



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

GABRIELA GRISOTE

EFEITO DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS XENÓGENOS NA RESPOSTA DE
OSTEOBLASTOS E MACRÓFAGOS À ENDOTOXINA BACTERIANA

RIBEIRÃO PRETO

2022

Gabriela Grisote

EFEITO DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS XENÓGENOS NA RESPOSTA DE
OSTEOBLASTOS E MACRÓFAGOS À ENDOTOXINA BACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa M. S. C. Raucci

RIBEIRÃO PRETO

2022

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

GRISOTE, Gabriela, 1996-
G869e Efeito de substitutos ósseos xenógenos na resposta de osteoblastos
e macrófagos à endotoxina bacteriana / Gabriela Grisote. – Ribeirão
Preto, 2022.
66 f. : il. color.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Larissa Moreira S. de Castro Raucci.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Mestrado em Odontologia, 2022.

1. Macrófagos. 2. Inflamação. 3. Expressão gênica. 4. Cultura de
células. II. Título.

CDD 617.6

GABRIELA GRISOTE

“EFEITO DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS XENÓGENOS NA RESPOSTA DE OSTEÓBLASTOS E DE MACRÓFAGOS À ENDOTOXINA BACTERIANA”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção de título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro-Raucci

Área de concentração: Implantodontia

Data de defesa: 19 de outubro de 2022

Resultado: APROVADA

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro-Raucci

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) – Presidente



Profa. Dra. Erica Alves Gomes

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP)



Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira

Professor Doutor da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic



Este estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, com a colaboração do Laboratório de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Dedico este trabalho

À **Deus**, pela minha vida, por estar presente em todos os acontecimentos, por me permitir realizar esse grande sonho de ser mestre. Pela força nos momentos de desespero e fraqueza, pelo amparo nos momentos de ansiedade e por me encorajar a nunca não desistir.

Aos meus amados e maravilhosos pais, **Aparecido Benedito Grisote** e **Renata Maria Arcandes Alves Ferreira Grisote**, pelo exemplo de vida, superação, amor, sabedoria, companheirismo, força de vontade e dedicação a mim e ao meu irmão. Por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos, tanto de vitória e derrota, por sempre me mostrar que sou capaz. Por todos os dias batalhados, sem medir esforços, para oferecer do bom e do melhor a mim e ao meu irmão. Eu não seria nada sem vocês. Obrigada por toda educação, afeto e carinho pelos meus caminhos já traçados. Sinto muito orgulho e admiração pelos pais que são. Que Deus abençoe nossa família. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, **Matheus Grisote**, por me mostrar que a vida tem altos e baixos e que somente nós mesmo somos capazes de aceitar e superar os desafios que ela emprega e, que sem Deus e nossa família não somos nada. Obrigada por sempre me apoiar, por todo carinho e amor. Você é o amor da minha vida.

À minha **Família**, a qual sempre está presente em todas as etapas da minha vida, que sempre me motivaram e me deram forças para seguir. São pessoas de luz e afeto que quero sempre na minha caminhada. Sou muito grata por todos vocês.

Ao meu companheiro, **Thiago Pigozzi Codo Amaral**, que sempre esteve ao meu lado disposto a me ajudar, me apoiando e me dando forças para nunca desistir nos momentos que eu achava que não aguentaria mais, por sempre me erguer e acreditar na minha capacidade. Amo você!

Aos meus **colegas de profissão**, em especial **Antônio Secco Martorano**, que nunca mediu esforços para me ajudar. Obrigada pela sua dedicação, apoio, disponibilidade, paciência, sabedoria e ensinamentos por todos esses anos. Aos demais, que se mostraram sempre presentes e companheiros em todos os momentos, donos das melhores lembranças. Guardo com muito amor, cada um em meu coração.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, *Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucchi*, que acreditou em mim em todos esses anos; exemplo de seriedade e competência que compartilhou seu imenso conhecimento e experiência científica, sempre tendo muita paciência com a minha pessoa. Por estar presente e dedicada aos seus alunos, sempre com disponibilidade e vontade de ensinar. Por nos adotar como filhos. Devo tudo o que sou a você. Sou grata de coração, pelo que me tornei e conquistei em toda minha jornada. Graças à toda sua dedicação, atenção, carinho, amor, apoio e preocupação que a senhora nunca deixou faltar comigo. Agradeço imensamente por me estimular a seguir em frente, de me mostrar que sou capaz. Digo que todo mundo poderia ter a oportunidade de conhecer quem você é, por ser tão humilde, carinhosa e feliz, por mostrar que por mais difícil seja essa etapa, sempre temos que estar sorrindo e de cabeça erguida. Agradeço muito por ter entrado em minha vida. Você é inspiração. Que Deus abençoe você e toda sua família. Muito obrigada por me permitir ser sua orientada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Magnífica Reitora **Profa. Dra. Suzelei de Castro França**, personalidade constante e pioneira na educação nacional.

À coordenadora do curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Danielle Cristine F. Messias**.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha C. Silva Sousa**, agradeço pela grande oportunidade de estar me tornando mestre, em uma excelente universidade, a qual me graduei e tenho muito orgulho. Obrigada por todos os ensinamentos e apoios durante a graduação, projetos científicos e inúmeros congressos em que estive presente. Uma grande professora e inspiração profissional.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Profa. Dra. Andre Pitondo Da Silva, Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, Prof. Celso Bernardo de Souza Filho, Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior, Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni, Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris Rivera, Profa. Dra. Marcelle Danelon, Profa. Dra. Ana Beatriz Sila Sousa, Profa. Dra. Larissa Spinola de Castro Raucci, Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira, Prof. Dr. Silvio Rocha Correa da Silva, Prof. Dr. Walter Raucci Neto e Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, pela dedicação, atenção e pelos conhecimentos contribuídos para a minha formação como mestre.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, por toda parceria e conhecimento durante todos os anos da minha graduação e agora pós-graduação, possibilitando o desenvolvimento do meu trabalho nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP-USP).

À **Antônio Secco Martorano**, pelas inestimáveis contribuições científicas, indispensáveis à conclusão desse estudo.

À **Rayana Longo Bigueti Trevisan**, que devido à toda sua ajuda, conhecimento e companheirismo durante meus anos de iniciação científica, me encorajou a fazer meu mestrado. Sou muito grata a você.

Ao **Roger Rodrigo Fernandes**, por toda paciência ao transmitir seus conhecimentos aos alunos que o procuram, por nos apresentar o mundo da pesquisa científica dentro do seu laboratório.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, em especial **Antônio Secco Martorano, Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, Fabíola Singaretti de Oliveira, Milla Sprone Tavares e Adriana Luisa Gonçalves de Almeida**.

Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto, por estarem presentes em bons momentos durante toda a minha graduação e pós-graduação. Agradeço pelo apoio e carinho durante todos esses anos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES/PROSUP) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

RESUMO

O enxerto ósseo é considerado como um arcabouço temporário para a regeneração tecidual importante para o tratamento de defeitos ósseos. Sabe-se que endotoxinas bacterianas estão relacionadas ao desenvolvimento de reabsorção óssea inflamatória. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial osteogênico e imunomodulatório dos produtos de dissolução iônica de substitutos ósseos xenógenos em pré-osteoblastos e macrófagos expostos à lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Para isso, o meio de cultura foi condicionado com Bio-Oss® (Geistlich, Suíça), BoneFill® (Bionnovation, Brasil) ou GenOx Inorg® (Baumer, Brasil) por 24 h (0,1 g/mL), filtrado e utilizado nas concentrações de 100, 50 e 25% para avaliação inicial de citotoxicidade (método da resazurina) em pré-osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 e macrófagos RAW 264.7. Culturas não expostas serviram como Controle. Parte dos grupos foi cultivada adicionalmente com LPS a 1 µg/mL (LPS+). A partir dos resultados de viabilidade, em culturas de osteoblastos, a concentração de 100% foi utilizada para avaliar os efeitos dos biomateriais sobre os níveis de RNAm para importantes marcadores da diferenciação osteoblástica (RUNX2, ALP, BSP e OPG) por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) após 7 dias. Nas culturas de macrófagos, a concentração de 50% foi utilizada para análise de marcadores inflamatórios (IL-1β, IL-6, IL-23, iNOS e TNF-α) após 24 horas por PCR. Os dados quantitativos foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variâncias. Foi aplicado o teste ANOVA para dados normais, enquanto dados não normais foram analisados pelo teste Kruskal Wallis, ambos seguido de pós teste, quando apropriado ($\alpha = 5\%$). Em osteoblastos, os extratos dos biomateriais promoveram discreta redução da viabilidade celular em todas as concentrações. Ainda, houve redução na expressão dos marcadores de diferenciação osteoblástica em culturas expostas ao LPS, independente do grupo experimental. Na ausência de LPS (LPS-), de modo geral, os grupos de biomateriais exibiram os maiores valores de RUNX2 e BSP em relação ao Controle ($p < 0,05$), e valores similares a ele para ALP ($p > 0,05$). Para LPS+, os biomateriais promoveram níveis superiores de ALP, BSP e OPG, e inferiores de RUNX2 em relação ao Controle ($p < 0,05$). Em macrófagos, os biomateriais reduziram significativamente a viabilidade quando na mais alta concentração (100%). Para LPS-, houve aumento de TNF-α em BioOss, de IL-6 em Bonefill e de TNF-α, iNOS e IL-1β em GenOx, e redução de TNF-α e iNOS em Bonefill comparativamente ao controle ($p < 0,05$). Para LPS+, houve aumento de IL-1β em BioOss e Bonefill e de TNF-α, IL-1β e IL-23 em GenOx, e redução de iNOS em BioOss e de IL-6, TNF-α, iNOS e IL-23 em Bonefill ($p < 0,05$) em relação ao Controle ($p < 0,05$). Com base nos resultados, conclui-se que os íons liberados pelos biomateriais favoreceram a expressão de marcadores osteoblásticos e que, na presença do LPS, a exposição aos biomateriais preservou a expressão do fenótipo osteogênico. Além disso, os materiais exibiram efeito modulador sobre a inflamação, sendo que Bonefill e Bio-Oss modularam negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios, enquanto que o GenOx modulou positivamente a expressão desses genes em macrófagos, na presença ou não de LPS. Estes achados sugerem que a seleção do material pode ser determinante para o processo de regeneração tecidual de sítios ósseos na presença de contaminação bacteriana.

Palavras chave: Osso xenógeno. Osteoblasto. Macrófagos. Lipopolissacarídeo. Inflamação. Expressão gênica. Cultura de células.

SUMMARY

Bone graft is considered as a temporary framework for tissue regeneration important for the treatment of bone defects. It is known that bacterial endotoxins are related to the development of inflammatory bone resorption. This study aimed at evaluating the osteogenic and immunomodulatory potential of ionic dissolution products of xenogenous bone substitutes in pre-osteoblasts and macrophages exposed to bacterial lipopolysaccharide (LPS). For this, the culture medium was conditioned with Bio-Oss® (Geistlich, Switzerland), BoneFill® (Bionnovation, Brazil) or GenOx Inorg® (Baumer, Brazil) for 24 h (0.1 g/mL), filtered and used in concentrations of 100, 50 and 25% for initial evaluation of cytotoxicity (resazurin method) in pre-osteoblasts of the MC3T3-E1 lineage and RAW 264.7 macrophages. Unexposed cultures served as Control. Part of the groups were further cultured with LPS at 1 µg/mL (LPS+). From the viability results, in osteoblast cultures, the concentration of 100% was used to evaluate the effects of biomaterials on mRNA levels for important markers of osteoblastic differentiation (RUNX2, ALP, BSP and OPG) by chain reaction of real-time polymerase (PCR) after 7 days. In macrophage cultures, a concentration of 50% was used to analyze inflammatory markers (IL-1β, IL-6, IL-23, iNOS and TNF-α) after 24 hours by PCR. Quantitative data were subjected to tests of normality and homogeneity of variances. The ANOVA test was applied for normal data, while non-normal data were analyzed by the Kruskal Wallis test, both followed by post-test, when appropriate ($\alpha = 5\%$). In osteoblasts, the extracts of biomaterials promoted a slight reduction in cell viability at all concentrations. Furthermore, there was a reduction in the expression of osteoblastic differentiation markers in cultures exposed to LPS, regardless of the experimental group. In the absence of LPS (LPS-), in general, the groups of biomaterials exhibited the highest values of RUNX2 and BSP in relation to the Control ($p < 0.05$), and values similar to it for ALP ($p > 0.05$). For LPS+, the biomaterials promoted higher levels of ALP, BSP and OPG, and lower levels of RUNX2 in relation to the Control ($p < 0.05$). In macrophages, biomaterials significantly reduced viability at the highest concentration (100%). For LPS-, there was an increase in TNF-α in BioOss, IL-6 in Bonefill and TNF-α, iNOS and IL-1β in GenOx, and a reduction in TNF-α and iNOS in Bonefill compared to the control ($p < 0.05$). For LPS+, there was an increase in IL-1β in BioOss and Bonefill and in TNF-α, IL-1β and IL-23 in GenOx, and a reduction in iNOS in BioOss and in IL-6, TNF-α, iNOS and IL-23 in Bonefill ($p < 0.05$) in relation to the Control ($p < 0.05$). Based on the results, it is concluded that the ions released by the biomaterials favored the expression of osteoblastic markers and that, in the presence of LPS, exposure to the biomaterials partially rescued the expression of the osteogenic phenotype. In addition, the materials exhibited a modulatory effect on inflammation, with Bonefill and Bio-Oss negatively modulating the expression of pro-inflammatory genes, while GenOx positively modulated the expression of these genes in macrophages, in the presence or absence of LPS. These findings suggest that material selection may be decisive for the tissue regeneration process of bone sites in the presence of bacterial contamination.

Keywords: Xenogenous bone. Osteoblast. Macrophages. Lipopolysaccharide. Inflammation. Gene expression. Cell culture.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.2 PRERARAÇÃO DO ELUENTE DOS BIOMATERIAIS.....	22
3.3 OBTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES.....	24
3.4 VIABILIDADE CELULAR.....	25
3.5 EXPRESSÃO GÊNICA	25
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 CÉLULAS OSTEoblÁSTICAS (MC3T3-E1).....	30
4.1.1 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	30
4.1.2 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA	32
4.2 MACRÓFAGOS (RAW 264.7)	33
4.2.1 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR	33
4.1.2 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA	35
5 DISCUSSÃO.....	37

6 CONCLUSÃO.....43

REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado ativo e dinâmico, devido sua constante capacidade de ser remodelado, a partir de processos de formação e reabsorção (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Diferentes células são responsáveis pela manutenção desses processos, entre elas osteoblastos, osteócitos (células formadoras do tecido ósseo) e osteoclastos (células responsáveis por seu processo de reabsorção). A homeostase do tecido ósseo é mantida pela dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos. Esses processos são regulados por fatores sistêmicos, como os hormônios, mas também por fatores locais, como os fatores de crescimento e citocinas, que são capazes de modular a resposta celular (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Dessa forma, o processo de remodelação óssea também é modulado pelo sistema imune. Desequilíbrios nesses processos podem levar a reabsorções patológicas, nas quais citocinas e mediadores locais podem induzir a um aumento da reabsorção óssea, elevando a atividade osteoclástica ou à inibição da formação de matriz óssea, reduzindo a atividade dos osteoblastos (TAKAYANAGI, 2005; ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Considerando os tecidos ósseos da maxila e mandíbula, existem evidências para relacionar as bactérias e seus subprodutos como o principal fator etiológico de diversas patologias que promovem a reabsorção óssea inflamatória, como é o caso da periodontite, lesões periapicais de origem endodôntica e da periimplantite (GOKHALE et al., 2010). A periimplantite é uma doença de origem multifatorial associada à presença de bactérias patogênicas gram-negativas e anaeróbias, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (MÖRMANN et al., 2008). Esses microrganismos liberam endotoxinas que se aderem fortemente aos tecidos e intensificam os efeitos deletérios após a colonização da superfície de titânio (ABU-AMER et al., 1997; MÖRMANN et al., 2008; GOKHALE et al., 2010).

A endotoxina bacteriana ou também conhecida como LPS, componente da membrana externa de todas as bactérias gram-negativas, foi identificado como um importante fator patogênico em doenças com perda óssea (KIRKWOOD et al., 2007; YOGESHA et al., 2009). O LPS atua como forte estimulador da imunidade inata, e uma das muitas funções conhecidas é induzir a reabsorção óssea *in vivo* e *in vitro* (ITOH et al., 2003; ISLAM et al., 2007; MÖRMANN et al., 2008; ZHOU et al., 2013). O LPS possui uma estrutura anfifílica composta, por lipídeo A hidrofóbico e uma longa cadeia polissacarídica conhecida como antígeno O (ERRIDGE et al., 2002).

Uma vez nos tecidos, o LPS causa doenças inflamatórias e danos teciduais induzindo uma variedade de mediadores inflamatórios: citocinas (por exemplo, fator de necrose tumoral [TNF] α , interleucina [IL] -1 e IL-6), quimiocinas (por exemplo, IL-8), espécies reativas de oxigênio (por exemplo, óxido nítrico e superóxido) e metabólitos lipídicos (por exemplo, prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária) (FUJIHARA et al., 2003). O LPS ativa predominantemente macrófagos, a via de sinalização Toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B e induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-6, IL-1 β , proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) (CUI et al., 2014; GALARRAGA-VINUEZA et al., 2019). Estas células participam ativamente do processo inflamatório, e podem ser classificadas em dois fenótipos principais: os macrófagos que apresentam fenótipo M1, associados à secreção de citocinas, possuem mecanismos que podem governar a homeostase e a progressão das doenças nos tecidos inflamados, são como “a ponte entre a resolução da inflamação e o reparo tecidual” (GARLET; GIANNOBILE, 2018; GALARRAGA-VINUEZA et al., 2019); e os macrófagos ativados por vias alternativas apresentam fenótipo M2, ligados à “inflamação construtiva” envolvendo a secreção de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento que potencializam o reparo tecidual (HAYES et al., 1996; STÖGER et al., 2012; YU et al., 2016).

Mesmo após a morte bacteriana, o LPS contribui para a manutenção do processo inflamatório, que leva a destruição de tecidos moles e duros, através da ativação de macrófagos, do estímulo à formação de osteoclastos e do impedimento para a atividade e diferenciação dos osteoblastos, não tendo o equilíbrio entre a absorção e a reconstrução do osso alveolar (ABU-AMER Y et al., 1997; TAKEUCHI et al., 1999; MÖRMANN M et al., 2008; INSUA et al., 2017; ZHOU et al., 2021). Sabe-se que a osteoclastogênese, a partir da fusão de monócitos, e a osteogênese, a partir de células-tronco mesenquimais, são processos importantes para a regeneração óssea alveolar (CHEN et al., 2013; CHEN et al., 2016; INSUA et al., 2017). Ainda, ao estimular osteoblastos a produzir ou secretar IL-1, IL-6, prostaglandina (PG) E2 e a proteína ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL) (ISHIMI et al., 1990; KEETING et al., 1991), o LPS promove a sobrevivência de pré-osteoclastos e induz a sua fusão para formar osteoclastos multinucleados ativos, induzindo sua maturação e/ou sua ativação (SUDA et al., 2002). Além de favorecer a osteoclastogênese e a reabsorção óssea, estudos demonstraram que a diferenciação osteogênica de precursores de osteoblastos pode ser inibida pelo LPS, o que pode ser considerado como outro mecanismo de perda óssea (KADONO et al., 1999; LAM et al., 2000; INADA et al., 2006; ROGERS et al., 2007; TOMOMATSU et al., 2009).

Considerando-se o tratamento de defeitos ósseos, infeccionados ou não, biomateriais têm sido empregados para restabelecer o tecido perdido e permitir a instalação adequada de implantes osseointegráveis, como também, manter as dimensões da crista alveolar pós-extração e levantamento de seio maxilar (JUODZBALYS; WANG, 2007, MARDAS et al., 2010). O enxerto ósseo consiste na utilização de materiais de origem natural ou sintética, implantado no sítio do defeito, para que sirva como arcabouço temporário para facilitar a regeneração tecidual, no qual este material deva ser degradado gradualmente durante o processo de remodelação do defeito e este ser substituído por osso neoformado. Estes podem ser classificados como autógenos ou heterógenos (KLIFTO et al., 2018).

O enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão ouro, por possuir osteocondução, como todo substituto ósseo, e apresentar capacidade osteoindutora (MIRON et al., 2011). Entretanto, exibe limitações como: morbidade na área doadora do enxerto, disponibilidade limitada, aumento de tempo cirúrgico, além de potenciais complicações associadas ao sítio doador (KLIFTO et al., 2018). Assim, enxertos xenógenos (de origem bovina, equina ou porcina) e sintéticos ou aloplásticos (a base de fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio, vidros bioativos hidroxiapatita sintética, polímeros, etc.) são considerados vantajosos por apresentar bom custo-benefício e facilidade na aquisição (ARTZI et al., 2001; CARMAGNOLA et al., 2008; TITSINIDES et al., 2019). No entanto, dependendo da sua composição, processo de fabricação e características físico-químicas, diferenças significativas em sua biodegradabilidade, bioatividade e osteocondutividade são observadas e que podem influenciar em sua resposta biológica (KIM et al., 2010; TITSINIDES et al., 2019).

Entre os biomateriais xenógenos origem bovina, o BioOss é considerado como padrão ouro e consiste em uma matriz óssea mineral organizada semelhante às fibras de colágenos, nanoporos na superfície, tamanho de cristalito HA de 15nm, livres de resíduos orgânicos, maior área superficial (86m²/g), baixa cristalinidade e alto teor de carbonato, que podem facilitar uma maior taxa de liberação de cálcio no teste de dissolução em ambientes ácidos (LUNDGREN et al., 1996; MCALLISTER et al., 1999; SCHLEGEL et al., 2003; SLOTT et al., 2003; ARAÚJO et al., 2008; TRAINI et al., 2008; JENSEN et al., 2012; DO DESTERRO et al., 2014). Seu procedimento de purificação consiste em um banho inicial para remoção de gordura e resíduos orgânicos brutos, seguido de aquecimento até 300°C antes de um banho de solução altamente alcalina (pH > 13) (THALLER et al., 1994; WENZ et al., 2001; BARBECK et al., 2014; GHANAATI et al., 2014). Já o Bonefill é submetido a uma sequência de banhos que solubilizam as estruturas orgânicas, como células remanescentes da matriz orgânica, fibras e proteínas, deixando apenas a porção mineral, e é processado em baixa temperatura

(BIONNOVATION; BIOMATERIALS, 2013; DO DESTERRO et al., 2014; REINO et al., 2021). Ainda, apresenta uma estrutura fibrosa, alguns microporos em sua superfície externa, com partículas de HA formando um único corpo, dificultando a visualização de partículas individuais. Em estudos anteriores, foram observados nanoporos semelhantes ao Bio-Oss, sem estrutura organizada. É considerado um material altamente amorfo e com baixa cristalinidade e, devido a isso, sugere uma avaliação para presença de material orgânico residual. Por sua vez, o Gen-Ox é obtido por desproteinização em altas temperaturas (entre 950 e 1.000°C). Sem estrutura organizada, por ser sinterizado em alta temperatura exibiu maiores tamanhos de partículas de HA. Um biomaterial com alto grau de cristalinidade (maior que Bio-Oss e Bonefill) e menor taxa de liberação de cálcio no ensaio de dissolução. Com textura de superfície lisa, apresenta microporos, sem visualização de nanoporos. Apresenta maior tamanho de cristalito de 39 nm e menor área superficial em relação ao Bio-Oss e BoneFill.

Desterro et al. (2014), comparando propriedades físico-químicas desses três biomateriais (BioOss, GenOx inorgânico e Bonefill), mostrou diferenças significantes nas taxas de dissolução e liberação de íons cálcio e fosfato. Sabe-se que a degradação de biomateriais acarreta na liberação de produtos ou partículas químicas que alteram a função dos macrófagos, podendo ativar ou suprimir sua função (NAIR et al., 1990). Estudos anteriores *in vitro* demonstram maior diferenciação em osteoblastos cultivados na presença de concentração adicional de Ca liberado por hidroxiapatita no meio de cultura de células (MA et al., 2005). Além disso, evidências de estudos sugerem que os íons OH^- e Ca^{2+} dissociados a partir do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ podem inativar o LPS (SAFAVI et al., 1993), além de inibir a liberação de $\text{TNF-}\alpha$ dos macrófagos expostos ao LPS (BARTHEL et al., 1997) e a estimulação de formação de osteoclastos (JIANG et al., 2003). Estudos *in vitro* mostraram que os íons OH^- e Ca^{2+} quebram as ligações éster na porção lipídica do LPS (SAFAVI et al., 1993) e altera as propriedades biológicas das endotoxinas (SAFAVI et al., 1994; BARTHEL et al., 1997), reduzindo os efeitos

deletérios provocados pelo contato da endotoxina com os tecidos (KODUKULA et al., 1988; SIQUEIRA et al., 1999; ESTRELA, 2004; FARHAD & MOHAMMADI, 2005; LOPES; SIQUEIRA JUNIOR, 2010).

Portanto, considerando que biomateriais para enxerto ósseo exibem liberação diferencial de íons cálcio e hidroxila, conhecer o efeito dos produtos da dissolução iônica de substitutos ósseos na função destas células é uma consideração relevante para a previsibilidade do prognóstico cirúrgico. Devido à escassez de trabalhos que explorem o potencial modulatório desses materiais em condições inflamatórias, é importante o desenvolvimento de estudos que avaliem os efeitos dos produtos de dissolução liberados de enxertos xenógenos em células do tecido ósseo expostas ao LPS.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo foi avaliar o potencial osteogênico e imunomodulatório dos produtos de dissolução iônica de substitutos ósseos xenógenos em pré-osteoblastos e macrófagos expostos ao LPS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos dos produtos de dissolução de osso bovino desproteinizado (Bio-Oss, BoneFill, e GenOx Inorg) sobre:

- A viabilidade celular de pré-osteoblastos e macrófagos expostos ou não ao LPS.
- A expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica em cultura de células pré-osteoblásticas expostas ou não ao LPS.
- A expressão gênica de marcadores da inflamação em macrófagos expostos ou não ao LPS.

A hipótese nula testada refere-se à inexistência de diferenças nas respostas osteoblástica e de macrófagos expostos ao LPS para diferentes extratos de substitutos ósseos utilizados no presente estudo.

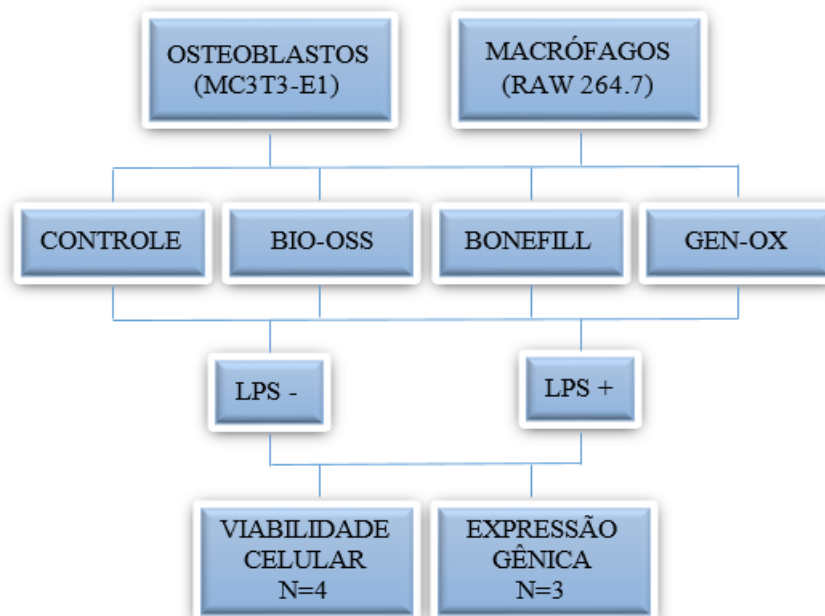
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os fatores em estudo foram os substitutos ósseos em quatro níveis (Controle; BioOss; BoneFill; GenOx Inorg) e o LPS em dois níveis (presença ou ausência). As variáveis de resposta quantitativas foram: viabilidade celular, e expressão gênica de marcadores osteoblásticos e de macrófagos.

O cálculo amostral evidenciou que, para as análises de atividade mitocondrial, poderiam ser utilizadas 4 amostras por grupo para obter 0,92 de poder do teste, considerando 5% de erro tipo α (Software G*power, ERDFELDER; FAUL; BUCHNER, 1996). Já para as análises de expressão gênica, poderiam ser utilizadas 3 amostras por grupo para obter 0,83 de poder do teste, considerando 5% de erro tipo α .

Figura 1. Delineamento experimental



Fonte: autor

3.2 PRERARAÇÃO DOS EXTRATOS DOS BIOMATERIAIS

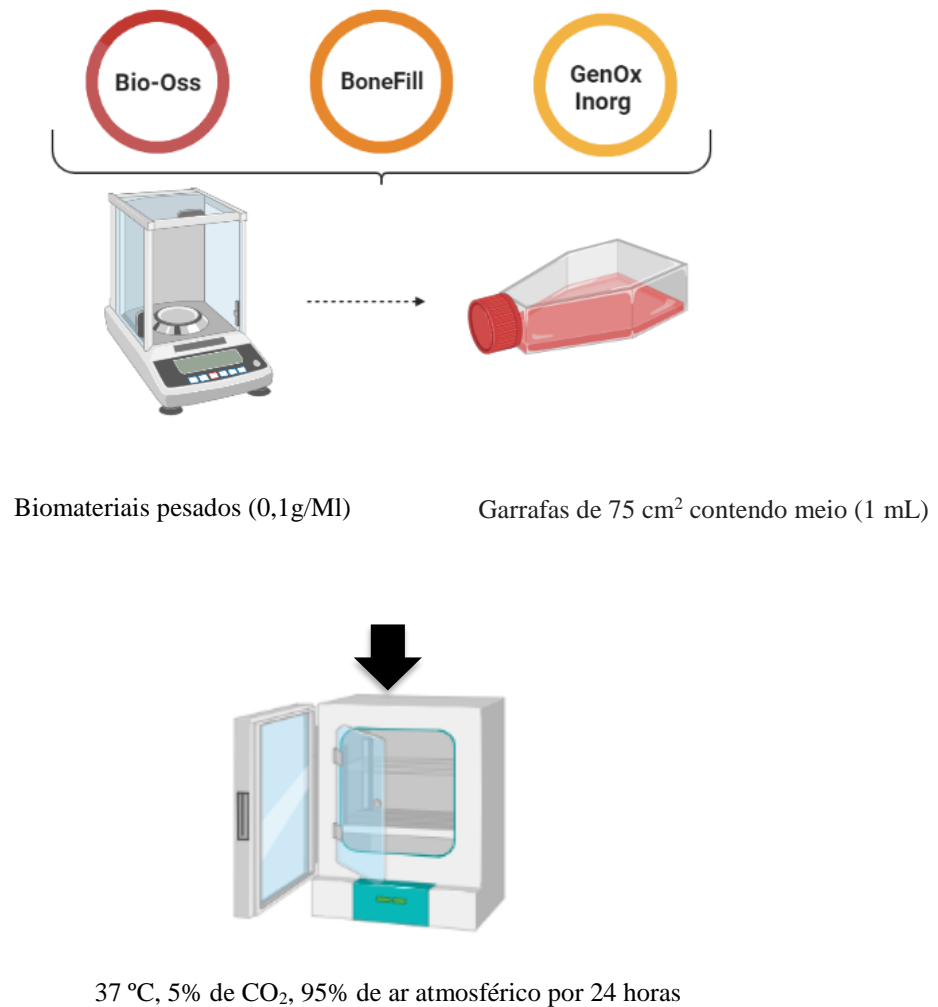
Para este estudo, foram utilizados os seguintes biomateriais: Bio-Oss (Geistlich, Suíça), BoneFill (Bionnovation, Brasil) ou GenOx Inorg (Baumer, Brasil) (tabela1). Para a obtenção dos extratos, todos os biomateriais foram pesados e acondicionados em garrafas de cultura esterilizada em capela de fluxo laminar. Para a obtenção dos extratos, meio α -MEM (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 100 UI/mL-100 μ g/mL de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado na proporção de 1 mL para cada 100 miligramas de biomaterial (0,1g/mL) e mantido na temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por períodos de 24 horas. Após este período, o meio de cultura utilizado para o condicionamento foi coletado, filtrado e armazenado a -20°C até a sua utilização nos experimentos. Para a exposição das culturas celulares, o extrato de cada um dos biomateriais foi descongelado a temperatura ambiente e utilizado nas concentrações baseadas em estudo piloto de 100; 50 e 25%, sendo adicionado soro fetal bovino (Invitrogen) em concentração final de 10%. Culturas expostas apenas ao meio osteogênico serviram como Controle.

Tabela 1. Substitutos ósseos utilizados na pesquisa

BIOMATERIAL	GRANULOMETRIA	LOTE
Geistlich Bio-Oss	0,25mm-1mm	30643.3
Bonefill Porous	0,60 – 1,50mm	16892
GenOx Inorg Esponjoso	0,5 - 1,0mm	4360079

Fonte: autor

Figura 2. Preparação do eluente dos biomateriais.



Fonte: Autor

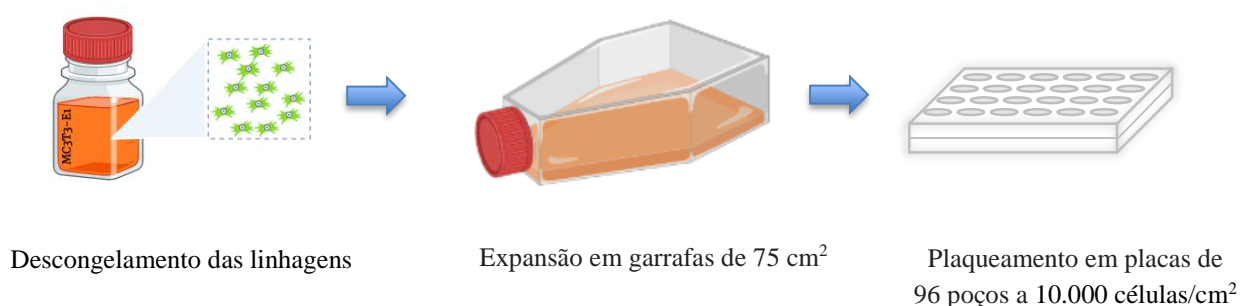
3.3 OBTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

Células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 (American Type Culture Collection - ATCC, EUA) foram descongeladas e cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning Inc) com de meio de expansão, composto por α -MEM (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 100 UI/mL-100 μ g/mL de penicilina-estreptomicina (Sigma). Após a

subconfluência, as células foram contadas e plaqueadas na densidade de 10.000 células/cm² diretamente nos poços de placas de poliestireno e cultivadas em meio osteogênico (composto pelo meio de expansão acrescido de 7 mM de β-glicerofosfato e 50 μg/mL de ácido ascórbico) e deixadas aderir por 24 horas previamente à exposição ao extrato dos cimentos avaliados. Durante todo o período de cultivo, as células foram mantidas na temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico; os meios de cultura foram trocados a cada 3 dias.

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (ATCC, EUA) foram crescidos em garrafas de cultura de 75 cm² (Corning) com meio de cultura DMEM (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 100 UI/mL penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina (Invitrogen) até a subconfluência. As células foram removidas dos frascos de cultura por uso de “*cell scraper*”, contadas e plaqueadas a 10.000 células/cm², deixadas aderir por 24 horas e expostas aos extratos dos cimentos na presença ou não do LPS por 24h. Durante todo o período de cultivo, as células foram mantidas na temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

Figura 3. Representação esquemática da obtenção das culturas celulares



3.4 VIABILIDADE CELULAR

Para esse ensaio, foi utilizada apenas extratos dos biomateriais na concentração de 25, 50 e 100%. A viabilidade celular foi avaliada após 24 (macrófagos) ou 72 horas (osteoblastos) por meio do kit comercial *CellTiter-Blue*® (Promega), que estima a viabilidade celular com base na capacidade das células vivas em converter um corante redox (resazurina) em um produto final fluorescente/colorido (resorufina). Para isso, foram adicionados 20 µL do reagente *CellTiter-Blue*® para cada 100 µL de meio de cultura e as culturas celulares foram mantidas por 3 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, alíquotas de 100 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570 nm; µQuanti, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA).

3.5 EXPRESSÃO GÊNICA

Após 24 horas (macrófagos) ou 7 dias (osteoblastos) foram avaliados os níveis de RNAm para importantes marcadores do processo inflamatório e da diferenciação osteoblástica, respectivamente (Tabela 2). Para isso, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen) à temperatura ambiente, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA). A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima

transcriptase reversa, utilizando-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para a reação de Real-time PCR, foram utilizados o reagente SYBR™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher) e o aparelho StepOne Plus (ThermoFisher). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 10 uL, contendo 12,5 ng de cDNA. As reações de amplificação consistiram em 2 min a 95°C e quarenta ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60 °C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene constitutivo β -actina. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par de *primers* avaliados. O método comparativo de 2^{-ddCt} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica das culturas dos diferentes grupos experimentais. As sequências dos *primers* selecionados para este estudo estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 2. Marcadores osteoblásticos e inflamatórios avaliados e funções conhecidas, de acordo com a literatura

GENE	SIGLA	FUNÇÃO	REFERÊNCIAS
Fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2	RUNX2	Utilizado como marcador inicial do processo de diferenciação osteoblástica.	KOMORI, 2009.
Fosfatase alcalina	ALP	Marcador da diferenciação osteoblástica, enzima que atua na quebra de moléculas que contém fosfato para torná-lo disponível para o processo de mineralização da matriz.	WANG et al., 2010; SHARMA et al., 2014.
Sialoprotéina óssea	BSP	Proteína não-colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita	HUNTER; GOLDBERG, 1993.
Osteoprotegerina	OPG	Proteína expressa osteoblastos que desempenha um papel importante no metabolismo ósseo inibindo a osteoclastogênese e reabsorção óssea.	SIMONET et al., 1997.
Interleucina-1 beta	IL-1 β	Amplificador de reações imunes, potente citocina pró-inflamatória que é fundamental para as respostas de defesa do hospedeiro à infecção e lesão agudas.	DINARELLO, 1996; DINARELLO, 2014; GARLANDA et al., 2013.
Interleucina 6	IL-6	Citocina pró-inflamatória importante para a proliferação e atividade de osteoclastos e à maturação dos osteoblastos, manutenção da homeostase.	TANAKA et al., 2018; DE AZAMBUKA et al., 2002; AXMANN et al., 2009.
Interleucina 23	IL-23	Intimamente relacionada com papel importante na regulação da inflamação tecidual.	MOSCHEN et al., 2019.
Fator de necrose tumoral alfa	TNF- α	Citocina inflamatória produzida por macrófagos/monócitos durante a inflamação aguda sendo responsável pela sinalização dentro das células, levando à necrose ou apoptose.	IDRISS; NAISMITH, 2000; TANI-ISHII et al., 1999; AZUMA et al., 2000; MACHTEI et al., 2006; KONTTINEN et al., 2006.
Sintase de óxido nítrico induzível	INOS	Enzima chave na resposta inflamatória de macrófagos	MCNEILL et al., 2015.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real

GENE		SEQUÊNCIA
IL-1β	<i>foward</i>	AAA GCC TCG TGC TGT CGG
IL-1β	<i>reverse</i>	GTG GGT GTG CCG TCT TTCA
IL-6	<i>foward</i>	AAC GAT GAT GCA CTT GCA GA
IL-6	<i>reverse</i>	GAG CAT TGG AAA TTG GGG TA
IL-23	<i>foward</i>	TCC TTG CTT GGC AGT ATC CA
IL-23	<i>reverse</i>	TGC TCA ATG TGT CAA CAG ACG
TNF-α	<i>foward</i>	TGT GCT CAG AGC TTT CAA CAA
TNF-α	<i>reverse</i>	CTT GAT GGT GGT GCA TGA GA
iNOS	<i>foward</i>	AAG CCC CGC TAC TAC TCC AT
iNOS	<i>reverse</i>	GCT GGA AGC CAC TGA CAC TT
HO1	<i>foward</i>	CCC AAA ACT GGC CTG TAA AA
HO1	<i>reverse</i>	CGT GGT CAG TCA ACA TGG AT
NFR2	<i>foward</i>	TCA CAC GAG ATG AGC TTA GGG CAA
NFR2	<i>reverse</i>	TAC AGT TCT GGG CGG CGA CTT TAT
RUNX2	<i>foward</i>	CTT CAC AAA TCC TCC CCA AGT G
RUNX2	<i>reverse</i>	GGA ATG CGC CCT AAA TCA CTG
ALP	<i>foward</i>	GGG GTA CAA GGC TAG ATG GC
ALP	<i>reverse</i>	CGG GCT CAA AGA GAC CTA AGA
BSP	<i>foward</i>	AGC ATG CCT ACT TTT ATC CTC CT
BSP	<i>reverse</i>	TTC GTT TGA AGT CTC CTC TTC CT
OPG	<i>foward</i>	GAA TGC CGA GAG AGT GTA GAG AGG
OPG	<i>reverse</i>	CAC GCT GCT TTC ACA GAG GT
ACT	<i>forward</i>	CCC TGA ACC CTA AGG CCA AC
ACT	<i>reverse</i>	TGT GGT ACG ACC AGA GGC AT

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), enquanto que dados não normais foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, ambos seguidos de pós-teste, quando apropriado. O nível de significância foi de 5%. A análise estatística foi realizada com auxílio do software SigmaStat 3.5 (Systat Software; San Jose, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS (MC3T3-E1)

4.1.1 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Para a concentração de 25%, foi observado que a presença dos biomateriais reduziu a viabilidade celular em relação ao Controle, tanto na presença quanto na ausência do LPS (ANOVA, $p < 0,05$). Para 50%, embora tenha ocorrido tendência a menores valores de viabilidade para os biomateriais em relação ao Controle, foi observada diferença estatisticamente significativa apenas para a comparação entre BioOss e Controle em culturas crescidas na ausência de LPS ($p < 0,05$), não havendo diferenças significantes para as demais comparações ($p > 0,05$). Em 100%, para LPS-, observaram-se valores inferiores de viabilidade para os biomateriais em relação ao Controle ($p < 0,05$); entre os biomateriais, Bonefill® exibiu os maiores valores de viabilidade nessa condição. Para LPS+, apenas BioOss® exibiu valores de viabilidade inferiores aos do Controle ($p < 0,05$). De modo geral, verificou-se, para essa linhagem, que o aumento da concentração do extrato não reduziu de forma significativa a viabilidade das culturas (Figura 4).

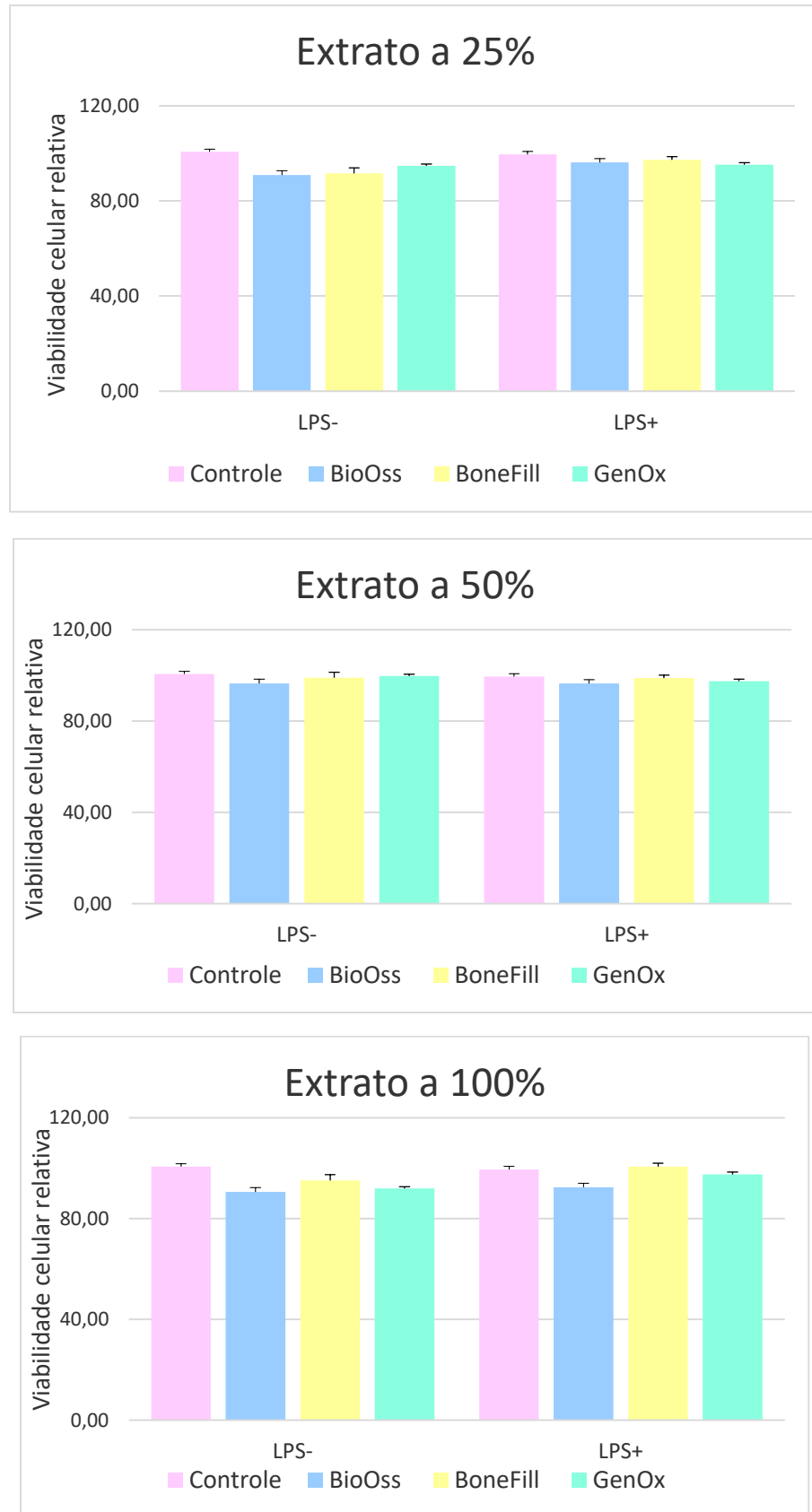


Figura 4. Viabilidade celular em culturas de pré-osteoblastos expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill, GeOx Inorg, nas concentrações de 25, 50 e 100% por 3 dias, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-).

Tabela 4. Valores de média (\pm desvio padrão) da viabilidade celular em culturas de pré-osteoblastos expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill, GeOx Inorg, nas concentrações de 25, 50 e 100% por 3 dias, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-)

[]	CONDIÇÃO	GRUPO				Teste estatístico
		Controle	BioOss	BoneFill	GenOx	
25%	LPS-	100,58(\pm 1,15)a	90,82(\pm 1,82)b	91,61(\pm 2,31)b	94,78(\pm 0,68)c	ANOVA two way
	LPS+	99,51(\pm 1,28)a	96,14(\pm 1,62)b*	97,30(\pm 1,33)b*	95,18(\pm 0,89)b	
50%	LPS-	100,58(\pm 1,15)a	96,53(\pm 1,19)b	99,03(\pm 1,26)ab	99,81(\pm 2,29)ab	ANOVA two way
	LPS+	99,51(\pm 1,28)a	96,47(\pm 2,95)a	98,82(\pm 1,12)a	97,42(\pm 2,89)a	
100%	LPS-	100,58(\pm 1,15)a	90,55(\pm 1,98)b	95,12(\pm 2,02)c	92,02(\pm 2,96)b	ANOVA two way
	LPS+	99,51(\pm 1,28)a	92,37(\pm 1,90)b	100,61(\pm 1,99)a*	97,60(\pm 2,42)a*	

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre valores de uma mesma linha ($p < 0,05$). Asterisco indica diferenças significantes na viabilidade celular entre as condições LPS- e LPS+ no mesmo grupo e concentração ($p < 0,05$).

4.1.2 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA

A exposição ao LPS reduziu significativamente a expressão de todos os marcadores avaliados em culturas de pré-osteoblastos, independentemente do grupo experimental ($p < 0,05$, Figura 5, Tabela 5). Para LPS-, a expressão de RUNX-2 foi superior para GenOx ($p < 0,05$), seguido por BoneFill e BioOss, com níveis semelhantes entre si ($p > 0,05$), e pelo Controle, com os menores valores ($p < 0,05$). Para LPS+, não foram observadas diferenças significantes para os níveis de RUNX-2 ($p > 0,05$). Para LPS-, não foram observadas diferenças significantes para os níveis de ALP entre os grupos ($p > 0,05$). Para LPS+, observou-se que os biomateriais promoveram níveis superiores de ALP ($p > 0,05$), não sendo observada expressão de ALP no Controle nessa condição experimental. Em ambas as condições experimentais (LPS- e LPS+), a expressão de OPG foi superior para GenOx ($p < 0,05$), seguido por BoneFill e BioOss ($p < 0,05$). Para LPS-, a expressão de BSP foi superior para GenOx e Bonefill em relação ao Controle ($p < 0,05$). Para LPS+, a presença dos produtos de dissolução dos biomateriais aumentou a

expressão de BSP em relação ao Controle, sendo os maiores valores observados para GenOx e BoneFill ($p < 0,05$).

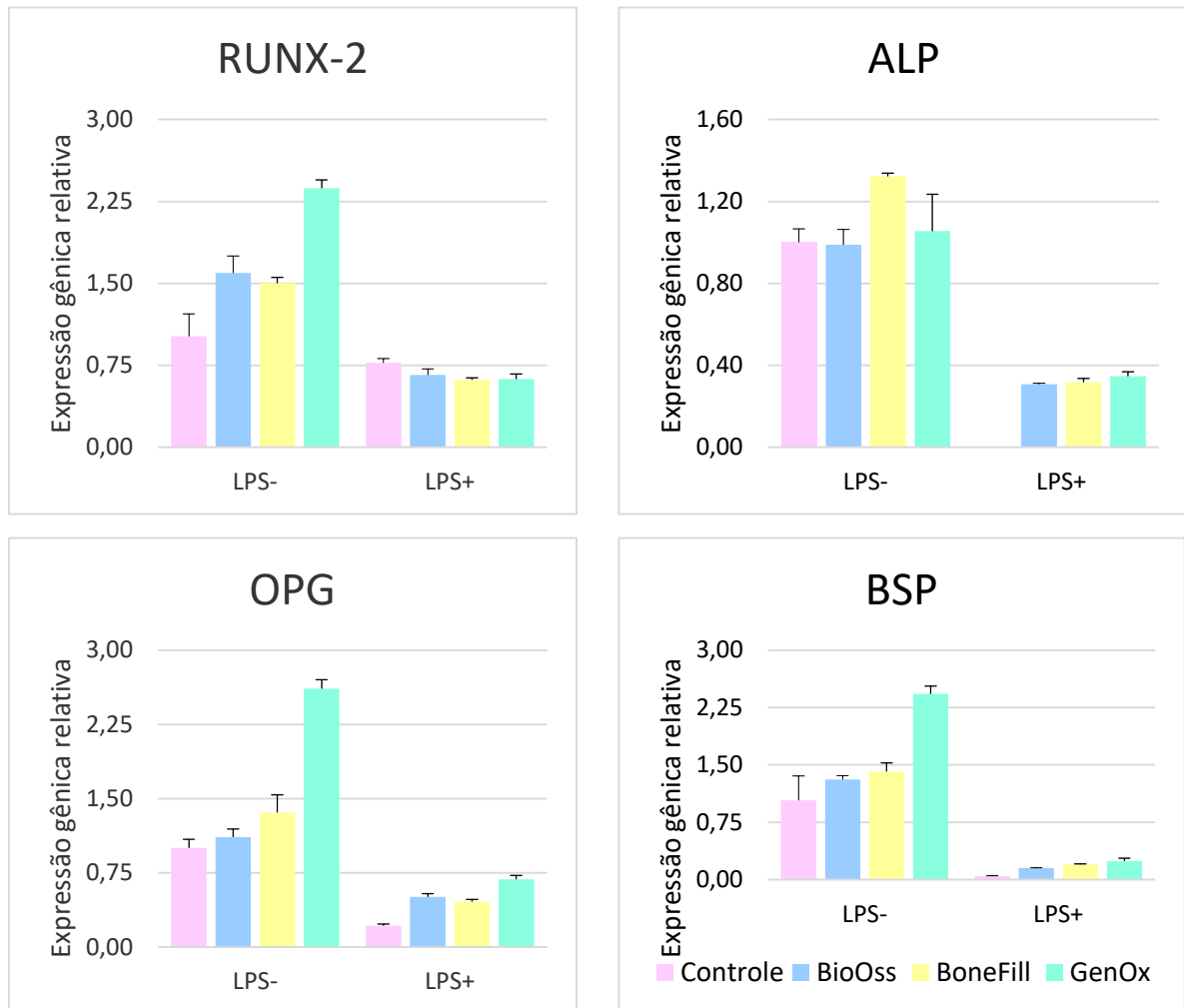


Figura 5. Expressão gênica do fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2 (RUNX-2), fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP) e osteoprotegerina (OPG) em culturas de células pré-osteoblásticas expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill, GeOx Inorg, na concentração de 100% por 3 dias, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-).

Tabela 5. Valores de média (\pm desvio padrão) da expressão gênica do fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2 (RUNX-2), fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP) e osteoprotegerina (OPG) em culturas de células pré-osteoblásticas expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill, GeOx Inorg, na concentração de 100% por 3 dias, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-)

GENE	CONDIÇÃO	GRUPO				Teste estatístico
		Controle	BioOss	BoneFill	GenOx	
BSP	LPS-	1,04 (\pm 0,32)a*	1,31(\pm 0,05)ab*	1,41(\pm 0,11)b*	2,43(\pm 0,10)c*	Kruskal Wallis / Mann Whitney
	LPS+	0,05(\pm 0,00)a	0,15(\pm 0,01)b	0,20(\pm 0,00)c	0,24(\pm 0,00)c	
OPG	LPS-	1,00 (\pm 0,09)a*	1,11(\pm 0,08)a*	1,36(\pm 0,18)b*	2,61(\pm 0,09)c*	ANOVA two way
	LPS+	0,22(\pm 0,01)a	0,51(\pm 0,03)b	0,46(\pm 0,02)b	0,69(\pm 0,04)c	
RUNX2	LPS-	1,01 (\pm 0,21)a*	1,60(\pm 0,16)b*	1,50(\pm 0,05)b*	2,37(\pm 0,08)c*	ANOVA two way
	LPS+	0,77(\pm 0,04)a	0,66(\pm 0,06)a	0,62(\pm 0,02)a	0,62(\pm 0,04)a	
ALP	LPS-	1,00 (\pm 0,06)a*	0,99(\pm 0,07)a*	1,32(\pm 0,02)a*	1,06(\pm 0,18)a*	Kruskal Wallis / Mann Whitney
	LPS+	0,00(\pm 0,00)a	0,31(\pm 0,00)b	0,32(\pm 0,02)b	0,35(\pm 0,02)b	

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre valores de uma mesma linha ($p < 0,05$). Asterisco indica diferenças significantes na expressão do gene no mesmo grupo entre as condições LPS- e LPS+ ($p < 0,05$).

4.2 MACRÓFAGOS (RAW 264.7)

4.2.1 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

A presença do LPS reduziu de forma significativa a viabilidade celular das culturas. Para a concentração 25%, foi observado que a presença dos biomateriais não interferiu de forma relevante na viabilidade celular em relação ao Controle, tanto na presença quanto na ausência do LPS (ANOVA, $p > 0,05$). Para 50%, embora em LPS- os valores de viabilidade tenham sido semelhantes entre os grupos experimentais em relação ao Controle ($p > 0,05$), em LPS+, GenOx exibiu os maiores valores, e Bonefil, os menores em comparação a BioOss e Controle ($p < 0,05$). Em 100%, para LPS-, observaram-se valores inferiores de viabilidade para os biomateriais em relação ao Controle ($p < 0,05$); particularmente para Bonefill. Para LPS+, apenas Bonefill exibiu valores de viabilidade inferiores aos do Controle ($p < 0,05$). De modo geral, verificou-se, para essa linhagem, que o aumento da concentração do extrato reduziu de forma significativa a viabilidade das culturas, particularmente a 100% (Figura 6).

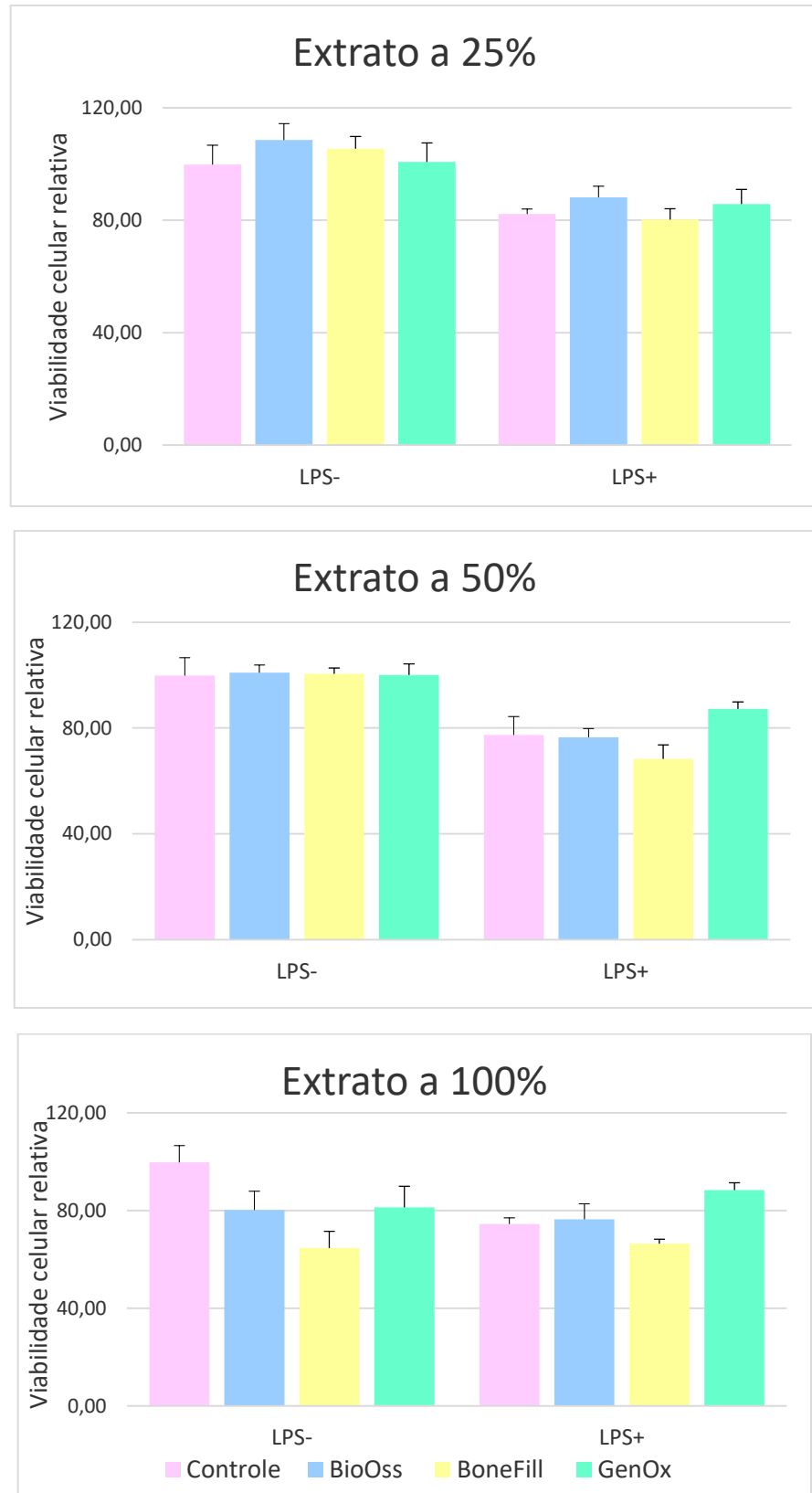


Figura 6. Viabilidade celular em culturas de macrófagos expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill, GeOx Inorg, nas concentrações de 25, 50 e 100% por 3 dias, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-). Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre valores de uma mesma linha (ANOVA two way, $p < 0,05$). Asterisco indica diferenças significantes na expressão do gene no mesmo grupo entre as condições LPS- e LPS+ (ANOVA two way, $p < 0,05$).

Tabela 6. Valores de média (\pm desvio padrão) da viabilidade celular em culturas de macrófagos expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill, GeOx Inorg, nas concentrações de 25, 50 e 100% por 3 dias, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-)

[]	CONDIÇÃO	GRUPO				Teste estatístico
		Controle	BioOss	BoneFill	GenOx	
25%	LPS-	99,82(\pm 6,82)a*	108,53(\pm 5,76)a*	105,41(\pm 4,40)a*	100,67(\pm 6,76)a*	ANOVA two way
	LPS+	82,22(\pm 1,70)a	88,12(\pm 4,00)a	80,22(\pm 3,84)a	85,71(\pm 5,27)a	
50%	LPS-	99,82(\pm 6,82)a*	100,94(\pm 2,88)a*	100,54(\pm 2,15)a*	100,06(\pm 4,17)a*	ANOVA two way
	LPS+	77,44(\pm 6,96)a	76,51(\pm 3,30)a	68,29(\pm 5,30)b	87,26(\pm 2,69)c	
100%	LPS-	99,82(\pm 6,82)a*	80,26(\pm 7,65)b	64,70(\pm 6,80)c	81,38(\pm 8,59)b	ANOVA two way
	LPS+	74,44(\pm 2,56)a	76,37(\pm 6,35)a	66,46(\pm 1,84)a	88,36(\pm 3,02)b	

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre valores de uma mesma linha ($p < 0,05$). Asterisco indica diferenças significantes na viabilidade celular entre as condições LPS- e LPS+ no mesmo grupo e concentração ($p < 0,05$).

4.2.2 EFEITOS DOS PRODUTOS DE DISSOLUÇÃO DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA

Para avaliar os efeitos dos biomateriais sobre a inflamação foram avaliadas as expressões dos genes: IL-1 β , IL-6, IL-23, iNOS-2 e TNF- α na presença (LPS+) ou ausência do LPS (LPS-). De modo geral, a exposição dos macrófagos ao LPS promoveu aumento significativo da expressão gênica de todos os marcadores inflamatórios avaliados (Figuras 7 e 8; Tabela 7). A expressão de IL-1 β foi semelhante entre os grupos para LPS- ($p=0,05$). Para LPS +, todos os grupos de biomateriais promoveram valores de expressão de IL-1 β superiores ao Controle, com destaque para Bonefill ($p < 0,05$). Em ambas as condições, foram observados valores de expressão de IL-6 semelhantes entre os grupos ($p=0,05$), apesar das diferenças numéricas observadas. A expressão de IL-23 semelhante entre os grupos para LPS- ($p=0,05$). Em LPS+, GenOx exibiu valores de expressão de IL-23 superiores ao Controle, enquanto Bonefill e BioOss exibiram valores inferiores aos do Controle ($p < 0,05$). Para LPS-, os maiores níveis de expressão de TNF- α foram observados para GenOx e BioOss ($p < 0,05$). Em ambas as condições, BoneFill sustentou os menores níveis de expressão de TNF- α ($p < 0,05$). Para LPS-, os maiores níveis de expressão de iNOS-2 foram observado em GenOx, enquanto que Bonefill

exibiu os menores valores ($p < 0,05$). Já em LPS+, BoneFill e BioOss exibiam os menores valores para este parâmetro ($p < 0,05$).

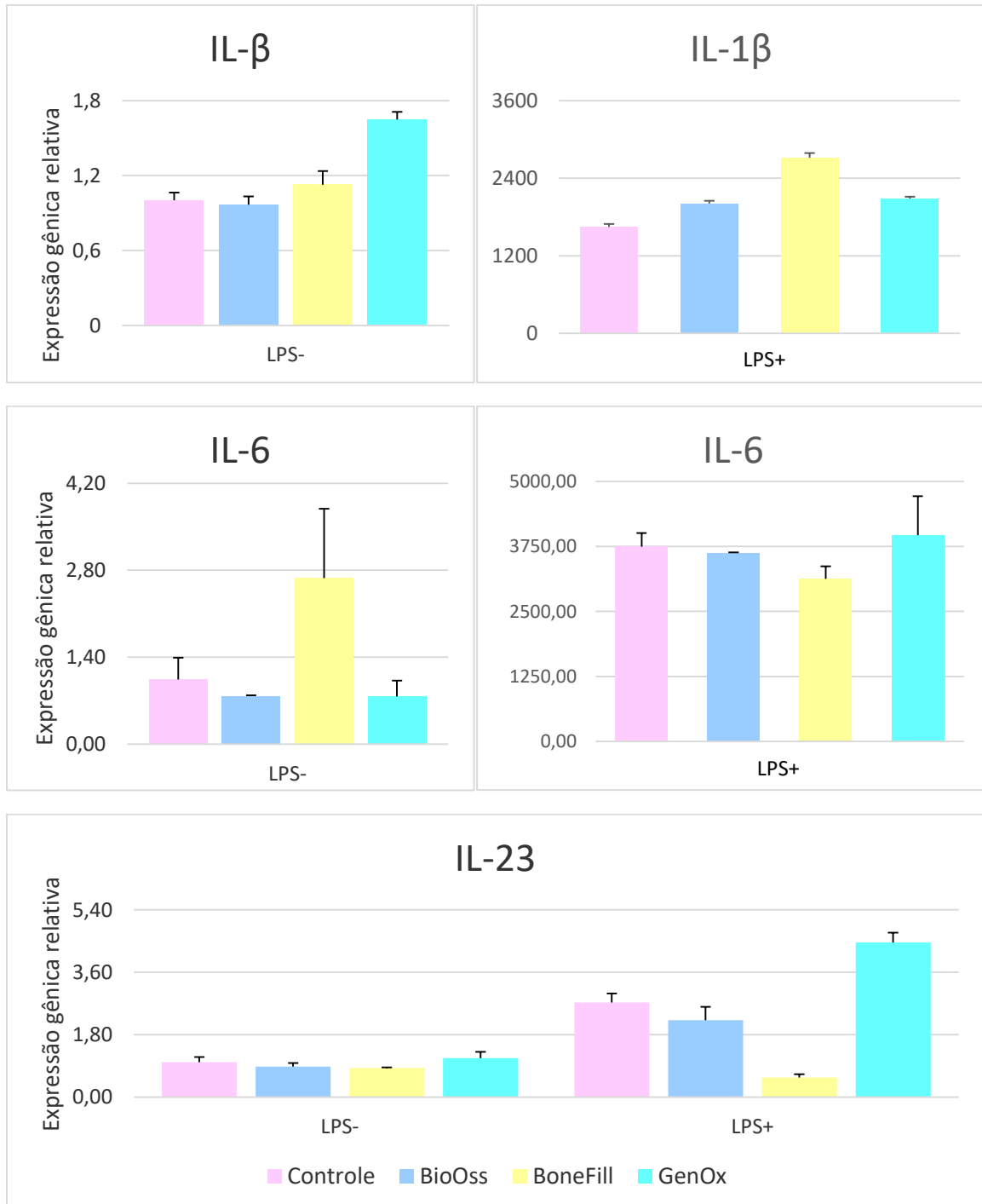


Figura 7. Expressão gênica das interleucinas 1 beta (IL-1 β), 6 (IL-6) e 23 (IL-23) em culturas de macrófagos expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill e GeOx Inorg na concentração de 50% por 48 horas, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-).

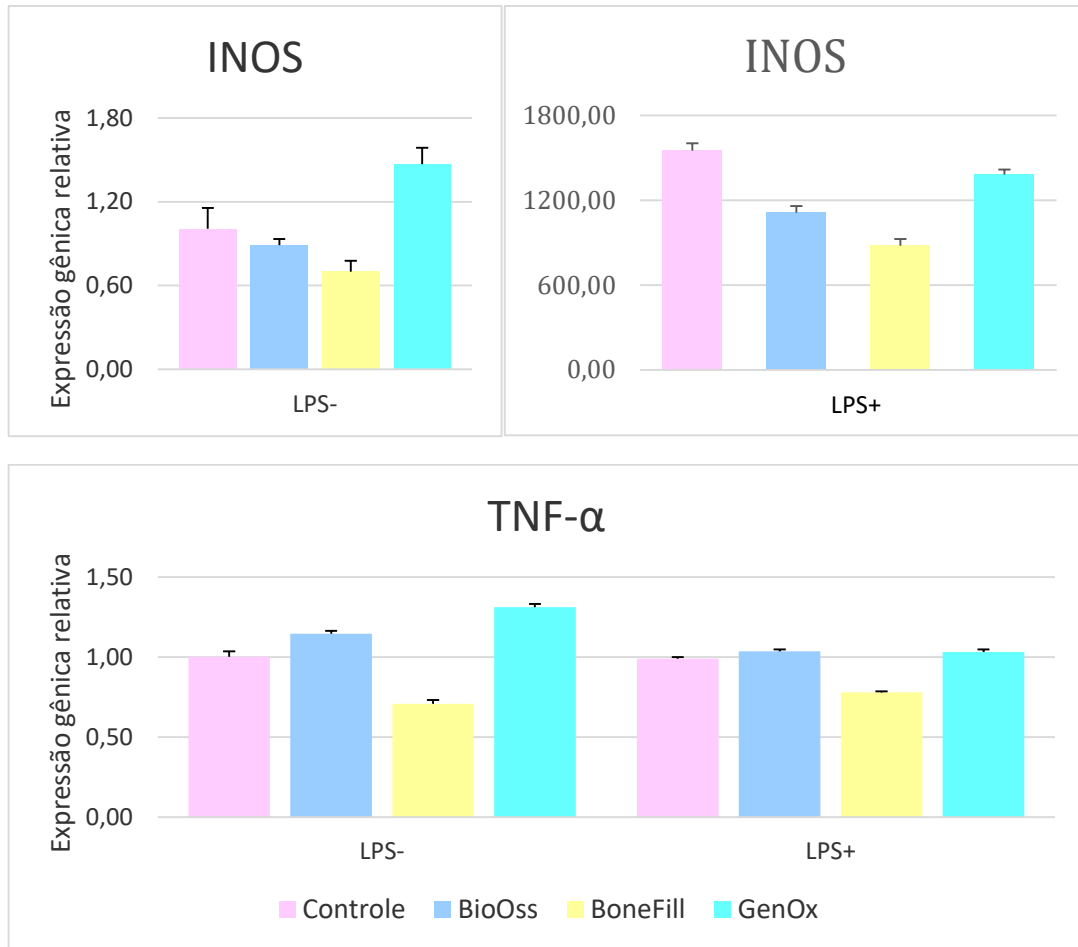


Figura 8. Expressão gênica do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) em culturas de macrófagos expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill e GeOx Inorg na concentração de 50% por 48 horas, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-).

Tabela 7. Valores de média (\pm desvio padrão) de expressão gênica das interleucinas 1 beta (IL-1 β), 6 (IL-6) e 23 (IL-23), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) em culturas de macrófagos expostos ou não (Controle) aos produtos de dissolução iônica (0,1g/mL) BioOss, Bonefill e GeOx Inorg na concentração de 50% por 48 horas, na presença (LPS+) ou ausência de LPS (LPS-)

GENE	CONDIÇÃO	GRUPO				Teste estatístico
		Controle	BioOss	BoneFill	GenOx	
IL-1 β	LPS-	1,00(\pm 0,07)a*	0,97(\pm 0,08)a*	1,13(\pm 0,14)a*	1,65(\pm 0,06)a*	ANOVA two way
	LPS+	1627,9(\pm 41,1)a	1998,6(\pm 35,3)b	2728,5(\pm 29,9)c	2088,4(\pm 27,6)d	
IL-6	LPS-	1,04(\pm 0,35)a*	0,78(\pm 0,01)a*	2,68(\pm 1,12)a*	0,77(\pm 0,25)a*	Kruskal Wallis / Mann Whitney
	LPS+	3746,0(\pm 263,9)a	3627,8(\pm 8,0)a	3126,9(\pm 243,5)a	3965,5(\pm 750,3)a	
IL-23	LPS-	1,01(\pm 0,15)a*	0,88(\pm 0,10)a*	0,84(\pm 0,01)a	1,12(\pm 0,18)a*	ANOVA two way
	LPS+	2,73(\pm 0,26)a	2,21(\pm 0,39)b	0,57(\pm 0,10)c	4,46(\pm 0,29)d	
TNF- α	LPS-	1,00 (\pm 0,04)a	1,14(\pm 0,02)b	0,71(\pm 0,02)c	1,31(\pm 0,02)d	Kruskal Wallis / Mann Whitney
	LPS+	0,99(\pm 0,01)a	1,04(\pm 0,01)a	0,78(\pm 0,01)b	1,03(\pm 0,02)a	
iNOS	LPS-	1,01(\pm 0,15)a*	0,89(\pm 0,04)a*	0,70(\pm 0,08)b*	1,47(\pm 0,12)c*	ANOVA two way
	LPS+	1550,9(\pm 51,9)a	1111,1(\pm 48,6)b	879,2(\pm 46,7)c	1382,4(\pm 34,8)a	

Letras maiúsculas distintas indicam diferença estatística entre valores de uma mesma linha ($p < 0,05$). Asterisco indica diferenças significantes na expressão do gene no mesmo grupo entre as condições LPS- e LPS+ ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a biocompatibilidade, potencial osteogênico e a modulação inflamatória, *in vitro*, de materiais utilizados como substitutos ósseos sobre culturas de osteoblastos e macrófagos expostos ou não ao LPS. Tanto em osteoblastos quanto em macrófagos, a hipótese nula foi rejeitada, já que os produtos de dissolução iônica dos substitutos ósseos interferiram tanto na viabilidade celular quanto na expressão gênica dos marcadores, tanto na presença quanto na ausência do LPS.

O processo de remodelação óssea e de incorporação do enxerto envolve várias células e moléculas, que devem servir como suporte para a migração celular de osteoblastos, osteoclastos e vasos endoteliais, a fim de promover e regular suas atividades. (STANLEY et al., 2006; ROLVIEN et al., 2018; PONZETTI et al., 2019). Ainda, o processo inflamatório ao enxerto é uma preocupação atual em relação ao uso de biomateriais para aumento ósseo, sendo que a reação de macrófagos é um marcador importante para prever se um biomaterial terá biocompatibilidade no osso hospedeiro e permitirá a neoformação óssea, ou, se pode sofrer encapsulamento completo (ANDERSON et al., 2008; BARBECK et al., 2016; ROLVIEN et al., 2018; BARBECK et al., 2019). Neste sentido, e considerando que o enxerto muitas vezes é realizado em áreas de contaminação bacteriana por microrganismos Gram negativos, este trabalho visou verificar a resposta de osteoblastos e macrófagos a diferentes xenoenxertos, na presença de LPS bacteriano.

Para a avaliar os efeitos dos produtos de dissolução iônica dos biomateriais na resposta osteoblástica ao LPS, optou-se por utilizar células MC3T3-E1, que são de uma linhagem clonal murina de osteoblastos imaturos derivados de camundongos, apresenta resultados previsíveis e excelente reprodutibilidade (SUDO et al., 1983; GIBON et al., 2012, QUARLES et al., 1992). Já o potencial imunomodulatório dos xenoenxertos foi avaliado utilizando-se da linhagem

celular RAW 264.7, descritas como um modelo de macrófagos, (TACIAK et al., 2018, FUENTES et al., 2014).

Os materiais analisados foram escolhidos baseados nas suas composições, ou seja, nos distintos efeitos que estes podem provocar na biocompatibilidade e na modulação inflamatória, na presença ou na ausência de LPS. Dentre os materiais disponíveis para enxerto ósseo, o osso bovino xenógeno inorgânico apresenta evidências para utilização na reconstrução óssea em reabilitações com implantes osseointegráveis, sendo observado resultados similares ao osso autógeno, seja utilizado de forma isolada ou associado ao próprio osso autógeno (FUGAZZOTTO; VLASSIS, 1998; MCALLISTER et al., 1999; AL RUHAIMI, 2001; SCHLEGEL et al., 2003; SLOTT et al., 2003; ZAMBUZZI et al., 2009; URBAN et al., 2011; AGHAZADEH et al., 2012; JENSEN et al., 2012; JENSEN et al., 2014). Portanto, no presente estudo, avaliou-se os efeitos dos produtos de dissolução de três substitutos ósseos xenógenos: Bio-Oss, BoneFill, e GenOx Inorgânico.

Para a verificação inicial da biocompatibilidade *in vitro*, optou-se pela avaliação da viabilidade celular pelo método da resazurina, um indicador de coloração roxa, que se torna rosa quando reduzido a resorufina por oxidorreduções celulares, classicamente utilizado para análises de viabilidade/proliferação (VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011, BIGALKE, 1984; DRUMMOND; WAIGH, 2000; MCNICHOLL et al., 2006; SARKER et al., 2007). Em culturas osteoblásticas, embora não tenham sido observadas diferenças importantes para os valores de viabilidade entre os grupos de biomateriais, verificou-se que todos eles reduziram este parâmetro em relação ao Controle, independentemente da concentração avaliada (particularmente para LPS-), embora tenham sustentado valores acima de 80%. Esses efeitos poderiam ser relacionados, pelo menos em parte, aos íons cálcio liberados por estes biomateriais, que quando em altas concentrações pode exibir efeito citotóxico (DVORAK; RICCARDI, 2004; NARITA et al., 2010). Por outro lado, em macrófagos, os valores de

viabilidades se mantiveram semelhantes aos do controle quando os extratos foram utilizados nas menores concentrações, porém, a exposição à maior concentração resultou em queda significativa da viabilidade celular. Ainda, apenas nessa linhagem verificou-se redução da viabilidade celular em função da exposição ao LPS. De fato, a literatura mostra que linhagens distintas podem exibir diferenças de sensibilidade a um mesmo estímulo (Schwartz et al., 2000).

Além disso, avaliou-se, por reação em cadeia da polimerase em tempo real, os efeitos dos substitutos ósseos na expressão do fenótipo osteoblástico, na presença do LPS. Corroborando dados prévios, foi observado no presente estudo, que a presença de LPS suprime a diferenciação celular de osteoblastos. De fato, outros trabalhos mostraram que o processo inflamatório induzido pelo LPS inibe a diferenciação de osteoblastos por aumentar os níveis de proteínas de fosforilação responsáveis pela regulação do processo de apoptose celular (GUO, et al., 2014). Além disso, o LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e pode comprometer a atividade mitocondrial, limitando as funções celulares (ABU-AMER Y et al., 1997; FUJIHARA et al., 2003; MÖRMANN M et al., 2008).

Por outro lado, o contato com os extratos dos biomateriais estimulou a diferenciação osteoblástica em relação ao controle em ambas as condições, inclusive, atenuando os efeitos negativos do LPS sobre a diferenciação osteoblástica, já que foi observada expressão de ALP em todos os grupos de biomateriais, e não no controle. Estes resultados podem estar relacionados aos efeitos positivos promovidos por produtos de dissolução desses biomateriais, como o Ca^{2+} , que aumenta a produção de fosfatase alcalina e a expressão de osteocalcina e sialoproteína óssea (SONG, et al., 2021), além do potencial efeito na inativação do LPS (SAFAVI et al., 1993; SAFAVI et al., 1994; BARTHEL et al., 1997).

Na comparação entre os grupos, verificou-se maiores níveis de marcadores de diferenciação osteoblástica em GenOx em relação aos demais biomateriais. Esse resultado foi

diferente do esperado para esses biomateriais. Sabe-se que as altas temperaturas usadas para remover o conteúdo orgânico do osso resultam no crescimento de cristalito de HA, o que se nota em estudos sobre o GenOx, um biomaterial altamente cristalino com baixa taxa de dissolução, comparado ao Bio-Oss e Bonefill (LEGEROS, 2002; DOROZHKIN, 2010; DO DESTERRO et al., 2014). Accorsi-Mendonça et al. (2008) mostraram em seus estudos que existe porosidade semelhantes entre os materiais, porém com o aumento da temperatura o efeito de sinterização sobre a coalescência de cristais de apatita é claro para o GenOx. Isso faz com que o material exiba menor área superficial e maior tamanho de partículas, diferenciando o GenOx dos demais biomateriais. Essas diferenças afetam diretamente a área de superfície disponível para reagir com células e fluidos biológicos (osteogênese e regeneração óssea) (ROSENGREN et al., 2003; DO DESTERRO et al., 2014). Ainda, a distribuição do tamanho das partículas também interfere em sua cinética de reabsorção: se for grande como no GenOX, as partículas menores tendem a obstruir os espaços entre as partículas maiores, reduzindo a vascularização (DUCHEYNE; QUIU et al., 1999; LEGEROS, 2002), e se a distribuição for pequena, a reabsorção da HA aumentará com partículas pequenas (WHEELER et al., 1998; DUCHEYNE et al., 1999; CONZ et al., 2005). Grânulos maiores são reabsorvidos lentamente. Nos procedimentos de regeneração óssea guiada é importante que o biomaterial seja reabsorvido simultaneamente com a formação óssea e, o biomaterial GenOx por apresentar-se altamente cristalino tende a ter um comportamento estático sem remodelação, atuando de modo negativo como suporte para a osteogênese (CONZ et al., 2011).

O papel de células imunes em torno dos biomateriais têm recebido destaque nas últimas décadas, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Sabe-se que células da linhagem monocítica são as primeiras a entrar contato com vários biomateriais, incluindo implantes metálicos e enxertos ósseos (CHEHROUDI et al., 2010; PAJARINEN et al., 2013), e que a inflamação crônica em torno dos biomateriais se desenvolve como estímulos inflamatórios persistentes na

interface do material com macrófagos, representando uma força motriz da resposta imune (HAMILTON, 2003; DAVIES et al., 2013). Os monócitos que chegam ao local de implantação sofrem uma mudança fenotípica, diferenciando-se para os macrófagos, onde desempenham um papel crítico na geração microambiente pró-inflamatório ou um pró-cicatrização de feridas (BROUGHTON et al., 2006; JENSEN et al., 2014), mediado pela apresentação de antígenos aos linfócitos T, fagocitando corpos estranhos e liberando citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias ao cessar do estímulo citotóxico (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Nesse sentido, esse estudo avaliou a expressão de marcadores inflamatórios e da diferenciação celular para identificar a capacidade de reparo tecidual e a resolução do processo inflamatório em condição normal (LPS-) e patológica (LPS+).

A partir dos dados de expressão gênica, foi observado que os substitutos ósseos promoveram variações importantes na expressão dos marcadores inflamatórios, em ambas as condições experimentais avaliadas. Enquanto BoneFill modulou negativamente a expressão de TNF- α e INOS, GenOx aumentou significativamente a expressão desses marcadores. Além disso, apenas Bonefill e BioOss exibiram potencial em reduzir a expressão de marcadores inflamatórios em relação ao Controle, com destaque para Bonefill (TNF- α , INOS, IL-23) em culturas expostas ao LPS.

As citocinas pró-inflamatórias são pequenas proteínas que medeiam células de diferentes origens, de inflamação, proliferação e reações imunológicas em vários ambientes biológicos. Eles também medeiam a inflamação na lesão óssea após um procedimento cirúrgico, como aumento do seio ou destruição do tecido periodontal (GRAVES, 2008). A interleucina-1 β (IL-1 β) é uma potente citocina pró-inflamatória que é crucial para as respostas de defesa do hospedeiro a infecções e lesões (DINARELLO et al., 1996). A IL-23 é um membro da família IL-12 de citocinas com propriedades pró-inflamatórias que, quando expressas por macrófagos inflamatórios potencializam o processo inflamatório, estimulando a produção de IL-1, TNF- α

e da própria IL-23 (DUVALLET et al., 2011). A sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) é uma enzima chave na resposta inflamatória de macrófagos, que é a fonte de óxido nítrico (NO) que é induzida de forma potente em resposta a estímulos pró-inflamatórios (MCNEILL et al., 2015). O TNF- α é uma proteína pró-inflamatória envolvida em muitos mecanismos patológicos, como um potente estimulador da reabsorção óssea, funciona como um regulador negativo do osso neoformado e está correlacionado *in vivo* com perda óssea alveolar após implante, por danos de inflamação na peri-implantite (TANI-ISHII et al., 1999; AZUMA et al., 2000; MACHTEI et al., 2006; KONTTINEN et al., 2006). Assim como o TNF- α , a IL-6 também é uma citocina pró-inflamatória capaz de estimular a proliferação e atividade de osteoclastos e à maturação dos osteoblastos (DE AZAMBUJA et al., 2002; AXMANN et al., 2009). Nesse sentido, a regulação positiva desses genes por GenOx, em ambas as condições experimentais, sugere um potencial pró-inflamatório desse biomaterial, em contraste com o comportamento dos demais substitutos ósseos, particularmente o Bonefill. Os resultados de expressão gênica desse estudo corroboram em parte aqueles de estudos anteriores, que mostraram-uma regulação negativa da expressão de TNF- α e IL-6 nos osteoblastos cultivados em Bio-Oss (AMERIO et al., 2010).

Cada tipo de biomaterial exige um método de processamento específico. Para xenoenxertos, o banho em solução alcalina, a temperatura de processamento, o tamanho da granulação, são essenciais para permitir a formação de um novo osso e para remover os restos orgânicos do doador (patógenos, proteínas ou material genético) (KIM et al., 2013; FRETWURST et al., 2014; GHANAATI et al., 2014; KAČAREVIĆ et al., 2018). Esses restos orgânicos, podem levar à transmissão da doença, exacerbar uma reação inflamatória e induzir uma reação imunológica adversa (WENZ et al., 2001; GHANAATI et al., 2014; GHANAATI et al., 2018; KAČAREVIĆ et al., 2018; BARBECK et al., 2019). De fato, o processo de purificação dos xenoenxertos representam um fator decisivo em seu desempenho biológico.

Vários métodos têm sido descritos na literatura, mas sabe-se que o aquecimento acima de 1000°C é a forma mais eficaz de desnaturação de proteínas (WENZ et al., 2001; GHANAATI et al., 2018). Entretanto, o aquecimento a alta temperatura reduz a porosidade e derrete a estrutura lamelar do biomaterial, prejudicando a molhabilidade e a fixação de células osteogênicas, modificando as propriedades mecânicas e osteocondutoras dos materiais (KACAREVIĆ et al., 2018), sendo, portanto, necessário avaliar o comportamento de diferentes materiais disponíveis comercialmente.

Além disso, a composição e aumento da temperatura de sinterização poderiam ser fatores a serem considerados, pois o GenOx é um biomaterial com alto grau de cristalinidade e, devido a isso, apresenta menor taxa de liberação de cálcio no ensaio de dissolução, comparativamente ao BioOss e Bonefill (LANDI, 2000; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008; DO DESTERRO et al., 2014), o que poderia reduzir seus efeitos sobre o LPS. Dados sobre a cristalinidade dos biomateriais são de extrema relevância, pois a taxa de reabsorção deve ser compatível com a taxa de reparo ósseo do tecido receptor. A solubilidade dos fosfatos de cálcio depende da relação Ca/P e, para a mesma composição, depende do grau de cristalinidade; então materiais menos cristalinos são mais solúveis (LEGEROS, 1991).

Portanto, avaliando-se o conjunto de achados nesse estudo, pode-se sugerir que Bonefill e BioOss exibem potencial osteogênico, uma vez que promovem a expressão de importantes marcadores da diferenciação osteoblástica, e também potencial imunomodulatório, reduzindo a expressão de genes pró-inflamatórios, representando alternativas particularmente relevantes em sítios ósseos com contaminação bacteriana. Por outro lado, embora o GenOx tenha promovido a expressão de marcadores osteoblásticos, aumentou também a expressão de genes pró-inflamatórios, fator que poderia justificar em parte seu desempenho clínico em comparação aos demais biomateriais. Sabe-se que a avaliação dos materiais odontológicos através da cultura celular *in vitro* apresenta algumas limitações como a ausência da interação entre células, não

reproduzindo a complexidade do ambiente *in vivo*. Nesse sentido, os achados do presente estudo, deverão ser confirmados por estudos *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, conclui-se que os íons liberados pelos biomateriais, apesar de reduzirem a viabilidade celular em ambas as linhagens, favoreceram a expressão de marcadores osteoblásticos e atenuam os efeitos negativos do LPS sobre a expressão do fenótipo osteogênico em culturas de pré-osteoblastos.

Além disso, os materiais exibiram efeito modulador sobre a inflamação, sendo que Bonefill e Bio-Oss regulam negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios, enquanto que o GenOx promoveu a expressão desses genes em macrófagos, na presença ou não de LPS. Estes achados sugerem que a seleção do material pode ser determinante para o processo de regeneração tecidual de sítios ósseos com contaminação bacteriana. Ainda, embora os resultados encorajadores, estes deverão ser confirmados por estudos *in vivo*, utilizando estratégias de avaliação destas preparações em diferentes aplicações para o reparo tecidual em defeitos ósseos infeccionados ou não.

REFERÊNCIAS

- ABU-AMER, Y., ROSS, F. P., EDWARDS, J., TEITELBAUM, S. L. Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its P55 receptor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1557-1565, 1997.
- ACCORSI-MENDONÇA. T., CONZ M. B., BARROS T. C., SENA L. A., SOARES DE G. A., GRANJEIRO J. M. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Brazilian Oral Research**, v. 22, n. 1, p. 5-10, 2008.
- ACCORSI-MENDONÇA. T., PAIVA K. B., ZAMBUZZI W. F., CESTARI T. M., LARA V. S., SOGAYAR M. C., TAGA R., GRANJEIRO J. M. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, n. 2, p. 201-208, 2008.
- AGHAZADEH A., RUTGER PERSSON G., RENVERT S. A singlecentre randomized controlled clinical trial on the adjunct treatment of intra-bony defects with autogenous bone or a xenograft: results after 12 months. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 7, p. 666-673, 2012.
- AL RUHAIMI K.A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. **The International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v.16, n. 1, p. 105-114, 2001.
- AMERIO P., VLANALE G., REALE M., MURARO R., TULLI A., PLATTELLI A. The effect of deproteinized bovine bone on osteoblast growth factors and proinflammatory cytokine production. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 6, p. 650-655, 2010.
- ANDERSON J. M.; RODRIGUEZ A.; CHANG D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.
- ANDIA, D. C., CERRI, P. S., SPOLIDORIO, L. C. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. **Revista de Odontologia da Unesp**, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.

ARAÚJO M. G., LINDER E., LINDHE J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2011.

ARTZI Z., TAL H., DAYAN D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 2, p. 152-159, 2001.

AXMANN R., BOHM C., KROENKE G., ZWERINA J., SMOLEN J. & SCHETT G. Inhibition of Interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 9, p. 2747-2756, 2009.

AZUMA, Y., KAJI, K., KATOGLI, R., TAKESHITA, S. & KUDO, A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4858-4864, 2000.

BARBECK M.; JUNG O.; XIONG X.; KRASSTEV R.; KORZINSKAS T.; NAJMAN S.; RADENKOVIĆ M.; WEGNER N.; KNYAZEVA M.; WALTHER F. Balancing Purification and Ultrastructure of Naturally Derived Bone Blocks for Bone Regeneration: Report of the Purification Effort of Two Bone Blocks. **Materials**, v. 12, n. 19, p. 3234, 2019.

BARBECK M.; MOTTA A.; MIGLIARESI C.; SADER R.; KIRKPATRICK C. J.; GHANAATI, S. Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: Possible importance for the regeneration process? **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 2, p. 413-418, 2016.

BARBECK M.; UDEABOR S. E.; LORENZ J.; KUBESCH A.; CHOUKROUN J.; SADER R. A.; KIRKPATRICK C. J.; GHANAATI S. Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss™) results in an enhanced early implantation bed vascularization. **Annals of Maxillofacial Surgery**, v. 4, n. 2, p. 150-157, 2014.

BARTHEL, C. R., LEVIN, L.G., REISNER, H. M., TROPE, M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. **International Endodontic Journal**, v.30, n. 3, p.155-159, 1997.

BIGALKE D. L Methods used for monitoring the microbiological quality of raw milk. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v. 4, n. 5, p. 189-190, 1984.

BIONNOVATION, BIOMATERIALS. Available online: https://portal.bionnovation.com.br/wp-content/uploads/2020/07/IU_INQ003_17_PT-BR_Bonefill.pdf (accessed on 11 April 2021), 2013.

BROUGHTON G. I., JANIS J. E., ATTINGER C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7, p. 12S-34S, 2006.

CARMAGNOLA, D., ABATI, S., CELESTINO, S., CHIAPASCO, M., BOSSHARDT, D., LANG, N. P. Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 12, p. 1246-1253, 2008.

CHEHROUDI B., GHREBI S., MURAKAMI H., WATERFIELD J. D., OWEN G., BRUNETTE D. M. Bone formation on rough, but not polished, subcutaneously implanted Ti surfaces is preceded by macrophage accumulation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 93, n. 2, p. 724-737, 2010.

CHEN X., YAN Y., MULLNER M., PING Y, CUI J, et al. Shape-dependent activation of cytokine secretion by polymer capsules in human monocyte-derived macrophages. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 3, p. 1205-1212, 2016.

CHEN Z., KIM S. J., CHAMBERLAIN N. D., PICKENS S. R., VOLIN M. V., VOLKOV S., ARAMI S., CHRISTMAN J. W., PRABHAKAR B.S., SWEDLER W., MEHTA A., SWEISS N., SHAHRARA S. The novel role of IL-7 ligation to IL-7 receptor in myeloid cells of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 10, p. 5256-5266, 2013.

CONZ M. B., GRANJEIRO J. M., SOARES G. A. Physicochemical characterization of six comercial hydroxyapatites for medical – dental applications as bone graft **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 2, p. 136-140, 2005.

CONZ M. B., GRANJEIRO J. M., SOARES G. D. E. A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 4, p. 337-342, 2011.

CUI W., JOSHI N. S., LIU Y., MENG H., KLEINSTEIN S. H., KAECH S. M. TLR4 ligands lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid a differentially regulate effector and memory CD8⁺ T Cell differentiation. **Journal of Immunology**, v. 192, n. 9, p. 4221-4232, 2014.

DAVIES L. C., ROSAS M., JENKINS S. J., LIAO C-T., SCURR M. J., BROMBACHER F., FRASER D. J., ALLEN J. E., JONES S. A., TAYLOR P. R. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1886, 2013.

DE AZAMBUJA CARVALHO P. H., AL-MAAWI S., DOHLE E., SADER R. A., PEREIRA-FILHO V. A., GHANAATI S. Cellular Response of Human Osteoblasts to Different Presentations of Deproteinized Bovine Bone. **Materials (Basel)**, v. 15, n. 3, p. 999, 2022.

DESTERRO, F. P., SADER, M. S., SOARES, G. D. A., VIDIGAL JUNIOR, G. M. Can inorganic bovine bone grafts present distinct properties? **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 4, p. 282-288, 2014.

DINARELLO C. A. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. **Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. S43-S58, 2014.

DINARELLO C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DOROZHKIN S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v.31, n. 7, p. 1465-1485, 2010.

DRUMMOND A. J, WAIGH R. D. The development of microbiological methods for phytochemical screening. In: Pandalai S (ed) Recent research developments in phytochemistry. **Research Signpost, India**, 2000.

DUCHEYNE P., QUIU Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v.20, n. 23-24, p. 2287-2303, 1999.

DUVALLET E., SEMERANO L., ASSIER E., FALGARONE G. & BOISSIER M. C. Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases. **Annals of Medicine**, v. 43, n.7, p. 503-551, 2011.

DVORAK, M. M.; RICCARDI, D. Ca²⁺ as an extracellular signal in bone. **Cell Calcium**, v. 35, n. 3, p. 249-255, 2004.

ERDFELDER, E., FAUL, F., BUCHNER, A. GPOWER: A general power analysis program. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 28, p.1-11, 1996.

ERRIDGE, C., BENNETT-GUERRERO, E., POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 8, p. 837-851, 2002.

ESTRELA, C. **Ciência endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, v. 2, 2004.

FARHAD, A., MOHAMMADI, Z. Calcium hydroxide: a review. **International Dental Journal**, v. 55, n. 5, p. 293-301, 2005.

FLORENCIO-SILVA, R., SASSO, G. R., SASSO-CERRI, E., SIMÕES, M. J., CERRI, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**, v. 2015, 2015.

FRETWURST T.; SPANOU A.; NELSON K.; WEIN M.; STEINBERG T.; STRICKER A. Comparison of four different allogeneic bone grafts for alveolar ridge reconstruction: A preliminary histologic and biochemical analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology**, v. 18, n. 4, p. 424-431, 2014.

FUENTES A. L., MILLIS L., VAPENIK J., SIGOLA L. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. **Journal of Surgical Research**, v. 189, n. 2, p. 304-312, 2014.

FUGAZZOTTO P. A., VLASSISJ. Long-term success of sinus augmentation using various surgical approaches and grafting materials. **Internacional Journal Oral Maxillofacial Implants**, v. 13, n. 1, p. 52-58, 1998.

FUJIHARA, M., MUROI, M., TANAMOTO, K., SUZUKI, T., AZUMA, H., IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 100, n. 2, p. 171-194, 2003.

GALARRAGA-VINUEZA M. E., OBREJA K., RAMANAUSKAITE A., MAGINI R., BEGIC A., SADER R., SCHWARZ F. Macrophage polarization in peri-implantitis lesions. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 4, p. 2335-2344, 2021.

GARLANDA C., DINARELLO C. A., MANTOVANI A. The interleukin-1 family: Back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-1018, 2013.

GARLET G. P., GIANNOBILE W. V. Macrophages: The Bridge between Inflammation Resolution and Tissue Repair? **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 10, p. 1079-1081, 2018.

GHANAATI S.; BARBECK M.; BOOMS P.; LORENZ J.; KIRKPATRICK C. J.; SADER R. A. Potential lack of “standardized” processing techniques for production of allogeneic and xenogeneic bone blocks for application in humans. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 8, p. 3557-3562, 2014.

GHANAATI S.; ORLOWSKA A.; AL-MAAWI S.; BROZOVIC J.; SADER R. Xenosynthetic bone block includes cellular remnants: Acceptable components or lack of purification? **International Journal of Growth Factors Stem Cells in Dentistry**, v. 1, n. 2, p. 70-73, 2018.

GIBON E., BATKE B., JAWAD M. U., FRITTON K., RAO A., YAO Z., BISWAL S., GAMBHIR S. S., GOODMAN S. B. MC3T3-E1 osteoprogenitor cells systemically migrate to a bone defect and enhance bone healing. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 9-10, p. 968-973, 2012.

GOKHALE, S. R., SUMANTH, S., PADHYE, A. M. Evaluation of blood parameters in patients with chronic periodontitis for signs of anemia. **Journal of Periodontology**, v. 81, n. 8, p. 1202-1206, 2010.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1585–1591, 2008.

GUO C., YUAN L., WANG J. G., WANG F., YANG X. K., ZHANG F. H., SONG J. L., MA X. Y., CHENG Q., SONG G. H. Lipopolysaccharide (LPS) induces the apoptosis and inhibits osteoblast differentiation through JNK pathway in MC3T3-E1 cells. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 621-631, 2014.

GUO, J., YANG, D., OKAMURA, H., TERAMACHI, J., OCHIAI, K., QIU, L., HANEJI, T. Calcium hydroxide suppresses Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide-induced bone destruction. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 5, p. 508-513, 2014.

HAMILTON J. A. Nondisposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 6, p. 702-712, 2003.

HAYES R., CHALMERS S. A, NIKOLIC-PATERSON D. J., ATKINS R. C., HEDGER M. P. Secretion of bioactive interleukin 1 by rat testicular macrophages in vitro. **Journal of Andrology**, v.17, n. 1, p. 41-49, 1996.

HUNTER G. K., GOLDBERG H. A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)**, v. 90, n. 18, p. 8562-5, 1993.

IDRISS H. T., NAISMITH J.H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 3, p. 184-195, 2000.

INADA, M., MATSUMOTO, C., UEMATSU, S., AKIRA, S., MIYAURA, C. Membrane bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p.1879-1885, 2006.

INSUA A., MONJE A., WANG H. L., MIRON R. J. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 105, n. 7, p. 2075-2089, 2017.

ISHIMI, Y., MIYAURA, C., JIN, C. H., AKATSU, T., ABE, E., NAKAMURA, Y., YAMAGUCHI, A., YOSHIKI, S., MATSUDA, T., HIRANO, T., et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 10, p. 3297-303, 1990.

ISLAM S., HASSAN F., TUMURKHUU G., DAGVADORJ J., KOIDE N., NAIKI Y., MORI I., YOSHIDA T., YOKOCHI T. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 360, n. 2, p. 346-351, 2007.

ITOH K., UDAGAWA N., KOBAYASHI K., SUDA K., LI X., TAKAMI M., OKAHASHI N., NISHIHARA T., TAKAHASHI N. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3688-3695, 2003.

JENSEN S. S, BOSSHARDT D. D, GRUBER R., BUSER D. Long-term stability of contour augmentation in the esthetic zone: Histologic and histomorphometric evaluation of 12 human biopsies 14 to 80 months after augmentation. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 11, p. 1549-1556, 2014.

JENSEN T., SCHOU S., GUNDERSEN H. J., FORMAN J. L., TERHEYDEN H., JENSEN T., SCHOU S., STAVROPOULOS A., TERHEYDEN H., HOLMSTRUP P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: A systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, v.23, n. 3, p. 263-273, 2012.

JIANG, J., ZUO, J., CHEN, S. H., HOLLIDAY, L. S. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide stimulated osteoclast formation. **Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 95, n. 3, p. 348-354, 2003.

JUODZBALYS, G., WANG, H. L. Soft and hard tissue assessment of immediate implant placement: a case series. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 2, p. 237-243, 2007.

KAĆAREVIĆ P.; KAVEHEI F.; HOUSHMAND A.; FRANKE J.; SMEETS R.; RIMASHEVSKIY D.; WENISCH S.; SCHNETTLER R.; JUNG O.; BARBECK M. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 41, n. 11, p. 789-800, 2018.

KADONO, H., KIDO, J., KATAOKA, M., YAMAUCHI, N., NAGATA, T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. **Infection Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2841-2846, 1999.

KATCHBURIAN, E., ARANA CHAVEZ, V. E. *Histologia e Embriologia Oral* - 4.ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 2017.

KEETING, P. E., RIFAS, L., HARRIS, S. A., COLVARD, D. S., SPELSBERG, T. C., PECK, W. A., RIGGS, B. L. Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells. **Journal of Bone and Mineral Research: the journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 6, n. 8, p. 827-833, 1991.

KIM, K., OH, J., JIN, G., LEE, J., OH, D., KANG, H., KIM, H. M., LEE, S. H., CHO, D. W., AHN, S. T., RHIE, J. W. Preparation and evaluation of PLGA-Silica Scaffold with Human

Adipose-Derived Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 291-297, 2010.

KIM Y. K., LEE J., UM I.W., KIM K.W., MURATA M., AKAZAWA T., MITSUGI M. Tooth-derived bone graft material. **Journal of the Korean Association Oral Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 3, p. 103-111, 2013

KIRKWOOD, K. L., CIRELLI, J. A., ROGERS, J. E., GIANNOBILE, W. V. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 43, n. 1, p. 294-315, 2007.

KLIFTO, C. S., GANDI, S. D., SAPIENZA, A. Bone Graft Options in Upper-Extremity Surgery. **Journal of Hand Surgery (American Volume)**, v. 43, n. 8, p. 755-776, 2018.

KODUKULA, P. S., PRAKASAM, T.B.S., ANTONISEN, A.C.: Role of pH in biological wastewater treatment process. In: Physiological models in microbiology. Bazin, M. J., Prosser JI eds. 1st edn. CRC Press, Florida, p. 114-134, 1988.

KOMORI T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 658, n. 1, p. 43-49, 2009.

KONTTINEN, Y.T., LAPPALAINEN, R., LAINE, P., KITTI, U., SANTAVIRTA, S. & TERONEN, O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 26, n. 2, p. 135-141, 2006.

LAM, J., TAKESHITA, S., BARKER, J.E., KANAGAWA, O., ROSS, F.P., TEITELBAUM, S.L. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1481-1488, 2000.

LANDI E. Densification behavior and mechanisms of synthetic hydroxyapatite. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14-15, p. 2377-2387, 2000.

LEGEROS R. Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. **Monographs in Oral Science**, v. 15, n. 1, p. 1-201, 1991.

LEGEROS R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 1, n. 395, p. 81-98, 2002.

LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$. **Methodology Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JUNIOR, J. F. Endodontia: Biologia E Técnica - 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LUNDGREN S., MOY P., JOHANSSON C., AND NILSSON H., “Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study”. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 6, p. 760-766, 1996.

MA S., YANG Y., CARNES D. L., K. KIM, PARK S., OH S. H., ONG J. L. Effects of Dissolved Calcium and Phosphorous on Osteoblast Responses. **Journal Oral Implantology**, v. 31, n. 2, p. 61–67, 2005.

MACHTEI E. E., OVED-PELEG E. & PELED M. Comparison of clinical, radiographic and immunological parameters of teeth and different dental implant platforms. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 6, p. 658-656., 2006.

MARDAS, N., CHADHA, V., DONOS, N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, n. 7, p. 688-698, 2010.

MCALLISTER B. S., MARGOLIN M. D., COGAN A. G., BUCK D., HOLLINGER J. O., LYNCH S. E. Eighteen-month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. **The International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 14, n. 3, p. 361-368, 1999.

MCNEILL E., CRABTREE M. J., SAHGAL N., PATEL J., CHUAIPHICHA S., IQBAL A. J., HALE A. B., GREAVES D. R., CHANNON K. M. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 79, n. 1, p. 206-216, 2015.

MCNICHOLL B. P., MCGRATH J. W., QUINN J. P. Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. **Water Research**, v. 41, n. 1, p. 127-133, 2006.

MIRON, R. J., HEDBOM, E., SAULACIC, N., ZHANG, Y., SCULEAN, A., BOSSHARDT, D. D., BUSER, D. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 12, p. 1428-1433, 2011.

MÖRMANN, M., THEDERAN, M., NACKCHBANDI, I., GIESE, T., WAGNER, C., HÄNSCH, G. M. Lipopolysaccharides (LPS) induce the differentiation of human monocytes to osteoclasts in a tumour necrosis factor (TNF) alpha-dependent manner: a link between infection and pathological bone resorption. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3330-3337, 2008.

MOSCHEN A. R., TILG H., RAINE T. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 3, p.185-196, 2019.

NAIR P. N., SJÖGREN U., KREY G., KAHNBERG K. E., SUNDQVIST G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **Journal of Endodontics**, v. 16, n. 12, p. 580-588, 1990.

NARITA, H.; ITOH, S.; IMAZATO, S.; YOSHITAKE, F.; EBISU, S. An explanation of the mineralization mechanism in osteoblasts induced by calcium hydroxide. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 2, p. 586-590, 2010.

PAJARINEN J., KOURI V. P., JAMSEN E., LI T. F., MANDELIN J., KONTTINEN Y. T. The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. **Acta Biomaterialia**, v.9, n, 11, p. 9229-9240, 2013.

PONZETTI M.; RUCCI N. Updates on Osteoimmunology: What's New on the Cross-Talk between Bone and Immune System. **Front. Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 236, 2019.

QUARLES L. D., YOHAY D. A., LEVER L. W., et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 7, n. 6, p. 683, 1992.

REINO D. M.; DOS REIS L. D.; FERMIANO D.; GIRO G.; MAURICIO E. J. M.; MARINHO K. O.; FAVERI M. Alveolar Ridge Preservation Using a Bovine-derived Bone Graft in Association with Titanium Foil - A Prospective Case Series. **Journal International Academy of Periodontology**, v. 23, n. 1, p. 57-64, 2021.

ROGERS, J. E., LI, F., COATNEY, D. D., ROSSA, C., BRONSON, P., KRIEDER, J. M., GIANNOBILE, W. V., KIRKWOOD, K. L. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 550-558, 2007.

ROLVIEN T.; BARBECK M.; WENISCH S.; AMLING M.; KRAUSE M. Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. 19, n. 10, p. 2893, 2018.

ROSENGREN A., OSCARSSON S., MAZZOCCHI M., KRAJEWSKI A., RAVAGLIOLI A. Protein adsorption onto two bioactive glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 24, n. 1, p. 147-155, 2003.

SAFAVI, K. E., NICHOLS F. C. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. **Journal of Endodontics**, v. 20, n. 3, p. 127-129, 1994.

SAFAVI, K. E., NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 6, p. 76-78, 1993.

SAKUMA S., SAKAI M., ITOOKA R., MIYAURA N. Asymmetric conjugate 1,4-addition of arylboronic acids to alpha, beta-unsaturated esters catalyzed by Rhodium(I)/(S)-binap. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 19, p. 5951-5955, 2000.

SARKER S. D., NAHAR L., KUMARASAMY Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SCHLEGEL K. A., FICHTNER G., SHULTZE-MOSGAU S. Histologic Findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. **International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v. 18, n. 1, p. 53-58, 2003.

SCHWARTZ, Z.; CARNES, D. L. JR.; PULLIAM, R.; LOHMANN, C. H.; SYLVIA, V. L.; LIU, Y. et al. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. **Journal Periodontology**, v. 71, n. 8, p. 1287-1296, 2000.

SHAPOURI-MOGHADDAM A., MOHAMMADIAN S., VAZINI H., TAGHADOSI M., ESMAEILI S. A., MARDANI F., SEIFI B., MOHAMMADI A., AFSHARI J. T., SAHEBKAR A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.

SHARMA U., PAL D, PRASAD R. Alkaline phosphatase: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 269-278, 2014.

SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LÜTHY, R., NGUYEN, H.Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R., BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell Press Journal**, v. 89, n. 2, p. 309-19, 1997.

SIQUEIRA, J.F., LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 5, p. 361-369, 1999.

SLOTT E. C., LUNDGREN D, BURGOS P.M. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 18, n. 6, p. 795-805, 2003.

SONG W., LI S., TANG Q., CHEN L., YUAN Z. In vitro biocompatibility and bioactivity of calcium silicate based bioceramics in endodontics (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 48, n. 1, p. 28, 2021.

STANLEY K.T.; VANDORT C.; MOTYL C.; ENDRES J.; FOX D.A. Immunocompetent Properties of Human Osteoblasts: Interactions With T Lymphocytes. **Journal of Bone and Mineral Metabolism Research**, v. 21, n. 1, p. 29-36, 2006.

STÖGER J. L., GIJBELS M. J., VAN DER VELDEN S., MANCA M., VAN DER LOOS C. M., BIESSEN E. A., DAEMEN M. J., LUTGENS E., DE WINTHER M. P. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 2, p. 461-468, 2012.

SUDA, K., WOO, J. T., TAKAMI, M., SEXTON, P.M., NAGAI, K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- α , IL-1, and RANKL. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, n. 1, p. 101-108, 2002.

SUDO H., KODAMA H. A., AMAGAI Y., et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. **Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 1, p. 191, 1983.

TACIAK B., BIAŁASEK M., BRANIEWSKA A., SAS Z., SAWICKA P., KIRAGA Ł., RYGIEL T., KRÓL M. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PLOS One**, v. 13, n. 6, p. e0198943, 2018.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, n. 4, p. 287-293, 2005.

TAKEUCHI O., HOSHINO K., KAWAI T., SANJO H., TAKADA H., OGAWA T., TAKEDA K., AKIRA S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v.11, n. 4, p. 443-451, 1999.

TANI-ISHII N., TSUNODA A., TERANAKA T.& UNEMOTO T. Autocrine regulation of osteoclast formation and bone resorption by IL-1 alpha and TNF alpha. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 10, p. 1617-1623, 1999.

THALLER S. R., HOYT J., DART A., BORJESON K., TESLUK H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 5, n. 4, p. 242-246, 1994.

TITSINIDES, S., AGROGIANNIS, G., KARATZAS, T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. **Japanese Dental Science Review**, v. 55, n. 1, p. 26-32, 2019.

TOMOMATSU, N., AOKI, K., ALLES, N., SOYSA, N. S., HUSSAIN, A., NAKACHI, H., KITA, S., SHIMOKAWA, H., OHYA, K., AMAGASA, T. LPS-Induced Inhibition of Osteogenesis Is TNF- α Dependent in a Murine Tooth Extraction Model. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 10, p. 1770-1781, 2009.

TRAINI T., DEGIDI M., SAMMONS R., STANLEY P. & PIATELLI A. Histological microanalytical study of anorganic bone substitution following sinus floor augmentation in humans. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 7, p. 1232-1240, 2008.

URBAN I. A., NAGURSKY H., LOZADA J. L. Horizontal ridge augmentation with a resorbable membrane and particulated autogenous bone with or without anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 22 patients. **International Journal of Oral Implants**, v. 26, n. 2, p. 404-414, 2011.

VEGA-AVILA E., PUGSLEY M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, n. 1, p. 10-14, 2011.

WANG, H.; KAWASHIMA, N.; IWATA, T.; XU, J.; TAKAHASHI, S.; SUGIYAMA, T.; SUDA, H. Differentiation of odontoblasts is negatively regulated by MEPE via its C-terminal fragment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 398. n. 3, p. 406-412, 2010.

WENZ B., OESCH B., HORST M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 12, p. 1599-1606, 2001.

WHEELER D. L., STOKES K. E., HOELLRICH R. G., CHAMBERLAND D. L. MCLOUGHLIN S. W. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. **Journal Biomedical Mater Research**, v. 15, p. 527-533, 1998.

YOGESHA, S. D., KHAPLI, S. M., SRIVASTAVA, R. K., MANGASHETTI, L. S., POTE, S. T., MISHRA, G. C., WANI, M. R. IL-3 inhibits TNF-alpha-induced bone resorption and prevents inflammatory arthritis. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 1, p. 361-370, 2009.

YU J., QIU Y., YANG J., BIAN S., CHEN G., DENG M., KANG H., HUANG L. DNMT1-PPAR γ pathway in macrophages regulates chronic inflammation and atherosclerosis development in mice. **Scientific Reports**, v. 17, n. 6, p. 30053, 2016.

ZAMBUZZI W. F., YANO C. L., CAVAGIS A. D., PEPPELENBOSCH M. P., GRANJEIRO J. M., FERREIRA C. V. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 322, n. 1-2, p. 143-150, 2009.

ZHOU X., ZHANG Z., LI S., BAI Y., XU H. Osteoconduction of different sizes of anorganic bone particles in a model of guided bone regeneration. **British Journal of and Maxillofacial Surgery**, v. 49, n. 1, p. 37-41, 2011.

ZHOU Y., CHEN C., JOHANSSON M. J. The pre-mRNA retention and splicing complex controls tRNA maturation by promoting TAN1 expression. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 11, p. 5669-5678, 2013.