry FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was employed with data acquisition of 70,000 cells per tube. Cytometric data were analyzed using FlowJo 7.6.5 software (Tree Star Inc., Ashland, USA), determining the population of monocytes according to the location of its population in the chart size versus granularity. Then, populations of CD14+ monocytes were determined. Data were expressed as percentage of total monocytes and CD14+ monocytes expressing each one of the cytokines evaluated.

Statistical analysis

Data were initially submitted to the D'Agostino & Pearson normality test, which showed a normal distribution. The repeated measurements one way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used to evaluate if there are differences, among groups, in the frequency of cells expressing each one of the markers. This analysis was carried out separately for each one of the markers. The level of significance was established at 5%. Analyses were carried out by means of the GraphPad Prism 6.05 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

With the purpose of verifying whether biomaterials Bio-Oss and Cerasorb M Dental® are able to interfere with the function of monocytes, which are found in sites of bone grafting in the very first days, we evaluated the effect of substances released by the biomaterials on the expression of cytokines by human monocytes. After 20 hours of incubation, there were no significant differences in the frequencies of total monocytes, or in the frequencies of CD14+ monocytes expressing each one of the cytokines evaluated, when compared to groups Control, Bio-Oss and Cerasorb (Table 1).

Considering that in sites of bone grafting, after installing dental implants, a periimplantitis may possibly occur, we have verified whether biomaterials would be able to interfere with the production of cytokines by monocytes in response to an important periodontopathogenic bacterium, *P. gingivalis*. Thus, mononuclear cells of the peripheral blood were stimulated by *P. gingivalis* for one hour before adding the supernatant of biomaterials. Our analyses have shown that the stimulation with *P. gingivalis* decreased significantly the frequencies of CD14+ monocytes expressing

TNF- α and increased significantly the frequencies of total monocytes and CD14+ monocytes expressing cytokines IL-6 and IL-8 when compared to the control group (Table 1). However, adding the supernatant of Bio-Oss® and of Cerasorb M Dental® to cells stimulated with *P. gingivalis* has not changed significantly the frequencies of cells expressing IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 or TNF- α both in the population of total monocytes and in the population of CD14+ monocytes, when compared to group Pg (Table 1).

When comparing frequencies of monocytes expressing the cytokines evaluated between groups Bio-Oss and Cerasorb, both in the presence and in the absence of bacterial stimulus, we have verified the absence of significant differences (Table 1).

DISCUSSION

The present study has had the objective of evaluating the effect, *in vitro*, of Geistlich Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® biomaterials for bone graft in the expression of cytokines involved in the bone metabolism by human monocytes. These cells were chosen because it was previously shown in the literature that they play an active role in the inflammatory process caused by biomaterials, in those calcium phosphate derivatives, both *in vivo*^{28,29} and *in vitro*.^{21,30}

The topic biocompatibility is common in discussions on biomaterials. The concept of this topic is not limited to only the lack of antigenicity, but it also deals with the positive effects desired for these materials, both in terms of promoting biological processes and of the desired functionality.³¹ In this context, the knowledge of cytokines involved in the inflammatory process is relevant. These molecules are able

to modulate bone damages of inflammation after surgical procedures or in the periodontal disease.³²

The following cytokines were evaluated in the present study: tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-8, IL-10 and IL-12. TNF- α is a well-known pro-inflammatory cytokine, with a fundamental role in the expression of chemokines, leukocyte activation, promotion of angiogenesis, decreased activity of regulatory T cells, in addition to being able to sensitize nociceptors.³³ Studies have shown that this cytokine stimulates the differentiation of new osteoclasts, by increasing levels of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and of the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL).^{34,35} As this cytokine increases bone loss, it seems to play a fundamental role in typical damages of periimplantitis and periodontal disease.³⁶ RANKL is also able to act on dendritic cells, transdifferentiating them into osteoclasts, even more effectively than the differentiation from mesenchymal cells.³⁷ IL-6 is involved in the start and progression of periodontal disease, and it is found in high levels in patients with periodontal lesions.³⁸ It is produced by mature and immature osteoblasts and is able to stimulate the proliferation and activity of osteoclasts.³⁹ IL-8 is also a potent pro-inflammatory cytokine, able to recruit neutrophils and leukocytes for inflamed periodontal tissues, influencing these cells to release superoxides, proteases and reactive lipids.⁴⁰⁻⁴² This cytokine is synthesized by macrophages, fibroblasts, chondrocytes and osteoblasts, and acts synergistically with IL-6.^{19,43} Different from the cytokines previously mentioned, IL-10 has anti-inflammatory properties. It is produced by B cells, mast cells, eosinophils, macrophages and dendritic cells.⁴⁴ In the bone tissue, it is able to reduce the expression of TNF by the increase of differentiation of helper T lymphocytes 1, able to synthesize other anti-inflammatory cytokines and to inhibit the

production of anti-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF- α .^{45,46} IL-10 also inhibits osteoclastogenesis by the increase in the level of osteoprotegerin (OPG) and the decrease of RANKL.⁴⁷ This cytokine is related to the stimulation of osteoblastic differentiation.⁴⁸ IL-12, an important cytokine for the activation of T lymphocytes, is also able to inhibit osteoclastogenesis.¹⁸

Our results have shown that adding the supernatant of Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® biomaterials has not changed significantly the frequencies of total monocytes and CD14+ monocytes expressing each one of the cytokines evaluated (Table 1). These data suggest that, although these biomaterials have a distinct constitution and nature, substances possibly released by both are not able to influence the expression, by monocytes, of cytokines directly involved in the processes of bone remodeling. Thus, in addition to previous studies showing that both biomaterials do not produce significant inflammatory responses in the tissues, our data suggest that their solubilized products do not interfere with the mechanisms related to bone neoformation that occurs in grafting sites.

Flow cytometry is a method in which a computerized equipment creates a fluid flow containing cells and is able to measure the fluorescence, size and granularity of cells or particles, in a fast and effective way.⁴⁹

Lange et al.⁵⁰ conducted a study in vitro with the purpose of observing whether the size of particles of β -TCP influences the inflammatory potential of the biomaterial, during the incubation period. As a parameter of this potential, levels of TNF- α , IL-1 β and IL-8 were analyzed in the supernatant of PBMC. After 6h of incubation, only large particles had a significant increase in the level of cytokines. After 18h of incubation, regardless the size of the particle, significantly higher levels of cytokines were found. Furthermore, under the same circumstances, larger particles reached

cytokines up to 3 times larger when compared to particles of 1 μ m. Authors formulated the hypothesis that larger particles are more difficult to be phagocytized, which might boost the inflammatory response. It has already been shown that only particles smaller than 20 μ m in diameter may be phagocytized.⁵¹ Our results are in conflict with those obtained by Lange et al.⁵⁰ having in mind that we have shown that Cerasorb M Dental®, a β -TCP ceramic, has not changed the expression, by monocytes, of cytokines involved in the bone metabolism, even when the mean diameter of the particles was larger than those used by Lange et al.⁵⁰. It is worth mentioning that these authors incubated mononuclear cells in direct contact with particles of the biomaterial, whereas our study performed the incubation with the supernatant of the biomaterials. We have chosen this kind of incubation as the purpose was to analyze the behavior of biomaterials after their dissolution in the medium, simulating the dissolution that occurs clinically after the grafting with these biomaterials. In addition, Lange et al.⁵⁰ quantified total cytokines released into the supernatant by all mononuclear cells, without identifying the subpopulations responsible for its production and secretion. In our study, by means of flow cytometry, it was possible to identify subpopulations of monocytes, phenotypically identified, responsible for the production of each cytokine. The studies evaluated β -TCPs from distinct manufacturers, which may influence the results.

No studies were found in the English literature analyzing the influence of Bio-Oss® or Cerasorb® (or other brands of biomaterials with a similar composition) in the production of cytokines IL-10 and IL-12, or of Bio-Oss® and its relationship with IL-8. Nevertheless, Gradjean-Laquerriere et al.³⁰ studied the effects that different sizes and shapes of hydroxyapatite particles (material with a chemical structure similar to β -TCP) in the production of cytokines (IL-6, IL-8 and IL-10) by human monocytes in

vitro with periods of incubation of 6h and 18h. A significant increase of cytokines IL-10 was observed, mainly of hydroxyapatite particles with a pointed shape, when compared to the control group at any of the times of incubation. Canuto et al.⁵² evaluated a material based on hydroxyapatite in the induction of inflammatory mediators in alveoli after extraction in humans, among them IL-10. No significant increase of this cytokine was verified in any variant of time on the patients' mucosa, a similar result to that found in the present study, when analyzing samples containing β -TCP.⁵² Interleukin 12 (IL-12) is a cytokine with immunoregulatory functions, involved in the start and regulation of cell immune responses. This cytokine was produced by macrophages, monocytes and B lymphocytes in response to damages caused by microorganisms from different sources. The expression of proinflammatory cytokines (for example, IL-4 and IL-10) for this cytokine is also able to assist in maintenance and differentiation of helper T lymphocytes 1, producers of anti-inflammatory cytokines.⁵³

Bone grafts performed intraorally are particularly susceptible to bacterial contamination, since the normal oral microbiota already contains a significant number of microorganisms for the development of such event.⁵⁴ The early exposure of the graft to these microorganisms may lead to a contamination, and consequently develop an infection with a potential graft loss.⁵⁵ *Staphylococcus aureus* is a bacterium which is very commonly found in bone infections.⁵⁶ Sanchez et al.⁵⁷ observed the effect that the biofilm of this bacterium on osteoclasts, and concluded that this biofilm reduces the feasibility and differentiation, in addition to inducing a greater expression of RANLK, responsible for recruitment and differentiation of osteoclasts. Although it is not a very rare event, in the literature there are few studies that address this issue.^{57,58}

In this context, and considering that in sites of bone grafting, periimplantitis may occur after implants are installed, we verified if the biomaterials evaluated would be able to interfere with the production of cytokines by monocytes in response to an important periodontopathogen (*Porphyromonas gingivalis*). Thus, mononuclear cells of peripheral blood were stimulated for 1 hour with *P. gingivalis* before adding the supernatants of biomaterials. *P. gingivalis* is a gram-negative bacterium that is part of the microbiota associated to the development of a chronic periodontal disease in humans and its use in models of infection is widely employed for the study of immunological reactions and of bone reabsorption.^{59,60} The use of this bacterium in our study has the purpose of simulating an infection in the receptor site of the candidate patient to bone graft with biomaterial. Our results have shown that the stimulation with *P. gingivalis* increased significantly the frequencies of total monocytes and of CD14+ monocytes expressing cytokines IL-6 and IL-8, when compared to the control group (Table 1). This result is in accordance with previous studies, which have shown an increase in the mRNA transcription and in the expression of IL-8 and IL-6 in epithelial cells of oral mucosa, in the presence of *P. gingivalis*.^{61,62} However, our results have also shown that the stimulation with *P. gingivalis* reduced significantly the frequency of CD14+ monocytes expressing TNF- α , which might be explained by the fact that immunocompetent cells, when stimulated, may have a negative feedback, reducing the expression of a certain cytokine. As our study evaluated at only one time (20h), it is possible that the production of TNF- α increased in the first 6 hours and then decreased. Our results have also shown that adding the supernatant of Bio-Oss® and of Cerasorb M Dental® to *P. gingivalis*-stimulated cells has not significantly changed the frequencies of cells expressing IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 or TNF- α both in the population of total

monocytes and in the population of CD14+ monocytes, when compared to those frequencies observed in group Pg (Table 1). These results show that, even in the presence of periodontopathogenic bacteria, substances released by the biomaterials evaluated are not able to influence the expression, by monocytes, of cytokines associated with processes of bone remodeling. The functional activity of monocytes by means of cytokine production is fundamental to produce an immune response, which is appropriate to eliminate pathogens. These cytokines take part in the activation of microbicidal mechanisms and also stimulate cell mechanisms which cause tissue destruction, such as bone reabsorption. Thus, the influence of biomaterials on this process might significantly affect the response to microorganisms and may change the balance between the protection against pathogens and the maintenance of the tissue integrity, directly influencing the final result of the graft.

Nevertheless, it is important to highlight that our study has certain limitations. Samples were analyzed at only one time, which may reduce the sensitivity of the experiment to collect data, as well as to detect variations on the levels of cytokines. Only one species of bacterium was used in the experiment, as well as a single cell type (monocytes). The oral environment is colonized by a wide range of bacteria that interact among each other and with other cell types immersed in the saliva, which was not present in this experiment either. Further studies in vitro with different times of observation and different cell populations of the immune system, in addition to in vivo studies are important to confirm data found in the present paper.

In conclusion, our data suggest that Bio-Oss® and Cerasorb M Dental® do not stimulate the production of cytokines by human monocytes and do not interfere with the mechanisms of cell communication mediated by the cytokines evaluated, even in the presence of periodontopathogenic bacteria such as *P. gingivalis*.

REFERENCES

1. Newman MG, Carranza FA. *Periodontia Clinica*: Elsevier (Medicina); 2007.
2. Zhang Z, Egana JT, Reckhenrich AK, Schenck TL, Lohmeyer JA, Schantz JT, et al. Cell-based resorption assays for bone graft substitutes. *Acta Biomater* 2012;8(1):13-9.
3. Galindo-Moreno P, Moreno-Riestra I, Avila G, Padial-Molina M, Paya JA, Wang HL, et al. Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(8):857-64.
4. Bowler D, Dym H. Bone morphogenic protein: application in implant dentistry. *Dent Clin North Am* 2015;59(2):493-503.
5. Kurz LT, Garfin SR, Booth RE, Jr. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine (Phila Pa 1976)* 1989;14(12):1324-31.
6. Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(9):961-70.
7. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, et al. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. *Biomaterials* 2004;25(18):3963-72.
8. Stevens B, Yang Y, Mohandas A, Stucker B, Nguyen KT. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *J Biomed Mater Res Part B, Appl Biomaterials* 2008;85(2):573-82.
9. Horch HH, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35(8):708-13.
10. Xin R, Leng Y, Chen J, Zhang Q. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2005;26(33):6477-86.
11. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002;41(17):3130-46.

12. Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2003;14(3):369-72.
13. Hallman M, Lundgren S, Sennerby L. Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001;3(2):87-96.
14. Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 2003;30(3):261-70.
15. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 1991;202(1):3-14.
16. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75(6):863-79.
17. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop Relat Res* 1988(231):239-71.
18. Quinn JM, Sims NA, Saleh H, Miroso D, Thompson K, Bouralexis S, et al. IL-23 inhibits osteoclastogenesis indirectly through lymphocytes and is required for the maintenance of bone mass in mice. *J Immunol* 2008;181(8):5720-9.
19. Raman R, Pape HC, Giannoudis PV. Cytokines in orthopaedic practice: a review. *Curr Orthop* 2003;17(5):378-85.
20. Trindade MC, Lind M, Nakashima Y, Sun D, Goodman SB, Schurman DJ, et al. Interleukin-10 inhibits polymethylmethacrylate particle induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release by human monocyte/macrophages *in vitro*. *Biomaterials* 2001;22(15):2067-73.
21. Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, et al. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages *in vitro*. *J Biomed Mater Res Part A* 1996;31(1):19-26.

22. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes *in vitro*. *Biomaterials* 2003;24(16):2739-47.
23. Pesce P, Menini M, Tealdo T, Bevilacqua M, Pera F, Pera P. Peri-implantitis: a systematic review of recently published papers. *Int J Prosthodont* 2014;27(1):15-25.
24. Duarte Campos DF, Vogt M, Lindner M, Kirsten A, Weber M, Megens RT, et al. Two-photon laser scanning microscopy as a useful tool for imaging and evaluating macrophage-, IL-4 activated macrophage- and osteoclast-based *in vitro* degradation of beta-tricalcium phosphate bone substitute material. *Microsc Res Tech* 2014;77(2):143-52.
25. Jia R, Kurita-Ochiai T, Oguchi S, Yamamoto M. Periodontal pathogen accelerates lipid peroxidation and atherosclerosis. *J Dent Res* 2013;92(3):247-52.
26. Kinane JA, Benakanakere MR, Zhao J, Hosur KB, Kinane DF. *Porphyromonas gingivalis* influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. *Cell Microbiol* 2012;14(7):1085-96.
27. Souza PE, Gomez RS, Xavier GM, dos Santos JS, Gollob KJ, Dutra WO. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. *J Oral Pathol Med* 2005;34(5):312-7.
28. Lange T, Schilling AF, Peters F, Haag F, Morlock MM, Rueger JM, et al. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells *in vitro*. *Biomaterials* 2009;30(29):5312-8.
29. Lu J, Descamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J Biomed Mater Res* 2002;63(4):408-12.
30. Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Phillips TM. Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes *in vitro* induced by various hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 2005;26(15):2361-9.

31. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Wagner M, Kohler H, van Kooten TG, Klein CL, et al. Current trends in biocompatibility testing. *Proc Inst Mech Eng H* 1998;212(2):75-84.
32. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;79(8 Suppl):1585-91.
33. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest* 2011;41(12):1361-6.
34. Abu-Amer Y, Erdmann J, Alexopoulou L, Kollias G, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2000;275(35):27307-10.
35. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000;106(12):1481-8.
36. Konttinen YT, Lappalainen R, Laine P, Kitti U, Santavirta S, Teronen O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. *Int J Periodont Rest Dent* 2006;26(2):135-41.
37. Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rouboudin-Combe C, et al. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* 2004;104(13):4029-37.
38. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65(2):147-53.
39. Axmann R, Bohm C, Kronke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation *in vitro* and *in vivo*. *Arthritis Rheum* 2009;60(9):2747-56.
40. Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 1995;17(2):103-8.
41. Liu RK, Cao CF, Meng HX, Gao Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2001;72(11):1545-53.
42. Ward SG, Westwick J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem J* 1998;333 (Pt 3):457-70.

43. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996;25(4):254-72.
44. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:114-31.
45. Hourii-Haddad Y, Soskolne WA, Halabi A, Shapira L. IL-10 gene transfer attenuates *P. gingivalis*-induced inflammation. *J Dent Res* 2007;86(6):560-4.
46. Xu LX, Kukita T, Kukita A, Otsuka T, Niho Y, Iijima T. Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. *J Cell Physiol* 1995;165(3):624-9.
47. Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci* 2006;114(1):42-9.
48. Zhang Q, Chen B. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Res Int* 2014;2014:284836.
49. Delude RL. Flow cytometry. *Crit Care Med* 2005;33(12 Suppl):S426-8.
50. Lange T, Schilling AF, Peters F, Mujas J, Wicklein D, Amling M. Size dependent induction of proinflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalciumphosphate *in vitro*. *Biomaterials* 2011;32(17):4067-75.
51. Brandwood A, Noble KR, Schindhelm K. Phagocytosis of carbon particles by macrophages in vitro. *Biomaterials* 1992;13(9):646-8.
52. Canuto RA, Pol R, Martinasso G, Muzio G, Gallesio G, Mozzati M. Hydroxyapatite paste Ostim, without elevation of full-thickness flaps, improves alveolar healing stimulating BMP- and VEGF-mediated signal pathways: an experimental study in humans. *Clin Oral Implants Res* 2013;24 Suppl A100:42-8.
53. Queiroz-Junior CM, Silva MJ, Correa JD, Madeira MF, Garlet TP, Garlet GP, et al. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. *Clin Dev Immunol* 2010;2010:327417.
54. Hashemi HM, Beshkar M. Bacterial contamination of autogenous bone collected by rongeur compared with that collected by bone filter during implant surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2011;49(6):474-7.
55. Bahat O, Fontanesi FV. Complications of grafting in the atrophic edentulous or partially edentulous jaw. *Int J Periodont Rest Dent* 2001;21(5):487-95.

56. Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury* 2006;37 Suppl 2:S59-66.
57. Sanchez CJ, Jr., Ward CL, Romano DR, Hurtgen BJ, Hardy SK, Woodbury RL, et al. Staphylococcus aureus biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption *in vitro*. *BMC Musculoskelet Disord* 2013;14:187.
58. Nary Filho H, Pinto TF, de Freitas CP, Ribeiro-Junior PD, dos Santos PL, Matsumoto MA. Autogenous bone grafts contamination after exposure to the oral cavity. *J Craniofac Surg* 2014;25(2):412-4.
59. Gibson FC, 3rd, Genco CA. Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1. *Infect Immun* 2001;69(12):7959-63.
60. Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, Qu H, et al. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *J Immunol* 2011;186(2):869-77.
61. Eick S, Rodel J, Einax JW, Pfister W. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(4):201-8.
62. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res* 2000;79(10):1808-14.

TABLE 1 - Mean and standard deviation of the frequency (%) of cells expressing each of the markers, followed by a comparison between groups

	Control (1)	Bio-Oss (2)	Cerasorb (3)	Pg (4)	Bio-Oss + Pg (5)	Cerasorb + Pg (6)	Comparison between groups ¹						
							1 x 2	1 x 3	2 x 3	1 x 4	4 x 5	4 x 6	5 x 6
TNF total	5.85 ± 2.76	9.06 ± 4.74	9.46 ± 6.09	2.17 ± 1.74	2.43 ± 1.73	2.84 ± 2.62	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TNF in CD14	6.71 ± 3.23	10.43 ± 5.17	11.55 ± 6.35	1.72 ± 1.59	2.23 ± 1.80	2.31 ± 2.18	Ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
IL-6 total	3.02 ± 1.37	10.37 ± 18.05	3.76 ± 1.57	43.65 ± 18.70	44.40 ± 18.63	43.17 ± 18.80	Ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
IL-6 in CD14	4.18 ± 1.88	12.72 ± 21.53	4.87 ± 1.71	49.30 ± 19.77	50.96 ± 20.40	49.80 ± 20.44	Ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
IL-8 total	5.66 ± 0.83	7.16 ± 4.44	9.39 ± 3.24	47.39 ± 19.25	47.53 ± 17.93	51.33 ± 19.56	Ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
IL-8 in CD14	7.82 ± 0.69	9.69 ± 5.89	12.57 ± 4.26	55.89 ± 22.30	56.68 ± 19.87	61.25 ± 19.80	Ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
IL-10 total	2.87 ± 1.55	3.02 ± 1.44	2.53 ± 1.21	3.39 ± 2.43	5.16 ± 3.92	3.46 ± 1.71	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-10 in CD14	4.19 ± 2.25	4.38 ± 1.76	4.15 ± 2.06	5.04 ± 3.69	7.55 ± 4.46	5.85 ± 4.13	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-12 total	3.34 ± 1.56	4.92 ± 4.96	5.89 ± 5.77	3.54 ± 1.57	3.21 ± 1.55	3.65 ± 2.48	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-12 in CD14	5.24 ± 2.07	7.29 ± 6.59	8.94 ± 7.70	5.26 ± 2.11	4.76 ± 2.30	5.49 ± 3.18	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹ Comparison made by one way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. All groups were compared with each other, but only the biologically relevant comparisons were inserted into the table.

* p < 0.05

ns = not significant (p > 0.05)

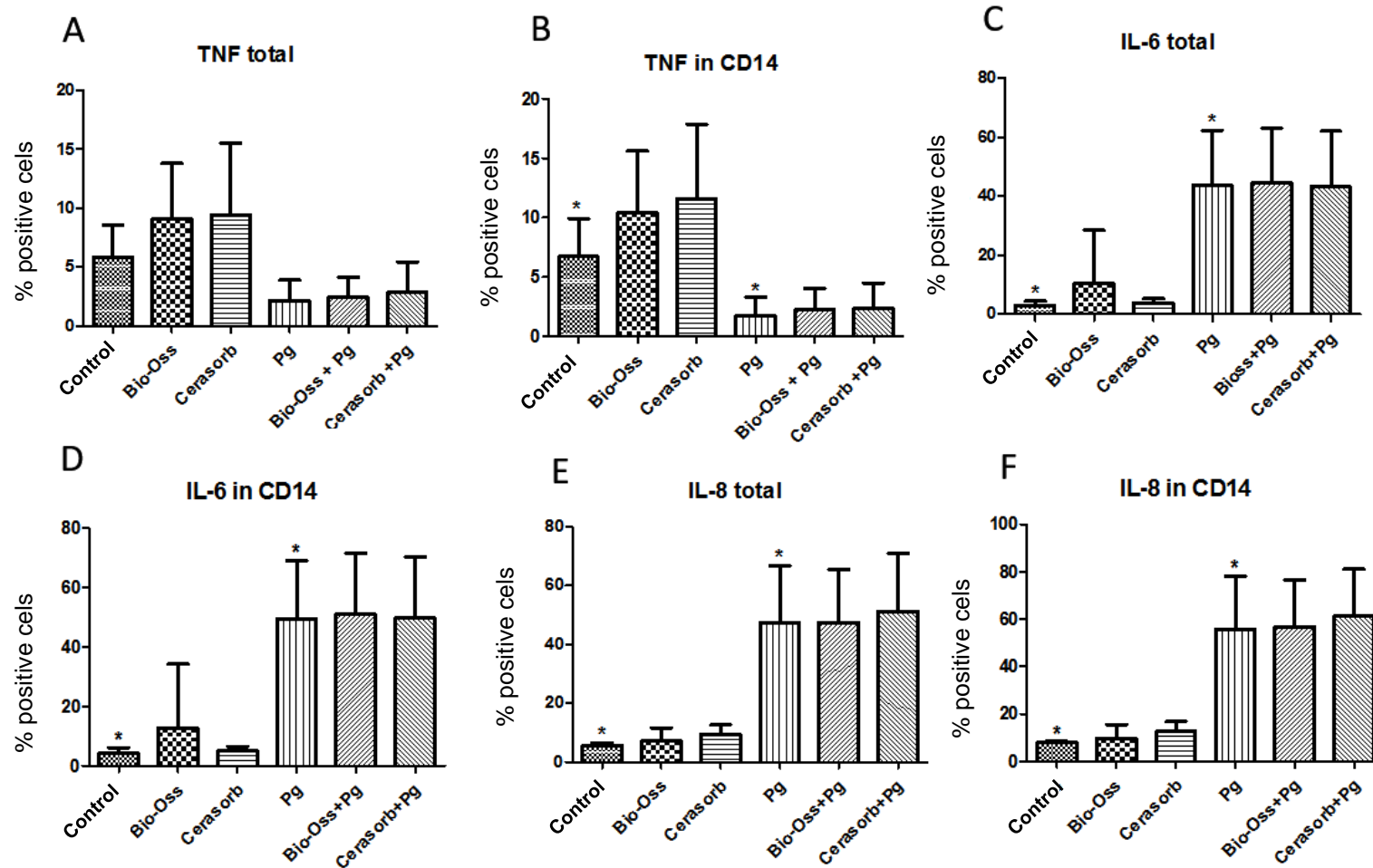


FIGURE 1. Cytokines in total monocytes and CD14 + monocytes. After 20 hours of incubation, there was no significant differences in total monocytes frequencies (A, C, E) or CD14 + monocytes (B, D, F) expressing each of the evaluated cytokines. After stimulation with *P. gingivalis*, a significant reduction in the frequency of CD14 + monocytes expressing TNF- α (B) was observed, while there was a significantly increase of the frequencies of total monocytes and monocyte CD14 + expressing IL-6 and IL-8 cytokine (C, D, E, F). Analyzing the frequency of monocytes expressing cytokines between groups of biomaterials, both in the presence and absence of bacterial stimulation, no significant differences were found. * $p < 0.05$.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos estudos sobre biocompatibilidade de materiais odontológicos, incluindo os biomateriais de enxertia óssea, avalia a viabilidade de diferentes tipos celulares e a resposta tecidual por meio da caracterização do infiltrado inflamatório associado. Essa caracterização é importante para determinar a interação tecidual com os materiais. Entretanto, embora os materiais possam não desencadear reações inflamatórias ou citotoxicidade relevantes, estes podem influenciar os processos de comunicação celular, afetando os mecanismos imunoinflamatórios e de renovação tecidual. Nesse sentido, a avaliação da influência dos materiais em concentrações não citotóxicas na expressão de moléculas relacionadas a esses processos torna-se relevante.

Nossos resultados mostraram que Bio-Oss e Cerasorb M Dental não alteraram significativamente as frequências de monócitos expressando citocinas pró- e anti-inflamatórias, envolvidas no processo de remodelação óssea, mesmo em condições infecciosas mimetizadas pela estimulação *in vitro* com *P. gingivalis*. Análises de outras subpopulações leucocitárias e de células mesenquimais quanto ao efeito desses biomateriais podem contribuir para melhor compreensão sobre o efeito dos mesmos nos processos biológicos relacionados à inflamação e reparo tecidual, que ocorrem nos sítios de enxertia.

REFERÊNCIAS

ABU-AMER, Y. et al. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 35, p. 27307-10, Sep 1 2000.

ABUKAWA, H. et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 205-16, viii, Apr 2006.

ABUSHAHBA, F. et al. Effect of grafting materials on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects. An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 4, p. 329-34, Apr 2008.

ADIB-CONQUY, M. et al. Paradoxical priming effects of IL-10 on cytokine production. **International Immunology**, v. 11, n. 5, p. 689-98, May 1999.

AL SAFFAR, N.; REVELL, P. A. Interleukin-1 production by activated macrophages surrounding loosened orthopaedic implants: a potential role in osteolysis. **British Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 4, p. 309-16, Apr 1994.

ALOY-PROSPER, A. et al. The outcome of intraoral onlay block bone grafts on alveolar ridge augmentations: a systematic review. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 20, n. 2, p. e251-8, Mar 2015.

AMERIO, P. et al. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 6, p. 650-5, Jun 2010.

ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 5, p. 433-40, May 2009.

ARAUJO, M. G. et al. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 12, p. 1122-31, Dec 2002.

ARTZI, Z.; NEMCOVSKY, C. E.; TAL, H. Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 21, n. 4, p. 395-405, Aug 2001.

ARTZI, Z. et al. Biomaterial resorption rate and healing site morphology of inorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate in the canine: a 24-month longitudinal histologic study and morphometric analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 19, n. 3, p. 357-68, May-Jun 2004.

ASTI, A. et al. Improved cell growth by Bio-Oss/PLA scaffolds for use as a bone substitute. **Technology and Health Care**, v. 16, n. 6, p. 401-13, 2008.

AVILA-ORTIZ, G. et al. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 10, p. 950-8, Oct 2014.

AXMANN, R. et al. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 9, p. 2747-56, Sep 2009.

AYBAR, B. et al. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 1, p. 119-25, Feb 2004.

AZIZI, A.; MOGHADAM, S. A. A Study on the effect of bio-oss and collagen membrane on the repair of dental socket. **Journal of Isfahan Dental School**, 2009.

BAGGIOLINI, M.; LOETSCHER, P.; MOSER, B. Interleukin-8 and the chemokine family. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 103-8, Feb 1995.

BAHAT, O.; FONTANESI, F. V. Complications of grafting in the atrophic edentulous or partially edentulous jaw. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 21, n. 5, p. 487-95, Oct 2001.

BARON, R. Molecular mechanisms of bone resorption. An update. **Acta Orthopaedica Scandinavica. Supplementum**, v. 266, p. 66-70, Oct 1995.

BECKTOR, J. P.; ISAKSSON, S.; SENNERBY, L. Survival analysis of endosseous implants in grafted and nongrafted edentulous maxillae. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 19, n. 1, p. 107-15, Jan-Feb 2004.

BELLOWS, C. G.; HEERSCHKE, J. N.; AUBIN, J. E. Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. **Bone and Mineral**, v. 17, n. 1, p. 15-29, Apr 1992.

BELOTI, M. M. et al. In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 1, p. 48-54, Jan 2008.

BENKE, D.; OLAH, A.; MOHLER, H. Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content. **Biomaterials**, v. 22, n. 9, p. 1005-12, May 2001.

BERNHARDT, A. et al. Novel ceramic bone replacement material Osbone(R) in a comparative in vitro study with osteoblasts. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 6, p. 651-7, Jun 2011.

BERTOLINI, D. R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, v. 319, n. 6053, p. 516-8, Feb 6-12 1986.

- BLAIR, H. C. How the osteoclast degrades bone. **Bioessays**, v. 20, n. 10, p. 837-46, Oct 1998.
- BOWLER, D.; DYM, H. Bone morphogenic protein: application in implant dentistry. **Dental Clinics of North America**, v. 59, n. 2, p. 493-503, Apr 2015.
- BOYCE, B. F. et al. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. **Laboratory Investigation**, v. 79, n. 2, p. 83-94, Feb 1999.
- BRANDWOOD, A.; NOBLE, K. R.; SCHINDHELM, K. Phagocytosis of carbon particles by macrophages in vitro. **Biomaterials**, v. 13, n. 9, p. 646-8, 1992.
- BREITBART, A. S. et al. Tricalcium phosphate and osteogenin: a bioactive onlay bone graft substitute. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 96, n. 3, p. 699-708, Sep 1995.
- BROWAEYS, H.; BOUVRY, P.; DE BRUYN, H. A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 9, n. 3, p. 166-77, Sep 2007.
- BUSER, D. et al. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. **Clinical Oral Implants Research**, v. 8, n. 3, p. 161-72, Jun 1997.
- CAMUSSI, G. et al. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 1, p. 3-14, Nov 15 1991.
- CANUTO, R. A. et al. Hydroxyapatite paste Ostim, without elevation of full-thickness flaps, improves alveolar healing stimulating BMP- and VEGF-mediated signal pathways: an experimental study in humans. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24 Suppl A100, p. 42-8, Aug 2013.
- CARINCI, F. et al. Genetic effects of anorganic bovine bone (Bio-Oss) on osteoblast-like MG63 cells. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 2, p. 154-63, Feb 2006.
- CHAVES, M. D. et al. Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss((R))) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 40, n. 8, p. e315-20, Dec 2012.
- CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 24 Suppl, p. 237-59, 2009.
- CORDARO, L. et al. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 8, p. 796-803, Aug 2008.

CORNELL, C. N. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 591-8, Oct 1999.

CURRAN, J. M.; GALLAGHER, J. A.; HUNT, J. A. The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/macrophage co-culture. **Biomaterials**, v. 26, n. 26, p. 5313-20, Sep 2005.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 81, n. 5, p. 672-6, May 1988.

DE SOUZA, P. E. et al. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 34, n. 5, p. 312-7, May 2005.

DELUDE, R. L. Flow cytometry. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 Suppl, p. S426-8, Dec 2005.

DOROZHKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 41, n. 17, p. 3130-46, Sep 2 2002.

DUARTE CAMPOS, D. F. et al. Two-photon laser scanning microscopy as a useful tool for imaging and evaluating macrophage-, IL-4 activated macrophage- and osteoclast-based in vitro degradation of beta-tricalcium phosphate bone substitute material. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 2, p. 143-52, Feb 2014.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-4, Sep 1 2000.

DUTTENHOEFER, F. et al. Long-term survival of dental implants placed in the grafted maxillary sinus: systematic review and meta-analysis of treatment modalities. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e75357, 2013.

DVORAK, M. M. et al. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5140-5, Apr 6 2004.

EICK, S. et al. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 17, n. 4, p. 201-8, Aug 2002.

FIGUEIREDO, A. et al. Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response. **Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 6, p. 3506-13, Aug 1 2013.

FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3815-22, Dec 1 1991.

- FUKUTA, K. et al. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 3, n. 1, p. 25-9, Jul 1992.
- GALINDO-MORENO, P. et al. Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 8, p. 857-64, Aug 2011.
- GHANAATI, S. et al. Influence of beta-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. **Acta Biomater**, v. 6, n. 12, p. 4476-87, Dec 2010.
- GIBSON, F. C., 3RD; GENCO, C. A. Prevention of Porphyromonas gingivalis-induced oral bone loss following immunization with gingipain R1. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7959-63, Dec 2001.
- GONZALEZ, O.; SMITH, R. L.; GOODMAN, S. B. Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, n. 4, p. 463-73, Apr 1996.
- GOODMAN, S. B. et al. Loosening and osteolysis of cemented joint arthroplasties. A biologic spectrum. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 337, p. 149-63, Apr 1997.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews: Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003.
- GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A. et al. Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2361-9, May 2005.
- GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1585-91, Aug 2008.
- GREENWALD, A. S. et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. **The Journal Of Bone And Joint Surgery. American Volume**, v. 83-A Suppl 2 Pt 2, p. 98-103, 2001.
- HALLMAN, M.; LUNDGREN, S.; SENNERBY, L. Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 3, n. 2, p. 87-96, 2001.
- HANDSCHEL, J. et al. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. **Head & Face Medicine**, v. 5, p. 12, 2009.
- HARADA, Y. et al. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages

in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 31, n. 1, p. 19-26, May 1996.

HASHEMI, H. M.; BESHKAR, M. Bacterial contamination of autogenous bone collected by rongeur compared with that collected by bone filter during implant surgery. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 49, n. 6, p. 474-7, Sep 2011.

HORCH, H. H. et al. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, n. 8, p. 708-13, Aug 2006.

HORWOOD, N. J. et al. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 3, p. 595-603, Feb 1 1998.

HOURI-HADDAD, Y. et al. IL-10 gene transfer attenuates *P. gingivalis*-induced inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 6, p. 560-4, Jun 2007.

HUGHES, F. J. et al. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. **Endocrinology**, v. 136, n. 6, p. 2671-7, Jun 1995.

ILIZAROV, G. A. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 238, p. 249-81, Jan 1989.

JAFFE, W. L.; SCOTT, D. F. Total hip arthroplasty with hydroxyapatite-coated prostheses. **Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)**, v. 78, n. 12, p. 1918-34, Dec 1996.

JIA, R. et al. Periodontal pathogen accelerates lipid peroxidation and atherosclerosis. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 3, p. 247-52, Mar 2013.

JIRANEK, W. A. et al. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization. **Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)**, v. 75, n. 6, p. 863-79, Jun 1993.

KAJI, K. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced osteoclastogenesis requires tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 9, p. 1593-9, Sep 2001.

KELLER, J. et al. Divergent resorbability and effects on osteoclast formation of commonly used bone substitutes in a human in vitro-assay. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e46757, 2012.

KINANE, J. A. et al. Porphyromonas gingivalis influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 1085-96, Jul 2012.

KIRKPATRICK, C. J. et al. Current trends in biocompatibility testing. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 212, n. 2, p. 75-84, 1998.

KNABE, C. et al. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 3, p. 498-508, Dec 5 2000.

KNOP, C. et al. Successful posterior interlaminar fusion at the thoracic spine by sole use of beta-tricalcium phosphate. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 126, n. 3, p. 204-10, Apr 2006.

KNOTHE TATE, M. L. et al. The osteocyte. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 1-8, Jan 2004.

KOEPP, H. E. et al. Biocompatibility and osseointegration of beta-TCP: histomorphological and biomechanical studies in a weight-bearing sheep model. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 70, n. 2, p. 209-17, Aug 15 2004.

KONTTINEN, Y. T. et al. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 26, n. 2, p. 135-41, Apr 2006.

KUBLER, A. et al. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. **Implant Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 171-9, Jun 2004.

KURIHARA, N. et al. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 11, p. 4226-30, Jun 1 1990.

KURZ, L. T.; GARFIN, S. R.; BOOTH, R. E., JR. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 14, n. 12, p. 1324-31, Dec 1989.

LAM, J. et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1481-8, Dec 2000.

LAMAZZA, L. et al. The use of etanercept as a non-surgical treatment for temporomandibular joint psoriatic arthritis: a case report. **Australian Dental Journal**, v. 54, n. 2, p. 161-5, Jun 2009.

LANGE, T. et al. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5312-8, Oct 2009.

LANGE, T. et al. Size dependent induction of proinflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalciumphosphate in vitro. **Biomaterials**, v. 32, n. 17, p. 4067-75, Jun 2011.

LAQUERRIERE, P. et al. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 16, p. 2739-47, Jul 2003.

LEBRE, M. C.; TAK, P. P. Dendritic cell subsets: their roles in rheumatoid arthritis. **Acta Reumatol Port**, v. 33, n. 1, p. 35-45, Jan-Mar 2008.

LEKHOLM, U. et al. Oral implants in combination with bone grafts. A 3-year retrospective multicenter study using the Branemark implant system. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 28, n. 3, p. 181-7, Jun 1999.

LIANG, S. et al. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 869-77, Jan 15 2011.

LIU, D.; YAO, S.; WISE, G. E. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, n. 1, p. 42-9, Feb 2006.

LIU, R. K. et al. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 11, p. 1545-53, Nov 2001.

LU, J. et al. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, n. 4, p. 408-12, 2002.

MAIORANA, C. et al. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: preliminary clinical and histologic evaluations. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 23, n. 3, p. 227-35, Jun 2003.

MARKEL, D. C. et al. Characterization of the inflammatory response to four commercial bone graft substitutes using a murine biocompatibility model. **Journal of Inflammation Research**, v. 5, p. 13-8, 2012.

MARTINEZ, A. et al. Deproteinated bovine bone vs. beta-tricalcium phosphate as bone graft substitutes: histomorphometric longitudinal study in the rabbit cranial vault. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, n. 6, p. 623-32, Jun 2015.

MATSUSHIMA, A. et al. In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate. **Artificial Organs**, v. 33, n. 6, p. 474-81, Jun 2009.

MCNALLY, A. K.; ANDERSON, J. M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of

macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. **American Journal of Pathology**, v. 147, n. 5, p. 1487-99, Nov 1995.

MERTEN, H. A. et al. Intraindividual comparative animal study of alpha- and beta-tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 12, n. 1, p. 59-68, Jan 2001.

MORDENFELD, A. et al. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 9, p. 961-70, Sep 2010.

NAITO, Y. et al. Locally applied TCP inhibits tumor growth via possible activation of macrophages. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92, n. 2, p. 542-7, Feb 2010.

NARAYAN, S. et al. Octacalcium phosphate crystals induce inflammation in vivo through interleukin-1 but independent of the NLRP3 inflammasome in mice. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 2, p. 422-33, Feb 2011.

NARY FILHO, H. et al. Autogenous bone grafts contamination after exposure to the oral cavity. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 25, n. 2, p. 412-4, Mar 2014.

NEWMAN, M. G.; CARRANZA, F. A. **Periodontia Clinica**. ELSEVIER (MEDICINA), 2007.

NKENKE, E.; STELZLE, F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20 Suppl 4, p. 124-33, Sep 2009.

O'GARRA, A. et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, p. 114-31, Jun 2008.

PALMIERI, A. et al. Anorganic bovine bone (Bio-Oss) regulates miRNA of osteoblast-like cells. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 30, n. 1, p. 83-7, Feb 2010.

PATIL, C. S. et al. Targeting mRNA stability arrests inflammatory bone loss. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 10, p. 1657-64, Oct 2008.

PESCE, P. et al. Peri-implantitis: a systematic review of recently published papers. **International Journal of Prosthodontics**, v. 27, n. 1, p. 15-25, Jan-Feb 2014.

PIATTELLI, M. et al. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, n. 6, p. 835-40, Nov-Dec 1999.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2010, p. 327417, 2010.

QUINN, J. M. et al. IL-23 inhibits osteoclastogenesis indirectly through lymphocytes and is required for the maintenance of bone mass in mice. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 8, p. 5720-9, Oct 15 2008.

RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **American Journal of Surgery**, v. 183, n. 3, p. 268-73, Mar 2002.

RAMAN, R.; PAPE, H. C.; GIANNOUDIS, P. V. Cytokines in orthopaedic practice: a review. **Current Orthopaedics**, v. 17, n. 5, p. 378-385, 2003.

REDDI, A. H.; WIENTROUB, S.; MUTHUKUMARAN, N. Biologic principles of bone induction. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 207-12, Apr 1987.

RIVOLLIER, A. et al. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. **Blood**, v. 104, n. 13, p. 4029-37, Dec 15 2004.

SANCHEZ, C. J., JR. et al. Staphylococcus aureus biofilms decrease osteoblast viability, inhibits osteogenic differentiation, and increases bone resorption in vitro. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 14, p. 187, 2013.

SANDROS, J. et al. Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 10, p. 1808-14, Oct 2000.

SARTORI, S. et al. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 3, p. 369-72, Jun 2003.

SCHERES, N. et al. Diverse effects of Porphyromonas gingivalis on human osteoclast formation. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 3, p. 149-55, Sep 2011.

SCHETT, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 41, n. 12, p. 1361-6, Dec 2011.

SCHILLING, A. F. et al. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 3963-72, Aug 2004.

SCHLEGEL, A. K.; DONATH, K. BIO-OSS--a resorbable bone substitute? **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 8, n. 3-4, p. 201-9, 1998.

SCHLEGEL, K. A. et al. Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 18, n. 1, p. 53-8, Jan-Feb 2003.

SCHUCKERT, K. H.; JOPP, S.; OSADNIK, M. Modern bone regeneration instead of bone transplantation: a combination of recombinant human bone morphogenetic

protein-2 and platelet-rich plasma for the vertical augmentation of the maxillary bone—a single case report. **Tissue Engineering Part C Method**, v. 16, n. 6, p. 1335-46, Dec 2010.

SCHWARTZ, Z. et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 8, p. 1258-69, Aug 2000.

SEN, M. K.; MICLAU, T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? **Injury**, v. 38 Suppl 1, p. S75-80, Mar 2007.

SIMUNEK, A. et al. Deproteinized bovine bone versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: a comparative histologic and histomorphometric study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 23, n. 5, p. 935-42, Sep-Oct 2008.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**, v. 24, n. 1, p. 99-126, 2000.

SOUTAR, D. S.; MCGREGOR, I. A. The radial forearm flap in intraoral reconstruction: the experience of 60 consecutive cases. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 78, n. 1, p. 1-8, Jul 1986.

SPECTOR, M. Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 21, n. 3, p. 437-44, Jul 1994.

STERLING, H.; SAGINARIO, C.; VIGNERY, A. CD44 occupancy prevents macrophage multinucleation. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 3, p. 837-47, Nov 2 1998.

STEVENS, B. et al. A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 85, n. 2, p. 573-82, May 2008.

TADJOEDIN, E. S. et al. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 3, p. 261-70, Mar 2003.

TAGUCHI, Y. et al. Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 110, n. 6, p. 559-74, Nov-Dec 1998.

TAI, S. et al. Characterization of beta-tricalcium phosphate as a novel immunomodulator. **International Immunopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 45-51, Mar 2014.

TAKAHASHI, K. et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 65, n. 2, p. 147-53, Feb 1994.

TAKEICHI, M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. **Journal of Cell Biology**, v. 75, n. 2 Pt 1, p. 464-74, Nov 1977.

TAMURA, T. et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11924-8, Dec 15 1993.

TANI-ISHII, N. et al. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 alpha and TNF alpha. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 10, p. 1617-23, Oct 1999.

TRAMPUZ, A.; ZIMMERLI, W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. **Injury**, v. 37 Suppl 2, p. S59-66, May 2006.

TRENTZ, O. A. et al. [Response of osteoblast cultures to titanium, steel and hydroxyapatite implants]. **Swiss Surgery**, n. 4, p. 203-9, 1998.

TRINDADE, M. C. et al. Interleukin-10 inhibits polymethylmethacrylate particle induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release by human monocyte/macrophages in vitro. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2067-73, Aug 2001.

TURHANI, D. et al. Invitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 5, p. 543-50, Jul 2005.

VAES, G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 231, p. 239-71, Jun 1988.

WARD, S. G.; WESTWICK, J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. **Biochemical Journal**, v. 333 (Pt 3), p. 457-70, Aug 1 1998.

WESTACOTT, C. I.; SHARIF, M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 25, n. 4, p. 254-72, Feb 1996.

WIEDMANN-AL-AHMAD, M. et al. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 1, p. 57-66, Jan 2005.

WOZNEY, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, n. 2, p. 160-7, Jun 1992.

XIA, Z. et al. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4557-65, Sep 2006.

XIN, R. et al. A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6477-6486, 11// 2005.

- XU, L. X. et al. Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. **Journal of Cellular Physiology**, v. 165, n. 3, p. 624-9, Dec 1995.
- YEE, M. et al. Porphyromonas gingivalis stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GSM-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells. **Anaerobe**, v. 28, p. 62-7, Aug 2014.
- YILDIRIM, M. et al. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. **Clinical Oral Implants Research**, v. 11, n. 3, p. 217-29, Jun 2000.
- YOSHITAKE, F. et al. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 17, p. 11535-40, Apr 25 2008.
- YOU, T.-M. et al. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 103, n. 4, p. e8-e12, 4// 2007.
- YOU, T. M. et al. The effect of platelet-rich plasma on bone healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss: a pilot study in the dog tibia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 103, n. 4, p. e8-12, Apr 2007.
- ZERBO, I. R. et al. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. **Biomaterials**, v. 26, n. 12, p. 1445-51, Apr 2005.
- ZERBO, I. R. et al. Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 6, p. 724-32, Dec 2004.
- ZHANG, Q.; CHEN, B. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. v. 2014, p. 284836, 2014.
- ZHANG, Z. et al. Cell-based resorption assays for bone graft substitutes. **Acta Biomater**, v. 8, n. 1, p. 13-9, Jan 2012.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de materiais para enxerto ósseo na expressão de mediadores associados à remodelação óssea em leucócitos humanos

Pesquisador: Martinho Campolina Rebello Horta

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42680115.6.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.010.535

Data da Relatoria: 25/03/2015

Apresentação do Projeto:

Frequentemente, o cirurgião-dentista que atua na área de reabilitação oral se depara com situações de atrofia do rebordo alveolar, causada principalmente pelo edentulismo, dificultando a ancoragem dos implantes dentais. Para favorecer a instalação destes dispositivos, o profissional lança mão de diversas técnicas para reconstrução óssea, e existem diversas opções de materiais alternativos ao enxerto autógeno. O conhecimento

dos mecanismos moleculares e celulares da fisiologia óssea e do processo de remodelação óssea (osteogênese e osteoclastogênese) associado à utilização desses biomateriais é de suma importância para a sua adequada utilização.

Objetivo da Pesquisa:

o objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar in vitro o efeito dos materiais para enxerto ósseo Geistlich Bio-Oss® e Cerasorb® na expressão de mediadores associados à remodelação óssea em células mononucleares humanas. Fragmentos de cada um dos materiais serão incubados com meio de cultura (serão coletados 20mL de sangue de quinze doadores voluntários saudáveis), e adicionado a células mononucleares de sangue periférico humano previamente estimuladas com LPS de Porphiromonas gingivalis.

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br

Continuação do Parecer: 1.010.535

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Durante a coleta de sangue pode haver pequeno desconforto e é possível que ocorra um hematoma na área, o que é minimizado por meio de compressão com algodão, após punção, por cerca de 1 a 3 minutos. A coleta será feita na PUC, por uma enfermeira devidamente capacitada.

Benefícios: Não haverá benefício direto algum para os indivíduos participantes. Os resultados obtidos com esta pesquisa podem contribuir para a melhor compreensão sobre a interação entre biomateriais utilizados para enxerto ósseo nos maxilares e células imunocompetentes presentes nos sítios cirúrgicos, e seus possíveis efeitos na produção de mediadores moleculares envolvidos nos processos de combate à microorganismos, reparo tecidual e osseointegração de implantes dentários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico CEP: 30.535-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 Fax: (31)3319-4517 E-mail: cep.proppg@pucminas.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



Continuação do Parecer: 1.010.535

BELO HORIZONTE, 05 de Abril de 2015

Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico CEP: 30.535-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 Fax: (31)3319-4517 E-mail: cep.proppg@pucminas.br