

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

Alice de Araújo Ferreira Silva

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE COLÁGENO E USO DE
CORTICOIDE TÓPICO SOBRE O POTENCIAL MINERALIZADOR DAS CÉLULAS
PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS MC3T3 CULTIVADAS ASSOCIADAS A DIFERENTES
HIDROXIAPATITAS XENÓGENAS**

Belo Horizonte
2018

Alice de Araújo Ferreira Silva

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE COLÁGENO E USO DE
CORTICOIDE TÓPICO SOBRE O POTENCIAL MINERALIZADOR DAS CÉLULAS
PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS MC3T3 CULTIVADAS ASSOCIADAS A DIFERENTES
HIDROXIAPATITAS XENÓGENAS**

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 em Implantodontia.

Linha de Pesquisa: Propriedades biomecânicas, físico-químicas e biocompatibilidade dos biomateriais e materiais odontológicos.

Orientador: Prof. Dr. Elton Gonçalves Zenóbio

Coorientadora: Profa. Dra. Ivana Márcia Alves Diniz

Belo Horizonte

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

S586a Silva, Alice de Araújo Ferreira
Avaliação do efeito da membrana de colágeno e uso de corticoide tópico sobre o potencial mineralizador das células pré-osteoblásticas MC3T3 cultivadas associadas a diferentes hidroxiapatitas xenógenas / Alice de Araújo Ferreira Silva. Belo Horizonte, 2018.
71 f.: il.

Orientador: Elton Gonçalves Zenóbio
Coorientadora: Ivana Márcia Alves Diniz
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Implantes dentários. 2. Colágeno. 3. Osteoblastos. 4. Materiais biomédicos. 5. Odontologia - Cirurgia. 6. Transplante ósseo. I. Zenóbio, Elton Gonçalves. II. Diniz, Ivana Márcia Alves. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314-089.23

Ficha catalográfica elaborada por Rogério da Silva Marques - CRB 6/2663

Alice de Araújo Ferreira Silva

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MEMBRANA DE COLÁGENO E USO DE CORTICOIDE TÓPICO SOBRE O POTENCIAL MINERALIZADOR DAS CÉLULAS PRÉ-OSTEOBLÁSTICAS MC3T3 CULTIVADAS ASSOCIADAS A DIFERENTES HIDROXIAPATITAS XENÓGENAS

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. Soraia Macari – UFMG
- 2- Prof. Dr. Maurício Greco Cosso – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Élton Gonçalves Zenóbio – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 29 de agosto de 2018

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Élton Gonçalves Zenóbio
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

*Dedico este trabalho aos meus pais,
sempre com carinho e
apoio em todos os meus passos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Eduardo, por aturar minhas angústias e alegrias e me encorajar sempre.

Meus irmãos, Matheus e Júlia...por serem meus irmãos.

A Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC Minas.

Ao Colegiado de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da PUC Minas, em nome do professor Rodrigo Villamarim. Extensivo às funcionárias, Silvana e Angélica, sempre dispostas a ajudar.

Aos docentes do Mestrado profissionalizante em Implantodontia, pelo grande aprendizado e pela boa convivência, em especial ao professor Paulo Roberto Gomes pela paciência e perseverança em meu aprendizado em prótese.

Ao professor Elton Gonçalves Zenóbio, meu orientador não somente neste trabalho como uma referência em todo o curso.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFMG, Ivana Diniz, Kátia Maltos, Allyson Moreira, Cláudia Silami e Tarcila, que acreditaram no nosso projeto e abriram as portas para que este trabalho pudesse ser executado.

As funcionárias do bloco cirúrgico e demais clínicas, em especial Luzia Vilela por sua grande competência e honestidade.

Aos pacientes que tive oportunidade de atender, sem os quais este caminho estaria incompleto.

Aos companheiros de mestrado, obrigada pelo convívio e pela troca de experiências, em especial a Carolina Nemésio, por acreditar em mim e pela amizade que levarei para a vida.

Ao Davidson Rodarte, pelo profissionalismo, amizade e incentivo para realização deste curso.

RESUMO

Enxertos ósseos são essenciais na terapia com implantes e estes são dependentes da performance biológica dos biomateriais utilizados. Devido às limitações ou morbidade causada pelas técnicas de remoção dos enxertos, o desenvolvimento de substitutos ósseos vem sendo elaborados e melhorados. A budesonida, um glicocorticoide tópico, tem sido empregado no pré e pós-operatório do levantamento de seio maxilar (LSM) visando minimizar a inflamação da mucosa sinusal durante o processo inicial de reparação óssea. O presente estudo procura inferir sobre o comportamento dos biomateriais utilizados na metodologia da regeneração óssea guiada (ROG), assim como no LSM em implantodontia, avaliando o potencial osteogênico de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 Subclone-4 (ATCC®CRL-2593™) cultivadas em contato direto ou indireto (meio condicionado 1% p/v) com duas hidroxiapatitas xenógenas (Bio-Oss® - Geistlich ou BioGen® - Bioteck). Os testes foram realizados associando-se ou não uma membrana de colágeno (Surgidry Dental F®) e um glicocorticoide tópico (budesonida 0,5%). A viabilidade celular foi avaliada nos tempos 48h, 96h e 144h (MTT) e a diferenciação celular avaliada após 14 dias de cultivo celular em meio osteogênico pelos ensaios de vermelho de alizarina e atividade de fosfatase alcalina. As diferenças entre os grupos foram testadas por teste *t* de Student ou ANOVA seguida de comparações entre grupos (Teste de *Tukey*) em nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O plaqueamento direto sobre os biomateriais e a presença da membrana de colágeno dificultou significativamente a proliferação celular. Em meio condicionado, o Bio-Oss® apresentou maior viabilidade celular que o Biogen®, particularmente nos dois últimos tempos experimentais ($p < 0,05$). Sobre a membrana colágena nenhum biomaterial foi capaz de mineralizar significativamente mais que o controle negativo, exceto quando a budesonida foi adicionada ao meio de cultura. Sem a membrana colágena, todos os biomateriais mineralizaram mais que o controle negativo, e a adição de budesonida não melhorou essa resposta. A análise da fosfatase alcalina mostrou que nos grupos cultivados sobre membrana colágena e sem budesonida, tanto Bio-Oss® como Biogen® demonstraram maior produção de fosfatase alcalina que o grupo de células cultivadas em meio condicionado regular. Nos grupos com budesonida, a adição do glicocorticoide só melhorou a produção de fosfatase

alcalina no grupo BioGen® sem membrana ($p < 0,05$). Conclui-se que o meio condicionado com biomateriais se mostrou uma técnica eficaz para avaliar funções celulares em resposta a biomateriais apresentados na forma de pó. Bio-Oss® e Biogen® mostraram nenhuma ou pouca citotoxicidade, respectivamente. A presença da membrana colágena dificultou a proliferação celular em todos os grupos. Entretanto, ambos os biomateriais apresentaram mais mineralização quando cultivados sobre a membrana. Finalmente, a adição de budesonida teve influência limitada na indução de maior quantidade de diferenciação celular.

Palavras-chave: Células MC3T3-E1. Hidroxiapatitas xenógenas. Colágeno. Tecido osseo. Glicocorticoide.

ABSTRACT

Bone grafts are essential in implant therapy and these are dependent on the biological performance of the biomaterials used, due to the limitations or morbidity caused by graft removal techniques, the development of bone substitutes has been elaborated and improved. Budesonide, a topical glucocorticoid, has been used in the pre and postoperative time of the maxillary sinus lift (MSL) in order to minimize inflammation of the sinus mucosa during the initial bone repair process. The present study seeks to infer the behavior of two biomaterials used in guided bone regeneration (GBR) methodology as well as MSL in implantology, evaluating the osteogenic potential of pre osteoblastic cells, MC3T3-E1 Subclone-4 (ATCC®CRL-2593™), cultured in direct or indirect contact (conditioned medium 1% w/v) with to xenogenic hydroxiapatites (Bio-Oss® - Geistlich or BioGen® - Bioteck). The tests were performed with or without a collagen membrane (Surgidry Dental F®), and a topical glucocorticoid (budesonide 0.5%). The cell viability was evaluated at 48h, 96h and 144h (MTT) and the cell differentiation evaluated after 14 days of cell cultured in osteogenic medium by alizarin red and alkaline phosphatase activity. Differences between groups were tested by Student's t test or ANOVA followed by comparisons between groups (*Tukey's test*) at a significance level of 5% ($p < 0.05$) for statistical analysis. Direct plating on biomaterials and the presence of collagen membrane made cell proliferation significantly more difficult. In conditioned medium, Bio-Oss® presented a greater cell viability than BioGen®, particularly in the last two experimental times ($p < 0.05$). On the collagen membrane, no biomaterial was able to mineralize significantly more than the negative control, except when budesonide was added to the culture medium. Without the collagen membrane, all biomaterials mineralized more than the negative control, and the addition of budesonid did not improve this response. The alkaline phosphatase analysis showed that in the groups cultured in conditioned osteogenic medium, with membrane and without budesonid, Bio-Oss® and BioGen® demonstrated higher alkaline phosphatase production then the groups of cells grown in regular conditioned medium. In the budesonide groups, addition of glucocorticoid only improved alkaline phosphatase production in the BioGen® group without membrane ($p < 0.05$). Concluding that conditioned medium with biomaterials proved to be an effective technique to evaluate cellular functions in response to biomaterials presented as powder. Bio-Oss® and Biogen® showed no

or low cytotoxicity respectively. The presence of the collagen membrane impaired cell proliferation in all groups. However, both biomaterials showed more mineralization when grown on the membrane. Lastly, the addition of budesonid had limited influence on the induction of greater amount of cell differentiation.

Keywords: MC3T3 - E1 cells. Xenogenic hidroxiapatites. Collagen. Bone tissue. Glicocorticoide.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM	Minimum Essential Medium (Meio Essencial Mínimo)
BG	Biogen®
BGM	Biogen® (direto ou condicionado) com membrana no fundo do poço
BGS	Biogen® (direto ou condicionado) sem membrana
BGR	Biogen® (condicionado) em meio regular
BO	Bio-Oss®
BOM	Bio-Oss® com membrana no fundo do poço
BOS	Bio-Oss® sem membrana
BOR	Bio-Oss® (condicionado) em meio regular
BUD	Budesonida
FA	Fosfatase alcalina
FBS	Soro Fetal Bovino
HA	Hidroxiapatita
IC	Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória)
LSM	Levantamento de seio maxilar
M	Membrana no fundo do poço
MC3T3-E1	Linhagem contínua comercial de células pré-osteoblásticas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MR	Membrana em meio regular
MTT	Metiltetrazólio (ensaio de viabilidade)
ROG	Regeneração óssea guiada
S	Sem membrana
SR	Sem membrana e meio regular (= controle negativo)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Hidroxiapatitas xenógenas.....	21
1.1.1 Bio-Oss®.....	22
1.1.2 Bio-Gen®.....	23
1.2 Pré-osteoblasto e osteoblasto	24
1.3 Membrana de colágeno.....	24
1.3.1 Surgidry Dental F	25
1.4 Budesonida.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Cultivo celular.....	29
3.2 Delineamento do estudo.....	29
3.3 Determinação da dose de glicocorticoide.....	31
3.4 Análise da viabilidade/proliferação (MTT).....	32
3.5 Análise de diferenciação pela marcação de matriz extracelular mineralizada (Vermelho de Alizarina)	33
3.6 Análise de diferenciação pela quantificação da atividade de Fosfatase Alcalina	33
3.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	34
3.8 Análise estatística	34
4 ARTIGO CIENTÍFICO	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO A – Viabilidade/proliferação celular das células pré osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas diretamente sobre as hidroxiapatitas xenógenas.....	71

1 INTRODUÇÃO

O procedimento de levantamento de seio maxilar usando osso autógeno foi considerado o padrão de referência para reabilitação dos casos de atrofia maxilar severa, devido às limitações ou morbidade causada pelas técnicas de remoção dos enxertos, o desenvolvimento de substitutos ósseos, vem sendo elaborados e melhorados (CARDOSO et al., 2016). Neste contexto, os biomateriais heterólogos são usados com alternativa ao osso autógeno (LUDOVICHETTI et al., 2011).

Os enxertos ósseos são essenciais na terapia com implantes e estes são dependentes da performance biológica dos biomateriais utilizados (ASTAKHOVA et al., 2018; YAMADA; EGUSA, 2018). A fonte mais comum dos enxertos xenógenos é a bovina. Como alternativa, materiais de origem suína ou equina também têm sido usados, e demonstram habilidade em induzir a diferenciação osteoblástica das células tronco advindas da medula óssea do sítio receptor (ARTESE et al., 2011).

Estudos de cultura celular são um meio eficaz de avaliar como as células osteoblásticas interagem com biomateriais (AÇIL et al., 2002). Atualmente, a maioria destes estudos utilizam linhas celulares osteogênicas para avaliar as interações celulares, avaliando os substitutos ósseos por meio das células-alvo *in vitro* (AYOBIAN-MARKAZI; FOUROOTAN; KHARAZIFAR, 2012).

1.1 Hidroxiapatitas xenógenas

Wiedmann-Al-Ahmad et al. (2005) realizaram um estudo de cultura celular 2D com células tipo osteoblásticas humanas cultivadas sobre 16 tipos de biomateriais divididos em 5 grupos: membranas de colágeno de origem bovina, equina ou bezerro; à base de tricalcio fosfato (alfa e beta); à base de ácido hialurônico; osso bovino inorgânico; e membranas anorgânicas à base de silicone. Avaliaram proliferação e colonização celular por meio de microscopia eletrônica de varredura. Observaram melhor taxa de proliferação e densidade celular nas membranas de colágeno, de ácido hialurônico associado à carboximetilcelulose e membrana de silicone de base inorgânica comparadas ao grupo controle, sugerindo que estas membranas são ótimas opções para regeneração óssea. Em contraste tiveram resultados inferiores com membrana de osso bovino inorgânico, com baixa taxa de proliferação celular e associaram isso à superfície lisa deste biomaterial.

Sanz e Vignoletti (2015) revisaram resultados clínicos e histológicos do uso de substitutos ósseos em diferentes áreas em relação à regeneração óssea: preservação alveolar, implante imediato, aumento ósseo lateral e vertical. Como resultados observaram que o uso de osso bovino desproteínizado parece ter efetividade na maior parte das indicações clínicas, devido sua capacidade de osteocondução, características de manutenção do espaço e reabsorção lenta.

1.1.1 Bio-Oss®

Geistlich Bio-Oss® é o substituto ósseo de origem bovina, esterilizado, com 75% a 80% de porosidade, com aproximadamente 10 nm de diâmetro. Este biomaterial demonstrou alta biocompatibilidade com o tecido bucal em animais e humanos, e cumpre o critério de ser osteocondutivo, conduzindo a uma regeneração óssea previsível e eficiente (GEISTLICH PHARMA, 2018).

Bio-Oss® se trata de hidroxiapatita xenógena de origem bovina, inorgânico esponjoso em grânulos reconhecido pelo Ministério da Saúde, registro na ANVISA 806969930002 (DENISSEN; DE GROOT, 1980; MAIORANA et al., 2005).

Traini et al. (2007) em um estudo histológico e histomorfométrico de osso bovino inorgânico removido 9 anos após enxerto em seio maxilar e observaram partículas de enxerto no espécime removido em contato íntimo ao osso neoformado, que se mostrou com diferentes estágios de maturação óssea e numerosos osteócitos. Evidenciaram alto poder de osteocondução do osso bovino inorgânico.

Açil et al. (2002) realizaram estudo de cultura de osteoblastos humanos cultivados sobre blocos de diferentes biomateriais, Bio-Oss®, Tutoplast® e PepGen® p-15, realizaram também grupos com estimulação com rhBMP-7 sobre os biomateriais e mostraram bons resultados no cultivo de osteoblastos primários sobre Bio-Oss®.

Mladenovic et al. (2013) realizaram um estudo experimental *in vitro* sobre a interface do Bio-Oss®, testado em 3 diferentes fontes celulares (células primárias advindas da medula de rato, primárias de calvária de rato e pré-osteoblásticas MC3T3-E1). Observaram que a expressão da mineralização foi semelhante nos 3 tipos de célula, e que a concentração da biomaterial foi um fator chave para os experimentos *in vitro* podendo, inclusive, ser correlacionados com a clínica.

1.1.2 Bio-Gen®

O substituto ósseo Biogen® é obtido a partir do tecido ósseo equino por meio de um exclusivo processo de desantigenização físico-químico. O uso de enzimas digestivas à temperatura fisiológica (37°C) permite a eliminação completa do componente antigênico do tecido sem que o componente mineral sofra quaisquer alterações. O substituto ósseo, passa por um processo de remodelação total, sendo substituído completamente por osso endógeno em tempos fisiológicos. Se caracteriza por um enxerto ósseo equino inorgânico esponjoso em grânulos, reconhecido pelo Ministério da Saúde, registro na ANVISA 10349760020 (LOHCUS HEALTH TECHNOLOGY, 2018).

Nevins et al. (2013) examinaram o potencial de regeneração óssea de uma matriz mineral derivado de osso equino, para elevação de seio maxilar com o intuito de reabilitar região posterior de maxila em uma série de casos. Foram selecionados 10 pacientes com 12 elevações de seio maxilar. Resultados histológicos após 6 meses demonstraram grande quantidade de osso vital neoformado em íntimo contato com as partículas residuais do enxerto. Uma média de 23.4% de neoformação óssea foi avaliada após 6 meses. Resultados qualitativos e quantitativos desta série de casos sugerem regeneração óssea comparável a enxertos derivados de osso bovino no tempo de 6 meses.

Pistilli et al. (2013) em um relato de caso utilizando de blocos de osso equino para elevação de assoalho de seio maxilar bilateral, por meio de resultados histológicos de amostras removidas 8 meses pós-enxertia. Evidenciaram que o osso ainda estava em processo de remodelação, áreas de neoformação óssea e osteoclastos foram observados. Concluíram que osso equino livre de antígenos foi biocompatível e a reabsorção foi mínima. Este material parece oferecer excelente potencial para ser incorporado em procedimentos que necessitem aumento da largura da crista óssea alveolar.

Em um estudo *in vitro* comparando duas hidroxiapatitas xenógenas (Colloss® e Colloss-E®) de origens bovina e equina testadas em células-tronco de medula óssea humana em relação a diferenciação osteogênica, El-Sabban et al. (2007) observaram que os dois tipos de hidroxiapatitas induzem diferenciação osteoblástica

das células. Segundo os autores, isso fornece uma fonte segura, barata e prontamente disponível de materiais de enxerto osteocondutor.

1.2 Pré-osteoblasto e osteoblasto

Os osteoblastos, osteócitos e células de revestimento encontram-se localizados a nível da camada interna do perióstio e da medula óssea (WALLER et al., 1995). Estas células são responsáveis pela formação do tecido ósseo, durante o desenvolvimento embrionário, crescimento e remodelação, mesmo quando induzido experimentalmente (CABRAL, 2004).

Cultura de osteoblastos são utilizados para estudar os mecanismos de formação e reabsorção óssea (ASTAKHOVA et al., 2018). Os osteoblastos respondem às características microarquitetônicas de seu substrato. Em culturas de monocamadas (2D), as células se ligam e proliferam, mas exibem uma expressão relativamente baixa de marcadores de diferenciação, mesmo quando confluentes. (BOYAN et al., 2003).

Kato et al. (2018) realizaram um estudo com células pré osteoblásticas MC3T3-E1 sobre hidroxiapatitas adsorvidas com polifosfato inorgânico. Relataram que a adição de polifosfato a hidroxiapatita tem efeito inibitório na adesão dos osteoblastos, em contraste, a diferenciação osteoblástica do pré-osteoblasto foi promovida nesta superfície.

1.3 Membrana de colágeno

Característica importante de uma membrana é rigidez suficiente para evitar flacidez e deformação na área de reparo, permitindo a manutenção do volume de coágulo sanguíneo subjacente à formação óssea, mas que sejam permeáveis, permitindo a passagem de macromoléculas para fornecer nutrição para o reparo tecidual abaixo da membrana (DE SANTANA et al., 2010).

1.3.1 Surgidry Dental F

Surgidry Dental F®, segundo seu fabricante (Technodry), é uma matriz orgânica de colágeno tipo I polimerizado e purificado. O colágeno é uma proteína fibrosa relativamente solúvel em água e constituída por cadeias de polipeptídios. A unidade essencial de colágeno está constituída por três cadeias de polipeptídios entrelaçadas formando uma hélice tripla constituindo uma unidade macromolecular chamada tropocolágeno, que se agrupam entre si formando fibrilas que se unem para formar fibras colágenas que, por sua vez se agrupam, em conjuntos, para formar feixes. O filme de colágeno resultante do processo de manufatura é um produto altamente purificado de comprovada biocompatibilidade, estéril e apirogênico (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018).

A Surgidry Dental F® pode ser usada como barreira ou cobertura nos procedimentos cirúrgicos. Sob registro ANVISA 80190460007 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018).

Zenóbio et al. (2018) realizaram análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura em 3 membranas de colágeno de diferentes materiais e origens, sendo 2 membranas de colágeno tipo I de origem bovina e 1 membrana de colágeno tipos I e III de origem suína para correlacionar a arquitetura de superfície e composição química destas membranas como barreira biocompatível. Não foi observado poros nas membranas, o que é desejável, para evitar invasão celular. Concluíram que os diferentes tipos de membranas de colágeno reabsorvíveis apresentam diferentes morfologias e composição química, o que poderia levar a diferenças no modo e tempo de reabsorção das membranas utilizadas para procedimentos de regeneração tecidual guiada.

1.4 Budesonida

Indicada no tratamento de rinosinusite e pólipos nasais, consiste em um glicocorticóide não-halogenado, cuja principal propriedade consiste em sua elevada relação entre a potente atividade anti-inflamatória direto na membrana sinusal, sendo efetivo na inibição de mediadores inflamatórios e atividade sistêmica muito baixa (LAVIGNE et al., 2002; LIU et al., 2017).

Namkung-Matthäi et al. (1998) realizaram um estudo comparativo dos efeitos de anti-inflamatórios esteroidais, fluticasona, budesonida e dexametasona em osteoblastos de origem humana, utilizaram cultura de células osteoblásticas advindas de osso humano e observaram que a budesonida exerceu uma potência maior comparado a dexametasona.

Pignataro et al. (2008) realizaram um estudo sobre o manejo dos pacientes candidatos a elevação de seio maxilar, relataram a importância da prescrição de medicação preventiva à inflamação e o controle dos sintomas causados pela cirurgia através de antibioticoterapia pré-cirúrgica e corticosteroide tópico no pós-cirúrgico. A budesonida foi a medicação de escolha para controle da reação inflamatória e o retorno do estado de homeostasia da membrana sinusal, devido sua efetividade no tratamento de enfermidades dos seios maxilares e pólipos nasais evidenciada com redução de sintomatologia dolorosa e melhora no fluxo de oxigênio durante trocas gasosas.

Khojasteh et al. (2013) realizaram cultura de células SaOs-2 *in vitro* sobre Bio-Oss® e grupos com adição de dexametasona 10^{-7} M e observaram que tanto o grupo Bio-Oss® como o Bio-Oss® com dexametasona aumentaram o número de células e atividade de fosfatase alcalina.

Namkung-Matthäi et al. (1998) em um estudo comparativo *in vitro* do efeito de corticosteroides anti-inflamatórios (dexametasona, fluticasona e budesonida) em células pré-osteoblásticas humanas. Relataram que corticosteroides induzem terminação precoce da proliferação celular *in vitro*, favorecendo a diferenciação dos osteoblastos.

Baseados nas evidências científicas até o presente momento, este estudo *in vitro*, tem como objetivo, avaliar a proliferação e potencial osteogênico de células progenitoras em contato com biomateriais e membrana de colágeno sob a influência da budesonida sobre estas células.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar substratos de hidroxiapatita de origem sintética, associados ou não a uma membrana de colágeno e glicocorticóide tópico, em culturas de células pré-osteoblásticas de linhagem contínua comercial MC3T3-E1.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar viabilidade/proliferação celular pelo teste MTT;
- b) avaliar a capacidade de formação de matriz extracelular mineralizada com ou sem estimulação exógena, por meio da curva dose-resposta com 10 diluições de budesonida
- c) avaliar a diferenciação celular pela atividade da fosfatase alcalina;
- d) avaliar a diferenciação celular pela marcação da matriz extracelular por meio do teste vermelho de Alizarina;
- e) avaliar a presença de células e a microestrutura dos biomateriais por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

Foi utilizada uma linhagem de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593™) de sexta passagem, cultivada em meio de cultura α -MEM completo (suplementado com 1% de antibiótico (100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (FBS – Gibco, USA) (meio regular), em garrafas de cultivo celular de 75 cm². As células foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e a troca de meio de cultura foi realizada a cada três dias. As células foram mantidas em meio completo regular ou meio completo indutor ou osteogênico, ou seja, meio regular com adição de 180 mM de KH₂PO₄ e 10⁻⁸ M de dexametasona (ambos Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); no caso dos ensaios de diferenciação, trocado a cada 3 dias ao longo dos experimentos, quando as células eram observadas em microscópio invertido (TCM 400, Labomed, Analítica, Brasil).

3.2 Delineamento do estudo

Para todas as condições experimentais, o cultivo celular foi conduzido em triplicata. Foram semeadas 2 x 10⁴ células/poço em quadruplicata em placas de 96 poços. Os materiais utilizados são apresentados no quadro 1.

Quadro 1: Descrição e composição dos biomateriais e medicamentos utilizados

SIGLA	BIOMATERIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO	GRANULAÇÃO
BO	Bio-Oss®	Giestlich Biomaterials®	Hidroxiapatita bovina inorgânica	0.25 mm - 1 mm
BG	Biogen®	Bioteck®	Hidroxiapatita equina deantigenada	500 - 1000 μ m
M	Surgidry Dental F®	TechnoDry Liofilizados Médicos Ltda	Matriz orgânica de colágeno tipo 1 liofilizado (xenógena bovina)	
BUD	BUSONID® Budesonida 32 mcg	Biosintética Farmacêutica Ltda, grupo Aché	Celulose microcristalina, carmelose sódica, glicose, polissorbato 20, edetato dissódico de cálcio di-hidratado, água purificada e ácido clorídrico	

Fonte: Elaborado pela autora

Para as análises de viabilidade as células foram cultivadas diretamente em contato com 0,017 g de grânulos de hidroxiapatita (HA), ou utilizando-se o meio condicionado, mantido em contato com cada hidroxiapatita (0,1 g de HA para 10 ml de meio, ou seja, 1% p/v) por 24 horas à 37°C previamente aos experimentos (TSIGKOU et al., 2009). As condições experimentais para análise de viabilidade estão descritas no quadro 2.

Quadro 2: Determinação dos grupos experimentais para a viabilidade celular

Meio regular								
Controle	Diretamente sobre os biomateriais				Meio condicionado 1% p/v			
	Sem membrana colágena		Com membrana colágena		Sem membrana colágena		Com membrana colágena	
	BO	BG	BO	BG	BO	BG	BO	BG

BO – Bio-Oss®

BG – Biogen®

Fonte: Elaborado pela autora

Para as análises diferenciação celular (fosfatase alcalina e vermelho de alizarina), as células foram testadas utilizando-se apenas a metodologia do meio condicionado, como descrito anteriormente por Tsigkou et al. (2009). Além disso, os grupos também foram testados com acréscimo ou não de budesonida, como descrito no quadro 3. O meio de cultura foi trocado completamente a cada 3 dias.

A diferenciação diretamente sobre o biomaterial não foi realizada, uma vez que o cultivo direto sobre as hidroxiapatitas impediu a proliferação (ANEXO A) e diferenciação celular (resultados não apresentados).

Quadro 3: Determinação dos grupos experimentais para a diferenciação celular

	Meio regular	Meio condicionado Regular		Meio condicionado Indutor			
Sem Budesonida	Controle Negativo	BO regular	BG regular	Controle positivo		Membrana colágena	
				BO	BG	BO*	BG*
Budesonida	Controle Negativo bud	BO regular	BG regular	Controle positivo bud		Membrana colágena	
				BO	BG	BO*	BG*

BO – Bio-Oss®

BG – Biogen®

Controle negativo - apenas células cultivadas com meio completo regular com ou sem budesonida

Controle positivo - apenas células cultivadas com meio completo osteogênico com ou sem budesonida

bud – presença de budesonida

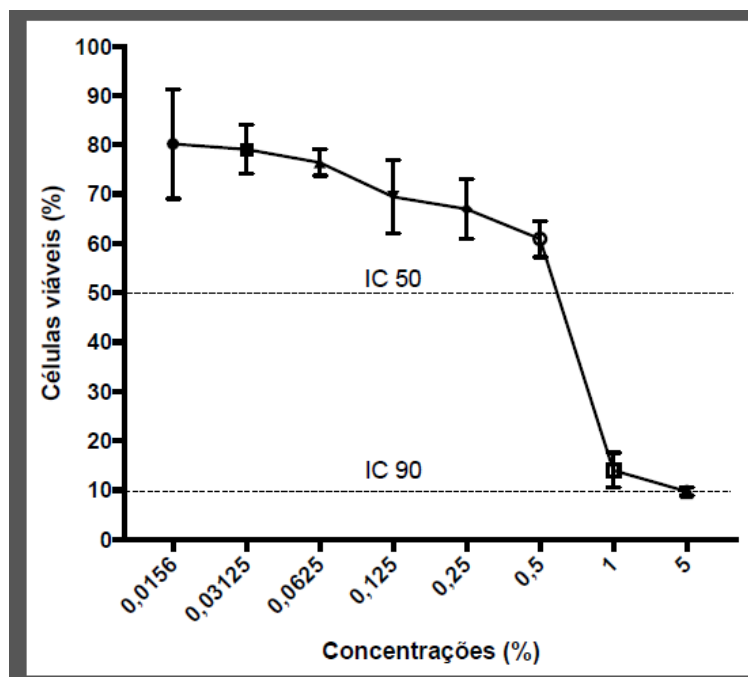
* presença de membrana colágena

Fonte: Elaborado pela autora

Para cada biomaterial, inclusive a membrana de colágeno, foi realizado um grupo experimental sem células, apenas com os corantes utilizados na etapa de preparo, para a determinação dos valores de branco, a serem subtraídos posteriormente nas análises espectrofotométricas.

3.3 Determinação da dose de glicocorticoide

Para a determinação da dose máxima do glicocorticoide tópico budesonida 32 mcg que pudesse ser trabalhada em associação com os biomateriais, ou seja, a dose que preserva acima de 50% de viabilidade celular, foram consideradas 8 diluições, nas seguintes porcentagens: 0,0156, 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,05, 1,0 e 5,0%. A sobrevivência celular se manteve acima de 50% (IC50) até a concentração de 0,5%. Abaixo de 0,5%, o percentual de morte celular aproximou-se 90% (Gráfico 1). Diante desse dado, a concentração de budesonida definida para utilização no estudo foi a de 0,5%, equivalente a 0,8 mcg em cada 125 microlitros de meio de cultura (volume usado no poço de uma microplaca de 96 poços).

Gráfico 1: Curva dose-resposta: avaliação da citotoxicidade da budesonida

IC – Concentração inibitória

Fonte: Resultados da pesquisa

3.4 Análise da viabilidade/proliferação (MTT)

Os padrões de proliferação foram analisados com os dados de viabilidade celular obtidos em 48, 96 e 144 horas através da utilização da análise da atividade mitocondrial das células submetidas ao teste de redução do MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, Invitrogen/Gibco). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um cristal de formazan insolúvel. A solução de MTT foi preparada com 0,05 g do pó de MTT dissolvido em 10 ml de PBS (pH 7,2). No período de cada análise, para cada poço foi adicionado 10 µl da solução de MTT e 90 µl de meio fresco. A placa de cultivo foi mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 4h. Em seguida, a placa foi levada para o microscópio invertido de fase para confirmar a formação dos cristais de formazan. Removida a solução de MTT, foi adicionado 50 µl por poço da solução de DMSO (Sigma Aldrich). O formazan, de cor azul purpúrea, foi solubilizado e sua absorbância foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro Spectra Max 190 (BioTeK®, Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA) com filtro de 540 nm.

As leituras foram realizadas utilizando-se o Software Soft Max (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA).

3.5 Análise de diferenciação pela marcação de matriz extracelular mineralizada (Vermelho de Alizarina)

A formação de nódulos mineralizados após 14 dias de cultivo foi detectada utilizando o ensaio de vermelho de alizarina. Após o período de indução, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS, fixadas com isopropanol a 70%, reidratadas em água destilada e coradas com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich) a 1% (pH 4,2), por 30 min. As culturas foram então lavadas 3 vezes em PBS e deixadas secar. Os poços foram fotografados utilizando leitor de placas de multifunções (Cytation 5, Biotek Multiplate Image Reader, software Gen 5 Image 3.3) no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CAPI, FAOUFMG). Para a análise quantitativa, solução de 10% de ácido acético e metanol (4:1 v/v) foi adicionada aos poços por 30min, sob agitação, para dissolução dos nódulos mineralizados. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Biotek) utilizando o filtro de 490 nm.

3.6 Análise de diferenciação pela quantificação da atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi avaliada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleínamonofosfato para todos os grupos experimentais. A medida da FA foi realizada segundo as instruções do fabricante do kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), que utiliza a metodologia de Roy modificada, por leitura de alteração de pH. Foram utilizados *eppendorfs* de 3 ml. O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A medida da absorbância em 590 nm foi utilizada para o cálculo da concentração. A atividade de FA foi calculada a partir da solução padrão e os dados foram expressos em U/L de FA.

3.7 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Microscopia Avançada da PUC Minas (JEOL, JSM-IT300). Foi utilizada para estudar a superfície dos biomateriais e células eventualmente aderidas em sua superfície.

Para esta análise foram realizados plaqueamentos celulares em duplicata, sobre os biomateriais ou em amostras de grupos com membrana e meio condicionado. Após 48h do plaqueamento, as culturas foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, durante 10 min. A desidratação foi feita com álcool etílico em graduação crescente (30, 50, 70, 80, 90 e 100%), submetidas à secagem por ponto crítico de CO₂ e montadas em suportes adequados. Foram recobertas com filme de ouro, observadas num microscópio eletrônico de varredura.

3.8 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, USA). As diferenças entre os grupos foram testadas por teste *t* de Student ou ANOVA seguida de comparações entre grupos (Teste de *Tukey*). Em todos os casos, $p < 0.05$ foi considerado para identificar diferenças estatísticas.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Evaluation of the effect of collagen membrane and topical corticosteroid use on the mineralizing potential of pre-osteoblastic MC3T3 cells cultured in contact with different xenogenic hydroxyapatites.

Será submetido ao periódico **Brazilian Oral Research (Qualis A2)**.

Normas para submissão de artigo podem ser visualizadas no endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/revistas/bor/iinstruc.htm>

Evaluation of the effect of collagen membrane and topical corticosteroid use on the mineralizing potential of pre-osteoblastic MC3T3 cells cultured in contact with different xenogenic hydroxyapatites

Alice de Araújo Ferreira SILVA¹, Carolina Nemesio de Barros PEREIRA¹, Ivana Marcia Alves DINIZ², Katia Lucy Melo MALTOS³, Cláudia Silami de MAGALHÃES⁴, Allyson Nogueira MOREIRA⁵, Elton Gonçalves ZENÓBIO⁵

¹ Master in Implantology, Postgraduate Program in Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Adjunct Professor, College of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³ Associate Professor, College of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Titular Professor, College of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Associate Professor IV, Department of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author:

Elton Gonçalves Zenóbio • Av. Dom José Gaspar, 500 – Coração Eucarístico •
Zip-code 30.535-901 • Belo Horizonte • MG • Brazil • Phone: +55 31 3319-4414
• E-mail: zenobio@pucminas.br

ABSTRACT

Bone grafts are essential in implant therapy and these are dependent on the biological performance of the biomaterials used, due to the limitations or morbidity caused by graft removal techniques, the development of bone substitutes has been elaborated and improved. Budesonide, a topical glucocorticoid, has been used in the pre and postoperative time of the maxillary sinus lift (MSL) in order to minimize inflammation of the sinus mucosa during the initial bone repair process. The present study seeks to infer the behavior of two biomaterials used in guided bone regeneration (GBR) methodology as well as MSL in implantology, evaluating the osteogenic potential of pre-osteoblastic cells, MC3T3-E1 Subclone-4 (ATCC®CRL-2593™), cultured in direct or indirect contact (conditioned medium 1% w/v) with to xenogenic hydroxiapatites (Bio-Oss® - Geistlich or BioGen® - Bioteck). The tests were performed with or without a collagen membrane (Surgidry Dental F®), and a topical glucocorticoid (budesonide 0.5%). The cell viability was evaluated at 48h, 96h and 144h (MTT) and the cell differentiation evaluated after 14 days of cell cultured in osteogenic medium by alizarin red and alkaline phosphatase activity. Differences between groups were tested by Student's t test or ANOVA followed by comparisons between groups (*Tukey's test*) at a significance level of 5% ($p < 0.05$) for statistical analysis. Direct plating on biomaterials and the presence of collagen membrane made cell proliferation significantly more difficult. In conditioned medium, Bio-Oss® presented a greater cell viability than BioGen®, particularly in the last two experimental times ($p < 0.05$). On the collagen membrane, no biomaterial was able to mineralize significantly more than the negative control, except when budesonide was added to the culture medium. Without the collagen membrane, all biomaterials mineralized more than the negative control, and the addition of budesonid did not improve this response. The alkaline phosphatase analysis showed that in the groups cultured in conditioned osteogenic medium, with membrane and without budesonid, Bio-Oss® and BioGen® demonstrated higher alkaline phosphatase production then the groups of cells grown in regular conditioned medium. In the budesonide groups, addition of glucocorticoid only improved alkaline phosphatase production in the BioGen® group without membrane ($p < 0.05$). Concluding that conditioned medium with biomaterials proved to be an effective technique to evaluate cellular functions in response to biomaterials presented as powder. Bio-Oss® and Biogen® showed no or low cytotoxicity respectively. The presence of the collagen membrane impaired cell proliferation in all groups. However, both biomaterials showed more mineralization when grown on the membrane. Lastly, the addition of budesonid had limited influence on the induction of greater amount of cell differentiation.

DESCRIPTORS: MC3T3 – E1 cells; Xenogenic hidroxiapatites; Collagen; Bone tissue; Glicocorticoid.

INTRODUCTION

The maxillary sinus lifting procedure using autogenous bone was considered the standard reference for rehabilitation of cases of severe maxillary atrophy. Due to limitations or morbidity caused by graft removal techniques, the development of bone substitutes is being developed and improved.¹ In this context, the heterologous biomaterials are used as an alternative to autogenous bone.²

The most common source of xenogene grafts is the bovine, as an alternative, materials of porcine origin have been used, and there are few articles on bone substitutes of equine origin, who have shown ability to induce osteoblastic differentiation of stem cells derived from the bone marrow of the receptor site.³

To evaluate the behavior of these biomaterials studies as Cosso et al.⁴ and Favato et al.⁵ assessed that the presence of xenogene hydroxyapatites contribute of greater stability of grafts in elevation of the maxillary sinus.

Cell culture studies are an effective means of assessing how the osteoblastic cells interact with biomaterials⁶ currently, the majority of these studies use osteogenic cell lines to assess the cellular interactions, evaluating the bone substitutes by means of target cells *in vitro*.⁷

The use of collagen membranes associated with hydroxyapatites in bone regeneration aims to protect the clot and maintain the framework of the biomaterial, avoiding the epithelial proliferation in the absence of porosities, being permeable only to allow the passage of nutrients.^{8,9}

Pignataro et al.¹⁰ conducted a study on the management of patients in surgery for maxillary sinus elevation, reported the importance of the prescription of preventive medication to inflammation and the control of the symptoms caused by the surgery through pre-surgical antibiotic therapy and topical corticosteroid in the post-surgical.

Due the effectiveness of budesonide in the treatment of diseases of the paranasal sinuses and nasal polyps evidenced with reduction of painful symptoms, it was the drug of choice for control of the inflammatory reaction and the return of the state of homeostasis of the sinus membrane.

Based on scientific evidence until the present moment, this *in vitro study*, has as objective to evaluate the proliferation and osteogenic potential of progenitor cells in contact with biomaterials and collagen membrane under the influence of budesonide on these cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture

It was used a lineage of pre-osteoblastic cells MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC® CRL-2593) of sixth passage, grown in culture medium α -MEM (supplemented with 1% of antibiotic (100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) and 10% fetal bovine serum (FBS - Gibco, USA) (regular), in cell culture bottles of 75 cm². The cells were maintained at 37°C in humid atmosphere containing 5% CO₂ and the exchange of culture medium was performed every three days. The cells were maintained in regular medium or full medium osteogenic inductor, in the regular medium addition of 180mM KH₂PO₄ and 10⁻⁸ of dexamethasone (both Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); in the case of tests of differentiation, changed every 3 days throughout the experiments, when the cells were observed in inverted microscope (TCM 400, Labomed, Analítica, Brazil).

Study Design

For all experimental conditions, the cell cultivation was carried out in triplicate. Were sowed 2×10^4 cells/well on quadruple in 96-well plates. The materials used are presented in chart 1.

For the cell viability assay the cells were cultivated directly in contact with 0.017 g of hydroxyapatite granules (HA), or by using the conditioning medium, kept in touch with each hydroxyapatite (0.1 g of HA to 10 ml of medium, i.e. 1% w/v) for 24 hours at 37°C prior to experiments.¹¹ The experimental conditions for viability analysis are described in chart 2.

For the cell differentiation assay (alkaline phosphatase and alizarin red), the cells were tested using only the methodology of conditioned medium, as previously described by Tsigkou et al.¹¹. Withal, the groups were also tested with the addition or not of budesonide as described in chart 3.

The differentiation directly on the biomaterial was not performed, once the direct cultivation on the hydroxyapatites prevented the cell proliferation.

The differentiation directly on the biomaterial was not performed, once the direct cultivation on the hydroxyapatites prevented the proliferation (Graphs 9 and 10) and cell differentiation (results not shown).

For each biomaterial, including collagen membrane, was conducted an experimental group without cells, with only the dye used in the stage of preparation, for the determination of the values of white, to be subtracted later in spectrophotometric analysis.

Determination of the glucocorticoid dose

For the determination of the maximum topic glucocorticoid, budesonide 32 mcg, dose that could be worked in association with the biomaterials, i.e., the dose that preserves above 50% of cell viability, was considered 8 dilutions, the following percentages: 0.03125, 0.0156, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.05, 1.0 and 5.0%. The cell survival remained above 50% (IC₅₀) until the concentration of 0.5%. Below 0.5%, the percentage of cell death approached 90% (Graph 1). Given this fact, the concentration of budesonide defined for use in this study was 0.5%, equivalent to 0.8 mcg in each 125 microliters of culture medium (volume used in the well of a 96 wells microplate).

Analysis of the viability/proliferation (MTT)

The patterns of proliferation were analyzed with the data of cell viability obtained at 48, 96 and 144 hours through the use of the analysis of the mitochondrial activity of cells submitted to the test of reduction of MTT (3-(bromide4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, Invitrogen/Gibco). The MTT solution was prepared with 0.05 g of powder of MTT dissolved in 10 ml of PBS (pH 7,2; LGC Biotechnology). In the period of each analysis, for each well was added to 10 µl of MTT solution and 90 µl of fresh medium. The plate of cultivation was maintained at 37°C, in humid atmosphere containing 5% CO₂ for 4 hours. Then, the plate was taken to the inverted microscope stage to confirm the formation of formazan crystals. Removed the MTT solution was added 50 µl in each well of the DMSO solution (Sigma Aldrich). The blue formazan was solubilized and its absorbance was determined by optical density in a spectrophotometer Spectra Max 190 (BioTeK®,

Instruments, Inc. Winooski, Vermont, USA) with 540 nm filter. The readings were performed using the Software Soft Max (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).

Analysis of differentiation by marking of extracellular matrix mineralization (Alizarin Red)

The formation of mineralized nodules after 14 days of cultivation (described above) was detected using the test of alizarin red. After the induction period, the cultures were washed twice in PBS, fixed with 70% isopropanol, rehydrated in distilled water and stained with alizarin red (Sigma-Aldrich) 1% (pH 4.2), for 5 min. The cultures were washed 3 times in PBS and left to dry. The wells were photographed using multi-function plate reader (Cytation 5, Biotek Multiplate Image Reader software Gen 5 Image 3.3) in the Center of Image Acquisition and Processing of the Institute of Biological Sciences at UFMG (CAPI, FAOUFMG). For quantitative analysis, solution of 10% acetic acid and methanol (4:1 v/v) was added to the wells for 30 min, with stirring, for dissolution of mineralized nodules. The absorbance was read in a spectrophotometer (Biotek) using the 490 nm filter.

Alkaline phosphatase activity

The alkaline phosphatase activity (AF) was evaluated through the release of thymolphthalein by hydrolysis of the substrate of thymolphthaleinmonofosphate for all experimental groups. The measure of AF was performed according to the manufacturer's instructions of the commercial kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil), which uses the methodology of Roy modified, by reading the amendment of pH. Were used eppendorfs of 3 ml. The test was performed according to the manufacturer's instructions. The measurement of the absorbance at 590 nm was

used for the calculation of the concentration. The activity of AF was calculated from the standard solution and the data were expressed as U/L of AF.

Scanning electron microscopy

The scanning electron microscopy was performed at the Laboratory of Advanced Microscopy of PUC Minas, (Jeol JSM-IT300). It was used to study the surface of biomaterials and cells eventually adhered on its surface.

For this analysis the plating were performed in duplicate, on the biomaterials or in samples of groups with membrane and through conditioned medium. After 48h of plating, the cultures were fixed with 2.5% glutaraldehyde in sodium phosphate buffer 0.1 M, during 10 min. Dehydration was performed with ethyl alcohol in increasing graduation (30, 50, 70, 80, 90 and 100%), subjected to drying by critical point of CO₂ and mounted in suitable supports. Samples were overlaid with a gold film, observed in a scanning electron microscope.

Statistical analysis

The data were analyzed using the software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, USA). Differences between groups were tested by Student's t test or ANOVA followed by comparisons between groups (*Tukey test*). In all cases, $p < 0.05$ was considered to identify statistical differences.

RESULTS

In the evaluation of biomaterials in tests of viability with conditioned medium and without the use of collagen membrane, it was observed that the BO led to cell proliferation, while the viability of cells in contact with the BG was similar in all

experimental times (Graph 1). BO also presented cellular viability significantly higher than BG in times of 48 and 96h ($p < 0.05$), may be considered, therefore, less cytotoxic (Graph 1).

In the evaluation of biomaterials in tests of viability with conditioned medium and with the use of collagen membrane, it was observed that the presence of membrane significantly hindered cell proliferation. There was no difference in growth in the different experimental times within the different groups or between them ($p > 0.05$) (Graph 2).

In relation to the cellular differentiation of cells cultured in contact with through conditioned medium with the biomaterials, collagen membrane and in the absence of budesonide, it was observed that there was no statistical difference between the negative and positive controls grown directly on the plate. However, on the membrane, no biomaterial was capable of significantly mineralize more than the negative control (Graph 3).

In relation to the cellular differentiation of cells cultured in contact with through conditioned medium with the biomaterials, collagen membrane and in the presence of budesonide, there was statistical difference between the negative and positive controls grown directly on the plate (Graph 4). On the membrane, all biomaterials were capable of significantly mineralize more than the negative control with budesonide. The Bio-Oss® was the only biomaterial to submit the same induction of mineralization that the positive control with budesonide grown directly on the plate (Graph 4).

In relation to the cellular differentiation of cells cultured in contact with through conditioned medium with the biomaterials, in the absence of collagen membrane and in the absence of budesonide, all biomaterials mineralized more than the negative

control, but only BG mineralized more than your regular control cultured in conditioned medium (Graph 5).

In relation to the cellular differentiation of cells cultured in contact with through conditioned medium with the biomaterials, in the absence of collagen membrane and in the presence of budesonide, observed that the addition of budesonide to culture medium with the biomaterials not favored significantly the cellular mineralization (Graph 6).

The images of the wells of culture used in the Alizarin Red assay can be observed in Figures 1 to 3, where can be visualized regions of accumulation of red dye, revealing more mineralized areas.

The analysis of the supernatant of groups grown in conditioned medium, with or without collagen membrane, and in the absence of budesonide in BG group showed a greater production of alkaline phosphatase when cultured in induced medium and on the membrane (BG + membrane) in comparison with the other groups (BG and BG regular) (Graph 7). In the medium conditioned by BO, the production of alkaline phosphatase was significantly lower in the group cultured in regular medium (BO regular) in comparison with the groups grown in inductive medium, regardless of the presence or absence of membrane (BO + membrane and BO). BG + membrane and BO + membrane showed higher production of alkaline phosphatase that the group of cells cultured on the membrane only (Membrane) ($p < 0.05$), as shown in Graph 7.

In the analysis of the supernatant of groups grown in conditioning, with or without collagen membrane, and in the presence of budesonide observed that the production of alkaline phosphatase was significantly lower in the group cultured in regular medium in comparison with the groups grown in inductive medium,

regardless of the presence or absence of membrane (Graph 8). BG + membrane and BO + membrane showed higher production of alkaline phosphatase than the group of cells cultured on the membrane only (Membrane) ($p < 0.05$). The addition of budesonide only improved the production of alkaline phosphatase in group BG, who went on to demonstrate a statistical difference in relation to its control through regular medium (BG regular) ($p < 0.05$), as shown in Graph 8.

Scanning electron microscopy (SEM)

Only samples cultivated on membrane could be observed under SEM. For samples with granules of hydroxyapatites, it has not been possible to view cells. On the membranes with conditioning/inductive medium was possible to detect the presence of cells and/or cell debris (Figures 4 and 5).

DISCUSSION

The present study seeks to infer the behavior of biomaterials used in the methodology of guided bone regeneration (ROG), as well as the survey of maxillary sinus (LSM) in implantology. In this context, the osteogenic potential of progenitor cells in contact with xenogenic hydroxyapatites, under the influence of budesonide and in contact with a resorbable collagen membrane was evaluated.

The results obtained in this study demonstrated that culture of pre-osteoblastic cells MC3T3-E1 present differences in cell proliferation when in direct contact with the biomaterials and the collagen membrane. Boyan et al.¹² reported the growth of osteoblasts on rough surfaces of titanium, where they observed that the cellular growth and development is linked to the type of surface on which the cells will join, and that in smooth surfaces, the cells exhibit low differentiation. They also

reported that when these cells are cultured on bone blocks, they exhibit reduced proliferation and increased cellular differentiation.

Ayobian-Markazi et al.⁷ assessed viability and morphology of cells similar to human osteoblasts (pre-osteoblasts SaOS-2) cultivated on 4 biomaterials (Bio-OssTM, TutodentTM, and Cerasorb OsteonTM) *in vitro*. These authors also suggested that the release of phosphate ions could suppress this cell growth due to changes in pH.

In agreement with these authors and specifically if it concerns the evaluation of xenogenic hydroxyapatite and collagen in cell culture, Wiedmann-Al-Ahmad et al.¹³ suggested that the lack of adhesion of cells would be related to the smooth surface of biomaterials. These authors reported, in particular on Bio-OssTM and the Bio-OssTM collagen, that the cells were floating in the wells of culture and were not able to adhere the biomaterial.

In the present study the alkaline phosphatase activity was higher in groups of conditioned medium by the biomaterials, which is in agreement with the study of Hanken et al.¹⁴, who cultivated mesenchymal cells of rats on 7 biomaterials (CerasorbTM M, OstimTM, Fortoss VitalTM, TriCosTM, NanoBoneTM, Bio-OssTM and OsteoBiolTM mp3) in 3D culture, and reported that the high alkaline phosphatase reveals an indicator of osteogenic differentiation by biomaterials.

Mladenovic et al.¹⁵ conducted an experimental study *in vitro* on the interface of Bio-OssTM, tested in 3 different cell sources (primary cells derived from the bone marrow of rat, mouse calvaria of primary and pre-osteoblastic MC3T3-E1). Observed that the expression of mineralization was similar in the 3 types of cell and that the concentration of the biomaterial was a key factor for *in vitro* experiments and could even be correlated with the clinical.

In an *in vitro* study comparing two xenogenic hydroxyapatites (Colloss™ And Colloss-E™) of bovine and equine sources tested on stem cells of human bone marrow in relation to osteogenic differentiation, El-Sabban et al.¹⁶ observed that the two types of hydroxyapatites induce osteoblastic differentiation of the cells. According to the authors, this provides a safe, inexpensive and readily available source of osteoconductive graft materials.

In relation to the presence of the bovine collagen membrane in the groups which the cells were seeded directly on the biomaterial, in this study, we observed that the membrane hindered the cell proliferation, which differs from the study of Wiedmann-Al-Ahmad et al.¹³, who underwent culture of osteoblastic cells of human origin on membranes from different origins, being them 2 of bovine origin (type I collagen), where they observed good rate of proliferation on the membranes, suggesting that these biomaterials are great tools for bone regeneration.

Ayobian-Markazi et al.⁷ observed that the chemical and structural characteristics of biomaterials play an important role in the behavior of osteoblasts. This effect cannot be verified in the scanning electron microscopy images, as it was not possible to visualize the presence of cells in the samples with hydroxyapatite granules. On the other hand, it was observed in the present study in groups with collagen membrane and the conditioned medium, the presence adherent or dead (cytoplasm retracted) cells on the collagen membrane web. The collagen membrane was previously studied by Saldaña et al.¹⁷ and Zenóbio et al.⁹ reported that the topography, porosity, stiffness and chemical composition of the membrane may influence the tissue regeneration. Despite having been used only one type of membrane in the present study, it was possible to observe that it is a heterogeneous material from the point of view of superficial characteristics, which may have resulted

in a different pattern of cell adsorption in each experimental condition, regardless of the biomaterial is used to condition the culture medium.

The presence of budesonide has improved, but not significantly, the mineralization for groups Biogen™, but not of Bio-Oss™. Khojasteh et al.¹⁸ showed an improvement in the proliferation and differentiation of osteoblasts by addition of corticosteroids (dexamethasone) to cell culture. The results presented here are consistent with the study of Namkung-Matthäi et al.¹⁹ who reported that corticosteroids induce early termination of cell proliferation *in vitro*, favoring the differentiation of osteoblasts.

As a methodological limitation in this study, we emphasize that the use of a single cell lineage of pre-osteoblast (MC3T3-E1) as a parameter. Because it is a continuous cell lineage, it may also exhibit lower mineralizing potential than cells obtained from primary lineages or mesenchymal stem cells, impairing the observation of favorable results.

CONCLUSION

Considering the limitations of this study, it was possible to conclude that the conditioned medium with the biomaterials proved to be an effective technique to evaluate cellular functions in response to biomaterials in granules form. The collagen membrane hindered the cell growth, regardless of the presence of biomaterials. In contact with the conditioned medium, Bio-Oss™ proved less cytotoxic reactions than Biogen, presenting similar cell growth to cells grown in ideal conditions. Both biomaterials showed more mineralization when grown on the membrane. Finally, the addition of budesonide had limited influence on the induction of a larger quantity of cell differentiation.

ACKNOWLEDGEMENT

Technodry by yielding the sterile, size-specific collagen membranes for culture in the wells.

REFERENCES

1. Cardoso CL, Curra C, Santos PL, Rodrigues MFM, Ferreira-Júnior O, de Carvalho PSP. Current considerations on bone substitutes in maxillary sinus lifting. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2016;9(2):102-7. doi: 10.1016/j.piro.2016.03.001.
2. Ludovichetti M, Di Stefano DA, Pagnutti S, Vaccari E, Ludovichetti FS, Celletti R. Vertical ridge augmentation using a flexible heterologous cortical bone sheet: three-year follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2011 Jul-Aug;31(4):401-7.
3. Artese L, Piattelli A, Di Stefano DA, Piccirilli M, Pagnutti S, D'Alimonte E, et al. Sinus lift with autologous bone alone or in addition to equine bone: an immunohistochemical study in man. *Implant Dent*. 2011 Oct;20(5):383-8. doi: 10.1097/ID.0b013e3182310b3d.
4. Cosso MG, de Brito RB Jr, Piattelli A, Shibli JA, Zenóbio EG. Volumetric dimensional changes of autogenous bone and the mixture of hydroxyapatite and autogenous bone graft in humans maxillary sinus augmentation. A multislice tomographic study. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Nov;25(11):1251-6. doi: 10.1111/clr.12261.
5. Favato MN, Vidigal BC, Cosso MG, Manzi FR, Shibli JA, Zenóbio EG. Impact of human maxillary sinus volume on grafts dimensional changes used in maxillary

- sinus augmentation: a multislice tomographic study. Clin Oral Implants Res. 2015 Dec;26(12):1450-5. doi: 10.1111/clr.12488.
6. Açıl Y, Springer IN, Broek V, Terheyden H, Jepsen S. Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. J Cell Biochem. 2002;86(1):90-8.
 7. Ayobian-Markazi N, Fourrootan T, Kharazifar MJ. Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SOS-2) seeded on various bone substitute materials: An *in vitro* study. Dent Res J (Isfahan). 2012 Jan;9(1):86-92. doi: 10.4103/1735-3327.92959.
 8. de Santana RB, de Mattos CM, Francischone CE, Van Dyke T. Superficial topography and porosity of an absorbable barrier membrane impacts soft tissue response in guided bone regeneration. J Periodontol. 2010 Jun;81(6):926-33. doi: 10.1902/jop.2010.090592.
 9. Zenóbio EG, Cosso MG, Martins AGV, Oliveira LJ, Abreu FAM, Souza PEA. Morphological analysis of resorbable collagen membranes by scanning electron microscopy. J Int Acad Periodontol. 2018;20(1):19-24.
 10. Pignataro L, Mantovani M, Torretta S, Felisati G, Sambataro G. ENT assessment in the integrated management of candidate for maxillary sinus lift. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2008 Jun;28(3):110-9.
 11. Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. Biomaterials. 2009 Jul;30(21):3542-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.019.

12. Boyan BD, Lossdörfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater*. 2003 Oct 24;6:22-7.
13. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich NC, Hübner U, Schmelzeisen R. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. *J Mater Sci Mater Med*. 2005 Jan;16(1):57-66.
14. Hanken H, Alpers J, Böbel M, Wöltje M, Hartjen P, Friedrich RE, et al. Bone substitutes enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in three-dimensional scaffolds. *In Vivo*. 2014 Sep-Oct;28(5):733-9.
15. Mladenović Ž, Sahlin-Platt A, Andersson B, Johansson A, Björn E, Ransjö M. In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Mar;24(3):329-35. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02334.x.
16. El-Sabban ME, El-Khoury H, Hamdan-Khalil R, Sindet-Pedersen S, Bazarbachi A. Xenogenic bone matrix extracts induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2007 Jul;2(4):383-90. doi: 10.2217/17460751.2.4.383.
17. Saldaña L, Sánchez-Salcedo S, Izquierdo-Barba I, Bensiamar F, Munuera L, Vallet-Regí M, et al. Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater*. 2009 May;5(4):1294-305. doi: 10.1016/j.actbio.2008.11.022.
18. Khojasteh A, Ghahremani MH, Ostad SN, Eslami M, Motahhary P, Morad G, et al. The effect of deproteinized bovine bone mineral on Saos-2 cell proliferation. *Iran Endod J*. 2013;8(3):118-22.

19. Namkung-Matthäi H, Seale JP, Brown K, Mason RS. Comparative effects of anti-inflammatory corticosteroids in human bone-derived osteoblast-like cells. *Eur Respir J*. 1998 Dec;12(6):1327-33.

Chart 1. Description and composition of the used biomaterials and drugs

INITIALS	BIOMATERIAL	MANUFACTURER	COMPOSITION	GRANULATION
BO	Bio-Oss™	Giestilich Biomaterials™	Inorganic bovine hydroxyapatite	0.25 mm - 1 mm
BG	Biogen™	Bioteck™	Deantigenated equine hydroxyapatite	500 - 1000 µm
M	Surgidry Dental F™	TechnoDry Liofilizados Médicos Ltda	Organic matrix of lyophilized collagen type 1 (bovine xenogene)	
BUD	BUSONID™ Budesonida 32 mcg	Biosintética Farmacêutica Ltda, Aché group	Microcrystalline cellulose, carmellose sodium, glucose, polysorbate 20, calcium disodium edetate dihydrate, purified water and hydrochloric acid	

Chart 2. Determination of experimental groups for cell viability

Regular medium								
Control	Directly on biomaterials				Meio condicionado 1% p/v			
	Without collagen membrane		With collagen membrane		Without collagen membrane		With collagen membrane	
	BO	BG	BO	BG	BO	BG	BO	BG

BO – Bio-Oss™

BG – Biogen™

Chart 3. Determination of experimental groups – Alizarin red and Alkaline phosphatase tests

	Regular medium	Conditioned medium Regular		Conditioned medium Inductor			
Without Budesonid	Negative control	BO regular	BG regular	Positive control		Collagen membrane	
				BO	BG	BO*	BG*
Budesonid	Negative control bud	BO regular	BG regular	Positive control bud		Collagen membrane	
				BO	BG	BO*	BG*

BO – Bio-Oss™

BG – Biogen™

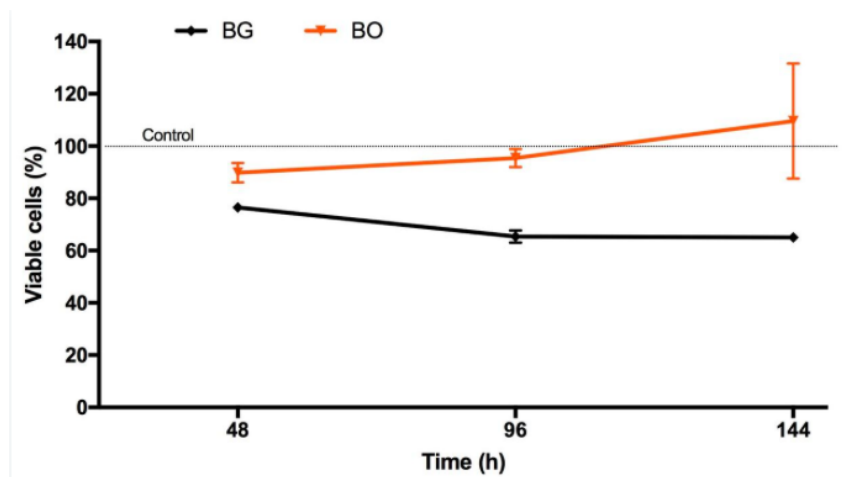
Negative control - only cells cultured with regular complete medium with or without budesonid

Positive control - only cells cultured with complete osteogenic medium with or without budesonid

bud – presence of budesonid

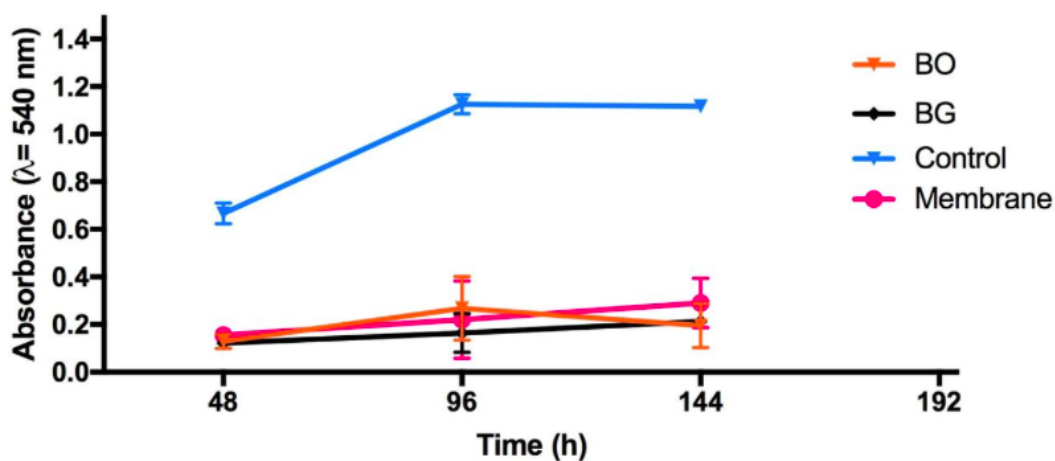
* presence of collagen membrane

Graph 1. Cell viability/proliferation of cultured cells with conditioned medium with Bio-Oss™ and BioGen™ and without collagen membrane.



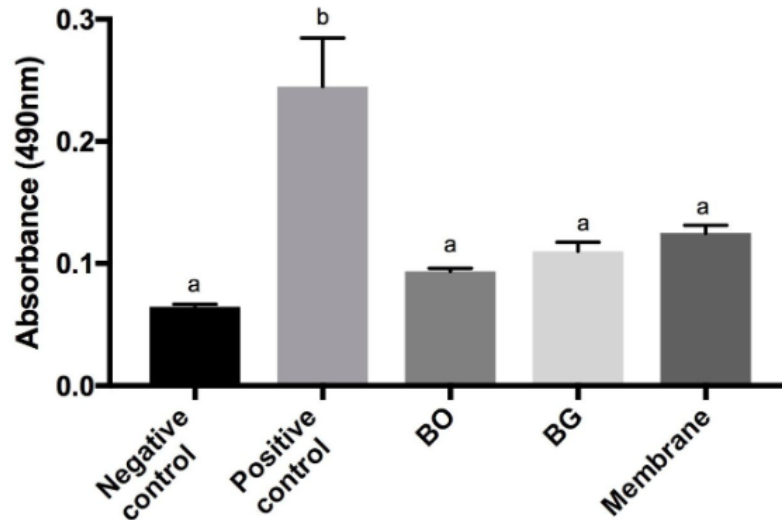
BO – conditioned medium with Bio-Oss™; BG – conditioned medium with BioGen™; Control – cells cultured under ideal conditions (100% viability)

Graph 2. Cell viability/proliferation of cultured cells with conditioned medium with Bio-Oss™ and BioGen™ on collagen membrane.



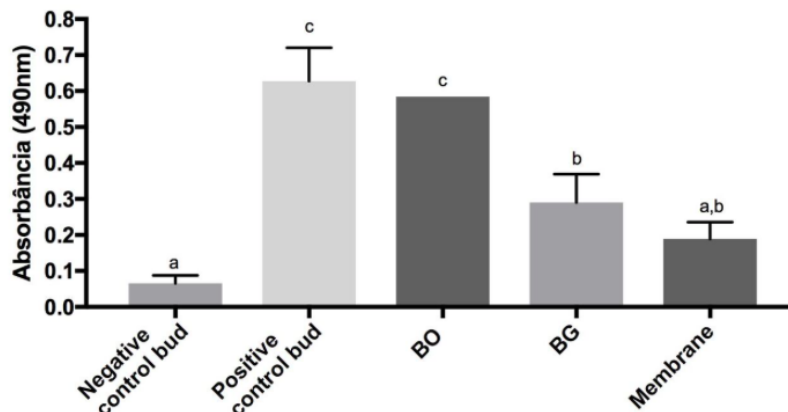
BO – cells cultured on collagen membrane in conditioned medium with Bio-Oss™; BG – cells cultured on collagen membrane in conditioned medium with BioGen™; Control – Cells cultured under optimal conditions; Membrane – cells cultured on collagen membrane in regular medium.

Graph 3. Spectrophotometric quantification of alizarin red nodules in groups of cells cultured with conditioned medium with Bio-Oss™ and BioGen™ on collagen membrane.



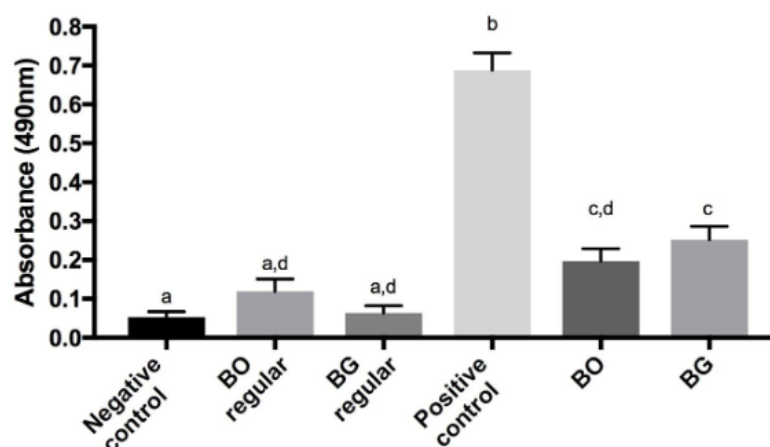
Negative control – cells cultured on the bottom of the plate in regular medium; Positive control – cells cultured on the bottom of the plate in osteogenic medium; BO – cells cultured on the membrane in osteogenic medium conditioned with Bio-Oss™; BG – cells cultured on the membrane in osteogenic medium conditioned with BioGen™; Membrane – cells cultured on the membrane in osteogenic medium.

Graph 4. Spectrophotometric quantification of alizarin red nodules in groups of cells cultured with conditioned medium with Bio-Oss™ and BioGen™ on collagen membrane, with addition of budesonid.



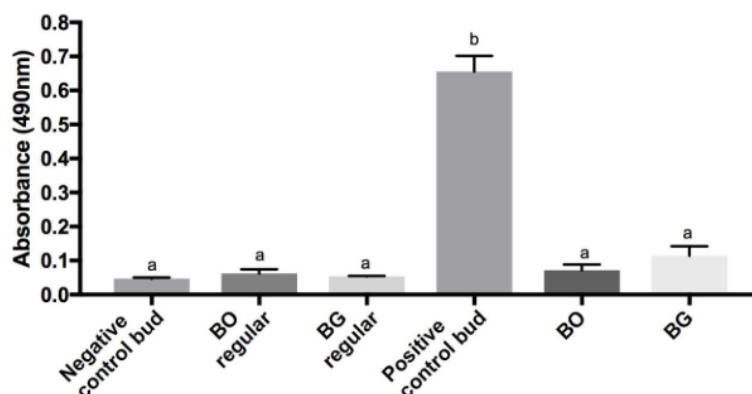
Negative control bud– cells cultured at the bottom of the plate in regular medium with addition of budesonide; Positive control bud – cells cultured at the bottom of the plate and in osteogenic medium with addition of budesonide; BO – cells cultured on membrane in osteogenic medium conditioned with Bio-Oss™ and added with budesonide; BG – cells cultured on membrane in osteogenic medium conditioned with BioGen™ and added with budesonide; Membrane – cells cultured on in osteogenic medium and added with budesonide.

Graph 5. Spectrophotometric quantification of alizarin nodules in groups of cells cultured on conditioned medium with Bio-Oss™ e BioGen™.



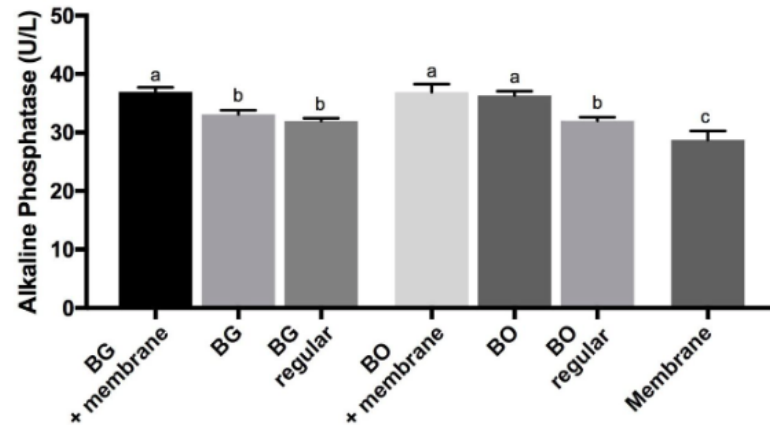
Negative control – cells cultured on the bottom of the plate and in regular medium; BO regular – cells cultured at the bottom of the plate and in regular medium conditioned with Bio-Oss™; BG regular – cells cultured at the bottom of the plate and in regular medium conditioned with BioGen™; Positive control – cells cultured on the bottom of the plate and in osteogenic medium; BO – cells cultured in the bottom of the plate in osteogenic medium conditioned with Bio-Oss™; BG – cells cultured in the bottom of the plate in osteogenic medium conditioned with BioGen™.

Gráfico 6. Quantificação espectrofotométrica dos nódulos de alizarina nos grupos de células cultivadas com meio condicionado com Bio-Oss® e BioGen® com adição de budesonida.



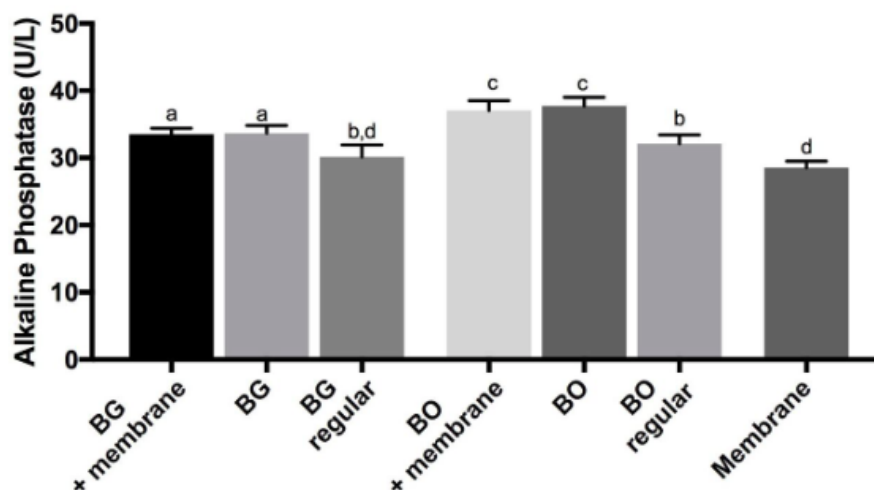
Negative control bud – cells cultured at the bottom of the plate in regular medium with addition of budesonide; BO regular – cells cultured on the bottom of the plate in regular medium conditioned with Bio-Oss™ and added with budesonide; BG regular – cells cultured on the bottom of the plate in regular medium conditioned with BioGen™ and added with budesonide; Positive control bud – cells cultured in the bottom of the plate and in osteogenic medium with addition of budesonide; BO – cells cultured on the bottom of the plate and in osteogenic medium conditioned with Bio-Oss® and added with budesonide; BG – cells cultured on the bottom of the plate and in osteogenic medium conditioned with BioGen® and added with budesonide.

Graph 7. Quantification of alkaline phosphatase activity in groups cultured in conditioned medium with Bio-Oss™ and BioGen™, with or without collagen membrane and without budesonide.



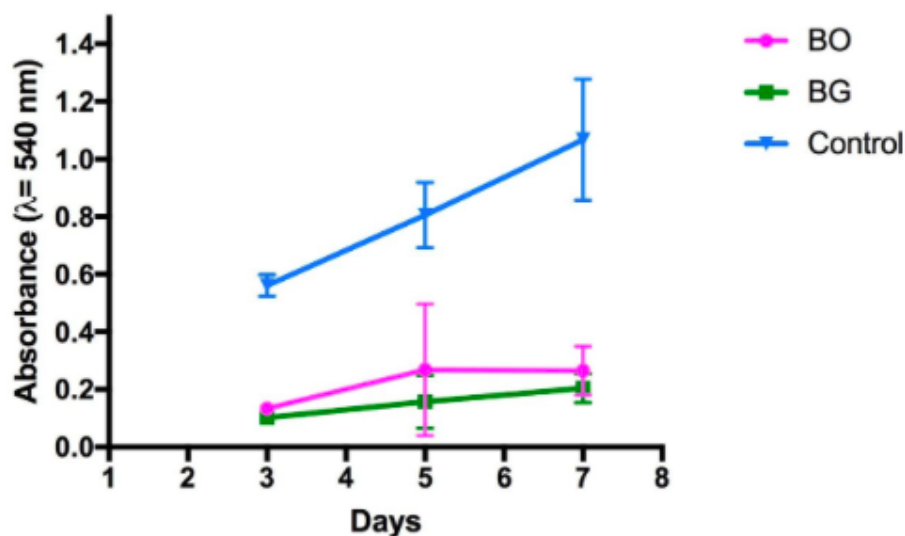
BG + membrane – cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by BioGen™ with collagen membrane; BG - cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by BioGen™ without collagen membrane; BG regular – cells cultured on the bottom of the plate in regular medium conditioned by BioGen®; BO + membrane - cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by Bio-Oss™ with collagen membrane; BO - cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by Bio-Oss™ without collagen membrane; BO regular - cells cultured on the bottom of the plate in regular medium conditioned by Bio- Oss®; M – cells cultured on the bottom of the plate in induced medium on membrane.

Graph 8. Quantification of alkaline phosphatase activity in groups cultured in conditioned medium with Bio-Oss™ and BioGen™, with or without collagen membrane and with budesonide.



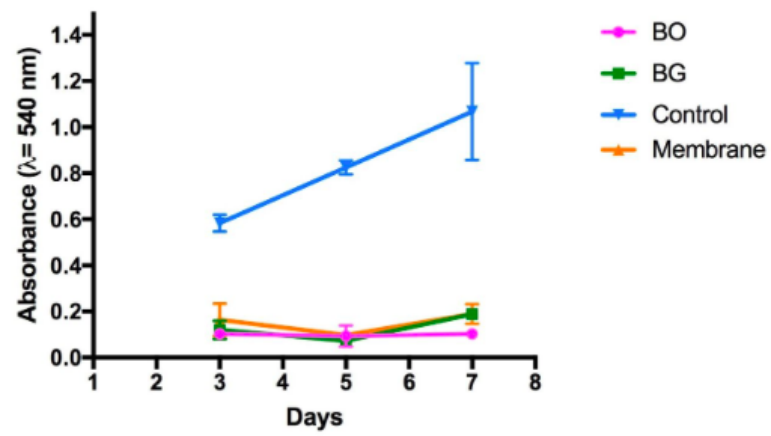
BG + membrane – cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by BioGen™ with collagen membrane; BG – cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by BioGen™ without collagen membrane; BG regular – cells cultured on the bottom of the plate in regular medium conditioned by BioGen®; BO + membrane - cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by Bio-Oss™ with collagen membrane; BO – cells cultured on the bottom of the plate in inducer medium conditioned by Bio-Oss™ without collagen membrane; BO regular - cells cultured on the bottom of the plate in regular medium conditioned by Bio- Oss®; M – cells cultured on the bottom of the plate in induced medium on membrane.

Graph 9. Cell viability/proliferation of cultured cells with with granules of Bio-Oss™ and BioGen™ and without collagen membrane.



BO – conditioned medium with Bio-Oss™ granules; BG – conditioned medium with BioGen™ granules; Control – cells grown under ideal conditions.

Graph 10. Cell viability/proliferation of cultured cells with granules of Bio-Oss™ and BioGen™ and with collagen membrane.



BO – cells cultured on the membrane in conditioned medium with Bio-Oss™ granules; BG – cells cultured on the membrane in conditioned medium with BioGen™ granules; Control – cells grown under ideal conditions; Membrane – cells cultured on the membrane in regular medium.

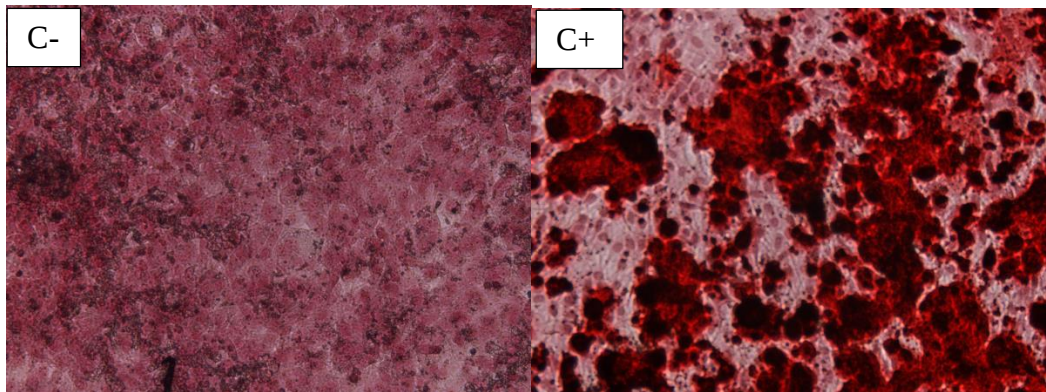


Figura 1. Alizarin red test, MT3C3 – Negative control (C-); Positive control (C+).

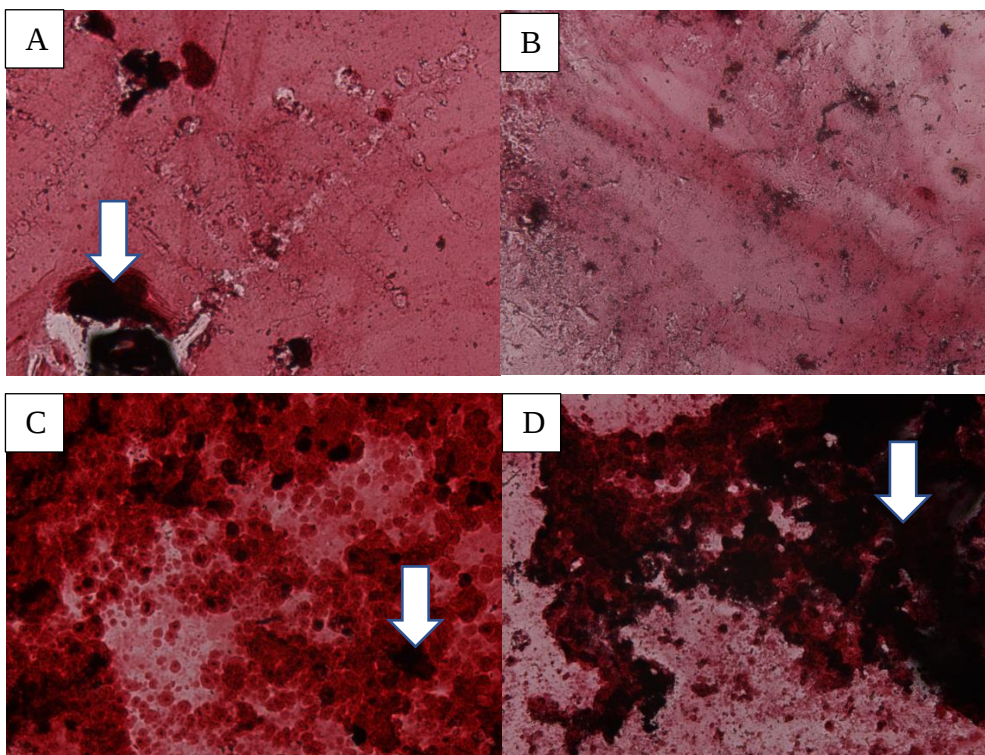


Figura 2. Alizarin red test BG – Accumulation of Alizarin red (white arrow) represent mineralization. A) BG in regular medium, B) BG in regular medium with addition of budesonide, C) BG in inducer medium, D) BG in inducer medium with addition of budesonide.

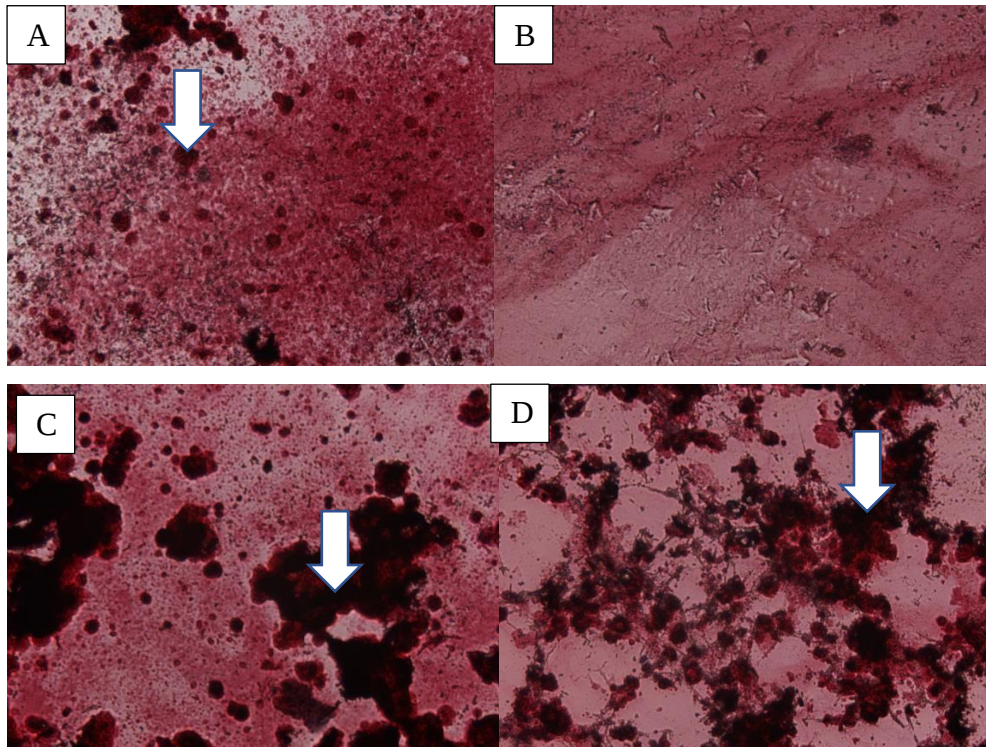


Figure 3. Alizarin red test BO – Accumulation of Alizarin red (white arrow) represent mineralization. A) BO in regular medium, B) BO in regular medium with addition of budesonide, C) BO in inducer medium, D) BO in inducer medium with addition of budesonide.

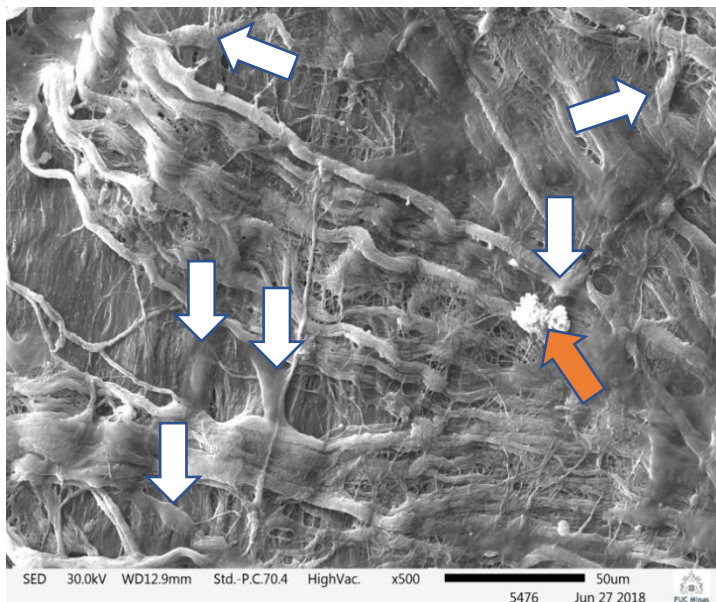


Figure 4. Scanning electron microscopy, collagen membrane in conditioned medium with Biogen®. White arrows – adhered cells; orange arrow – dead cells (500x magnification).

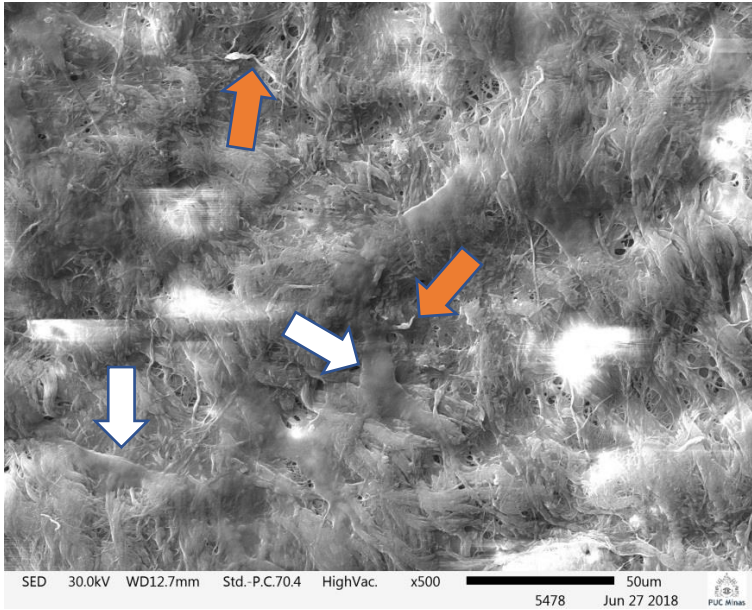


Figura 5. Scanning electron microscopy, collagen membrane in conditioned medium with Bio-Oss®. White arrows – adhered cells; orange arrow – cell debris (500x magnification).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- a) não foi possível verificar adesão e crescimento celular diretamente sobre os grânulos de hidroxiapatita;
- b) a presença da membrana colágena dificultou a proliferação celular em todos os grupos;
- c) o meio condicionado com os biomateriais se mostrou uma técnica eficaz para observar células em contato com biomateriais na forma de pó;
- d) ambos os biomateriais apresentaram mais mineralização quando cultivados sobre a membrana;
- e) a presença de budesonida não foi significativa na indução da o
- f) Outros experimentos visando explicitar a correlação clínica com eventos biológicos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

ACHÉ. **Biosintética uma empresa Aché. Busonid - Budesonida**. 2018. Disponível em: < <http://www.ache.com.br/produtos/biosintetica-sob-prescricao/busonid-suspensao-aquosa-nasal-47/>>. Acesso em: 12 de junho de 2018.

AÇIL, Y. et al. Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.86, n.1, p. 90-98, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Registro ANVISA nº 80190460007 - Surgidry Dental F. Membranas Regenerativas Odontológicas**. Brasília, 2018. Disponível em: <<https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodDetail&anvisald=80190460007>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

ARTESE, L. et al. Sinus lift with autologous bone alone or in addition to equine bone: an immunohistochemical study in man. **Implant Dentistry**, v.20, n.5, p. 383-388, Oct. 2011.

ASTAKHOVA, N.M. et al. Analysis of the basic characteristics of osteogenic and chondrogenic cell lines important for tissue engineering implants. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.164, n.4, p. 561-568, Mar. 2018.

AYOBIAN-MARKAZI, N.; FOUROOTAN, T.; KHARAZIFAR, M.J. Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SOS-2) seeded on various bone substitute materials: an *in vitro* study. **Dental Research Journal**, v.9, n.1, p. 86-92, Jan. 2012

BOYAN, B.D. et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. **European Cells & Materials**, v.6, p. 22-27, Oct. 2003.

CABRAL, M.C.P.M.T. **Estudo do tecido ósseo relacionado com patologias dos maxilares e influência de materiais exógenos**. 2004. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto.

CARDOSO, C.L. et al. Current considerations on bone substitutes in maxillary sinus lifting. **Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral**, v.9, n.2, p. 102-107, 2016.

DE SANTANA, R.B. et al. Superficial topography and porosity of an absorbable barrier membrane impacts soft tissue response in guided bone regeneration. **Journal of Periodontology**, v.81, n.6, p. 926-933, June 2010.

DENISSEN, H.W.; DE GROOT, K. Tissue response to dense apatite implants in rats. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.14, n.6, p. 713-721, 1980.

EL-SABBAN, M.E. et al. Xenogenic bone matrix extracts induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Regenerative Medicine**, v.2, n.4, p. 383-390, July 2007.

GEISTLICH PHARMA. **Geistlich Bio-Oss® - Benefícios para o usuário**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://www.geistlich.com.br/pt/dentistas/substitutos-osseos/bio-oss/beneficios-para-o-usuario/>>. Acesso em: 05 de junho de 2018.

KATO, K. et al. Enhancement of calcification by osteoblasts cultured on hydroxyapatite surfaces with adsorbed inorganic polyphosphate. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v.54, n.6, p. 449-457, 2018.

LAVIGNE, F. et al. Intranasal administration of topical budesonide to allergic patients with chronic rhinosinusitis following surgery. **Laryngoscope**, v.11, n.25, p. 858-864, 2002.

LIU, S.C. et al. Effect of budesonide and azelastine on histamine signaling regulation in human nasal epithelial cells. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v.274, n.2, p. 845-853, Feb. 2017.

LOHCUS HEALTH TECHNOLOGY. **Biomateriais**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://lohcus.com.br/biomateriais-bioteck/>>. Acesso em: 5 de junho de 2018.

LUDOVICHETTI, M. et al. Vertical ridge augmentation using a flexible heterologous cortical bone sheet: three-year follow-up. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.31, n.4, p. 401-407, 2011.

MAIORANA, C. et al. Reduction of Autogenous Bone Graft Resorption by Means of Bio-Oss Coverage: A Prospective Study. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.25, n.1, p.18-25, 2005.

MLADENOVIC, Ž. et al. In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. **Clinical Oral Implants Research**, v.24, n.3, p. 329-335, Mar. 2013.

NAMKUNG-MATTHÄI, H. et al. Comparative effects of anti-inflammatory corticosteroids in human bone-derived osteoblast-like cells. **The European Respiratory Journal**, v.12, n.6, p. 1327-1333, Dec. 1998.

NEVINS, M. et al. Series international. **Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.33, n.4, p. 483-484, 2013.

PIGNATARO, L. et al. ENT assessment in the integrated management of candidate for maxillary sinus lift. **Acta Otorhinolaryngology Italica**, v.28, n.3, p. 110-119, June 2008.

PISTILLI, R. et al. Case of severe bone atrophy of the posterior maxilla rehabilitated with blocks of equine origin bone: histological results. **Implant Dentistry**, v.22, n.1, p. 8-15, Feb. 2013.

SANZ, M.; VIGNOLETTI, F. Key aspects on the use of bone substitutes for bone regeneration of edentulous ridges. **Dental Materials**, v.31, n.6, p. 640-647, June 2015.

TRAINI, T. et al. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. **Journal of Periodontology**, v.78, n.5, p.955-961, May 2007.

TSIGKOU, O. et al. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. **Biomaterials**, v.30, n.21, p. 3542-3550, July 2009.

WALLER, E.K. et al. The “common stem cell” hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. **Blood**, v.85, n.9, p. 2422-2435, May 1995.

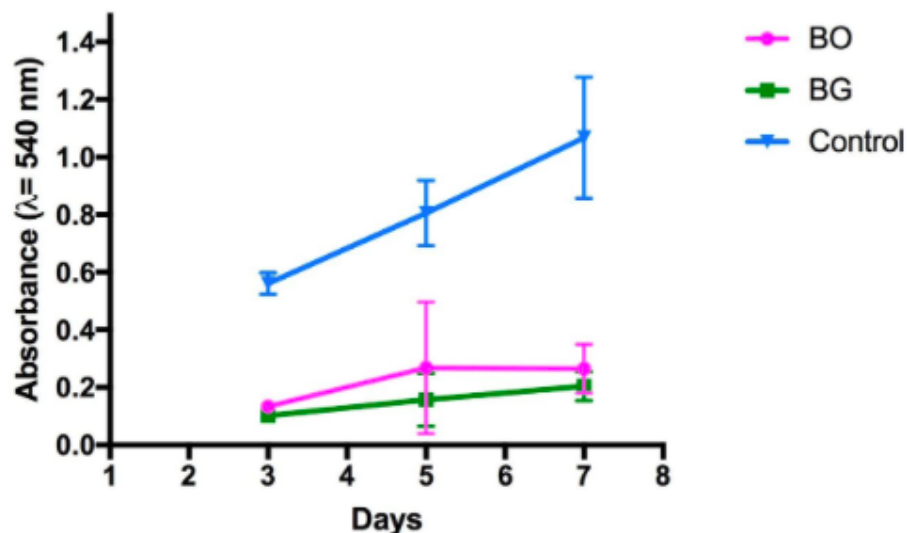
WIEDMANN-AL-AHMAD, M. et al. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v.16, n.1, p. 57-66, Jan. 2005.

YAMADA, M.; EGUSA, H. Current bone substitutes for implant dentistry. **Journal of Prosthodontic Research**, v.62, n.2, p. 152-161, Apr. 2018.

ZENÓBIO, E.G. et al. Morphological analysis of resorbable collagen membranes by scanning electron microscopy. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v.20, n.1, p. 19-24, 2018.

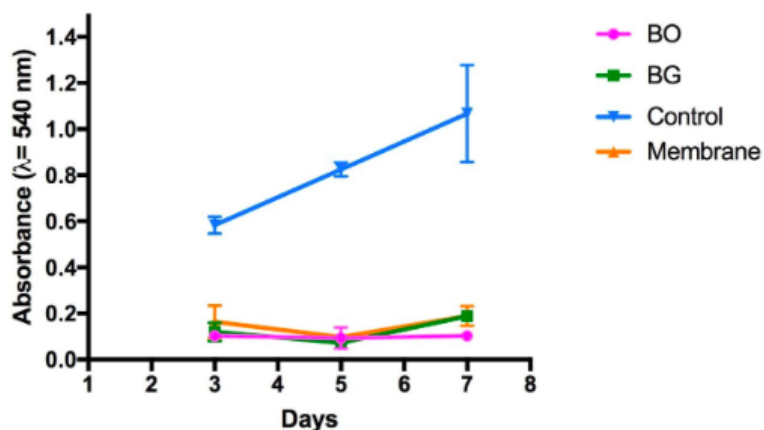
ANEXO A – Viabilidade/proliferação celular das células pré osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas diretamente sobre as hidroxiapatitas xenógenas

Gráfico 1. Viabilidade/proliferação celular das células cultivadas diretamente sobre grânulos de Bio-Oss® e BioGen® e sem membrana colágena



BO – conditioned medium with Bio-Oss™ granules; BG – conditioned medium with BioGen™ granules; Control – cells grown under ideal conditions.

Gráfico 2. Viabilidade/proliferação celular das células cultivadas diretamente sobre grânulos de Bio-Oss® e BioGen® na presença de membrana colágena



BO – cells cultured on the membrane in conditioned medium with Bio-Oss™ granules; BG – cells cultured on the membrane in conditioned medium with BioGen™ granules; Control – cells grown under ideal conditions; Membrane – cells cultured on the membrane in regular medium.