

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

Eduardo Frois Temponi

**EFEITO DO TÂNTALO POROSO NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO  
DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS EXPOSTOS  
A *PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

Belo Horizonte  
2016

Eduardo Frois Temponi

**EFEITO DO TÂNTALO POROSO NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO  
DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS EXPOSTOS  
A *PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

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: Clínicas Odontológicas.

Linha de Pesquisa: Biologia oral.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

T284e Temponi, Eduardo Frois  
Efeito do tântalo poroso no comportamento biológico de leucócitos mononucleares humanos expostos a Porphyromonas Gingivalis / Eduardo Frois Temponi. Belo Horizonte, 2016.  
71 f. : il.

Orientador: Rodrigo Villamarim Soares  
Coorientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza  
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Citocinas. 2. Leucócitos. 3. Doenças periodontais. 4. Implante Dentário Endoósseo. 5. Materiais biomédicos. I. Soares, Rodrigo Villamarim. II. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Eduardo Frois Temponi

**EFEITO DO TÂNTALO POROSO NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE  
LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS EXPOSTOS A  
*PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

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: Clínicas Odontológicas.

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:**

- 1- Profa. Dra. Paula Rocha Moreira – UFMG
- 2- Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas

**DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 13 de dezembro de 2016**

**A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora**

Belo Horizonte, 26 de janeiro de 2017

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares  
**Orientador**

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

**Dedico sempre a ELE, que é Único e fonte de toda santidade.  
Aos meus avós que já se foram e às minhas avós ainda em Fortaleza.  
Aos meus pais pelo carinho e exemplo.  
À minha esposa Caroline pela presença constante e pelo amor.  
Ao meu grande mestre Lucio Honório pelo exemplo.**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha esposa e familiares, pela compreensão nos muitos e inesgotáveis momentos de ausência e, acima de tudo, pelo apoio irrestrito.

Aos meus amigos, em especial Luiz Fernando e Lincoln Paiva, e funcionários do Hospital Madre Teresa que me deram substrato e força para continuar meus estudos.

Ao Instituto das Pequenas Missionárias de Maria Imaculada, às Irmãs Sacramentinas e ao Padre Gladston Elias pela força para manutenção da minha fé.

Ao Professor Martinho Horta Campolina pela confiança e por ter me escancarado uma porta para a Pós-graduação.

Aos mestres Rodrigo Villamarim Soares e Paulo Eduardo de Alencar e Souza, meus orientadores, pela confiança, respeito e exemplo. Foi e ainda é uma honra trabalhar com vocês.

A todos os colegas do curso de Mestrado em Clínicas Odontológicas 2015-2016 que me receberam de braços abertos e me deram a oportunidade de junto cursar o curso ao longo destes dois anos.

Aos alunos e professores do Laboratório Biologia das Interações Celulares do ICB-UFMG que diretamente contribuíram para a realização dos experimentos.

A todos os funcionários do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUC Minas, principalmente à Angélica e Silvania, sempre atentas e dispostas a ajudar diante de todas as necessidades.

Aos doadores que gentilmente cederam amostras de sangue para que esse projeto pudesse ser realizado.

Às instituições de fomento à pesquisa FIP-PUC Minas, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro sem o qual esse projeto não poderia ser realizado.

E a todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento desse trabalho, ficam meus sinceros agradecimentos.

*Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes (Isaac Newton).*

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a viabilidade celular e o comportamento biológico das CMSP em contato com TP associado ou não à *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*). Hipotetizou-se que tanto a viabilidade celular quanto a resposta biológica não seriam alteradas pelo TP e, além disso, que o TP poderia modular o efeito da exposição à *Pg*. CMSP foram colhidas de 10 indivíduos saudáveis e os seguintes grupos foram formados: CMSP (CG); CMSP com TP (PTG); CMSP com *Pg* (PGG); CMSP com TP e *Pg* (PTPGG). Todas as CMSP foram incubadas sozinhas ou com o TP *overnight* (12 horas), tendo subsequentemente sido adicionada a *Pg* a grupos específicos e a incubação continuada por mais 8 horas em todos os grupos. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT-formazan e a expressão de IL-10, TGF- $\beta$ , MMP9 e RANKL determinadas pelo teste de ELISA. A morfologia e adesão das CMSP ao TP foi observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). O teste de MTT-formazan revelou que o TP não interferia na atividade mitocondrial das CMSP ( $p > 0,05$ ). A MEV revelou a adesão das CMSP ao TP. A análise da expressão dos biomarcadores revelou que TGF- $\beta$ , MMP9 e RANKL não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Em contraste, a expressão de IL-10 significativamente ( $p = 0,004$ ) variou em todos os grupos (CG <PTG <PTPGG <PGG). Em conclusão, o TP não afetou a viabilidade das CMSP, permitiu a adesão celular e aumentou a expressão de uma citocina anti-inflamatória (IL-10), além de não ter aumentado as respostas pró-inflamatórias através de MMP9 e RANKL, mesmo na presença de um patógeno periodontal. Estes resultados sugerem que este biomaterial é biocompatível e exibe atividade biomoduladora em relação à resposta inflamatória.

**Palavras-chave:** Citocinas. Células mononucleares do sangue periférico. Tântalo poroso. *Porphyromonas gingivalis*.



## ABSTRACT

Tantalum is an inert, biologically active metal that has increasing applicability to a variety of situations in orthopedic and dental practice. Despite the success of using porous tantalum (PT) in certain surgical cases, whether in the orthopedic or odontological practice, the interaction of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with this material has not been widely studied. The aim of this study was evaluate *in vitro* the cell viability and biological behavior of human PBMC in contact with PT associated or not to *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*). It was hypothesized that both cell viability and biological response will not be altered by the PT, and in addition, that PT could modulate the effect of *Pg* exposure. PBMC was collected from 10 healthy individuals and the following groups were formed: PBMC cells (CG); PBMC with PT (PTG); PBMC with *Pg* (PGG); PBMC with PT and *Pg* (PTPGG). All PBMC were incubated alone or with PT *overnight* (12 hours), subsequently *Pg* was added to specific groups and incubation continued for 8 hours in all groups. Cell viability was evaluated by MTT assay, the morphology and adhesion of PBMCs to PT was observed via scanning electron microscopy (SEM), and the expression of IL-10, TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL was determined by ELISA. The MTT assay revealed that PT did not interfere in the mitochondrial activity of PBMC ( $p>0.05$ ). SEM revealed the adherence of PBMC to PT. Analysis of biomarkers expression showed that TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL did not exhibit significant differences among groups. In contrast, the expression of IL-10 significantly ( $p=0.004$ ) varied in all groups (CG < PTG < PTPGG < PGG). PT did not affect PBMC cell viability, allowed cell adhesion, did not enhanced the expression of two pro-inflammatory molecules (MMP-9 and RANKL), enhanced the expression of an anti-inflammatory cytokine (IL-10) and modulate *Pg* influence in this expression. These results suggest that this biomaterial is biocompatible and display biomodulator activity in regard to the inflammatory response.

**Keywords:** Cytokines. Peripheral mononuclear cells. Porous tantalum. *Porphyromonas gingivalis*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ta - Tântalo / tantalum

TP / PT - Tântalo poroso / porous tantalum

CMSP / PBMC - Células mononucleares do sangue periférico / peripheral blood mononuclear cells

*Pg* - *Porphyromonas gingivalis*

CG - peripheral blood mononuclear cells

PTG - PBMC with PT / Células mononucleares do sangue periférico com tântalo poroso

PGG - PBMC with *Pg* / Células mononucleares do sangue periférico com *Porphyromonas gingivalis*

PTPGG - PBMC with PT and *Pg* / Células mononucleares do sangue periférico com tântalo poroso e *Porphyromonas gingivalis*

DP - Doenças periodontais

MMPs - Matrix metalloproteinases / Metaloproteinases de matriz

MTT - Methyl tetrazolium

SEM - Scanning electron microscopy / Microscopia eletrônica de varredura

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Microestrutura do metal trabeculado poroso de tântalo .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 2: Células mononucleares do sangue periférico em contrato com a microestrutura do metal trabeculado poroso de tântalo .....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 3: Biologia na doença periodontal .....</b>	<b>36</b>

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1: Comparação do tântalo poroso com as demais ligas metálicas .....28**

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Tântalo.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.1 Propriedades mecânicas .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.2 Bioatividade e biocompatibilidade.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.3 Aplicabilidade odontológica.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2 Doença periodontal.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.1 Porphyromonas gingivalis (Pg) .....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.2 Citocinas e marcadores biológicos na doença periodontal.....</b>	<b>34</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>3 ARTIGO .....</b>	<b>39</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP .....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tântalo (Ta) é um metal biologicamente ativo que vem tendo aplicabilidade crescente para uma variedade de situações na prática ortopédica e odontológica (BELLINGER, 1947; BOBYN et al., 1999; BENCHARIT et al., 2014). O Ta tem sido usado por mais de 50 anos como material de implante em condições selecionadas: placas de cranioplastia e como componente de marca-passo. Em anos mais recentes o tântalo poroso (TP) foi introduzido como componente estrutural de determinadas órteses e próteses (ZARDIACKAS et al., 2001; SHIMKO et al., 2005; MAS-MORUNO et al., 2015). O TP oferece vantagens sobre outros materiais convencionais utilizados para implantes devido à sua uniformidade e continuidade estrutural, baixa rigidez, alta porosidade, resistência e coeficiente de atrito, o que garante melhor e maior sobrevida dos implantes em uso, além de melhor comportamento biológico de osteointegração ( HEINER; BROWN; POGGIE, 2001; CHRISTIE, 2002; COHEN, 2002; SCHILDHAUER et al., 2006; LIU et al., 2015; NINOMIYA et al., 2015).

No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos biológicos do TP em comparação aos outros metais e ligas metálicas tradicionais. Apesar do sucesso do uso do TP em determinados casos cirúrgicos, seja no meio ortopédico ou odontológico, a interação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) com este material não foi investigada em todos os aspectos (BOUILLON et al., 1995; LEE et al., 2015; NINOMIYA et al., 2015). É bem reconhecido que a interação celular com o meio de crescimento é fundamental para o processo celular de função e diferenciação (SCHILDHAUER et al., 2006). É provável que estas células sejam ativadas na superfície do TP, uma vez que é conhecido que as células após aderência a biomateriais apresentam vários graus de ativação, dependendo da química e estrutura da superfície do biomaterial em questão (SCHILDHAUER et al., 2006).

O processo biológico inclui ainda respostas eletrofisiológicas iniciais mediadas por integrinas seguido pela ativação de vias de sinalização intracelular. Estes mecanismos podem agir para regular as ações e os níveis de transcrição de vários fatores, que por sua vez regulam genes que codificam proteínas da matriz óssea. Dentre tais proteínas, as citocinas são moléculas de sinalização que coordenam vários processos fisiológicos: reações imunitárias, cicatrização de feridas, reparação e regeneração de tecidos. A capacidade dos osteoblastos para responder a um

conjunto específico de citocinas é restringida pela expressão de receptores da superfície celular. A ligação de citocinas em seus receptores gera uma sinalização a partir da membrana plasmática para o núcleo, resultando em aumentos da transcrição de genes específicos e, conseqüentemente ativação de diferentes processos celulares. A secreção e ligação de citocinas e fatores outros da osteogênese formam circuitos autócrinos e parácrinos envolvidos na regulação da remodelação óssea. Sendo assim, as citocinas como mediadores pró e anti-inflamatórios podem desempenhar um papel crucial para o mecanismo global de defesa do hospedeiro (HOROWITZ, 1998; BRODBECK et al., 2003; REFAI et al., 2004). Portanto, a liberação de citocinas por células quando em contato com os biomateriais é de importância clínica, uma vez que os implantes de metal são um alvo típico para a aderência bacteriana.

Reações de defesa relacionadas aos materiais de implante podem ter uma influência clínica direta sobre quadros de solturas sépticas e não sépticas. Diante do número cada vez crescente da utilização de implantes, tanto no meio ortopédico quanto odontológico, surge a preocupação com quadros infecciosos. Do ponto de vista ortopédico Kurtz et al. (2008) projetaram aumento de 673% na demanda por procedimentos cirúrgicos ortopédicos até 2030, com conseqüente aumento das taxas infecciosas que hoje representam 0,4 a 2% em procedimentos primários e 3,2 a 5,6% em procedimentos de revisão (MAHOMED et al., 2005; CARVALHO JÚNIOR; TEMPONI; BADET, 2013). Os microrganismos mais comumente encontrados em culturas de feridas infectadas e peri-implantes ortopédicos são *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase-negative*, seguidos pela contaminação por flora mista (LOWY, 1998; ZIMMERLI; TRAMPUZ; OCHSNER, 2004; von EIFF et al., 2006).

Do ponto de vista odontológico, é de conhecimento que os implantes dentários tornaram-se uma terapia indispensável. Taxas de sucesso de 82,9% após 16 anos de acompanhamento foram relatadas (ATIEH et al., 2012; SIMONIS; DUFOUR; TENENBAUM, 2010). Sob os cuidados e atenção das indicações, a inserção de implantes dentários parece representar uma opção de tratamento seguro e efetivo em casos de defeitos e falhas dentárias. No entanto, nas últimas décadas, cada vez mais casos de inflamações peri-implante vêm sendo relatados, o que implica em danos aos tecidos moles e às estruturas ósseas. Portanto, estratégias para a prevenção e tratamento da doença peri-implante devem ser

integradas (ATIEH et al., 2012; KHAMMISSA et al., 2012). Outro ponto de interesse odontológico relaciona-se aos casos de periodontite. A periodontite é doença comum e progressiva que afeta as estruturas de suporte dos dentes, provocando a perda de fixação ao osso e, muitas vezes, resultando na perda do dente (GRIFFEN et al., 1998; KOLENBRANDER, 2000). Um número limitado de espécies bacterianas têm sido associadas com a periodontite, e a mais forte evidência indica a *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) como patógeno direto. Estudos têm mostrado que a *Pg* ocorre com maior frequência e em níveis mais elevados em locais com doença ativa (BROWN; OLIVER; LOE, 1989; HOJO et al., 2009).

Diante do exposto, é de importância o melhor conhecimento da interação entre o TP e as CMSP, assim como em relação à possível interferência de microorganismos de maior prevalência em condições infecciosas ortopédicas e odontológicas neste contexto. A melhor compreensão destas relações pode ajudar no controle dos quadros infecciosos relacionados a implantes e consequentes solturas/perdas destes.

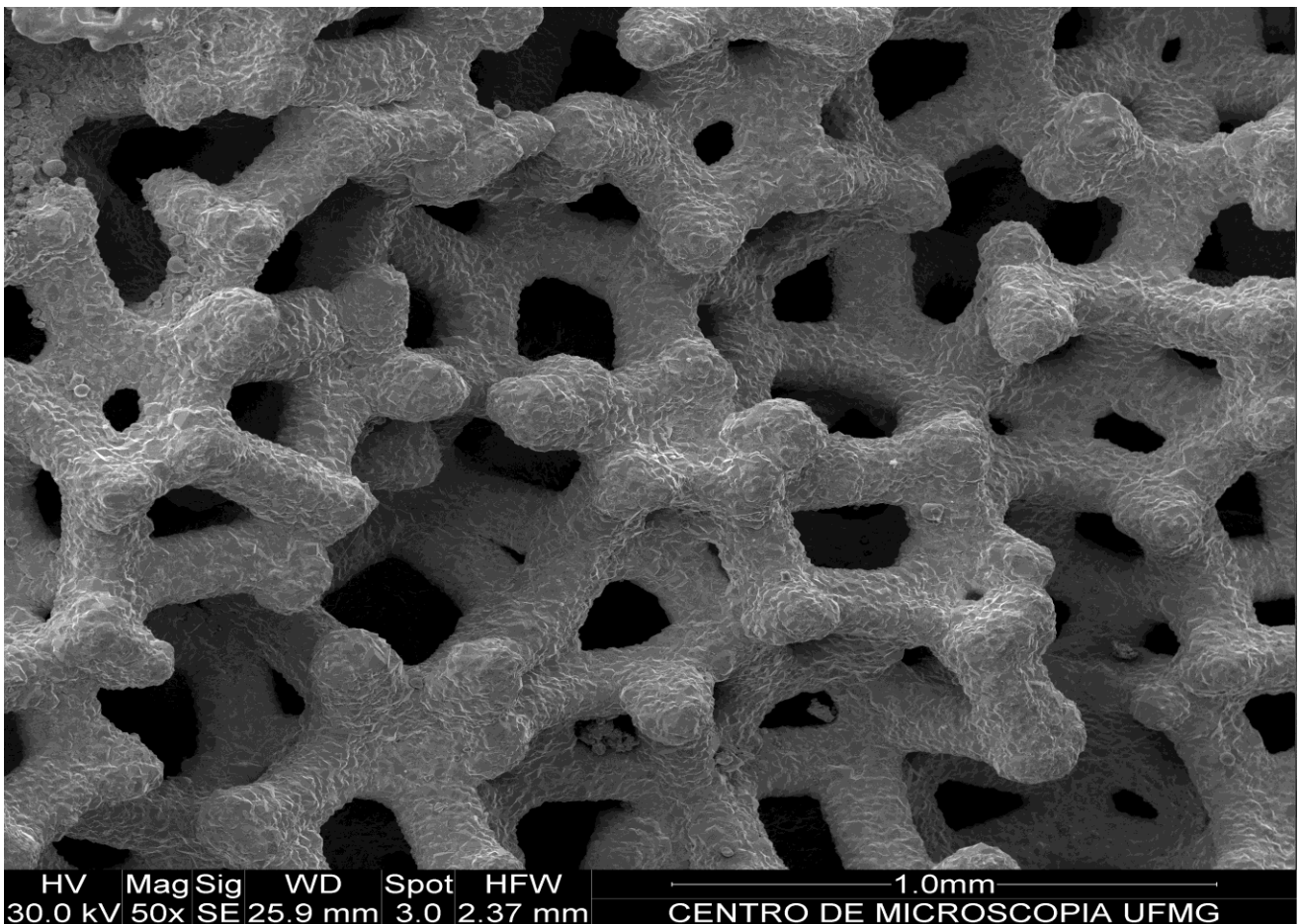
### 1.1 Tântalo

O Ta é um metal de transição, raro, resistente à corrosão, com número atômico 73. A palavra Ta foi cunhada a partir do Tântalo, uma figura da mitologia grega castigado a ficar imerso em uma poça de água sob uma árvore com frutos. Quando tentasse obter água, esta iria recuar, e quando estendesse a mão para pegar o fruto, o galho da árvore se moveria para cima (CHRISTIE, 2002). Esta propriedade "tentadora" do Ta foi vista pelos primeiros químicos quando tal metal era imerso em ácidos. Foi constatado que o Ta era altamente estável em quase todos os ácidos, exceto quando exposto ao contato com o ácido fluorídrico e ácidos que contivessem o trióxido de enxofre. O desenvolvimento do TP tem permitido o desenvolvimento de ligas mais resistentes e bioativas, com aplicabilidade ortopédica, craniofacial e odontológica. A estrutura do TP proporciona uma porosidade volumétrica elevada, com baixo módulo de elasticidade e características de atrito relativamente elevadas (HEINER; BROWN; POGGIE, 2001; LIU et al., 2015; MAS-MORUNO et al., 2015). Embora o Ta em sua forma *in natura* seja bioativo, sua utilização em dispositivos de implantes foi limitada devido ao seu



elevado custo para produção e difícil processamento, além de escassez na natureza. Sua alta densidade também é uma outra desvantagem, o que dificulta a elaboração de implantes de maior tamanho (ZARDIACKAS et al., 2001). O TP, conhecido comercialmente como metal trabecular (Zimmer Inc., Warsaw, IN, USA), é um biomaterial poroso com microestrutura semelhante ao osso trabecular que apresenta conformidade dodecaédrica e melhores condições biológicas (Fig. 1). As repetições dodecaédricas são fabricadas a partir de um molde de carbono semelhante à espuma, que forma o esqueleto interno do dispositivo (1%). Este arcabouço é então colocado numa câmara sem contato com o ar, sendo após o Ta evaporado (99%) como  $TaCl^2$ , e tendo suas moléculas depositadas sobre o arcabouço de carbono (COHEN, 2002), formando o que se conhece como TP.

**Figura 1: Microestrutura do metal trabeculado poroso de tântalo**



Fonte: Acervo Mestrado PUC Minas, Centro de Microscopia UFMG, 2016

### **1.1.1 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas do TP foram comparadas com o osso esponjoso, ligas de titânio, de cromo e outros biomateriais (Tabela 1) (SCHILDHAUER et al., 2006). Na forma sólida o Ta mantém um módulo de elasticidade alto, em torno de 185 GPa, que é significativamente reduzido quando utilizado na sua forma porosa (3 GPa). O TP utilizado em implantes ortopédicos e odontológicos possui porosidade em torno de 75-85% em comparação ao CoCr (30-35%) e ligas de outros metais (40-50%). Tais condições favorecem uma melhor estabilidade do implante e um maior contato com os tecidos de integração quando da utilização clínica. O módulo de elasticidade do TP é semelhante ao do osso subcondral, no entanto, a resistência à deformação final é dez vezes maior, o que torna-se interessante ao contribuir para a melhora estrutural dos tecidos. Shimko et al. (2005) encontraram módulos de elasticidade semelhantes entre implantes de TP, ossos esponjosos bovinos e de seres humanos. Zardiackas et al. (2001) demonstraram que o TP apresenta melhores resultados que o osso esponjoso quando submetido a cargas em flexão. Heiner, Brown e Poggie (2001) nesta mesma linha demonstraram que tal propriedade do TP aumenta com a diminuição da porosidade desta estrutura. No estado disponível atualmente, os implantes de TP mantêm uma rigidez à flexão semelhantes a fíbula do ser humano (HEINER; BROWN; POGGIE, 2001; CHRISTIE, 2002; LU et al., 2015). Todas estas propriedades mecânicas permitem que o TP seja utilizado de forma segura em aplicações ortopédicas e odontológicas que necessitam de recrutamento precoce de carga e arcabouço estrutural para regeneração e reparo ósseo (fusões da coluna vertebral, artroplastia de quadril e joelho, substituto de enxertos ósseos).

**Tabela 1: Comparação do tântalo poroso com as demais ligas metálicas**

Propriedade	Osso cortical	Ta poroso	Ta puro(F560)	Ti-6Al-4V(F1472)	Co-28Cr-6Mo(F75)	UHMWPE(F648)
Módulo de elasticidade	10-15	2.5-3.9	186	106-115	210	12.6
Força máxima		50-110	207-517	860	655-889	35
Deformação plástica		35-51	138-345	758	445-517	21
Resistência a compressão	167-213	50-70	n/a	n/a	n/a	n/a
Resistência tênsil	90-130	63	n/a	n/a	n/a	n/a
Resistência a flexão	103-238	110	n/a	n/a	n/a	n/a
Alongamento	1-3	n/a	2-30	8	8	300
Redução de área		n/a	n/a	14	8	n/a

Fonte: LEVINE et al., 2006

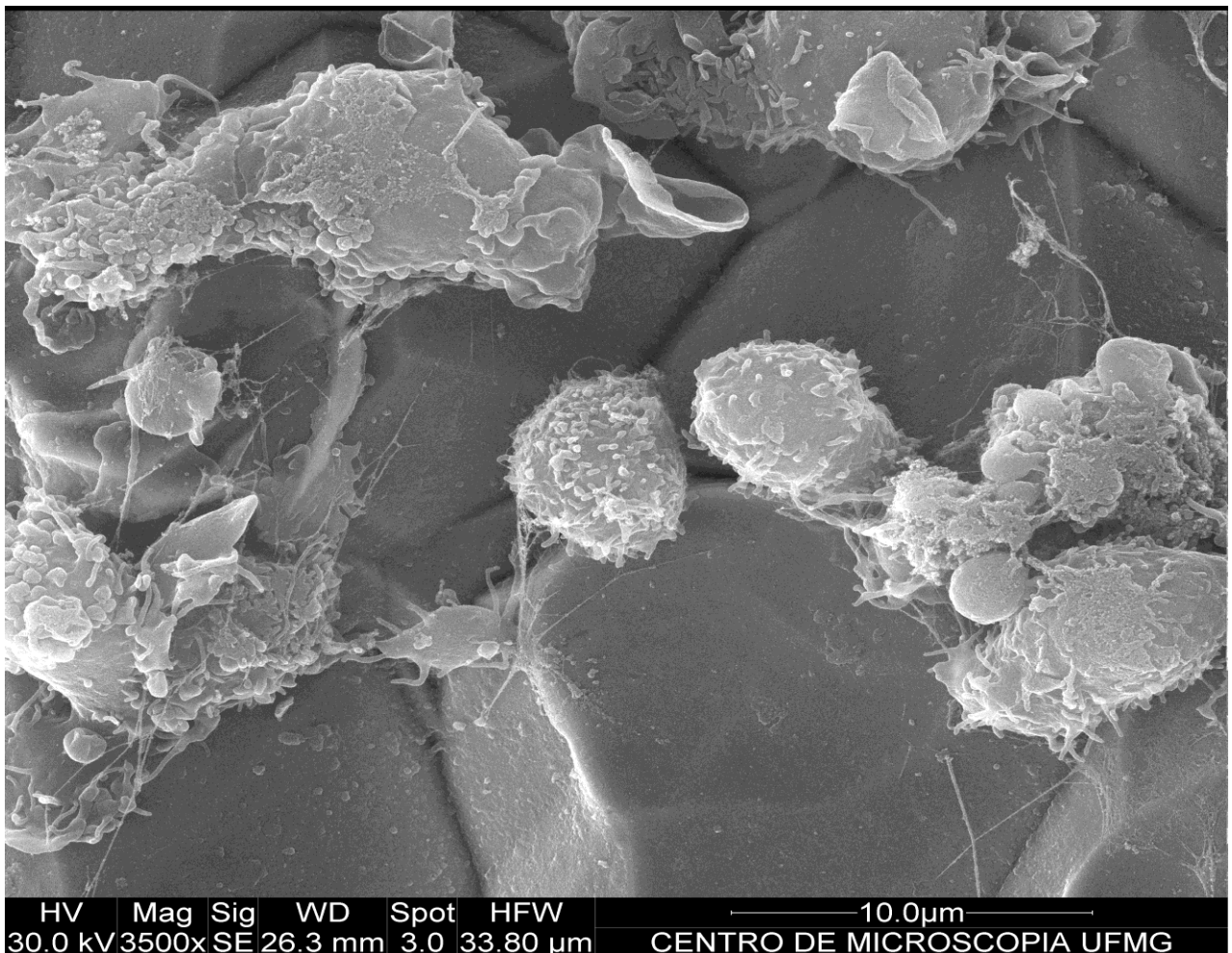
### 1.1.2 Bioatividade e biocompatibilidade

O TP é conhecido por ter comportamento bioativo *in vivo* sendo utilizado na constituição de diversos materiais (COHEN, 2002; MAS-MORUNO et al., 2015). O óxido formado sobre a superfície dos implantes de TP *in vivo* mostrou ser bastante estável em diversas faixas de pH, com análises histológicas indicando nenhuma ou em alguns casos pouca evidência de reação inflamatória nos tecidos circunjacentes (ZARDIACKAS et al., 2001). Matsuno et al. (2001) demonstraram boa interação entre o TP, partes moles e tecidos ósseos, sem indução de tecido inflamatório e com resistência à corrosão, apesar do tempo de fixação do implante.

Metais convencionais utilizados para a fabricação de aparelhos ortopédicos e odontológicos são normalmente inertes e, portanto, incapazes de se relacionar diretamente aos tecidos vivos. Foi demonstrado que o TP suporta o crescimento interno de tecido ósseo em condições simuladas e permite adesão celular em sua superfície (Fig. 2). Findlay et al. (2004) estudaram as interações de discos de Ta com osteoblastos humanos e compararam estes resultados com os de implantes convencionais. Não encontraram nenhuma diferença nas taxas de crescimento celular, expressão gênica, fixação celular, morfologia celular nos discos de Ta quando comparado aos demais, mostrando ser o Ta também capaz de manter a

qualidade e capacidade óssea. Todavia chamam a atenção para a necessidade desta mesma investigação utilizando o TP, que possui melhor capacidade biológica, e o melhor entendimento das reações advindas dos debris deste metal. Em estudos envolvendo animais, este metal poroso garantiu também arcabouço para o crescimento ósseo e fixação mecânica celular (BOBYN et al., 1999; KIM et al., 2013). Estudos mais recentes têm mostrado ainda que a utilização de componentes à base de TP durante procedimentos artroplásticos foram associados com menor incidência de falha de todas as causas e menor incidência de infecção subsequente quando utilizado em pacientes com infecção periprotética (TOKARSKI; NOVACK; PARVIZI, 2015).

**Figura 2: Células mononucleares do sangue periférico em contato com a microestrutura do metal trabeculado poroso de tântalo**



Fonte: Acervo Mestrado PUC Minas, Centro de Microscopia UFMG, 2016

A fim de incentivar e melhorar a ligação dos componentes metálicos para com os tecidos vivos, metais porosos com revestimento bioativo têm sido desenvolvidos. Estes materiais bioativos, assim como outras ligas, também possuem capacidade de se degradar ao longo do tempo, o que tem levado à busca de um metal mais bioativo que mantenha alta resistência mecânica, além de ligação química estável para com o osso circunjacente (SCHILDHAUER et al., 2006). Kato et al. (2000) testaram mecanicamente e avaliaram histologicamente a ligação óssea em placas de Ta com e sem pré-tratamento. Histologicamente, as placas pré-tratadas exibiram contato direto osso-implante, enquanto que o grupo não tratado desenvolveu uma interface de tecido fibroso na junção do osso-implante. Tal biocapacidade deveu-se a possibilidade de melhor ambiente para interação entre o TP e o meio ambiente de teste. Tang et al. (2013) estudaram ligas que foram cobertas por TP e demonstraram boa biocompatibilidade com aumento da indução óssea *in vitro* e da formação óssea *in vivo*.

### **1.1.3 Aplicabilidade odontológica**

O Ta foi primeiramente utilizado para fabricação de implantes dentários durante os anos 40 (BELLINGER, 1947; RIEGER, 1950), sendo a partir do final da década de 90 utilizados como componentes de implantes na sua forma porosa (Zimmer Inc., Warsaw, IN, EUA). A tecnologia do TP na odontologia foi introduzida para se criar um microambiente propício para o crescimento tridimensional ósseo ao redor dos implantes convencionais, sendo parte estrutural dos implantes de titânio. A liga de titânio (Ti-6Al-4V grau 5) e os componentes de TP são originalmente fabricados separadamente, sendo o componente poroso adicionado à porção média dos implantes de titânio (Tapered Screw-Vent ® Implant, Zimmer Dental Inc., Carlsbad, CA, EUA). A utilização do TP como componente de implantes dentários vem permitindo a melhora do desempenho mecânico e biológico, enriquecendo as opções de implantes atualmente existentes (SCHLEE et al., 2015; SCHLEE; van der SCHOOOR; van der SCHOOOR, 2015; ZHANG et al., 2015). Por meio da tecnologia dos elementos finitos, foi descrito pico de estresse mais baixo e mais uniformemente distribuído no tecido ósseo cortical em torno de um modelo de implante dentário com o TP quando comparado ao de sólidos convencionais (GENG; TAN; LIU, 2001).

Embora os implantes de TP sejam amplamente usados com sucesso em

implantes ortopédicos (cirurgia do joelho, quadril e coluna) a utilização na cavidade oral ainda é pouco estudada (KOLENBRANDER, 2000; DHIR, 2013;). Diferentemente da maioria dos locais cirúrgicos ortopédicos, a cavidade oral é um campo não estéril, que pode abrigar mais de 500 espécies bacterianas (BROWN; OLIVER; LOE, 1989; PREUS et al., 1995; KOLENBRANDER, 2000; HOJO et al., 2009). As interações entre tecido hospedeiro, saliva e microrganismos pode tornar difícil prever como o implante de TP irá reagir a este ambiente complexo. No entanto, há determinados cenários em que a terapia de implante dentário deve ser reforçada e, neste contexto, modelos com TP podem ser úteis (KIM et al., 2013; LEE et al., 2015). Um exemplo seria quando da abordagem a tecidos ósseos de má qualidade, como em pacientes diabéticos, osteoporóticos, em uso crônico de tabaco e com histórico de irradiação. Outro, quando não há estrutura suficiente de osso remanescente para um potencial implante direto, devendo ser tratado o defeito previamente à colocação do implante. Adicionalmente, o TP pode ser utilizado para reforçar outras ligas, como parte de implantes para preenchimento de defeito ósseo de maior monta, assim como nos casos de pacientes que demandem reabilitação precoce. (RIEGER, 1950; KIM et al., 2013).

Schlee et al. (2015) conduziram um estudo no qual o desempenho clínico do TP de implantes dentários com carga precoce foi avaliado. 17 pacientes com 22 implantes foram avaliados durante um ano de seguimento clínico. Resultados indicaram sobrevida de todos os implantes sem complicações graves, exceto em um, onde insuficiência de integração por motivo desconhecido foi observada. As alterações médias no nível ósseo variaram entre 0,29 e 0,35 milímetros 6 e 12 meses após o tratamento, respectivamente. Em comparação com outros estudos, os dados demonstraram que a quantidade de perda óssea marginal média foi significativamente menor, com segurança e efetividade para carga precoce, quando comparada a observada nos implantes controle. Schlee et al. conduziram também ensaio clínico multicêntrico onde o desempenho dos implantes com TP foi avaliado (SCHLEE et al., 2015). Os resultados após 1 ano indicaram uma taxa de sucesso semelhante e elevada nos 145 implantes de 105 pacientes dos 22 centros clínicos. Foi observado que 90,8% dos implantes não apresentavam nenhum sinal de inflamação gengival e 78,0% qualquer acúmulo de placa, tendo a perda óssea marginal periimplante variação média de  $0,43 \pm 0,57$  mm. Papi et al. (2014) também demonstraram bons resultados a curto prazo quando da utilização de tais

componentes em pacientes oncológicos (PAPI et al., 2014; BRAUNER et al., 2015). Descreveram sobrevida de 100% dos implantes em um ano, com média de perda óssea marginal de marginal  $0,19 \pm 0,25$ ,  $0,22 \pm 0,4$ ,  $0,3 \pm 0,46$  e  $0,57 \pm 0,62$  mm, aos 2, 4, 6 e 12 meses, respectivamente. Outros estudos relataram ainda que implantes com recobrimento com o TP além de apresentarem melhora da capacidade mecânica, possuíam capacidade antibacteriana e aumento da resistência à corrosão induzida (RABENSEIFNER et al., 1984; TOKARSKI; NOVACK; PARVIZI, 2015; ZHANG et al., 2015).

É reconhecido que tal como o titânio, o Ta é altamente biocompatível e resistente à corrosão. Entretanto, diante de falhas que se estendam a tal estrutura, é necessária a remoção do implante, enxertia e, posteriormente, uma nova colocação do implante pode ser indicado como tratamento de escolha (PREUS et al., 1995; MIYAZA et al., 2002; KHAMMISSA et al., 2012). Neste contexto, uma preocupação mecânica foi levantada em torno de implantes dentários de titânio-TP. Implantes de TP podem ser propensos a fraturas, especialmente quando são implantadas em estruturas ósseas de melhor qualidade com torque inadequado (tipo 1). Diante do exposto, parece que estes implantes sejam recomendados para pacientes com ossos de menor densidade (tipo 3 e 4) (BENCHARIT et al., 2014). Adicionalmente as interações com os fluidos, microorganismos e demais tecidos da cavidade oral ainda não foram investigadas amplamente (KOLENBRANDER, 2000; HOJO et al., 2009).

Os estudos atuais relacionados ao uso dos implantes com o TP na odontologia, embora escassos, têm indicado desfechos clínicos promissores (KOLENBRANDER, 2000; HOJO et al., 2009; KIM et al., 2013). No entanto, as preocupações sobre os possíveis riscos e complicações incluindo as reações ainda imprevisíveis do TP dentro do ambiente oral, o risco de periimplantite, a dificuldade de remoção do implante e a possibilidade de fratura na interface titânio-tântalo são aventadas quando tal liga é aplicada na cavidade oral. Pouco se sabe sobre os efeitos biológicos em nível molecular do TP em comparação aos outros metais e ligas metálicas tradicionais. Portanto, a condução de estudos clínicos randomizados poderá contribuir para ampliar o conhecimento sobre as aplicações e limitações do TP na Odontologia, tanto do ponto de vista laboratorial quanto clínico.

## 1.2 Doença periodontal

As doenças periodontais (DP) são doenças inflamatórias crônicas caracterizadas pela destruição das estruturas de suporte dos dentes, sendo fator modificador da saúde sistêmica dos pacientes (TONETTI; CLAFFEY, 2005). A doença periodontal é uma infecção multifatorial associada à presença de um complexo microbiano agregado na forma de biofilme. Curiosamente, a presença de periodontopatógenos é necessária, mas não suficiente, para a iniciação do processo (GRAVES, 2008). De fato, uma série de estudos demonstraram que a resposta inflamatória imunológica do hospedeiro contra os patógenos na destruição de tecidos periodontais moles e mineralizados é fundamental (GRAVES, 2008; LIU; LERNER; TENG, 2010).

### 1.2.1 *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

A periodontite é uma doença comum e progressiva que afeta as estruturas de suporte dos dentes, provocando a perda de fixação ao osso e, muitas vezes resultando na perda do dente. Entre mais de 500 espécies bacterianas que habitam a cavidade oral, um complexo bacteriano denominado "complexo vermelho" e composto por *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Forsythia* e *Tannerella* têm sido fortemente associado às lesões periodontais (BROWN; OLIVER; LOE, 1989; HOJO et al., 2009; MYSAK et al., 2014). Foi demonstrado que a *Pg* ocorre com maior frequência e em níveis mais elevados em locais com doença ativa, e que certos indicadores de saúde periodontal em indivíduos são inversamente correlacionados com a presença dos níveis deste patógeno periodontal (MYSAK et al., 2014).

A *Pg* existe normalmente no tecido subgingival e forma biofilmes com algumas espécies de bactérias (KOLENBRANDER, 2000). A *Pg* é uma espécie anaeróbica gram-negativa que possui diversos fatores de virulência, tais como lipopolissacáridos, fímbrias, proteases e hemaglutininas, estando fortemente associado com quadros de periodontite crônica em adultos. Receptores Toll-like destes desencadeiam liberação de citocinas e quimiocinas que são responsáveis pelo acúmulo de células inflamatórias e desencadeamento da infecção periodontal



(KOLENBRANDER, 2000; KIM et al., 2013). Tem sido bem estabelecido que, em consequência da estimulação por produtos bacterianos, monócitos e macrófagos sintetizam um amplo espectro de citocinas que têm efeitos pró-inflamatórios importantes e estão relacionados com a destruição de tecido periodontal. Secreção elevada de várias citocinas por células do hospedeiro, foi observada após a estimulação com LPS de *Pg* (PREUS et al., 1995; GRIFFEN et al., 1998; HOROWITZ, 1998). Estas substâncias detêm um grande potencial para servir como indicadores de processos inflamatórios e, conseqüentemente, da doença periodontal.

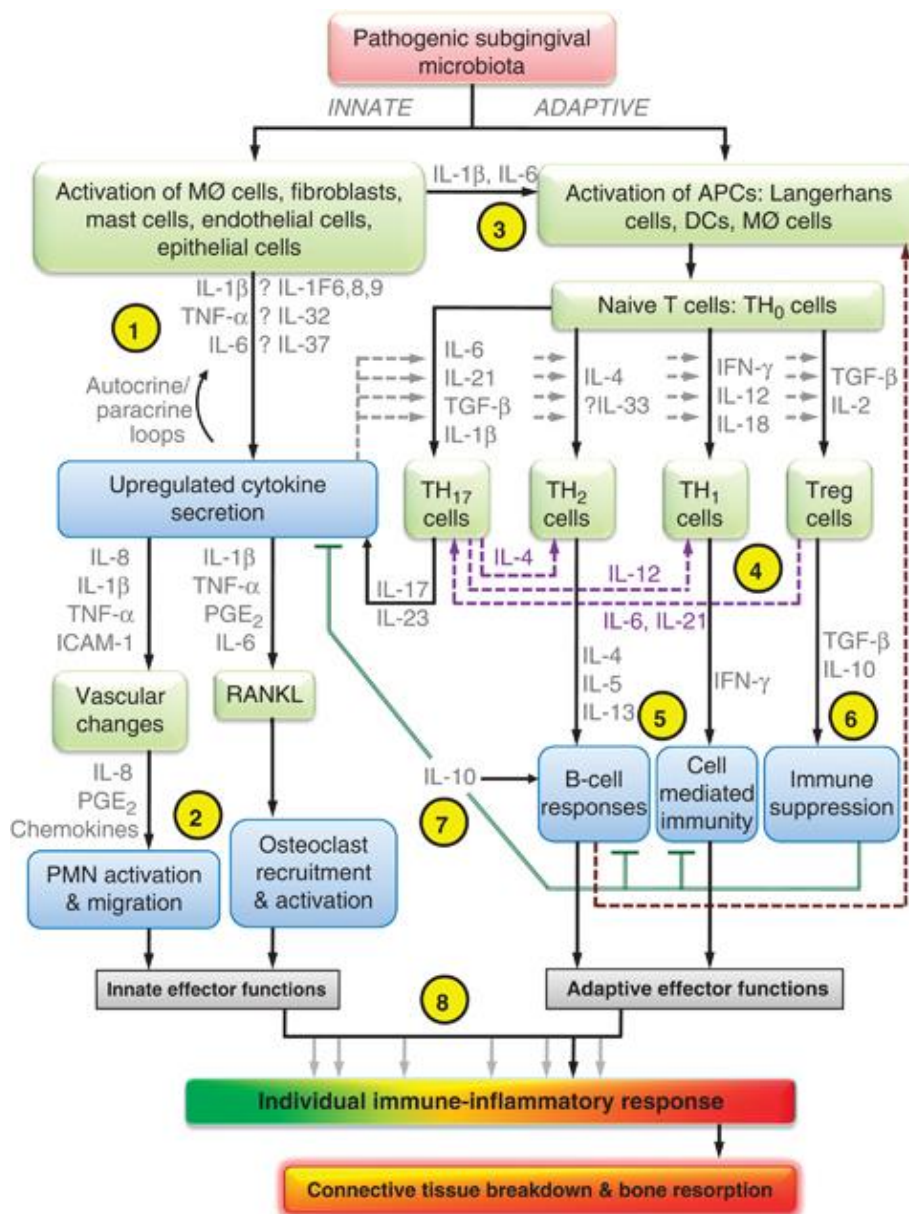
### ***1.2.2 Citocinas e marcadores biológicos na doença periodontal***

De maneira prática e objetiva o sistema imune é composto de duas divisões maiores: o sistema não específico e o sistema específico. O primeiro faz parte da primeira linha de defesa em casos agudos e é composto por monócitos/macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Já o sistema específico faz parte da segunda linha de defesa, em casos crônicos, e composto por predomínio de células mononucleares (ABBAS; LICHTMAN, 2007; GRAVES, 2008; KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011). Para iniciar uma resposta imune adaptativa ou específica, após quadro agudo, as células mononucleares produzem uma série de mediadores inflamatórios, como polipeptídeos, fatores do complemento, fatores de coagulação, enzimas como proteases e lipases. As citocinas são um subgrupo dentro dos polipeptídeos que interagem com receptores específicos. Uma rede de citocinas é definida como um grupo de citocinas que, em conjunto, são capazes de regular as funções celulares chaves. As redes de citocinas na periodontite não são totalmente compreendidas (GRAVES, 2008; KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011). Elas podem atuar de forma autócrina, quando são capazes de agir sobre as próprias células que as produzem; ou de forma parácrina, quando agem em células vizinhas sem que para isso tenha que atingir a corrente sanguínea; e endócrina quando agem em células distantes ao seu local de produção. Essas proteínas atuam de formas distintas, sendo elas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (OKADA; MURAKAMI, 1998; WELLNER et al., 2012). A gravidade da periodontite e da liberação de citocinas se eleva à medida que a destruição tecidual aumenta (OKADA;

MURAKAMI, 1998; GRAVES, 2008; KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011; MYSAK et al., 2014).

Durante o processo inflamatório específico do quadro periodontal são liberadas diversos grupos de citocinas. O conhecimento atualmente existente a respeito da resposta biológica na doença periodontal foi esquematicamente descrito na Fig. 3, embora ainda não exista consenso (KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011). Como pró-inflamatórias existem IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, RANKL e TNF- $\alpha$ . Estas, tem como função estimular a migração de células do sistema imune, ativar a atividade fagocitária, estimular a produção de mais citocinas por outras células, estimular a secreção de colagenase, induzir secreção de anticorpo pelos plasmócitos e modular a reabsorção óssea (ABBAS; LICHTMAN, 2007; OKADA; MURAKAMI, 1998; VARELA; FORTE, 2001; TOSI, 2005). Mais especificamente, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  são os clássicos mediadores da inflamação, estimulando alterações vasculares, recrutando leucócitos e controlando a resposta imunológica celular (ROMAGNANI, 2002). Ao contrário, existem as citocinas anti-inflamatórias, estas responsáveis pela modulação do quadro inflamatório. O grupo das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) tem como função desativar os macrófagos e os linfócitos, bem como inibir a produção e bloquear o efeito de citocinas pró-inflamatórias, inibir a angiogênese e a produção de prostaglandinas (OKADA; MURAKAMI, 1998; VARELA; FORTE, 2001; TOSI, 2005; ABBAS; LICHTMAN, 2007) As células T ativadas em condições inflamatórias levam à produção de citocinas osteoclastogênicas tal como RANKL, fator importante de perda óssea associada a condições inflamatórias tais como a periodontite crônica (HERRERA et al., 2014; MUCCI et al., 2015). As metaloproteinases de matriz (MMPs), embora não sejam citocinas, também são capazes de ativar vários fatores de crescimento latentes, citocinas e clivagem de proteínas de superfície de célula (receptores de citocinas, a adesão celular de moléculas, o receptor de urocinase), participando na via final da cascata de resposta aos patógenos periodontais. Através da sua atividade proteolítica, as MMPs desempenham um papel crucial nas vias de sinalização que controlam o crescimento celular, sobrevivência, invasão, a inflamação e a angiogênese (HOPPER et al., 2015; BAUVOIS, 2012).

Figura 3: Biologia na doença periodontal



Fonte: KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a viabilidade celular e o comportamento biológico das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) em contato com o tântalo poroso (TP) e *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*).

### 2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a viabilidade celular das CMSP em presença do TP;
- b) avaliar a adesão das CMSP ao TP por microscopia eletrônica de varredura;
- c) quantificar e comparar a expressão de IL-10, TGF-  $\beta$ , RANKL e MMP-9 em CMSP incubadas com o TP e com *Pg*.



### 3 ARTIGO

Ao término desta pesquisa, foi possível elaborar a seguinte proposta de artigo, que será encaminhada para publicação na revista **Clinical Implant Dentistry and Related Research**.

**The effect of porous tantalum on the biological response of PBMC exposed to *Porphyromonas gingivalis***

Artigo preparado dentro das normas da revista **Clinical Implant Dentistry and Related Research (Qualis A2)**.

Normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1708-8208/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1708-8208/homepage/ForAuthors.html)

**The effect of porous tantalum on the biological response of PBMC exposed to *Porphyromonas gingivalis***

Eduardo Frois Temponi, M.D.<sup>a,e</sup>, Paulo Eduardo Alencar Souza, Ph.D.<sup>a</sup>, Luísa Mourão Dias Magalhães, MS<sup>b</sup>, Walderez Ornelas Dutra, Ph.D.<sup>b</sup>, Kenneth John Gollob, PhD<sup>c</sup>, Tarcília Aparecida Silva Ph.D.<sup>d</sup>, Rodrigo Villamarim Soares, Ph.D.<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Morphology, ICB, Federal University of Minas Gerais UFMG , Belo Horizonte, Brazil.

<sup>c</sup> Núcleo de Ensino e Pesquisa do Hospital Mario Penna, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>d</sup> Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, Brazil.

<sup>e</sup> Hospital Madre Teresa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author: Rodrigo Villamarim Soares. 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 3319-4166

E-mail: rodrigo\_vsoares@gmail.com

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was evaluate *in vitro* the cell viability and biological behavior of human peripheral mononuclear cells (PBMC) in contact with porous tantalum (PT) associated or not to *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*). It was hypothesized that both cell viability and biological response will not be altered by the PT, and in addition, that PT could modulate the effect of *Pg* exposure.

**Methods:** PBMC was collected from 10 healthy individuals and the following groups were formed: PBMC cells (CG); PBMC with PT (PTG); PBMC with *Pg* (PGG); PBMC with PT and *Pg* (PTPGG). All PBMC were incubated alone or with PT overnight (12 hours), subsequently *Pg* was added to specific groups and incubation continued for 8 hours in all groups. Cell viability was evaluated by MTT assay, the morphology and adhesion of PBMCs to PT was observed via scanning electron microscopy (SEM), and the expression of IL-10, TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL was determined by ELISA.

**Results:** The MTT assay revealed that PT did not interfere in the mitochondrial activity of PBMC ( $p>0.05$ ). SEM revealed the adherence of PBMC to PT. Analysis of molecules expression showed that TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL did not exhibit significant differences among groups. In contrast, the expression of IL-10 significantly ( $p=0.004$ ) varied in all groups (CG < PTG < PTPGG < PGG).

**Conclusion:** PT did not affect PBMC cell viability, allowed cell adhesion, did not enhanced the expression of two pro-inflammatory molecules (MMP-9 and RANKL), enhanced the expression of an anti-inflammatory cytokine (IL-10) and modulate *Pg* influence in this expression. These results suggest that this biomaterial is biocompatible and display biomodulator activity in regard to the inflammatory response.

**KEYWORDS:** cytokines, peripheral mononuclear cells, porous tantalum, trabecular metal, *Porphyromonas gingivalis*.



## INTRODUCTION

Tantalum is a metal that continues to gain interest due to a variety of orthopedic and dental applications.<sup>1-6</sup> Porous tantalum (PT) was added to the middle section of the titanium multithreaded self-tapping endosseous dental implant (Tapered Screw-Vent® Implant, Zimmer Dental Inc., Carlsbad, CA, USA) and has been claimed to offer several advantages over other current conventional materials used in implantology. These benefits are derived from its uniformity and structural continuity, strength, low stiffness, high porosity, and high coefficient of friction that together, enable bone and tissue ingrowth.<sup>4,7</sup> However, information regarding the biologic effects of PT compared to other traditional biomaterials on the cells that surround this implant biomaterial is limited.<sup>8-12</sup> In this regard, the presence, *in vivo*, of multiple cell types in the bone microenvironment obscures the features of specific interactions *per se*.<sup>13</sup> Although previous studies have suggested that PT is biocompatible and likely not harmful since it does not exhibit any deleterious effects on different cells<sup>14-16</sup>, its interaction with some of the first cells after implantation, such as human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), has not been extensively studied.<sup>9,11,17,18</sup>

Dental biofilms maintain an inflammatory infiltrate in the periodontal microenvironment. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), a gram-negative anaerobic bacteria that colonizes subgingival tissue sites, plays an important role in triggering periodontal inflammation that can progress from gingivitis to periodontitis leading to a significant impairment of bone quality.<sup>19</sup> In this regard, the immune system recognizes pathogenic invaders and initiates an inflammatory response as well as the production of numerous mediators.<sup>20,21</sup> Any disability in inflammatory response may result in tissue damage, which may compromise implants osseointegration.<sup>22,23</sup>

Recently, some of the molecular mechanisms underlying periodontal tissue destruction were elucidated, and several host factors were investigated as promising therapeutic targets to arrest disease progression.<sup>21-25</sup> As a general rule, inflammatory mediators have been associated with tissue destruction, while anti-inflammatory mediators can counteract and attenuate disease progression.<sup>24-25</sup> A large number of activated T, B, and others types of immune cells are known to infiltrate inflamed gingival tissue as well as to produce representative molecules that modulate the etiopathogenesis of periodontal disease.<sup>24,25</sup> The matrix metalloproteinases (MMPs),

host proteases, are capable of activating various latent growth factors, cytokines and also to cleave cell surface proteins (i.e. cytokine receptors; cell adhesion molecules). Through their proteolytic activity, MMPs play crucial roles in signaling pathways that control cell growth, survival, invasion, inflammation, angiogenesis and have been especially associated with the remodeling of periodontal tissues.<sup>26,27</sup> Activated T cells in the inflammatory context lead to expression of osteoclastogenesis factors such as RANKL that is important for bone modulation in inflammatory conditions such as chronic periodontitis.<sup>24,28</sup> In contrast, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and interleukin-10 (IL-10) are anti-inflammatory cytokines with anti-osteoclastogenesis function and pleiotropic roles in the immune system.<sup>24,25,29</sup>

Biological response by PBMC to biomaterials is of clinical importance, since metal implants are a typical target for bacterial adherence. The relationship between implant materials and local host defense reactions may have an influence on clinically occurring implant site infection.<sup>9,12,22</sup> Therefore, in the present study the effect of PT on cell viability and biological behavior of PBMC stimulated or not by *Pg* was evaluated. It is hypothesized that cell viability will be maintained and biological response will be favorable in the PT presence, and also that PT will modulate PBMC response to *Pg*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Collection of samples and PBMC isolation**

This study was independently reviewed and approved by an University Research Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all individuals prior to their participation and subjects' rights were protected at all times. No financial incentives were offered to encourage subjects to participate in the study.

Blood samples (10 mL) were obtained by peripheral venipuncture into heparinized vacutainer tubes (Becton and Dickinson, Vacutainer®, New Jersey, USA) from 10 healthy donors (7 males, 3 females) with a median age of 29 years (24-40 years) without a history of periodontitis as well use of drugs that interfere with the immune inflammatory response. Purification of PBMCs was performed as previously described.<sup>30</sup> Briefly, heparinized blood was diluted to a proportion of 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). PBMCs were isolated from peripheral blood by density gradient centrifugation in Ficoll-Paque

(GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). The PBMC interface was collected and washed 3X by centrifugation with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with antibiotic-antimycotic (0.25 g/mL amphotericin B, 200 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin [Sigma, St. Louis, MO]) and L-glutamine (1 mM [Sigma, St. Louis, MO]), complete RPMI, to a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL.

### **Tantalum samples**

PT blocks ( $4 \text{ mm}^3$ ; 0.4g) were obtained from original Zimmer samples (Zimmer Inc., Warsaw, IN, USA). The final composition of tantalum is 99% Ta and 1% glassy carbon with a pore size of 590 nm and porosity of 80%. These blocks were first prepared by manual and neutral detergent cleaning, followed by ultrasonic bath with enzymatic detergent for 15 minutes (Medisafe UK Limited, Bishop's Stortford, UK), thermal disinfection at  $93^\circ\text{C}$  for 45 minutes (Baumer, São Paulo, Brazil) and steam autoclave at  $134^\circ\text{C}$  for 50 minutes (Baumer, São Paulo, Brazil). This cleaning and sterilization processes do not result in any effect on the PT structure (Zimmer Inc., instructional and institutional communication).

### **Methyl tetrazolium (MTT) assay for cellular viability**

Processed PBMCs (400  $\mu\text{l}$ ) from each participant was incubated with or without one PT block in polypropylene tubes for 20 hours. The cells were then subjected to MTT colorimetric functional assay to determine mitochondrial activity. MTT was added to each tube in a final concentration of 0.25mg/mL and incubated for 4 hours at  $37^\circ\text{C}$  in an atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ . After that, DMSO was added to the cultures in a 1:1 proportion and maintained at room temperature until the precipitate completely solubilized. Experiments were performed in triplicate. The samples were read against blank reagent at 575 nm in a microplate reader (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and the cell viability was expressed as percentages in comparison to control cells (hPBMC without PT block).

## Bacterial preparation

A single strain of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 was purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured as previously described by Kinane et al.<sup>31</sup> *Pg* were reactivated and cultured in Brucella agar (Pronadisa, Madrid, Spain) containing 5% blood, 5% yeast extract and 0.1% of hemin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 0.1% menadione (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) under anaerobic conditions (Bactron Anaerobic Chamber, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA) with an atmosphere of 90% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, at 37°C for 48 hours. The purified bacterial colonies were then harvested in PBS and heat inactivated at 100°C for 30 min., as described by Jia et al.<sup>32</sup> The final concentration of the *Pg* suspension was 4 x 10<sup>11</sup> CFU (colony forming units) per mL. The stock solution was kept at -20°C, thawed and diluted prior to experiments. The appropriate dilutions were made to achieve the desired concentration (moi 100:1).

## Analysis of IL-10, TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL expression

To quantify the production of these molecules, 400  $\mu$ l of PBMC were incubated alone or with PT during 12 hours at 37°C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. *Pg* was added to specific groups as described below and incubation continued for 8 hours at 37°C in an atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in all groups. Therefore, according to the condition the following groups were formed: PBMC cells (CG); PBMC with PT (PTG); PBMC with *Pg* (PGG); PBMC with PT and *Pg* (PTPGG). In CG the PBMC were maintained only in culture media, in PTG cells were also incubated with one PT block, and in the groups that were exposed to *Pg*, cells were incubated with heat-inactivated *Pg* at moi 100:1 (1.0 X 10<sup>8</sup> CFU/mL). Finally, in PTPGG, PBMC cells were incubated with one PT block and *Pg*. After a total period of 20 hours, all PBMC cells were centrifuged (3000 rpm, 4°C, 10 min) and the supernatant was collected. The production of IL-10, TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL was determined by double-ligand enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). The results were expressed in picograms of cytokine per mL.

## Microscopic analyses

Scanning electron microscopy (SEM) was performed using a FEG - Quanta 200 FEI instrument equipped with an ISIS EDX system (Link Analytical, Oxford Instruments). For visualization of adherent PBMC on metallic blocks, isolated PBMC ( $1 \times 10^6$  cells/mL supplemented RPMI 1640) were added to the samples and after, incubated for 24h using cell culture conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, humidified atmosphere). After this period, the blocks were carefully removed and washed three times with RPMI 1640. Then the adherent cells on PT were fixed in 5 ml of 2% glutaraldehyde for 3h. Following this, post-fixation was performed for each sample with 2% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) for 2 h at room temperature. Fixed samples were then dehydrated in an ethanol series (30%, 50%, 70%, 95% and 100% three times), followed by a hexamethyldisilane (HMDS) drying procedure. Dried samples were then mounted on aluminum stubs, gold coated and observed by SEM. The cells were microscopically photographed using FEG - Quanta 200 FEI and a digital camera (Colorview I, Olympus). Images were digitally processed using Cell P software (Olympus) and Photoshop 6.0 software (Adobe, Unterschleißheim, Germany).

## Statistical analysis

The data were tested for normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test. Cell viability (MTT) was analyzed by the Student t test and biomarkers expression by Mann-Witney test. The significance level was set at .05, and analysis was performed using SPSS, 20® (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 Armonk, NY: BM Corp).

## RESULTS

### Effect of PT on PBMC metabolic activity and adherence capacity

MTT assay was used to evaluate PBMC viability after incubation with PT. The results revealed that incubation for 20 hours did not lead to cytotoxicity to PBMC (Figure 1). All PT samples presented cell mitochondrial activity similar ( $p > 0.05$ ) to CG, with a cell viability of  $94,53\% \pm 22,61$ .

SEM shows the PT structure (Figure 2a) and in a higher magnification, PBMC adhered to a PT-block (Figure 2b and 2c). Typically, the cells accumulated in molds

and areas, where the PT struts converge.

### **Expression of IL-10, TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL**

In order to evaluate the expression of these molecules, PBMC were incubated alone, with PT blocks, *Pg* or both. After a total period of 20 hours, supernatants were collected and molecules concentration was determined (Table 1). Although medians among groups of TGF- $\beta$ , MMP-9 and RANKL were different, the observed values were not statistically significant ( $p>0.05$ ). Thus, the release of the anti-inflammatory TGF- $\beta$  and pro-inflammatory MMP-9 and RANKL were not influenced neither by PT, *Pg* or their association. Nevertheless, IL-10 expression displayed significant differences among groups. The anti-inflammatory IL-10 expression displayed a more complex pattern (CG<PTPGG<PTG<PGG;  $p=0.004$ ) in which both PT and *Pg* significantly enhanced its values, although a synergistic effect was not observed when PT and *Pg* were simultaneously incubated with PBMC, a result that indicates that PT reduce *Pg* stimulus of IL-10 expression by PBMC. CG exhibited the lowest expression (59.14 pg/mL), PTPGG (66.32 pg/mL) and PTG (68.59 pg/mL) intermediate higher values and PGG (84.56 pg/mL) the highest.

## **DISCUSSION**

The overall result of this study was that incubation of PBMC incubated with PT promotes cellular adhesion, did not interfere in cellular viability and modulate the expression of one cytokine. Although PT and *Pg* did not affect the expression of TGF- $\beta$ , MMP9 and RANKL by PBMC, the expression of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was enhanced both in PTG and PGG. However, a synergistic effect was not observed when PT and *Pg* were simultaneously (PTPGG) incubated with PBMC, and moreover, that PT interfere in *Pg* stimulus for IL-10 expression. To the best of our knowledge, the present study is the first to describe the effect of PT in these molecules by mononuclear leukocytes that were also exposed to a periodontal pathogen.

To better simulate the *in vitro* periodontal microenvironment, PBMC that are present in the periodontal tissues and a recognized periodontal pathogen (*Pg*)<sup>13,19</sup> were used, and the secretion of important molecules related to inflammatory response<sup>33</sup> analyzed when these cells were exposed to PT and/or *Pg*. The PBMCs

was chosen as the target cells since they are precursors of tissue macrophages and related to adaptive response in inflammation, which have consistently been identified in association with wear particles in periprosthetic tissues, and are known to produce potent inflammatory and bone-resorbing mediators, besides being some of the first cells to interact with biomaterials such as PT after implantation.<sup>24,33,34</sup>

Leukocyte adhesion to implants has long been recognized as a key and primary mechanism for inflammatory reactions to the material itself.<sup>33,35</sup> The biological response also depends of the physicochemical nature of the surface and positively correlates with material surface roughness.<sup>36-38</sup> Welldon et al. described that PT is a suitable material for human osteoblast-like cell growth and differentiation, and may enhance their maturations well as the expression of osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein, type I collagen, RANKL and OPG.<sup>39</sup> Tang et al. reported that PT coating not only enhanced hBMSC adhesion and proliferation, but also stimulated mesenchymal stem cell osteogenetic differentiation *in vitro* by the enhanced alkaline phosphatase and RUNX2 expression.<sup>9</sup>

It has been shown that cytokines, chemokines, transcription factors, MMPs, adhesion molecules and nuclear factor- $\kappa$ B-dependent anti-apoptotic genes are associated with periodontal status.<sup>40-42</sup> Expression of the representative molecules related to periodontal status by PBMC chosen in the present study (MMP9, RANKL, TGF- $\beta$  and IL-10) in the presence of PT and *Pg* were not previously described. MMP-9 and RANKL are molecules involved in osteoclastogenesis, bone resorption and connective tissue degradation, whereas TGF- $\beta$  is involved in the down regulation of inflammatory reactions and stimulation of tissue healing.<sup>24-28,33</sup> In this study, incubation of PBMC with PT and *Pg* rendered no effect on cell production of these three molecules. Since different molecules present diverse secretion kinetics, further experiments testing its expression at various incubation times are necessary to confirm the observed pattern. In contrast, IL-10 expression was enhanced by PT and *Pg* presence. IL-10 is a key regulator of the immune system that limits the inflammatory response that otherwise could cause tissue damage, being essential for homeostasis of the immune system.<sup>43</sup> However, high production of IL-10 is also associated with sustained chronic infections and its blockade promotes pathogen clearance.<sup>44</sup> Previous studies also reported increased levels of IL-10 and low levels of cytokines related to the Th1 cell profile (e.g. interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha) when cells were exposed to *Pg*.<sup>41,45</sup> Additionally, the absence of a

synergistic effect, incubation with PT/*Pg*, associate with the significant difference observed ( $PGG > PTPGG$ ) suggest that PT might have reduced *Pg* stimulus in PBMC expression of IL-10. Future studies will be necessary to evaluate the influence of this on the modulation of the inflammatory response and the effect of this interference on osteoclastogenesis, which is of clinical importance.

While PT itself is similar to titanium in that it is highly biocompatible and corrosion resistant, the biological interactions with oral fluid, oral and skin germs, and biofilm are not well known.<sup>1,13,22,23</sup> Tissue integration requires a fine balance between the need for inflammatory signals, which are necessary for host defense but also for induction of tissue remodeling, and subsequent reduction of inflammatory reactions.<sup>21,35</sup> Generally, the cell viability and initial adhesion influences the subsequent differentiation of stem cells.<sup>36,46</sup> In this study PBMC incubated with PT present similar cell mitochondrial activity results ( $p>0.05$ ) to controls groups, confirming the maintenance of cell viability in PT presence. The *in vitro* PBMC PT interaction results clearly indicated that the PT did not interfere in cell viability and also in cells adherence as assessed by SEM. The same reports are described for previous studies. Wei et al. showed that the proliferation of BMSCs co-cultured with PT was not inhibited when compared to a control group after a follow-up.<sup>15</sup> The same behavior was reported by Wang et al<sup>16</sup>, Wang et al.<sup>14</sup> and Chen et al.<sup>47</sup>

In this *in vitro* study, the experimental conditions were limited to one microbial agent and one time point analysis. Furthermore, oral environment factors, such as saliva, may impact the cytotoxicity and cell response to the substances studied here. Nevertheless, the present study was performed in controlled experimental conditions and rendered reliable and reproducible results. Another limitation is that only four molecules may not allow the prediction of an overall functional cellular response under *in vivo* conditions, since many other functional and temporally occurring mediators may be involved.

In summary, the biological activity of the released immune inflammatory mediators at the implant site influences the local host defense capacity. Therefore, biological response by PBMC to biomaterials is of clinical importance, since metal implants are a typical target for bacterial adherence. Implant material related local host defense reactions may have an influence on clinically occurring implant site infection. This *in vitro* study has shown that PBMC are not affected in its viability when exposed to PT and not enhanced responses via regulation of MMP-9 and



RANKL. IL-10 expression was enhanced in PT presence, a result that demonstrates that PT may modulate the inflammatory process and might control *Pg* stimulus for the expression of this cytokine. Further investigations should be conducted in order to comprehend the clinical relevance of the findings observed in the present study.

## **CONCLUSION**

PT did not affect PBMC cell viability, allowed cell adhesion, did not enhanced the expression of two pro-inflammatory molecules (MMP-9 and RANKL), enhanced the expression of an anti-inflammatory cytokine (IL-10) and modulate *Pg* influence in this expression. These results suggest that this biomaterial is biocompatible and display biomodulator activity in regard to the inflammatory response.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil; Fundo de Incentivo à Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (FIP-PUC Minas 2016/10347). EFT has a CAPES fellowship. The authors would like to acknowledge the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

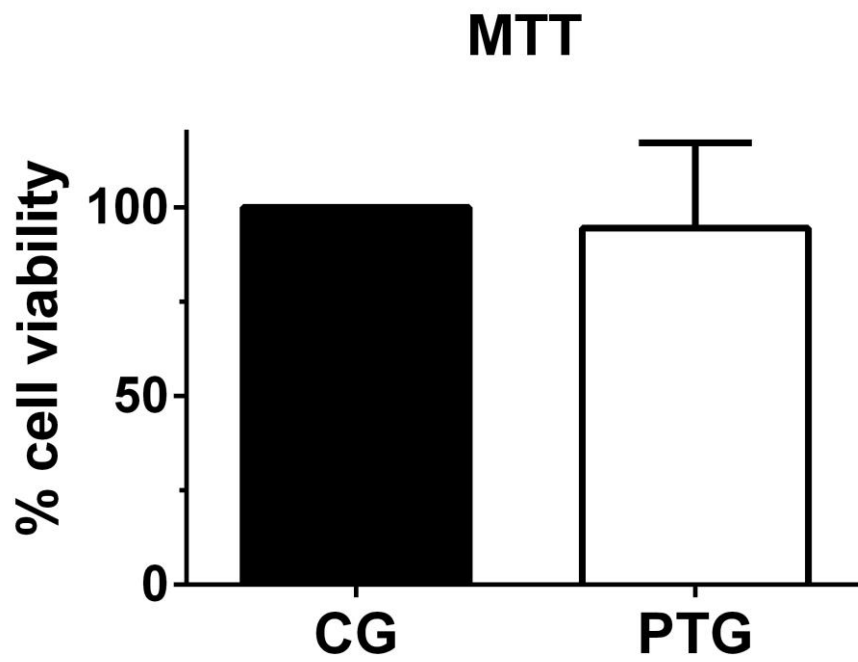
1. Bencharit S, Byrd WC, Altarawneh S, Hosseini B, Leong A, Reside G, et al. Development and applications of porous tantalum trabecular metal-enhanced titanium dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014; 16: 817-826.
2. Bobyn JD, Stackpool GJ, Hacking SA, Tanzer M, Krygier JJ. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *J Bone Joint Surg Br*. 1999; 81:907-914.
3. Bellinger DH. Preliminary report on the use of tantalum in maxillofacial and oral surgery. *J Oral Surg (Chic)*. 1947; 5:108-122.
4. Cohen R. A porous tantalum trabecular metal: basic science. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2002; 31:216-217.
5. Rieger HG. Tantalum as a replacement for bone in oral surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1950; 3:727-731.
6. Schlee M, Pradies G, Mehmke WU, Beneytout A, Stamm M, Meda RG, et al. Prospective, multicenter evaluation of trabecular metal-enhanced titanium dental implants placed in routine dental practices: 1-year interim report from the development period (2010 to 2011). *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015; 17:1141-53.
7. Zardiackas LD, Parsell DE, Dillon LD, Mitchell DW, Nunnery LA, Poggie R. Structure, metallurgy, and mechanical properties of a porous tantalum foam. *J Biomed Mater Res*, 2001; 58:180-187.
8. Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 2005; 26:1837-1847.
9. Tang Z, Xie Y, Yang F, Huang Y, Wang C, Dai K, et al. Porous tantalum coatings prepared by vacuum plasma spraying enhance bmscs osteogenic differentiation and bone regeneration in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013; 8:e66263.
10. Shimko DA, Shimko VF, Sander EA, Dickson KF, Nauman EA. Effect of porosity on the fluid flow characteristics and mechanical properties of tantalum scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; 73:315-324.
11. Ninomiya JT, Struve JA, Krolikowski J, Hawkins M, Weihrauch D. Porous ongrowth surfaces alter osteoblast maturation and mineralization. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103:276-281.

12. Liu Y, Bao C, Wismeijer D, Wu G. The physicochemical/biological properties of porous tantalum and the potential surface modification techniques to improve its clinical application in dental implantology. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015; 49:323-329.
13. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:413.
14. Wang Q, Zhang H, Li Q, Ye L, Gan H, Liu Y, et al. Biocompatibility and osteogenic properties of porous tantalum. *Exp Ther Med.* 2015; 9:780-786.
15. Wei X, Zhao D, Wang B, Wang W, Kang K, Xie H, et al. Tantalum coating of porous carbon scaffold supplemented with autologous bone marrow stromal stem cells for bone regeneration in vitro and in vivo. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016; 241:592-602.
16. Wang H, Li J, Yang H, Liu C, Ruan J. Fabrication, characterization and in vitro biocompatibility evaluation of porous Ta-Nb alloy for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 40:71-75.
17. Bouillon R, Bex M, van Herck E, Laureys J, Dooms L, Lesaffre E, et al. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:1194-1202.
18. Lee JW, Wen HB, Battula S, Akella R, Collins M, Romanos GE. Outcome after placement of tantalum porous engineered dental implants in fresh extraction sockets: a canine study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015; 30:134-142.
19. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014; 2014:476068.
20. Zhao L, Wu YF, Meng S, Yang H, OuYang YL, Zhou XD. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. *J Periodontal Res.* 2007; 42:511-517.
21. Schmitz ML, Weber A, Roxlau T, Gaestel M, Kracht M. Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813:2165-2175.
22. Dhir S. Biofilm and dental implant: The microbial link. *J Indian Soc Periodontol.* 2013; 17:5-11.
23. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88:982-990.

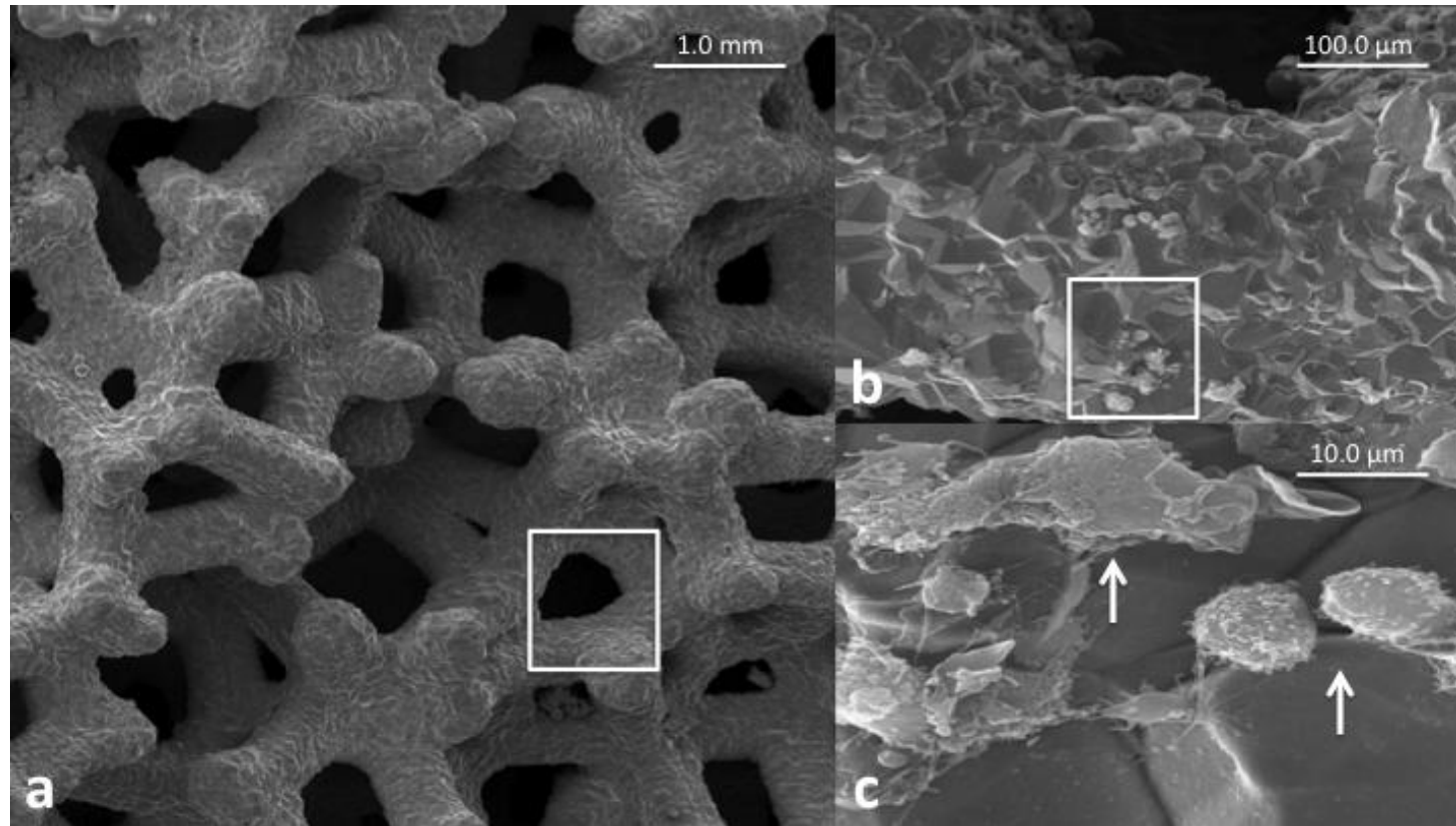
24. Herrera BS, Bastos AS, Coimbra LS, Teixeira SA, Rossa C, Jr., van Dyke TE, et al. Peripheral blood mononuclear phagocytes from patients with chronic periodontitis are primed for osteoclast formation. *J Periodontol.* 2014; 85:e72-81.
25. Champaiboon C, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Mahanonda R. The immune modulation of B-cell responses by *Porphyromonas gingivalis* and interleukin-10. *J Periodontol.* 2000; 71:468-475.
26. Hopper N, Henson F, Brooks R, Ali E, Rushton N, Wardale J. Peripheral blood derived mononuclear cells enhance osteoarthritic human chondrocyte migration. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17:199.
27. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1825:29-36.
28. Mucci JM, Cuello MF, Kisinovsky I, Larroude M, Delpino MV, Rozenfeld PA. Proinflammatory and proosteoclastogenic potential of peripheral blood mononuclear cells from Gaucher patients: Implication for bone pathology. *Blood Cells Mol Dis.* 2015; 55:134-143.
29. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity.* 2008; 28:468-476.
30. Souza PEA, Gomez RS, Xavier GM, Santos JSC, Gollob KJ, Dutra WO. Systemic leukocyte activation in patients with central giant cell lesions. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34:312-317.
31. 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; 14:1085-1096.
32. Jia R, Kurita-Ochiai T, Oguchi S, Yamamoto M. Periodontal pathogen accelerates lipid peroxidation and atherosclerosis. *J Dent Res.* 2013; 92:247-252.
33. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9:248-266.
34. Howie DW. Tissue response in relation to type of wear particles around failed hip arthroplasties. *J Arthroplasty.* 1990; 5:337-348.
35. Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Nouri-Shirazi M, Kim J, Bell D, et al. Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic

- periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J Immunol.* 2001; 167:4693-4700.
36. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116:241-249.
  37. Schildhauer TA, Robie B, Muhr G, Köller M. Bacterial adherence to tantalum versus commonly used orthopedic metallic implant materials. *J Orthop Trauma.* 2006; 20:476-484.
  38. Balla VK, Bodhak S, Bose S, Bandyopadhyay A. Porous tantalum structures for bone implants: fabrication, mechanical and in vitro biological properties. *Acta Biomater.* 2010; 6:3349-3359.
  39. Chen M, Hein S, Le DQ, Feng W, Foss M, Kjems J, et al. Free radicals generated by tantalum implants antagonize the cytotoxic effect of doxorubicin. *Int J Pharm.* 2013; 448:214-220.
  40. Shen M, Garcia I, Maier RV, Horbett TA. Effects of adsorbed proteins and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumor necrosis factor alpha release and procoagulant activity of monocytes. *J Biomed Mater Res A.* 2004; 70:533-541.
  41. Jin L, Soder B, Corbet EF. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71:929-939.
  42. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Vale VL, Galdino-Neto M, et al. Porphyromonas gingivalis antigens differently participate in the proliferation and cell death of human PBMC. *Arch Oral Biol.* 2012; 57:314-320.
  43. Brodbeck WG, Voskerician G, Ziats NP, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 64:320-329.
  44. Welldon KJ, Atkins GJ, Howie DW, Findlay DM. Primary human osteoblasts grow into porous tantalum and maintain an osteoblastic phenotype. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 84:691-701.
  45. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* 2010; 81:89-98.

46. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9:447-453.
47. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008; 180:5771-5777.



**Figure 1** The effect of TaP on cellular viability in PBMC. Cell viability was assessed by a MTT-based assay and expressed as a percentage of control (media). CG (control group); PTG (Porous tantalum group)



**Figure 2** Representative scanning electron microscopy (SEM) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) adherent to a porous tantalum sample (Zimmer Inc., Warsaw, IN, USA - Fig. **(a)** The right and inferior parts of the figure represent magnifications of areas indicated by white lines. **(b)** PBMC's on the material surface and **(c)** white arrows indicated PBMC adherent to a porous tantalum sample.





**TABLE 1** Biological response of PBMC either exposed or not with *Pg*, in the presence or absence of porous tantalum (PT). Culture supernatants were harvested and tested using ELISA analysis. Table represents median, minimum and maximum values. The values correspond to the concentrations of a) IL-10 (pg/mL), b) TGF- $\beta$  (pg/mL), c) MMP9 (pg/mL) and d) RANKL (pg/mL). (Kolmogorov-Smirnov followed by Mann-Whitney test). PBMC cells (CG); PBMC with PT (PTG); PBMC with *Pg* (PGG); PBMC with PT and *Pg* (PTPGG)

	CG			PTG			PGG			PTPGG			<i>p</i> values
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	
<b>IL-10</b>	59,14	40,04	101,26	68,59	49,80	96,85	84,56	72,33	115,83	66,32	34,81	116,57	<b>0.004*</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	271,25	142,30	428,63	283,73	222,34	457,12	253,96	80,81	377,09	77,33	418,43	766,00	0,449
<b>MMP-9</b>	1656,31	1213,27	2923,20	1270,12	945,62	2586,93	1365,66	1226,24	2822,57	1606,97	1381,51	2670,10	0,226
<b>RANKL</b>	6,27	5,83	7,47	5,94	5,54	6,84	5,97	5,30	6,98	5,93	5,19	6,63	0,418



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O resultado global deste estudo foi que as células mononucleares do sangue periférico humano aderem à superfície do tântalo poroso sem comprometer sua viabilidade e que esse contato afeta a produção de uma citocina.

O tântalo poroso e a *Porphyromonas gingivalis* não afetaram a expressão de TGF- $\beta$ , MMP-9 e RANKL por leucócitos mononucleares no tempo avaliado, sugerindo ausência de efeitos significativos dessas células nos processos de osteoclastogênese e remodelação óssea, estes importantes na doença periodontal e consequentemente na implantodontia.

A expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 foi aumentada pela exposição ao tântalo poroso e à *Porphyromonas gingivalis*, embora a presença do TP tenha impedido o significativo aumento de IL-10 causado pela estimulação microbiana.

Até onde se sabe, o presente estudo foi o primeiro a descrever o efeito do tântalo poroso na expressão destes biomarcadores por leucócitos mononucleares que também foram expostos a um patógeno periodontal.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 354p.
- ATIEH, M. A. et al. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. **J Periodontol**, v. 84, p. 586-598, 2012.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1825, n.1, p. 29-36, Jan. 2012.
- BELLINGER, D.H. preliminary report on the use of tantalum in maxillofacial and oral surgery. **Journal of Oral Surgery (Chic)**, v.5, n.2, p. 108-122, Apr. 1947.
- BENCHARIT, S. et al. Development and applications of porous tantalum trabecular metal-enhanced titanium dental implants. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v.16, n.6, p. 817-826, Dec. 2014.
- BOBYN, J.D. et al. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.81, n.5, p. 907-914, Sept. 1999.
- BOUILLON, R. et al. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.80, n.4, p. 1194-1202, Apr. 1995.
- BRAUNER, E. et al. Evaluation of highly porous dental implants in postablative oral and maxillofacial cancer patients: a prospective pilot clinical case series report. **Implant Dentistry**, v.24, n.5, p. 631-637, Oct. 2015.
- BRODBECK, W.G. et al. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, v.64, n.2, p. 320-329, Feb. 2003.
- BROWN, L.J.; OLIVER, R.C.; LOE, H. Periodontal diseases in the U.S. IN 1981: prevalence, severity, extent, and role in tooth mortality. **Journal of Periodontology**, v.60, n.7, p.363-370, July 1989.
- CARVALHO JÚNIOR, L.H.; TEMPONI, E.F.; BADET, R. Infection after total knee replacement: diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Ortopedia** v.48, n.5, p. 389-396, Sept./Oct. 2013.
- CHRISTIE, M.J. Clinical applications of trabecular metal. **American Journal of Orthopedics (Belle Mead NJ)**, v.31, n.4, p. 219-220, Apr. 2002.
- COHEN, R. A porous tantalum trabecular metal: basic science. **American Journal of Orthopedics (Belle Mead NJ)**, v.31, n.4, p. 216-217, Apr. 2002.

DHIR, S. Biofilm and dental implant: the microbial link. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.17, n.1, p. 5-11, Jan. 2013.

FINDLAY, D.M. et al. The proliferation and phenotypic expression of human osteoblasts on tantalum metal. **Biomaterials**, v.25, n.12, p. 2215-2227, May 2004.

GENG, J.P.; TAN, K.B.; LIU, G.R. Application of finite element analysis in implant dentistry: a review of the literature. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.85, n.6, p. 585-598, June 2001.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v.79, Suppl.8, p. 1585S-1591S, Aug. 2008.

GRIFFEN, A.L. et al. Prevalence of porphyromonas gingivalis and periodontal health status. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.11, p. 3239-3242, Nov. 1998.

HEINER, A.D.; BROWN, T.D.; POGGIE, R.A. Structural efficacy of a novel porous tantalum implant for osteonecrosis grafting. **Transactins Orthopaedic Research Society**, v.26, p. 480, 2001.

HERRERA, B.S. et al. Peripheral blood mononuclear phagocytes from patients with chronic periodontitis are primed for osteoclast formation. **Journal of Periodontology**, v.85, n.4, p. e72-81, Apr. 2014.

HOJO, K. et al. Bacterial interactions in dental biofilm development. **Journal of Dental Research**, v.88, n.11, p. 982-90, Nov. 2009.

HOPPER, N. et al. Peripheral blood derived mononuclear cells enhance osteoarthritic human chondrocyte migration. **Arthritis Research & Therapy**, v.17, p. 199, Aug. 2015.

HOROWITZ, M.C. The role of cytokines in bone remodeling. **Journal of Clinical Densitometry**, v.1, n.1, p. 187-198, 1998.

KATO, H. et al. Bonding of alkali- and heat-treated tantalum implants to bone. **Journal of Biomeical Materials Research**, v.53, n.1, p. 28-35, 2000.

KHAMMISSA, R.A. et al. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: clinical and histopathological characteristics and treatment. **Journal of the South African Dental Association**, v. 67, n.122, p. 124-126, 2012.

KIM, D.G. et al. Bone ingrowth and initial stability of titanium and porous tantalum dental implants: a pilot canine study. **Implant Dentistry**, v.22, n.4, p. 399-405, Aug. 2013.

KINANE, D.F.; PRESHAW, P.M.; LOOS, B.G. Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, Suppl.11, p. 44-48, Mar. 2011.

KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annual Review of Microbiology**, v.54, n.413-437, p. 413, 2000.

KURTZ, S.M. et al. Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. **The Journal of Arthroplasty**, v.23, n.7, p. 984-91, Oct. 2008.

LEE, J. W. et al. Outcome after placement of tantalum porous engineered dental implants in fresh extraction sockets: a canine study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.30, n.1, p. 134-42, Jan./Feb. 2015.

LEVINE, B.R. et al. Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopedic surgery. **Biomaterials**, v.27, n.27, p. 4671-4681, Sept. 2006.

LIU, Y. et al. The physicochemical/biological properties of porous tantalum and the potential surface modification techniques to improve its clinical application in dental implantology. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v.49, p. 323-329, Apr. 2015.

LIU, Y.C.; LERNER, U.H.; TENG, Y.T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. **Periodontology 2000**, v.52, n.1, p. 163-206, Feb. 2010.

LOWY, F.D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n.8, p. 520-532, Aug. 1998.

LU, T. et al. Enhanced osteointegration on tantalum-implanted polyetheretherketone surface with bone-like elastic modulus. **Biomaterials**, v.51, p. 173-183, May 2015.

MAHOMED, N.N. et al. Epidemiology of total knee replacement in the united states medicare population. **The Journal of Bone and Joint Surgery American**, v.87, n.6, p. 1222-1228, June 2005.

MAS-MORUNO, C. et al. Biofunctionalization strategies on tantalum-based materials for osseointegrative applications. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v.26, n.2, p. 109, Feb. 2015.

MATSUNO, H. et al. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. **Biomaterials**, v.22, p. 1253-1262, 2001.

MIYAZA, T. et al. Mechanism of bonelike apatite formation on bioactive tantalum metal in a simulated body fluid. **Biomaterials**, v.23, n.3, p. 827-832, Feb. 2002.

MUCCI, J.M. et al. Proinflammatory and proosteoclastogenic potential of peripheral blood mononuclear cells from Gaucher patients: Implication for bone pathology. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v.55, n.2, p. 134-143, Aug. 2015.

MYSAK, J. et al. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. **Journal of Immunology Research**, v.2014, p. 476068, 2014.



NINOMIYA, J.T. et al. Porous ongrowth surfaces alter osteoblast maturation and mineralization. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.103, n.1, p. 276-281, Jan. 2015.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.9, n.3, p. 2482-66, 1998.

PAPI, P. et al. Clinical evaluation with 18 months follow-up of new ptm enhanced dental implants in maxillo-facial post-oncological patients. **Annali di Stomatologia (Roma)**, v.5, n.4, p. 136-141, Oct./Dec. 2014.

PREUS, H.R. et al. The natural history of periodontal disease. the correlation of selected microbiological parameters with disease severity in sri lankan tea workers. **Journal of Clinical Periodontology**, v.22, n.9, p. 674-678, Sept. 1995.

RABENSEIFNER, L. et al. Is fracture healing in the presence of biocompatible implant materials tantalum and niobium different in comparison to steel implants? **Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete**, v.122, n.3, p. 349-355, May/June 1984.

REFAI, A.K. et al. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. **ournal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.70, n.2, p. 194-205, Aug. 2004.

RIEGER, H.G. Tantalum as a replacement for bone in oral surgery. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v.3, n.6, p. 727-31, June 1950.

ROMAGNANI, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Molecular Immunology**, v.38, n.12-13, p. 881-885, May 2002.

SCHILDHAUER, T.A. et al. Bacterial adherence to tantalum versus commonly used orthopedic metallic implant materials. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v.20, n.7, p. 476-484, July 2006.

SCHLEE, M. et al. Prospective, multicenter evaluation of trabecular metal-enhanced titanium dental implants placed in routine dental practices: 1-year interim report from the development period (2010 to 2011). **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v.17, n.6, p. 1141-1153, Dec. 2015.

SCHLEE, M.; van der SCHOOR, W.P.; van der SCHOOR, A.R. Immediate loading of trabecular metal-enhanced titanium dental implants: interim results from an international proof-of-principle study. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v.17 Suppl.1, p. E308-20, Jan. 2015.

SHIMKO, D.A. et al. Effect of porosity on the fluid flow characteristics and mechanical properties of tantalum scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v.73, n.2, p. 315-324, May 2005.

SIMONIS, P.; DUFOUR, T.; TENENBAUM, H. Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, p. 772-777, 2010.

TANG, Z. et al. Porous tantalum coatings prepared by vacuum plasma spraying enhance bmscs osteogenic differentiation and bone regeneration in vitro and in vivo. **PLoS Oone**, v.8, n.6, p. E66263, 2013.

TOKARSKI, A.T.; NOVACK, T.A.; PARVIZI, J. Is tantalum protective against infection in revision total hip arthroplasty? **The Bone & Joint Jorna**, v.97-B, n.1, p. 45-49, Jan. 2015.

TONETTI, M.S.; CLAFFEY, N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5<sup>th</sup> European Workshop in Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v.32, Suppl.6, p. 210-213, 2005.

TOSI, M.F. Innate immune responses to infection. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.116, n.2, p. 241-249, Aug. 2005.

VARELLA, P.P.; FORTE, W.C.N. Citokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.24, n.4, p. 146-154, 2001

von EIFF, C. et al. Emerging staphylococcus species as new pathogens in implant infections. **The International Journal of Artificial Organs**, v.29, n.4, p. 360-367, Apr. 2006.

WELLNER, P. et al. Cytokine release from human leukocytes exposed to silorane and methacrylate based dental materials. **Dental Materials**, v.28, p. 743-748, 2012.

ZARDIACKAS, L.D. et al. Structure, metallurgy, and mechanical properties of a porous tantalum foam. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.58, n.2, p. 180-187, 2001.

ZHANG, Y. et al. Tantalum nitride-decorated titanium with enhanced resistance to microbiologically induced corrosion and mechanical property for dental application. **PLoS One**, v.10, n.6, p. E0130774, 2015.

ZIMMERLI, W.; TRAMPUZ, A.; OCHSNER, P.E. Prosthetic-joint infections. **The New England Journal of Medicine**, v.351, n.16, p. 1645-1654, Oct. 2004.

ZINGER, O. et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. **Biomaterials**, v.26, n.14, p. 1837-47, May 2005.



## 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:** AVALIAÇÃO IN VITRO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

**Pesquisador:** EDUARDO FROIS TEMPONI

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 52928516.8.0000.5137

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.533.794

#### Apresentação do Projeto:

O tântalo é um metal bioativo que vem tendo aplicabilidade crescente para uma variedade de situações na prática ortopédica e odontológica. Apesar do sucesso do uso do tântalo, na sua forma porosa, em determinadas situações clínicas, a interação de células mononucleares com este material não foi investigada até a presente data. Por meio de punção de veia periférica, serão coletados 20mL de sangue de 10 doadores voluntários saudáveis em tubos contendo heparina. A pesquisa será conduzida no Laboratório de Biologia Oral do Departamento de Odontologia da PUC Minas, sendo todo o material laboratorial já existente.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é analisar in vitro a viabilidade celular, bem como a expressão de citocinas de células mononucleares incubadas com tântalo poroso na presença de microorganismos de importância clínica (*Porphyromonas gingivalis*; *Staphylococcus aureus*).

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:** A coleta de sangue será feita por pesquisador com experiência nesse procedimento, utilizando tubos a vácuo e material descartável. O procedimento pode causar pequeno desconforto durante a coleta e é possível que ocorra um hematoma na área, o que é minimizado por meio de compressão com dedo no local.

**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: 1.533.794

**Benefícios:** Este estudo pode auxiliar a aumentar a compreensão das interações celulares e moleculares, assim como a entender a influência de microorganismos relacionados a quadros infecciosos em contato com um biomaterial.

**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:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_648849.pdf	10/04/2016 21:04:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Tantalo.doc	10/04/2016 21:03:06	EDUARDO FROIS TEMPONI	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.docx	02/02/2016 19:15:19	EDUARDO FROIS TEMPONI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COMPLETO_mestrado_plataforma.docx	01/02/2016 20:08:53	EDUARDO FROIS TEMPONI	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	01/02/2016 20:08:01	EDUARDO FROIS TEMPONI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao.docx	01/02/2016 11:18:18	EDUARDO FROIS TEMPONI	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

**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: 1.533.794

Não

BELO HORIZONTE, 06 de Maio de 2016

---

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