

ANDREIA SOFIA DE PAIVA FIGUEIREDO

**ESTUDO *IN VIVO* DE CARACTERIZAÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA
PÓS IMPLANTAÇÃO DE BIOMATERIAIS À BASE DE HIDROXIAPATITE
PARA APLICAÇÃO EM **MEDICINA DENTÁRIA****

Setembro de 2013

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer
responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, § único)

“Aqueles que passam por nós não vão sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

Antoine de Saint-Exupéry

ORIENTADORES:

Professor Doutor Fernando Alberto Deométrio Rodrigues Alves Guerra

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Professora Doutora Maria Manuela Monteiro Grazina

À minha mãe e ao meu pai, pelos exemplos que foram, são e sempre serão

Ao Osvaldo, por caminhar ao meu lado, todos os dias

À Cristina, por estar sempre presente

À minha avó Jacqueline, ao meu primo João e ao meu avô José IN MEMORIAM

Aos meus avós Alice e Américo

Aos meus primos, aos meus tios

Aos meus amigos

Aos meus alunos

Aos meus colegas do Instituto de Ciências da Saúde, UCP - Viseu

Agradecimentos

Uma tese é sempre um trabalho de equipa, embora continue a acreditar que um investigador estará sempre destinado a um trabalho pautado por alguma solidão. A elaboração desta tese não teria sido possível sem o trabalho conjunto de bastantes pessoas, que me acompanharam desde o primeiro minuto do primeiro dia. A todas elas o meu sincero obrigada, por terem partilhado comigo estes momentos e tornado mais simples aquilo que ao início me parecia uma tarefa tão difícil...

Ao Senhor Professor Fernando Guerra quero agradecer o facto de me ter estendido a mão, provavelmente na altura em que mais precisei. Foi sempre incansável. Obrigada por ter sempre acreditado. Obrigada pela serenidade. Obrigada por todos os conselhos e toda a ajuda.

Ao Senhor Professor António Cabrita, agradeço pelo empenho que dedicou a este trabalho desde o primeiro minuto, e pela vontade incansável de ajudar. Sem o Senhor Professor esta tese não seria uma realidade. É, sem dúvida, uma pessoa que tem acompanhado de perto os momentos importantes da minha vida académica. Esteve presente nas cerimónias de obtenção do grau de licenciada em Medicina Dentária na UCP-Viseu e no grau de mestre em Patologia Experimental na FMUC-Coimbra. Obrigada por tudo. É uma referência. Obrigada pelos conselhos sábios nas alturas certas. Obrigada pela presença constante. Obrigada por ter sempre acreditado em mim, e no meu trabalho.

À Senhora Professora Manuela Grazina, obrigada por me ter ensinado tanto e, mais importante ainda, por se ter revelado uma amiga para todas as ocasiões. Confesso que não estava à espera, mas foi uma ótima surpresa. Obrigada pelo curso e pela rotação laboratorial, realizados no âmbito do Programa Doutoral, que me abriram os horizontes e me fizeram querer ir mais além. Obrigada por me incentivar a fazer melhor. Obrigada por me acompanhar, obrigada pelas críticas construtivas. Obrigada pela disponibilidade, pelo apoio, por realmente acreditar em mim. Não há obrigadas que cheguem.

Ao Senhor Professor Fontes Ribeiro, meu tutor neste desafio (e noutros anteriores) obrigada por estar sempre disponível para ajudar e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo destes anos de convivência.

À Senhora Professora Margarida Figueiredo e à Senhora Doutora Patrícia Coimbra obrigada pela paciência. A engenharia química não é, de facto, a minha área. Tinha realmente a perceção que não falamos a mesma linguagem. Obrigada pela paciência e perseverança. Obrigada por me terem ensinado a perceber as técnicas e os resultados. Este trabalho também é vosso.

Aos amigos do Serviço de Patologia Experimental: Mestre Rodrigo Farinha, Mestre José Cabeças, Eduardo, Rute, Gustavo, obrigada pela indispensável ajuda desde o delineamento do estudo até ao cuidado dos ratos. Obrigada por serem meus braços direitos e pelo vosso contributo. Obrigada pela amizade. Desculpem qualquer coisa.

À Mestre Maria João Santos do Laboratório de Bioquímica Genética, muito obrigada. Por me ensinares genética, pelas nossas conversas científicas, e não só. Obrigada por me teres sempre dado oportunidade de fazer e não só de ver. Obrigada pela confiança e pela paciência. Penso que fizemos a extração dos controlos pelo menos 10 vezes e tiveste sempre uma palavra de incentivo. Obrigada por responderes às minhas perguntas não-tão-inteligentes. Obrigada pela paciência, amiga.

Aos amigos do 1º Programa Doutoral em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (e das tertúlias gastronómicas) quero agradecer a vossa fantástica amizade. Sem vocês não era com certeza a pessoa que sou hoje. Cresci muito por ter tido o privilégio de partilhar convosco experiências e pensamentos. Estão no meu coração. Obrigada por me terem sempre acarinhado e demonstrado que juntos somos melhores. Obrigada Pizinho, és o maior (tu sabes disso, nunca te esqueças!). Siri, desde o 10º ano que me conheces, és uma fixe, adoro-te! Teresinha, embora andes um pouco ausente nestes últimos tempos, estás sempre no meu coração. Xuxu, obrigada pelo teu sorriso e pela tua palavra de apoio. Sempre acreditaste. Joaquim e Graciano, obrigada por me acompanharem. Quando caminhamos juntos, o percurso torna-se tão mais fácil...

Aos amigos da disciplina de Odontopediatria da Universidade Católica Portuguesa, Mestre Mariana Seabra e Professor Doutor Pedro Braga, obrigada por me ensinarem tanto sobre controlo do comportamento e Odontopediatria no geral. Trabalhar convosco é uma honra e um prazer. Obrigada por acreditarem. Obrigada Dra. Mariana pelo incentivo! Foram muito importantes os seus empurrões. É com muito carinho que relembro sempre a vossa presença. Obrigada por estarem a meu lado.

Ao Senhor Professor Jorge Leitão, por ter acreditado em mim. Por me ter apoiado num momento difícil e por ter ficado contente quando as adversidades pareciam ser maiores. Obrigada por todos os ensinamentos. E obrigada por me ter feito descobrir a minha verdadeira paixão: a Odontopediatria. Revelou-se fundamental.

Ao Senhor Professor Rui Amaral Mendes, por me ter desafiado a ficar responsável pelas cadeiras de Odontopediatria da UCP-Viseu. Sempre encarei este desafio como um dos maiores que já enfrentei. Tenho-me esforçado ao máximo para não o desapontar. Espero que nunca se arrependa.

Aos amigos para a vida: Nélio, Siri, Luís, Marisa, Dr. Miguel, Professor Manuel Paulo, obrigada por me acompanharem todos os dias e não se cansarem de mim. Só concebo a vida com base na amizade. E realmente sempre acreditei que, quando acompanhados de perto por pessoas que nos querem bem, até o que nos parece à primeira vista impossível ganha contornos de realidade.

Ao Dr. Francisco Delille obrigada por acreditar em mim. Obrigada pelo voto de confiança e obrigada pela aposta.

À Dra. Catarina Simões pelas palavras de incentivo, que foram determinantes para o sucesso deste projeto. Obrigada por ter sempre um sorriso e uma palavra de conforto.

À Eliseba, às Andreias, às Sónias, à Diana, à Sandra, à Catarina, à Ana, à Cristina, à Mónica, à Marlene obrigada por terem sempre um sorriso à minha espera, mesmo quando o humor não era o melhor e a ansiedade estava estampada no rosto.

Uma palavra especial ao Raphael e à Sara, pelo imenso carinho, pela amizade, pelo incentivo constante e pelo facto de depositarem sempre em mim uma confiança que às vezes me faltou.

À Celeste e ao Dr. Sobral, um obrigada especial. Obrigada por me terem sempre dado todas as condições que precisei. Obrigada por me estenderem a mão e pelas palavras carinhosas.

Ao Mestre Osvaldo Silva, obrigada por teres escolhido partilhar a tua vida comigo. É um prazer. Obrigada por fazeres de mim uma pessoa melhor. Obrigada por nunca te cansares e não desistires. Obrigada por dares sempre a opinião sensata. É muito bom quando encontramos alguém que nos complementa, dessa forma que só tu foste capaz. Bem sabes que esta tese é de ambos, por toda a ajuda que sempre deste e por acreditares tanto em mim, às vezes mais do que eu própria.

Ao meu pai e à minha mãe, obrigada por serem os meus exemplos de vida. Por me ensinarem os valores necessários para uma vida feliz e uma família unida. Obrigada por terem sempre optado pela escolha certa. Obrigada por me darem a mão quando pensava não conseguir continuar a caminhar sozinha. Obrigada pela preocupação que sempre demonstraram pelo progresso deste trabalho e pelas perguntas necessárias para que nunca parasse. Obrigada por sempre me incentivarem a fazer mais e melhor. Espero nunca vos desiludir. Esta tese é nossa.

À minha irmã, obrigada pela partilha. Continuamos juntas, assim como sempre estivemos. Espero que a tua dissertação te dê tanto prazer a elaborar como esta me deu a mim. Obrigada por estares sempre perto. E obrigada também pelo feijão.

Divulgação dos resultados

A) Publicações sob a forma de artigo científico

1. Inflammatory reaction post implantation of bone graft materials

Andreia Figueiredo, Osvaldo Silva, Silvério Cabrita

Experimental Pathology and Health Sciences 2012; 6 (1): 11-16

2. Reação inflamatória pós implantação de biomateriais: xenógeno é igual a sintético? [abstract]

Figueiredo, Andreia; Silva, Osvaldo; Farinha, Rodrigo; Cabrita, António; Guerra, Fernando.

Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac. 2012; 53 (Esp. Congresso):0.e1-e1

3. Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material use in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response

Figueiredo A, Coimbra P, Cabrita A, Guerra F, Figueiredo M.

Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013; 33 (6): 3506-13 doi: 10.1016/j.msec.2013.04047

4. Comparison of an alloplastic and a xenogeneic bone graft materials [abstract]

Andreia Figueiredo, Patrícia Coimbra, António Cabrita, Fernando Guerra, Margarida Figueiredo

International Dental Journal 2013; 63 (Supl. 1): 276

B) Apresentações em reuniões científicas sob a forma de comunicação oral

1. “Novas interfaces na pesquisa em Patologia” – Regeneração óssea

A. Figueiredo

I Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Recife (Brasil), 10-12 de Novembro de 2011

Recife (Brasil), 12 de Novembro de 2011.

2. “Regenerative materials and Implantology”

F. Guerra

Osstem Meeting 2012

Lisboa, 22-23 Setembro de 2012.

3. Symposio: *Cavitatis et Salutem*: “Modelos de regeneração óssea para Medicina Dentária”

A. Figueiredo

II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Coimbra, 10-12 de Dezembro de 2012

Coimbra, 10 de Dezembro de 2012.

C) Apresentações em reuniões científicas sob a forma de poster

1. Morphostructural properties of two bone substitutes: differences between a xenograft and a synthetic material

Figueiredo A.¹, Figueiredo M.², Coimbra P.², Cabrita A.¹, Guerra F.³

¹ – Serviço de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

² – Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Portugal

³ – Departamento de Medicina Dentária, Universidade de Coimbra, Portugal

I Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Recife (Brasil), 10-12 de Novembro de 2011.

2. Reação inflamatória pós implantação de biomateriais: xenógeno é igual a sintético?

Figueiredo A.^{1,3}, Silva O., Marques R.¹, Cabrita A.¹, Guerra F.²

¹ – Serviço de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

² – Departamento de Medicina Dentária, Universidade de Coimbra, Portugal

³ – Universidade Católica Portuguesa, Viseu, Portugal

XXXII Congresso Anual SPEMD 2012, Lisboa, 12 e 13 de Outubro de 2012

3. Inflammatory reaction evaluation after intramuscular implantation of biomaterials for bone regeneration – connection with the material's physico-chemical characteristics

Figueiredo, A.^{1,3,4}; Figueiredo, C.⁴, Silva, O., Silva, L.¹, Coimbra, P.², Figueiredo, M.², Guerra F.³, Cabrita A.¹

¹ - Experimental Pathology Service, University of Coimbra, Portugal

² - Chemical Engineering Department, University of Coimbra, Portugal

³ - Dentistry Department, University of Coimbra, Portugal

⁴ - Portuguese Catholic University, Viseu, Portugal

II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Coimbra, 10-12 Dezembro 2012

4. Inflammatory reaction molecular characterization after intramuscular implantation of biomaterials for bone regeneration – cytokines transcript expression analysis

Figueiredo A.^{1,4}, Santos M. J.², Cabrita A.¹, Grazina M.^{2,3}

¹ - Experimental Pathology Service, University of Coimbra, Portugal

² - CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Portugal

³ - Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁴ - Portuguese Catholic University, Viseu, Portugal

II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Coimbra, 10-12 Dezembro 2012

5. Comparison of an alloplastic and a xenogeneic bone graft materials

Figueiredo, A.^{1,3,4}; Coimbra, P.², Cabrita A.¹, Guerra F.³, Figueiredo, M.²

¹ - Experimental Pathology Service, University of Coimbra, Portugal

² - Chemical Engineering Department, University of Coimbra, Portugal

³ - Dentistry Department, University of Coimbra, Portugal

⁴ - Portuguese Catholic University, Viseu, Portugal

FDI Congress, Istanbul (Turquia), 28-31 Agosto 2013

6. Biomateriais de substituição óssea: expressão génica de mediadores inflamatórios

Figueiredo A.^{1,4,5}, Santos M. J.², Guerra F.⁴, Cabrita A.¹, Grazina M.^{2,3}

¹ - Experimental Pathology Service, University of Coimbra, Portugal

² - CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Portugal

³ - Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁴ - Dentistry Department, University of Coimbra, Portugal

⁵ - Portuguese Catholic University, Viseu, Portugal

XXXIII Congresso Anual SPEMD 2013, Porto, 11 e 12 de Outubro de 2013

7. Gene expression evaluation of IL1- β after muscular implantation of a synthetic biomaterial: an experimental study

Figueiredo, A.^{1,3,5}; Santos, M.J.²; Guerra, A.³; Cabrita, A.¹, Grazina, M.^{2,4}

¹ - Experimental Pathology Service, University of Coimbra, Portugal

² - CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Portugal

³ - Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁴ - Dentistry Department, University of Coimbra, Portugal

⁵ - Portuguese Catholic University, Viseu, Portugal

III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Tiradentes (Brasil), 23-25 de Outubro de 2013

8. Implantação de um biomaterial xenógeno: avaliação da expressão genética de mediadores inflamatórios

Figueiredo A.^{1,4,5}, Santos M. J.², Guerra F.⁴, Cabrita A.¹, Grazina M.^{2,3}

¹ - Experimental Pathology Service, University of Coimbra, Portugal

² - CNC - Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Portugal

³ - Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

⁴ - Dentistry Department, University of Coimbra, Portugal

⁵ - Portuguese Catholic University, Viseu, Portugal

XXII Congresso Anual da Ordem dos Médicos Dentistas, Lisboa, 21-23 Novembro 2013

Resumo

A inflamação, ou processo inflamatório, é uma reação do organismo a uma infecção/corpo estranho, ou lesão dos tecidos. Em caso de doentes com defeitos ósseos importantes resultantes de doença ou traumatismo, nos quais pretendemos prevenir problemas funcionais e estéticos, aliados à ausência de osso no complexo maxilo-facial, usam-se materiais de substituição óssea. Assim como acontece com a generalidade dos biomateriais, sabe-se que há uma panóplia de acontecimentos que ocorrem em consequência da implantação dos materiais de enxerto num organismo vivo. De entre estes acontecimentos, destaca-se a inflamação aguda e a inflamação crónica.

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a reação inflamatória pós implantação muscular de dois materiais de substituição óssea: um xeno-enxerto de origem porcina (nome comercial Osteobiol Gen-Os®) e uma hidroxiapatite sintética (nome comercial Bonelike®), usados normalmente na clínica dentária. Efetuou-se uma avaliação histológica e de expressão genética, esta relativa ao número de transcritos de cinco genes alvo distintos, importantes no processo inflamatório (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *CCL2* e *CCL3*). Previamente ao estudo *in vivo* da reação inflamatória, caracterizaram-se os materiais em termos de propriedades físico-químicas, uma vez que se sabe que essas propriedades influenciam de forma muito relevante a reação do sistema imunitário.

Os biomateriais referidos foram caracterizados sob diversos pontos de vista: morfologia e distribuição do tamanho de partículas, área de superfície específica, de porosidade e tamanho de poros e densidade. A composição química e estrutura dos materiais foram estudadas por espectroscopia de infravermelhos (FTIR) e difração de raios X (XRD). Os materiais foram implantados nos músculos lombares de ratos Wistar e a resposta inflamatória foi avaliada através de análise histológica, uma semana (8 dias) após a implantação. Quanto à avaliação da expressão genética sistémica, procedeu-se à colheita de sangue no início da experiência e no momento da necropsia para todos os ratos, com o objetivo de avaliar alguns mediadores envolvidos na resposta inflamatória, neste caso específico os cinco genes alvo já referidos. A

avaliação da expressão genética local foi realizada a partir do processamento de fragmentos musculares implantados com ambos os materiais separadamente.

Os resultados mostraram que os dois enxertos são muito diferentes em praticamente todas as propriedades avaliadas. Enquanto o material xenógeno apresenta uma estrutura e uma composição similar à do osso natural, o material sintético é constituído por uma fase cristalina principal de hidroxiapatite e duas fases secundárias de fosfato tricálcio α - e β -. Os grânulos do material xenógeno, além de serem maiores, são irregulares e apresentam extremidades afiadas, enquanto os do material sintético são aproximadamente cilíndricos, com contornos arredondados e mais uniformes em tamanho. A resposta *in vivo* foi avaliada a partir dos infiltrados inflamatórios produzidos pelos materiais e revelou que, apesar de ambos os materiais não causarem inflamação grave, os grânulos do material sintético provocam uma reação inflamatória consistentemente mais intensa do que a desencadeada pelos grânulos do material xenógeno, particularmente no que diz respeito à produção de colagénio e formação de cápsula fibrosa.

Relativamente à expressão genética, verificámos que os níveis de *CCL2* e *IL-1 β* se encontravam significativamente aumentados no sangue dos ratos implantados com o material sintético e com o material xenógeno, respetivamente. Os resultados para os níveis de transcritos de *CCL3*, *IL-6* e *TNF- α* não mostraram diferenças estatisticamente significativas na análise sistémica.

Na análise local, apresentam-se apenas resultados preliminares, mas os dados obtidos sugerem que o desempenho de ambos os materiais é semelhante, havendo maior produção de transcritos do que a nível sistémico, facto este que já era esperado.

Os nossos resultados sugerem que os materiais de enxerto ósseo desencadeiam uma resposta sistémica por parte do hospedeiro, facto que é comprovado pelo aumento de mediadores inflamatórios no sangue periférico. O material sintético despoletou a formação de níveis significativamente mais elevados da expressão de *CCL2*, a quimiocina que ativa os macrófagos e que provoca uma polarização do sistema imunitário para Th2. O material xenógeno despoletou a formação de níveis mais elevados de expressão de *IL-1 β* , citocina que é responsável pela ativação dos linfócitos.

Desta forma parece haver uma resposta imunitária distinta para os dois biomateriais, em que cada um deles desencadeia a ativação de células com funções diferentes na resposta inflamatória. O material xenógeno, aos 8 dias, parece estar ainda numa fase inflamatória mais precoce do que acontece com o material sintético, durante o mesmo período temporal.

Apesar de ter algumas limitações, este estudo é original e inovador e representa uma contribuição científica relevante na Medicina Dentária. Estudos como este podem trazer alguma luz para a compreensão da complexidade biológica e comportamento clínico dos substitutos ósseos.

Palavras-chave:

Material sintético, Material xenógeno, Caracterização físico-química, Resposta inflamatória, Expressão genética

Abstract

Inflammation is a physiological reaction to an infection or tissue injury, that also occurs when biomaterials are implanted in a living host. In patients with significant bone loss resulting from trauma or disease, in which we want to recover function and aesthetics, biomaterials are often used as bone graft materials. As already mentioned, its implantation triggers a series of biological events. Among these events are included acute and chronic inflammations, whose effects are important to us in order to understand better the impact they have in the host, depending on the material's origin.

The aim of this work was to study the inflammatory reaction originated after intramuscular implantation of two bone graft materials: a xenograft of porcine origin (commercial name Osteobiol™ Gen-Os) and a hydroxyapatite based synthetic material (commercial name Bonelike™) commonly used in the daily clinic by histological evaluation and gene expression analysis based in the transcripts number of five distinct target genes, crucial to the inflammatory process (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *CCL3* and *CCL2*). Prior to the *in vivo* study, both biomaterials were characterized in terms of physicochemical properties, as it is generally known that these properties influence the way the immune system reacts and therefore the inflammatory reaction.

The xenogenous and the synthetic biomaterials were characterized in terms of morphology, particle size distribution, specific surface area, porosity and pore size and density. The chemical composition and structure of the materials were accessed by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and X-ray Diffraction (XRD).

The graft materials were then implanted in the lumbar muscles of Wistar rats and the inflammatory response was evaluated through histological analysis, after one week of implantation.

For systemic gene expression analysis, blood was collected from the rat's tail vein at the beginning of the experiment and at the moment of sacrifice of all rats, with the aim of quantifying some inflammatory mediators namely the five target genes already

mentioned above. The local gene expression analysis was performed by processing lumbar muscle fragments implanted with both materials.

The results showed that both grafts have quite different characteristics in almost all the evaluated properties. While the xenogenous material exhibits a structure and composition similar to the natural bone, the synthetic one is constituted by a main crystalline phase of hydroxyapatite and two secondary phases of α - and β -tricalcium phosphate. The xenogenous material granules, besides being larger, are irregular, and exhibit sharp-edged tips, while those of the synthetic material are approximately cylindrical, with round contours, and more uniform in size.

The *in vivo* response evaluated from the inflammatory infiltrates revealed that although both implants did not cause severe inflammation, the synthetic granules elicit a consistently more intense inflammatory reaction than that triggered by the granules of the xenogenous material, particularly in terms of collagen production and formation of fibrous capsule.

We concluded that *CCL2* and *IL-1 β* were significantly elevated in blood of mice implanted with the synthetic material and the xenogenous one, respectively. The transcript levels of *CCL3*, *IL-6* and *TNF- α* did not show statistically significant differences in the systemic evaluation performed.

In the local analysis we concluded that both biomaterials behave similarly, with production of higher levels of transcripts when compared to the systemic analysis through blood assessment, fact that was already expected.

Our results suggest that bone graft materials trigger a systemic response from the host, fact that is proven by the increase of inflammatory mediators in the blood. The synthetic bone graft showed a Th2 polarization, triggering significantly higher levels of *CCL2* expression, the chemokine that activates macrophages. The xenogenous bone graft triggered higher levels of *IL-1 β* , the cytokine that is responsible for lymphocyte activation.

Taken together, the *in vivo* data demonstrate that the inflammatory response appears to be different for the two biomaterials evaluated, with each one triggering the activation of different cell types. The xenogenous material, for an implantation time of 8 days, seems to be in an earlier phase of the inflammatory reaction when compared to the synthetic material, during the same time period.

Despite some limitations, this study is unique and innovative and represents a significant scientific contribution in dentistry. Studies like this can bring some light to the understanding of complex biological and clinical behavior of bone graft materials.

Keywords:

Synthetic bone graft, Xenogenous bone graft, Physico-chemical properties, Inflammatory reaction, Gene expression

Índice

Divulgação dos resultados.....	1	
Resumo.....	9	
Abstract	13	
Índice	17	
Introdução e Motivação	19	
Capítulo 1	Revisão da literatura.....	25
1. Inflamação.....	27	
1.1. Resposta inflamatória aguda.....	29	
1.1.1. Resposta localizada	31	
1.1.2. Resposta sistémica	33	
1.2. Resposta inflamatória crónica.....	40	
1.3. Modelos animais de inflamação	44	
2. Materiais de substituição óssea	46	
2.1. Osso autólogo.....	50	
2.2. Osso alógeno	52	
2.3. Osso xenógeno	54	
2.4. Materiais aloplásticos.....	56	
2.5. Combinação de materiais.....	59	
3. Características dos biomateriais e inflamação.....	59	
4. Expressão genética.....	63	
Capítulo 2	Definição e Justificação dos Objetivos.....	67
Capítulo 3	Material e Métodos	73
1. Materiais utilizados	75	
2. Caracterização físico-química.....	76	
3. Avaliação <i>in vivo</i>	78	
3.1. Amostra	78	
3.2. Procedimento experimental	79	
3.3. Processamento e Isolamento de RNA total das amostras	82	
3.3.1. Tratamento do material	82	
3.3.2. Processamento das amostras de músculo	82	
3.3.3. Processamento das amostras de sangue	83	
3.4. Análise da pureza, integridade e quantificação de RNA	84	

3.4.1. Análise da pureza e quantificação de RNA por espectrofotometria.....	84
3.4.2. Avaliação de integridade de RNA através da determinação do RIN.....	84
3.5. RT-PCR.....	86
3.6. Normalização.....	86
3.7. PCR em tempo real.....	87
3.8. Análise estatística.....	89
Capítulo 4	Resultados 91
1. Caracterização físico-química.....	93
2. Avaliação da resposta <i>in vivo</i>	101
3. Estudo da expressão genética.....	107
3.1. Ensaio de normalização.....	107
3.1.1. Das amostras de sangue periférico.....	107
3.1.2. Das amostras de tecido muscular.....	110
3.2. Análise de transcritos.....	112
3.2.1. Nas amostras de sangue periférico.....	112
3.2.2. Nas amostras de tecido muscular.....	120
3.3. Relação entre a resposta localizada e a resposta sistémica.....	127
Capítulo 5	Discussão dos Resultados 131
1. Escolha do modelo.....	133
2. Escolha dos materiais.....	134
3. Características físico-químicas.....	136
4. Morfologia.....	137
5. Tamanho das partículas.....	139
6. Porosidade.....	141
7. Composição química.....	142
8. Hidrofilicidade/Hidrofobicidade.....	142
9. Resposta biológica a um material de substituição óssea.....	143
10. Inflamação – avaliação histológica.....	144
11. Expressão genética.....	147
12. Análise sistémica (das amostras de sangue periférico).....	148
13. Análise local (das amostras de tecido muscular).....	151
Capítulo 6	Conclusões..... 155
Capítulo 7	Referências Bibliográficas..... 163

Introdução e Motivação

A regeneração óssea é um processo fisiológico complexo e bem orquestrado de formação de novo osso, e apresenta-se como um fator preponderante na remodelação óssea contínua que acontece ao longo da vida de um indivíduo. No entanto, existem algumas condições clínicas complexas em que é necessário e desejável regenerar grandes quantidades de tecido ósseo perdido, como no caso da reconstrução de grandes defeitos ósseos causados por trauma, infecção, ressecção de tumores ou devido a anomalias esqueléticas (1).

Atualmente existem várias alternativas terapêuticas para as reconstruções ósseas que recorrem a várias técnicas cirúrgicas e a materiais de enxerto ou substituintes ósseos. O osso autólogo continua a ser geralmente considerado como o *gold standard*, mas também existem outras alternativas, como a utilização de outros tipos de enxertos ósseos (alógeno, xenógeno ou sintético), a utilização de fatores de crescimento ou a terapia genética. Todos estes procedimentos têm como objetivo otimizar os métodos reconstrutivos e possibilitar uma regeneração de tecido ósseo com propriedades semelhantes ao osso fisiológico, tentando acelerar o mais possível o processo de cicatrização.

Os procedimentos de enxerto ósseo são intervenções comumente realizadas, estimando-se que mais de 500 mil intervenções sejam realizadas anualmente nos Estados Unidos da América (2, 3). Estes procedimentos destinam-se a recuperar defeitos ósseos em áreas tão diferentes como a Ortopedia, a Neurocirurgia e a Medicina Dentária. Na área da Medicina Dentária e na Cirurgia Maxilo-Facial estes enxertos são utilizados não só para reconstrução de estruturas diretamente afetadas, mas também para melhorar a componente estética da face. Recriar o tecido ósseo já efetivamente perdido ou reabsorvido é uma das preocupações dos Médicos Dentistas, sendo para isso necessária a aplicação de um biomaterial, de forma a que esses intentos sejam satisfeitos. De facto, o recurso aos materiais de substituição óssea são uma das formas mais difundidas de terapia regenerativa.

Atualmente, a seleção do material a utilizar numa determinada intervenção baseia-se em diversos fatores, tais como: as características do próprio material, o tipo de defeito

ósseo a corrigir, as preferências do operador, os custos associados e a aceitação por parte do doente.

Todas as classes de biomateriais de enxerto ósseo: alógenos, xenógenos e aloplásticos encerram desvantagens, que se prendem com a reação do hospedeiro (respostas imunitárias), com a quantidade disponível, com as propriedades após os processos de fabrico, com a rapidez de reabsorção, entre outros. Até ao presente ainda não foi desenvolvido nenhum material que reúna todas as qualidades ideais de um material de enxerto ósseo e que se enumeram: biocompatível, osteogénico, osteoindutivo, osteocondutor, boa reabsorção, fácil manipulação, fácil esterilização, mau substrato para microorganismos, não cancerígeno, não antigénico, com boas propriedades mecânicas, fácil de reproduzir, hidrofílico, radiopaco, que seja transportador de moléculas ativas e que tenha um custo acessível.

Tal como acontece aquando da implantação de outros dispositivos médicos, desencadeiam-se no hospedeiro uma variedade de eventos biológicos que envolvem obrigatoriamente a inflamação. As variações na intensidade e duração temporal deste fenómeno inflamatório dependem não só do material implantado: do seu tamanho, forma e propriedades físicas e químicas; como também do tecido ou órgão específico no qual se executa essa implantação.

No caso particular das aplicações em Medicina Dentária, existem alguns estudos publicados que pretendem relacionar a taxa de sobrevivência de implantes dentários colocados em osso aumentado com substituintes ósseos quando comparados com osso autólogo sem nenhum procedimento de aumento. Jensen e Terheyden (4) admitem haver um nível de evidência alto (nível A ou B) atestando que as taxas de sobrevivência de implantes colocados em osso aumentado são comparáveis às taxas de implantes colocados em osso pristino.

Estando disponível uma grande variedade de materiais para utilização prática, com as mesmas indicações clínicas e com resultados equivalentes, este trabalho pretende contribuir para o conhecimento disponível acerca da ligação existente entre o fenómeno inflamatório decorrente da implantação de biomateriais e a sua relação na

expressão de mediadores inflamatórios, sob um ponto de vista sistémico (avaliação do sangue periférico) e local (avaliação dos músculos implantados).

Capítulo 1

Revisão da literatura

1. Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica a um conjunto de estímulos, como o são por exemplo, a infeção e a lesão tecidual.

No procedimento de implantação de um biomaterial num organismo vivo, há uma sequência clássica de eventos que ocorrem, descritos num artigo por Anderson (5) e resumidos na Tabela 1. Estes eventos serão sempre despoletados, isto é, haverá sempre um certo grau de lesão tecidual aquando da sua colocação *in vivo*, resultado do procedimento de implantação *per se*.

Tabela 1 – Sequência de reacções do hospedeiro após implantação de dispositivos médicos. Adaptado de (5).

Dano tecidual
Interacções sangue-material
Formação de matriz provisória
Inflamação aguda
Inflamação crónica
Tecido de granulação
Reacção de corpo estranho
Fibrose/Cápsula fibrótica

Um outro autor, David Williams (6), descreve de forma mais pormenorizada as características *major* de uma resposta genérica aos biomateriais, definindo mais entidades do que tinha descrito Anderson. Ele menciona fenómenos de adsorção proteica, efeitos citotóxicos generalizados, ativação dos neutrófilos, ativação dos macrófagos, produção de células gigantes de corpo estranho, formação de tecido de granulação, fibrose, alterações microvasculares, respostas celulares específicas do tecido implantado, ativação da cascata de coagulação, adesão, ativação e agregação de plaquetas, ativação do sistema complemento, produção de anticorpos, respostas

imunes, hipersensibilidade aguda, hipersensibilidade tardia, respostas mutagênicas e formação tumoral. Ficamos com a certeza que a implantação de qualquer tipo de biomaterial provoca uma série de respostas, complexas, que podem justificar, em maior ou menor grau, o sucesso ou fracasso a nível clínico do procedimento.

As proteínas adsorvem à superfície do material quase imediatamente após a sua implantação. Os neutrófilos são depois atraídos, seguidos pelos macrófagos (5, 7).

Nas fases iniciais da resposta inflamatória, o tipo celular predominante é o neutrófilo. Os neutrófilos são produzidos na medula óssea, e circulam no sangue. Em resposta aos mediadores da inflamação aguda, as células endoteliais aumentam a expressão das E e P-seletinas. A trombina e a histamina induzem o aumento de expressão das P-seletinas; citocinas como a IL-1 e o TNF- α induzem a expressão das E-seletinas. Os neutrófilos circulantes expressam mucinas como as PSGL-1, que se ligam às E e P-seletinas, como fica demonstrado na Figura 1 (8). Desta forma, os neutrófilos fazem a passagem da corrente sanguínea para os tecidos.

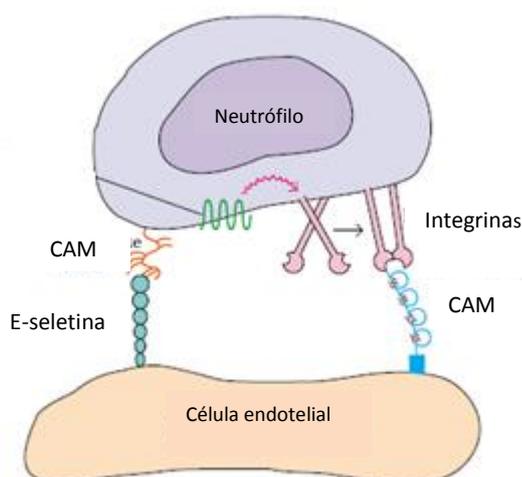


Figura 1 - Neutrófilo ligado a uma célula endotelial. A célula endotelial expressa a E-seletina, responsável pela adesão inicial dos leucócitos ao endotélio. As mucinas apresentam ligandos para as seletinas (CAM). Imagem adaptada de (8).

Há evidência de que uma ferida cirúrgica é motivo suficiente para atrair os neutrófilos. Contudo, os macrófagos não são atraídos se não ocorrer efetivamente a implantação

de um biomaterial (7). Desta forma, centra-se a atenção no papel preponderante que desempenham os macrófagos, sendo as células que iniciam todo o processo de resposta à implantação de um biomaterial.

1.1. Resposta inflamatória aguda

A resposta inicial do organismo a uma infeção ou trauma é denominada de resposta inflamatória aguda. Esta resposta não é específica e é a primeira linha de defesa do organismo, que providencia uma proteção inicial para restringir a lesão tecidual ao local da infeção ou da agressão. Esta resposta consiste numa ação coordenada, do foro local e sistémico, de mediadores imunes, endócrinos e neurológicos (9).

Regra geral, uma resposta inflamatória aguda tem um início rápido e dura pouco tempo. A inflamação aguda é geralmente acompanhada por uma reação sistémica conhecida como resposta de fase aguda, que é caracterizada por uma rápida alteração dos níveis de várias proteínas plasmáticas.

A Figura 2 ilustra a cinética celular da inflamação aguda (10). Numa fase inicial, as aminas vasoativas (histamina, bradiquinina) promovem a formação de exsudado e edema, que é seguido pela expressão de citocinas e quimiocinas que ativam o endotélio e medeiam a migração leucocitária (neutrófilos). Na fase de resolução, os mediadores anti-inflamatórios param a migração celular e promovem a apoptose. A fagocitose destas células apoptóticas pelas células mononucleares promove maior libertação de mediadores anti-inflamatórios, o que vai erradicar a inflamação. O processo inflamatório agudo fisiológico deve estar completamente resolvido às 72 horas.

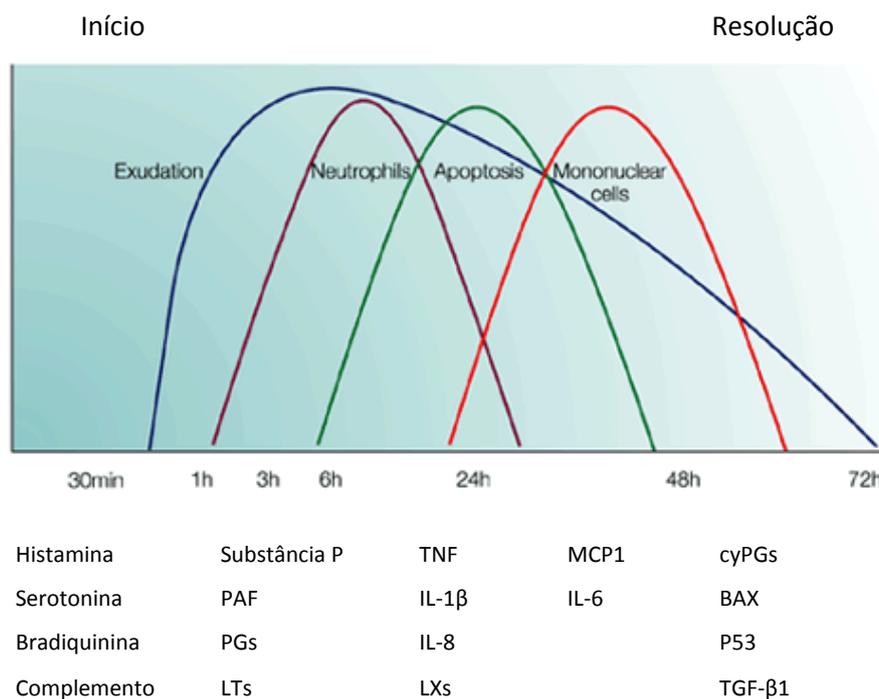


Figura 2 – Cinética celular da inflamação e liberação sequencial de vários mediadores, baseada em estudos de modelos animais de inflamação aguda. Ilustração adaptada de (10). PAF – Fator ativador das plaquetas; PGs – Prostaglandinas; LTs – Leucotrienos; TNF – Fator de necrose tumoral; LXs – Lipoxinas; cyPGs – Prostaglandinas ciclopentanonas; BAX – Proteína associada X; TGF- β 1 – Fator de crescimento transformante.

Numa situação de resposta saudável, após a ativação da resposta inflamatória, inicia-se o processo de reparação e ocorre uma resolução favorável da situação. Contudo, a inflamação pode originar dano a células saudáveis, que vão elas próprias estimular a continuação do processo inflamatório.

Os mediadores envolvidos são, como já foi referido, de origens distintas e com funções diferentes. A Tabela 2 pretende fazer um resumo das várias classes de mediadores envolvidos, distinguindo aqueles que têm uma ação pró-inflamatória, daqueles que são considerados anti-inflamatórios. É de realçar que as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e

as quimiocinas CCL2 e CCL3 são consideradas como mediadores pró-inflamatórios da resposta inflamatória aguda.

Tabela 2 – Mediadores que regulam a resposta inflamatória aguda, adaptado de (10).

Classe	Pró-inflamatórios	Anti-inflamatórios
Aminas	Histamina, bradiquinina	Adrenalina, Noradrenalina
Sistema complemento	C3a, C5a	Receptor C1q
Nucleótidos	GMP cíclico	AMP cíclico
Moléculas de adesão	E-selectinas, P-selectinas, ICAM1, VCAM1	Receptor TSP, receptor PS
Citocinas	TNF- α , IL-1 β , IL-6	TGF- β 1, IL-10
Quimiocinas	MIP1 α (CCL3), MCP1 (CCL2)	-
Hormonas esteróides	-	Glucocorticóides

A resposta inflamatória aguda abrange, como já foi referido, uma resposta localizada e uma resposta sistémica.

1.1.1. Resposta localizada

Os sinais clássicos de uma resposta inflamatória aguda localizada são tumor, rubor, dor e calor (sinais de Celsius) e perda de função (sinal acrescentado por Virchow).

Passados poucos minutos após a lesão tecidual há um aumento no diâmetro vascular (vasodilatação), resultando num aumento de volume e numa redução do fluxo sanguíneo no local. O volume sanguíneo aumentado aquece o tecido e causa a sua cor vermelha. A permeabilidade vascular também aumenta, levando à passagem de fluido dos vasos sanguíneos para o tecido. Este facto leva à acumulação de fluido (edema) no tecido. Quando o fluido exsuda da corrente sanguínea, a quinina, o coágulo e o sistema fibrinolítico são ativados. Muitas das alterações vasculares que ocorrem numa

resposta local são devidas aos efeitos directos de mediadores como a bradiquinina e fibrinopeptídeos, que induzem vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular. Algumas das alterações vasculares são devidas a efeitos indirectos das anafilotoxinas do sistema complemento (C3a, C4a e C5a) que induzem desgranulação dos mastócitos com libertação de histamina (11).

Passadas poucas horas depois do início destas alterações vasculares, os neutrófilos aderem às células endoteliais e migram do sangue para os espaços tecidulares, como já foi referido.

Estes neutrófilos fagocitam os patógenos invasores e libertam mediadores que contribuem para a resposta inflamatória. De entre estes mediadores estão as proteínas macrofágicas inflamatórias MIP-1 α ou CCL3, quimiocinas que atraem macrófagos para o local da inflamação. Os macrófagos chegam cinco a seis horas após a resposta inflamatória ter início.

Estes macrófagos são células ativadas que exibem fagocitose aumentada e aumento da libertação de mediadores e citocinas que contribuem para a resposta inflamatória. Os macrófagos tecidulares ativados segregam três citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) que induzem muitas das alterações localizadas e sistémicas observadas na resposta inflamatória aguda.

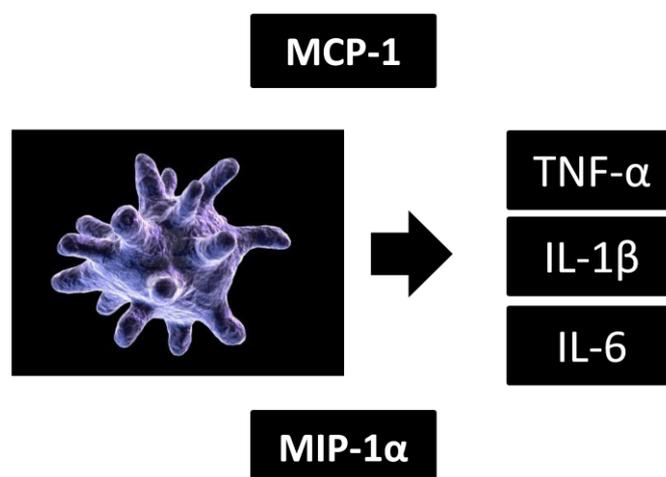


Figura 3 – Citocinas libertadas pelos macrófagos ativados.

Estas três citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) agem localmente, induzindo a coagulação e originando um aumento da permeabilidade vascular.

Tanto o TNF- α como a IL-1 β induzem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais. Por exemplo, o TNF- α estimula a expressão de E-seletina, uma molécula de adesão endotelial que liga selectivamente moléculas de adesão dos neutrófilos. A IL-1 β induz o aumento de expressão de ICAM-1 e VCAM-1, que se ligam a integrinas dos linfócitos e monócitos. Os neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes reconhecem estas moléculas de adesão nas paredes dos vasos sanguíneos, aderem, e em seguida, passam a parede do vaso para dentro dos espaços tecidulares. A IL-1 β e o TNF- α também actuam em macrófagos e células endoteliais, para induzir a produção das quimiocinas que contribuem para o influxo de neutrófilos, aumentando a sua adesão às células endoteliais e agindo como factores quimiotáticos potentes.

As citocinas libertadas no local da inflamação facilitam a adesão das células inflamatórias à parede vascular e a migração para o espaço tecidular. A duração e intensidade da resposta inflamatória local deve ser regulada para evitar dano tecidular e facilitar os mecanismos de reparação que levarão à cicatrização (12). De facto, o processo de adesão leucocitária é fulcral para a resposta inflamatória.

1.1.2. Resposta sistémica

A resposta inflamatória local é acompanhada por uma resposta sistémica – a resposta de fase aguda. Esta resposta é caracterizada pela indução de febre, aumento da produção de leucócitos e produção de um grande número de proteínas de fase aguda pelo fígado (por exemplo a proteína C reativa, que liga vários patógenos e ativa o sistema complemento). Muitos dos efeitos sistémicos são devidos à ação combinada das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6.

O TNF- α também actua nas células endoteliais e nos macrófagos para induzir a secreção de factores estimulantes de colónias (M-CSF, G-CSF e GM-CSF), que vão estimular a hematopoiese e por consequência, o aumento da produção de leucócitos. Há uma redundância na ação destas três citocinas (patente na Tabela 3) para induzir a produção de proteínas de fase aguda ao nível hepático.

Tabela 3 - Efeitos redundantes e pleiotrópicos da IL-1 β , TNF- α e IL-6, adaptado de (8).

Efeito	IL-1β	TNF-α	IL-6
Febre	+	+	+
Síntese de proteínas de fase aguda	+	+	+
Aumento da permeabilidade vascular	+	+	+
Aumento das moléculas de adesão no endotélio vascular	+	+	-
Proliferação fibroblástica	+	+	-
Produção de plaquetas	+	-	+
Indução de quimiocinas	+	+	-
Indução de IL-6	+	+	-
Ativação de células T	+	+	+
Ativação de células B	+	+	+
Aumento da síntese de imunoglobulinas	-	-	+

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e as quimiocinas MCP-1 e MIP1- α (13) são, provavelmente, as entidades mais importantes no mecanismo despoletador do fenómeno inflamatório pós implantação de biomateriais, cuja origem celular e efeitos principais estão explanados nas Tabela 4 Tabela 5.

IL-1 β e TNF- α

O fator de necrose tumoral é uma citocina envolvida na inflamação sistémica, que estimula a reação de fase aguda. É maioritariamente produzida por macrófagos ativado (M1) na sua versão α , sendo o TNF- β produzido por linfócitos T (14).

É um mediador chave na reação inflamatória aguda e crónica, não só por aumentar a sua própria secreção, mas também por estimular a produção de outras citocinas e quimiocinas inflamatórias (14).

A IL-1 β , também conhecida por catabolina é, como já foi referido, também produzida por macrófagos. Ambas induzem a ativação de fibroblastos (Figura 4).

Estas duas citocinas são indicadores da estimulação do sistema imunitário que ajudam a estudar os níveis de ativação celular induzida por diferentes biomateriais. A ideia de que os biomateriais atuam como antígenos e estimulam reações por parte do hospedeiro, incluindo inflamação, expressão de anticorpos, ativação do sistema complemento e libertação de citocinas assim o permite (15). Uma vez que a biocompatibilidade é reduzida quando os biomateriais induzem aumentos mais significativos da expressão de citocinas, a indução da sua formação pode ser usada para avaliar a intensidade das reações imunes anti-biomaterial (16).

Vários artigos as estudam, em modelos animais, no sentido de caracterizar a resposta inflamatória induzida por diferentes biomateriais (15, 17).

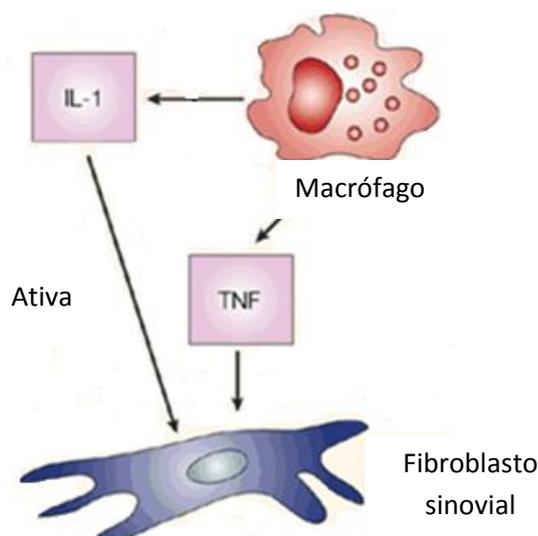


Figura 4 - Relação entre TNF e IL-1 em fenómenos de ativação simultânea de processos inflamatórios. Adaptado de (18).

IL-6

A IL-6 é uma proteína glicosilada com um peso molecular de 22-27 kDa, dependendo da sua origem (grupo celular) e da modificação pós-translacional que pode sofrer (19).

É uma citocina produzida por uma panóplia de tipos celulares (19), sendo os mais importantes os monócitos/macrófagos, as células T, os fibroblastos, as células endoteliais e as células musculares esqueléticas tendo, por este facto, a designação de “mioquina”. Hoje em dia considera-se o músculo como sendo um órgão endócrino, capaz de libertar mediadores químicos para a corrente sanguínea, gerando respostas noutros tecidos e órgãos (19-22).

Foi consistentemente demonstrado que o exercício físico aumenta as concentrações plasmáticas de IL-6 e que esta citocina é sintetizada e libertada apenas pelos músculos em contração e não pelos mesmos músculos relaxados (20, 22, 23).

Quer o TNF- α quer a IL-1 estimulam a produção de IL-6 que é classificada como sendo uma citocina pró e anti-inflamatória (19, 21).

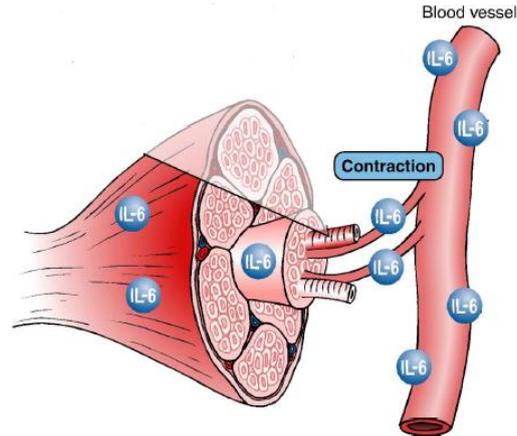


Figura 5 – As fibras do tipo I e II do músculo esquelético expressam e libertam mioquinas que por sua vez exercem efeito quer localmente no músculo (ação autócrina ou parácrina) quer a nível periférico noutros órgãos, após atingir a corrente sanguínea. Modificado de (20).

Como acção anti-inflamatória destaca-se o facto da IL-6 induzir a produção da proteína C reativa, que tem um papel importante na indução de citocinas anti-inflamatórias pelos monócitos circulantes e supressão da síntese de citocinas pro-inflamatórias pelos macrófagos tecidulares. Desta forma a IL-6 derivada do músculo pode ter efeitos supressores no sistema imunitário dirigido a fenómenos de inflamação (19, 20, 22).

CCL2 (MCP-1)

A quimiocina (família C-C ligando 2) CCL2, também denominada proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), é uma citocina pequena que recruta monócitos e macrófagos para locais onde decorrem eventos inflamatórios (24, 25).

Rhodes e colaboradores (26) demonstraram que o MCP-1 é um mecanismo através do qual os monócitos são atraídos ao local onde foi implantado um biomaterial. Também é sabido que as CCL2 estão presentes em células gigantes de corpo estranho após duas a quatro semanas de implantação do biomaterial sugerindo que podem influenciar as

atividades dos monócitos, macrófagos (são responsáveis pela sua fusão (27)) e células gigantes multinucleadas durante a reação de corpo estranho (28). Desta forma, acredita-se que a formação das células gigantes de corpo estranho não são essenciais para haver encapsulamento dos materiais implantados.

Hoenders e colaboradores (29) identificaram esta quimiocina como agente etiológico no processo inflamatório que leva, em último caso, à perda de próteses na área da Ortopedia.

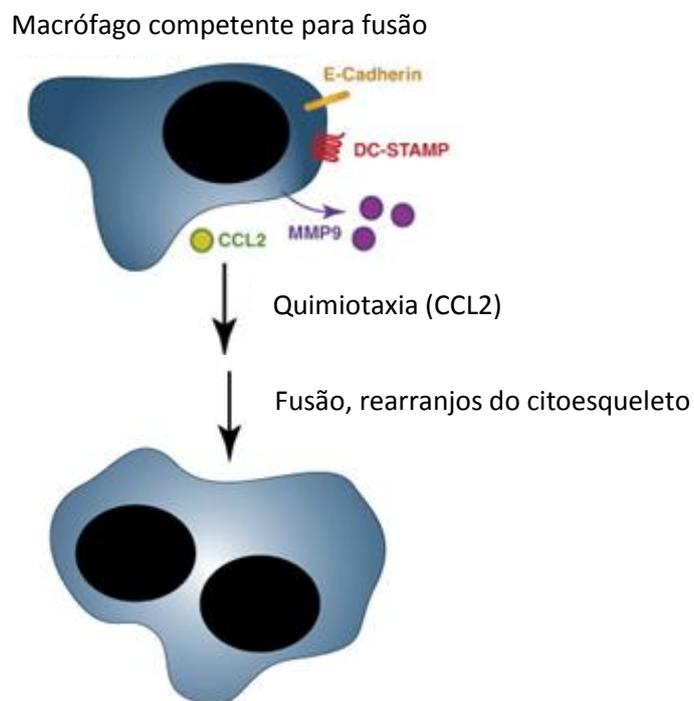


Figura 6 – Mecanismos moleculares da fusão dos macrófagos para formar células gigantes multinucleadas. 1) Indução de um estado de fusão. 2) Quimiotaxia dos macrófagos mediada pelo CCL2. 3) Fusão das membranas e formação de células gigantes envolvendo rearranjos no citoesqueleto. Adaptado de (27).

CCL3 (MIP1- α)

A quimiocina (também da família C-C, ligando 3) CCL3, também denominada proteína inflamatória macrofágica 1 α (MIP-1 α), é uma citocina envolvida no processo inflamatório que recruta e ativa os leucócitos polimorfonucleares.

Schuttle e colaboradores (30) demonstraram o aumento da sua concentração num estudo em ratos implantados com dispositivos com biomateriais distintos, nomeadamente polietileno, poliuretano e cloreto de polivinilo. Hoenders e colaboradores (29) identificaram também esta quimiocina como agente etiológico no processo inflamatório que leva, em último caso, à perda de próteses na área da Ortopedia.

A Tabela 4 e a Tabela 5 fazem o resumo da principal origem celular e dos efeitos *major* das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e das células que produzem, dos recetores, das células que são atraídas e dos efeitos das quimiocinas CCL2 e CCL3, respetivamente.

Tabela 4 – Resumo dos efeitos das citocinas escolhidas, adaptado de (31).

Citocina	Origem celular principal	Efeitos
TNF-α	Macrófagos Células T	Ativação dos neutrófilos Síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado Ativação das células endoteliais
IL-1β	Macrófagos Células endoteliais Algumas células epiteliais	Ativação das células endoteliais Síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado
IL-6	Macrófagos Células endoteliais Células T	Síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado Proliferação de células B produtoras de anticorpos

Tabela 5 - Resumo dos efeitos das quimiocinas CCL2 e CCL3, adaptado de (12).

Quimiocina	Produzida por	Recetor	Células atraídas	Efeitos
CCL2	Monócitos	CCR2B	Monócitos	Ativa macrófagos
	Macrófagos		Células T e NK	Promove imunidade
	Fibroblastos		Basófilos	Th2
	Queratinócitos		Células dendríticas	Estimula migração dos leucócitos do sangue para os tecidos
CCL3	Monócitos	CCR1	Monócitos	Promove imunidade
	Células T	CCR3	Células T e NK	Th1
	Mastócitos	CCR5	Basófilos	Estimula migração
	Fibroblastos		Células dendríticas	dos leucócitos do sangue para os tecidos

1.2. Resposta inflamatória crónica

A inflamação crónica surge quando o estímulo inflamatório persiste no local implantado, com os macrófagos a representarem a força motriz neste perpetuar da resposta imune (13).

Os monócitos circulantes que chegam ao local sofrem uma alteração fenotípica e diferenciam-se em macrófagos. As células macrofágicas não só têm a responsabilidade de fagocitarem substâncias estranhas ao organismo, como têm também a função de serem células apresentadoras de antígenos aos linfócitos Th (T helper). Mas a função mais importante que desempenham ao longo da resposta inflamatória é a secreção de uma panóplia de produtos biológicos altamente activos (Tabela 6). A libertação destas

moléculas pode ter consequências tão díspares como a migração celular, a diferenciação celular, a produção de novos tipos celulares, bem como a formação de novos vasos sanguíneos (32).

Tabela 6 - Funções de cada um dos fatores produzidos pelos macrófagos, adaptado de (32).

Produto	Função
Fatores de crescimento	Promovem crescimento do tecido
Citocinas (ex. IL-1)	Medeiam a inflamação e a recruta de macrófagos
Espécies reativas de oxigénio	Degradam ou destroem os materiais estranhos
Proteínas da matriz extracelular	Promovem adesão celular
Metaloproteinases da matriz	Remodelam a matriz extracelular
Fatores do sistema complemento	Ativam o sistema complemento
Metabolitos do ácido araquidónico	São precursores de outras moléculas de sinalização
Proteínas da coagulação	Iniciam e mediam a coagulação

As citocinas libertadas pelos macrófagos ativados também estimulam a proliferação fibroblástica e a produção de colagénio. Há produção de tecido cicatricial por um processo denominado fibrose, uma reação que pode interferir com a função normal do tecido afetado. A inflamação crónica também pode levar à formação de um granuloma, com uma área central de macrófagos ativados envolvida por linfócitos ativados. A área central do granuloma normalmente tem células gigantes multinucleadas formadas pela fusão de macrófagos ativados. Os macrófagos também desempenham um papel primordial na cicatrização e regeneração tecidulares. A fagocitose de partículas, a libertação de enzimas importantes para a reorganização do tecido afectado e a secreção de fatores de crescimento que induzem migração e

proliferação dos fibroblastos são passos essenciais dados pelos macrófagos e constituem os passos iniciais em direção à regeneração tecidual efetiva (13).

Hoje em dia, a questão da reação inflamatória pós implantação de biomateriais é colocada em termos de relação biomaterial/macrófagos e biomaterial/células gigante de corpo estranho. Assim sendo, tem-se estudado a função exacta dos macrófagos neste processo, havendo relatos que a resposta macrofágica pode conduzir a uma reconstrução funcional dos tecidos e órgãos ou a uma reacção típica de corpo estranho, com formação de células gigantes multinucleadas e encapsulação do material com tecido conjuntivo fibroso.

Neste sentido foram identificados dois fenótipos macrofágicos heterogéneos, sendo M1 o macrófago classicamente ativado, pró-inflamatório e M2 o macrófago ativado de forma alternativa, anti-inflamatório, homeostático, cicatrizador (13, 33, 34). A classificação apenas em dois fenótipos é claramente redutora, uma vez que o fenótipo é plástico e determinado por microambientes complexos, sendo mais correctamente considerado um espectro contínuo entre os extremos M1 e M2 (34, 35). A Figura 7 ilustra esta interrelação entre fenótipos, sendo todos eles passíveis de rápida alteração.

Deve ter se em conta que o termo macrófago M2 deve englobar virtualmente todos os macrófagos que não sejam M1 (36).

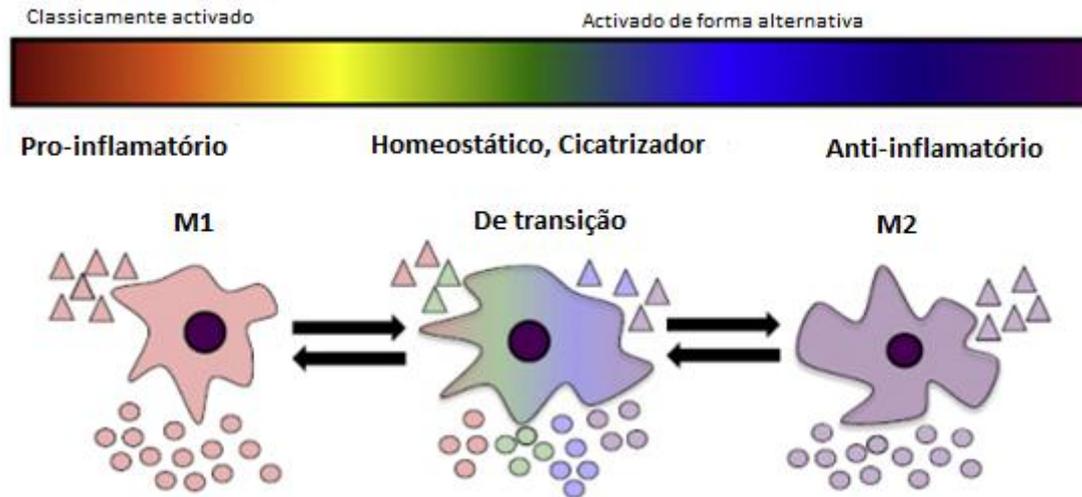


Figura 7 - Fenótipos dos macrófagos, M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório), ilustração adaptada de (35).

Regra geral uma resposta inicial do tipo M1 é realizada para destruir eventuais patógenos e para limpar o tecido de células mortas e tecido danificado. A transição para um fenótipo M2 é associada a remodelação tecidual, resultando em formação de cicatriz ou remodelação construtiva, dependendo do *timing* da alteração do fenótipo. A polarização prolongada em M1 ou uma transição exuberante para o fenótipo M2 pode levar a excessiva formação de tecido cicatricial ou a atrasos na cicatrização (35).

Pensa-se que uma resposta M2 mais exuberante é promovida pelos biomateriais sintéticos. A implantação de materiais de origem sintética como o poliHEMA ou o silicone geralmente resultam numa resposta de corpo estranho, com encapsulamento após um mês de implantação (35).

A Figura 8 pretende sistematizar as respostas possíveis quando os diversos fenótipos de macrófagos contactam com os biomateriais. O fenótipo M1 está ligado ou à reacção de corpo estranho clássica ou à inflamação crónica. Poderá eventualmente permitir a remodelação construtiva, mas unicamente através do fenótipo de transição. O fenótipo M2 permitirá essa remodelação construtiva de forma direta.

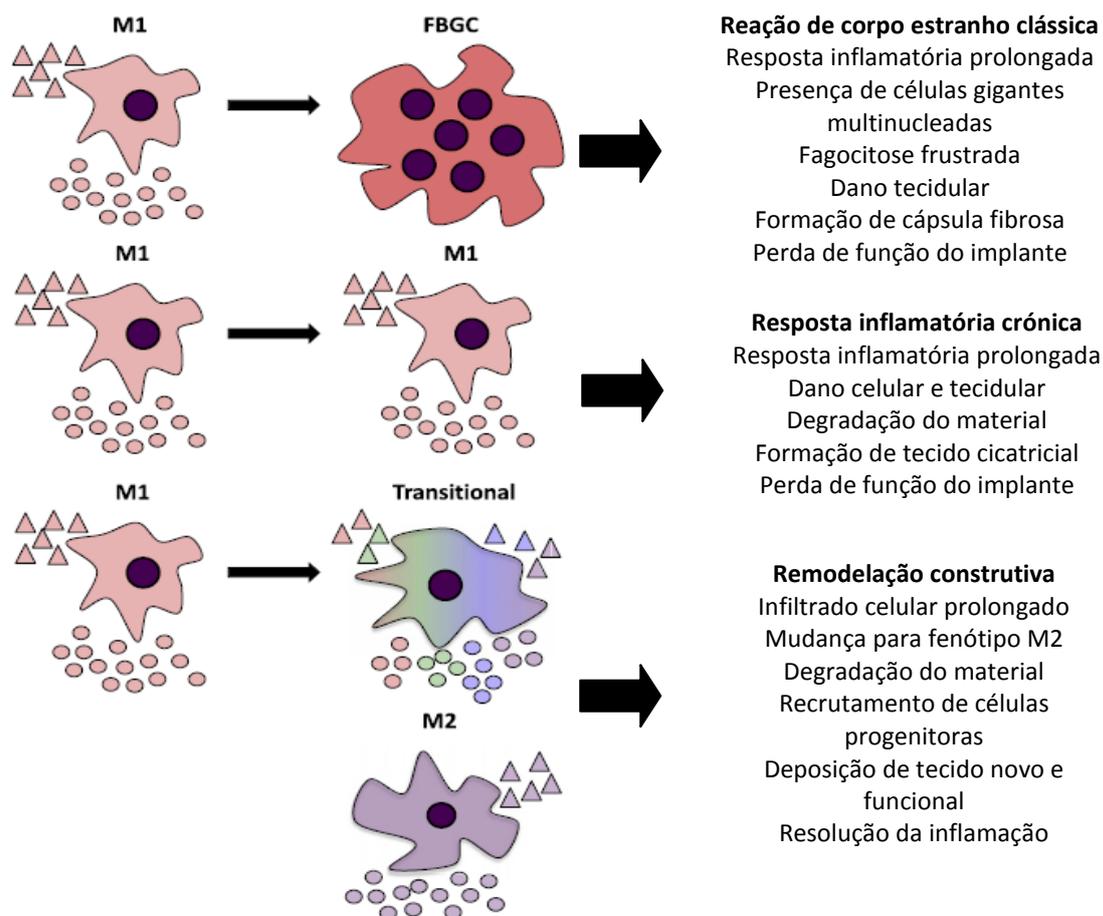


Figura 8 – Resultados possíveis da interação dos diversos fenótipos de macrófagos com biomateriais. Esquema adaptado de (35).

1.3. Modelos animais de inflamação

Os modelos animais têm sido utilizados para estudar os fenómenos ligados à inflamação durante os últimos 80 anos (37).

Os modelos animais são necessários quando beneficiamos da simplificação e quando é eticamente inapropriado estudar diretamente a questão em causa. Usamos modelos animais quando não temos acesso ao animal alvo, quando é impraticável usá-lo por causa de despesas ou de questões logísticas ou quando não conseguimos ter o número adequado de animais para o estudo que pretendemos desenvolver. Devemos escolher um determinado modelo animal baseado em vários critérios: adequação como

semelhante, capacidade de transferir a informação, uniformidade genética, conhecimento prévio das propriedades biológicas, generalização dos resultados, facilidade de manipulação experimental, consequências ecológicas e implicações éticas (38).

Os imunologistas focam a sua atenção largamente nos roedores, em parte por uma razão histórica, mas também devido aos custos e condições de manutenção, grande número de variantes genéticas e facilidade de manipulação de células e tecidos (39).

No amplo campo da investigação da inflamação, os autores recorrem preferencialmente a um dos dois animais seguintes para realizarem os seus ensaios: ou a ratinhos (40) ou a ratos de laboratório (41).

Mas tal não significa que os únicos modelos animais para estudar inflamação sejam roedores de pequeno porte. O caso do estudo da asma é paradigmático (42). Os modelos animais para o estudo desta patologia são provavelmente os mais bem caracterizados em termos de inflamação e processos de remodelação. E, para tal, não são usados somente pequenos roedores (ratinho (43), rato (44) e porquinho da índia (45)), como também o são animais de maior porte, como o gato (46), cão (47), porco (48), ovelha (49) e primatas não humanos (50).

No caso específico do estudo da inflamação relativa ao desempenho de biomateriais à base de hidroxiapatite, encontramos na literatura vários artigos que utilizam como modelo animal o rato (51-55).

Há um número considerável de autores que descrevem apenas ter feito uma “implantação muscular” dos biomateriais, não especificando quais os músculos envolvidos (56-58).

No entanto, o autor Walschus em 2009 (54) descreve ter implantado muscularmente os biomateriais nos músculos lombares de ratos. Foi este o modelo que escolhemos para adotar no nosso trabalho experimental.

Assim como acontece sempre que se utilizam modelos animais para estudar algum tipo de alteração no humano, devemos ter sempre cautela quanto ao significado das diferenças observadas entre aquilo que acontece no modelo e o que acontecerá no

homem, uma vez que as respostas podem não ocorrer exatamente da mesma forma e portanto não serem diretamente extrapoláveis.

2. Materiais de substituição óssea

Os materiais de enxerto ósseo constituem um dos vetores com franco potencial de investigação na área particular da Implantologia, mas também na Cirurgia Oral, na Periodontologia e na Endodontia, uma vez que a disponibilidade óssea do paciente é um dos motivos primários de ponderação aquando da realização de um correto e detalhado plano de tratamento. A recuperação da arquitetura do osso perdido ou reabsorvido com biomateriais, almejando uma recuperação funcional e estética, é um dos objetivos de uma reabilitação oral.

Um material de substituição óssea é definido pela GESTO (Association pour l'étude des greffes et substituts tissulaires de l'appareil locomoteur) como "todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintético, destinado à implantação no homem com a perspetiva de uma reconstituição do capital ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica" (59). Estes materiais, quando implantados, ajudam a promover a cicatrização óssea, isoladamente ou em combinação com outros (60).

Os materiais de substituição óssea desempenham várias funções importantes quando pretendemos a regeneração óssea (61): atuam como *scaffolds* e estimulam o crescimento ósseo e funcionam como uma proteção mecânica contra a pressão dos tecidos moles envolventes. Além destes, há outros fatores importantes a ter em conta que não devem ser descurados: a manutenção do espaço para ser possível a regeneração óssea, a pré determinação da forma anatómica desejada, a aceleração da remodelação óssea e a capacidade de serem veículos para antibióticos ou fatores de crescimento (62). Cato Laurencin (63) afirma que a geração atual de substituintes ósseos foi desenhada com uma dupla função: a de substituição e a de regeneração, ao contrário do que se passava há décadas atrás, em que a tónica era colocada somente na substituição.

O material de enxerto ideal (2, 62) é biocompatível, é uma matriz osteocondutora na qual irá ocorrer o crescimento ósseo, possui fatores osteoindutores que induzam regeneração e reparação ósseas, tem células osteogénicas com potencial para se diferenciarem, é poroso, tem integridade estrutural mesmo quando sujeito a stress, é reabsorvível/degradável, é hidrofílico, radiopaco, possui plasticidade, é estéril, é estável, tem uma estrutura semelhante ao osso, é de fácil utilização pelo profissional e não é dispendioso. Além disso, possui um perfil de segurança adequado sem efeitos adversos locais ou sistémicos (e é não cancerígeno e um mau substrato para os microorganismos). Não existe, na atualidade, nenhum material que reúna simultaneamente todas estas características.

Do ponto de vista clínico, os materiais de substituição óssea têm um campo alargado de indicações. No campo da Medicina Dentária, eles são utilizados em procedimentos tão variados como na Periodontologia (64-68), na Implantologia (65, 67, 69-71) ou na Endodontia (66, 68, 72, 73). Mais concretamente são utilizados na correção de defeitos periodontais (60, 64, 67), na regeneração periodontal (65, 74), na cirurgia de preservação do alvéolo (65), em casos de elevação do seio maxilar (69-71, 75, 76), aquando da reconstrução peri-implantar (65), na cirurgia periapical (72, 73), no tratamento de deiscências e fenestrações (77), na correção de grandes defeitos derivados a grandes traumas, excisões cirúrgicas (60), no aumento ósseo vertical (78) e horizontal do rebordo alveolar (79-81), etc. Este leque de aplicações é tão vasto que é facilmente perceptível que um único material não pode ser a solução para todas estas questões, mas antes que é imperativo procurar o material, ou até o conjunto de materiais, mais indicados para cada situação clínica específica.

Os materiais de substituição óssea que hoje temos ao nosso dispor provêm, essencialmente de quatro origens distintas: do próprio indivíduo (osso autólogo), de outro indivíduo da mesma espécie (82, 83) (alógeno), de indivíduos de outra espécie (xenógeno de origem animal, bovina ou porcina, ou coral/algas (84, 85)) ou são materiais que são sinteticamente produzidos (aloplásticos) (86, 87), como é descrito na Figura 9.

Para além desta classificação, existem outras, sistematizadas consoante diversas particularidades destes materiais. Relativamente à sua composição química (88), eles podem ser cerâmicos (sulfato de cálcio, biovidros, TCP, HA), polímeros (matrizes reabsorvíveis ou não reabsorvíveis) ou compósitos. Os materiais cerâmicos são definidos como sólidos não orgânicos, constituídos sobretudo à base de cálcio; os polímeros são materiais orgânicos macromoleculares formados por uma repetição múltipla de um grupo de átomos conhecidos por unidades estruturais – monómeros e os compósitos ou materiais combinados como uma associação de materiais de origens diversas, com o intuito de potenciar as características mais favoráveis dos seus constituintes (conjugação de tecidos biológicos e biomateriais sintéticos, de tecidos biológicos entre si ou de biomateriais sintéticos diferentes).

Relativamente ao comportamento biológico do hospedeiro (88) podem ser bioativos (existe a formação de uma ligação direta aos tecidos vivos, pois geralmente têm, na sua composição, íões de cálcio e/ou fósforo que vão estabelecer uma ponte química com o osso envolvente. Exemplos: hidroxiapatite, vidros bioativos) ou reabsorvíveis - aqueles que são lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados. Exemplos: fosfato tricálcico, vidros bioativos.

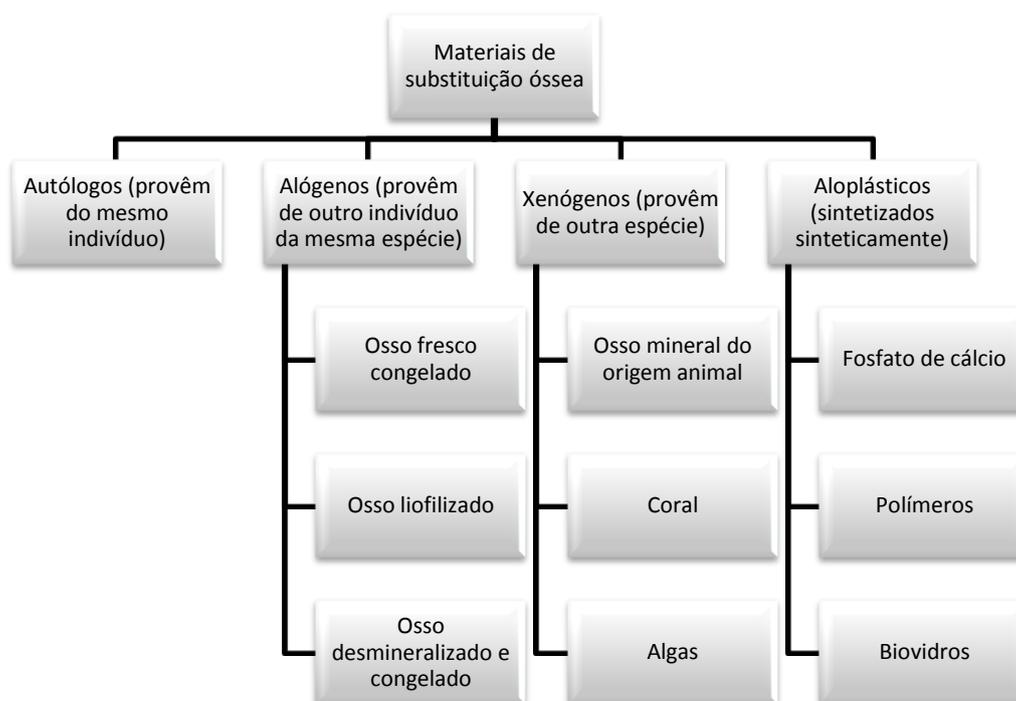


Figura 9 - Classificação dos materiais de substituição óssea, adaptado de (89).

É do conhecimento geral que a perda de uma peça dentária determina a reabsorção do osso alveolar. Sabemos que o osso cortical, nesta situação, é sujeito a reabsorção e a parte medular do alvéolo gradualmente desaparece. A consequência é a alteração da morfologia da crista alveolar, que determina o grau e a extensão do defeito ósseo (em relação direta com o número de dentes perdidos). O desaparecimento gradual do processo alveolar envolve a redução da dimensão sagital e vertical do osso remanescente, como foi descrito por Cawood e Howell (90), levando a uma subversão das relações intermaxilares e pondo em causa a oclusão (91). A perda destas duas dimensões pode ser explicada de forma simples pela fisiologia, que testemunha que a manutenção da anatomia óssea requer um estímulo contínuo, isto é, que se o osso não é utilizado devido à ausência do dente, é reabsorvido, no sentido de economizar o organismo (92).

Para a regeneração óssea ser uma realidade são necessários quatro elementos críticos: a presença de células osteogénicas (osteoblastos ou células pluripotenciais); fatores de crescimento para potenciarem a osteoindução; uma matriz osteocondutora e suprimento sanguíneo adequado (93).

As propriedades atrás mencionadas são os princípios biológicos que nos oferecem a possibilidade de regenerar com o máximo sucesso o volume ósseo perdido (60, 66, 91). O osso autólogo, contudo, é o único que nos permite obter uma verdadeira osteogenicidade. Denominamos enxertos osteogénicos aos sistemas que contêm todos os elementos necessários para uma formação óssea direta, incluindo células progenitoras competentes e respetiva matriz de suporte, sem qualquer medida adicional do leito implantar, além do suporte nutricional e metabólico.

A osteoindução permite a migração e proliferação das células conjuntivas indiferenciadas para o local a ser regenerado (facto este que é condicionado pela presença de fatores de crescimento). Chamamos enxertos osteoindutores àqueles materiais capazes de causar diferenciação osteoblástica de células progenitoras, levando à formação óssea num tecido onde de outra forma não se formaria osso. É exemplo de um material osteoindutor a utilização das proteínas recombinantes humanas.

A osteocondução é a capacidade do material servir como estrutura para guiar a regeneração óssea – são os materiais que providenciam uma matriz que suporta a migração de osteoblastos locais e células progenitoras e possibilitam uma atividade celular normal no sentido da síntese de uma matriz extracelular e a subsequente calcificação fisiológica. São exemplos de materiais osteocondutores os materiais xenógenos e os materiais sintéticos.

De acordo com estas premissas, um material de substituição óssea ideal é aquele que funciona respeitando estes mecanismos, isto é, que desempenha o papel de *scaffold* direcionando nas três dimensões do espaço o crescimento ósseo (osteocondução) e que recruta e induz a diferenciação de células pluripotenciais em células formadoras de osso (osteoindução).

2.1. Osso autólogo

O osso autólogo ainda é considerado o “gold standard” quando falamos em substitutos ósseos (2, 3, 86, 87, 94-97). No entanto o benefício clínico não está garantido, podendo surgir complicações (62) em 8-39% dos casos (93).

Como já foi referido anteriormente, o enxerto autógeno é o único que apresenta em simultâneo propriedades osteogénicas, osteocondutoras e osteoindutoras, sendo esta a sua principal vantagem relativamente aos materiais que surgem como alternativos. Outra vantagem identificada é o facto de não transmitirem doenças, uma vez que a provêm do próprio indivíduo.

Uma das principais desvantagens deste tipo de enxerto é a imprevisibilidade no que respeita à sua reabsorção (98-101). Outras desvantagens reconhecidas são o facto de ser necessário um segundo tempo cirúrgico no local dador (66) e da quantidade colhida poder não ser suficiente para o tipo de defeito que pretendemos corrigir (62). A intervenção cirúrgica pode implicar um internamento hospitalar, com consequente subida do custo do procedimento.

O osso autólogo pode ser colhido em locais intra ou extra-orais. Quando se opta pela colheita intra-oral normalmente são obtidos de alvéolos dentários pós-extração, cristas desdentadas, ramo da mandíbula, sínfise mentoniana, tuberosidade ou de outras zonas disponíveis da crista óssea, como são exemplo os tori palatinos ou linguais. No entanto, todos eles apresentam desvantagens, dependendo do local escolhido para a colheita. As complicações do procedimento na sínfise mandibular podem envolver alterações da sensibilidade nos dentes inferiores anteriores (102), descoloração dos incisivos inferiores devido a lesão pulpar ou deposição de dentina secundária, parestesia do mento (102, 103), meteorotropismo do queixo, fratura da mandíbula e dor pós-operatória. Complicações associadas ao procedimento de colheita no ramo mandibular incluem o dano potencial aos nervos alveolar inferior e bucal e trismus após a cirurgia, que obrigam à prescrição de anti-inflamatórios não-esteróides e glucocorticóides para ajudar a reduzir disfunção no período de pós-operatório. Quanto ao local recetor, as complicações mais frequentes são a ocorrência de deiscências (103).

Além da colheita intra-oral, pode ser realizada a extra-oral, que permite a obtenção de enxertos de muito maior dimensão, provenientes mais comumente da crista ílica ou da tibia (66), mas também possíveis da costela, do crânio e do perónio. No entanto também estes apresentam desvantagens, estando descritas, no caso da colheita da crista ílica, atraso no crescimento ósseo após a intervenção cirúrgica, no caso de crianças em fase de crescimento, interferência importante com órgãos abdominais originando cicatrizes, dor pós operatória moderada a grave, distúrbios da marcha e prolongamento do período de internamento hospitalar (98).

Além destes fatores, o procedimento de colheita de osso autólogo não está indicado para pacientes idosos ou pediátricos, ou aqueles com doenças infecciosas ou malignas (93). Os pacientes tendem a procurar alternativas que não tenham os inconvenientes da utilização de osso autógeno.

No entanto, as taxas de insucesso reportadas podem atingir os 50%, facto que pode ser explicado pela diversidade de técnicas de colheita, manipulação e métodos de

implantação e diferenças entre as condições do paciente e a vitalidade do tecido ósseo (104).

No que diz respeito a utilização do osso autólogo podemos referir essencialmente a existência de duas formas de apresentação para uso clínico: osso granulado ou blocos de osso. Estas diferentes formas assumem comportamentos díspares, como é descrito, por exemplo, por Sbordone et al (105) em que concluíram que para o mesmo tipo de procedimento (levantamento do seio maxilar) a reabsorção é maior no enxerto particulado (39,2%) quando comparado com os blocos (21,5%). Os autores concluíram que o bloco cortico-esponjoso sofre uma remodelação negativa quanto ao seu volume, provavelmente devida à reabsorção do osso cortical.

2.2. Osso alógeno

O osso alógeno é utilizado em 35% dos casos de transplantes (106) e é colhido em cadáveres ou em dadores vivos (107), aquando da realização de artroplastias. Possui atividade osteoindutiva e osteocondutora, mas faltam-lhe propriedades osteogénicas, uma vez que não possui células viáveis (62).

A quantidade disponível para colheita e o facto de poderem ser colhidas diferentes formas e tamanhos, comparativamente com o enxerto autólogo, são sem dúvida vantagens em relação a este, assim como o é a dispensabilidade de um procedimento cirúrgico adicional no paciente, para a sua colheita (88), não existindo morbilidade do local dador e não havendo a necessidade de sacrificar estruturas do local recetor.

Os aloenxertos também encerram algumas desvantagens: os custos consideráveis associados ao processo de colheita, processamento e conservação dos enxertos alogénicos e o facto de poderem transmitir vírus (hepatite B, hepatite C ou HIV) e outras doenças (107, 108), sendo as taxas de infeção reportadas na literatura entre 0 a 12,8% (109).

Para contrariar tal facto é necessário um processamento complexo, com esterilização e desativação das proteínas e outras substâncias bioativas necessárias para a osteoindução (110). Durante estes processos as propriedades biológicas e mecânicas do osso original podem ser perdidas (107). Além deste facto, também não estão disponíveis em alguns países por questões de índole religiosa, são caros e são rapidamente reabsorvidos.

Os enxertos alógenos estão disponíveis em várias formas (62, 108): corticais, esponjosos ou segmentos ósseos completos (corticoesponjosos). Para além desta classificação ainda podemos ter osso mineralizado ou desmineralizado. O osso mineralizado está disponível em diversas formas: fresco, congelado e liofilizado, sendo que as técnicas para os preparar podem influenciar de forma significativa as suas propriedades, justificando as diferenças passíveis de serem observadas ao nível da osteocondução, imunogenicidade, propriedades mecânicas e potencial para a transmissão de doenças (63). O osso fresco já é raramente utilizado, devido à resposta inflamatória que desencadeia e aos riscos de transmissão de doenças, comprometendo o seu desempenho e tornando-o claramente inferior ao osso autólogo (111). O osso alógeno mineralizado pode ser conservado de 2 formas (88): congelado (“fresh-frozen”) => a -70°C após uma lavagem com antibiótico (a sua utilização pode ir de 1 ano, se for mantido a -20°C, até 5 anos, se a -70°C) e liofilizado (“freeze-dried”) => lavagem dupla com antibiótico, congelação a -70°C e secagem até ficar com um conteúdo em água de cerca de 5% (duração ilimitada).

A congelação reduz a imunogenicidade e conseqüente rejeição crónica, mas não elimina o risco de transmissão de doenças. Pelo contrário, a liofilização reduz ainda mais a imunogenicidade e elimina o risco de HIV, mas diminui também a capacidade de osteoindução e as propriedades mecânicas do enxerto (88).

Outra alternativa é o uso do osso alógeno desmineralizado, através da utilização de ácidos, que após atuarem geram uma amálgama de proteínas não colagenadas, fatores de crescimento ósseo e colagénio (denominada no seu conjunto por matriz óssea desmineralizada). Devemos atentar no facto de estes produtos, apesar de estarem disponíveis no mercado e serem largamente utilizados, e uma vez que são

considerados tecidos processados, não estarem sob a égide da Food and Drug Administration (FDA), e desta forma não serem sujeitos ao mesmo escrutínio que o osso alógeno mineralizado.

Para a utilização em segurança deste tipo de enxertos, a Associação Americana de Bancos de Tecidos instituiu protocolos rígidos para avaliação do tecido ósseo, no sentido de evitar a transmissão de doenças (108, 110). No entanto há ainda fatores que têm que ser melhorados: nem todos os bancos de osso seguem estas normas e o rastreio através dos ácidos nucleicos só permite a identificação de vírus e não de bactérias. Da resolução destas questões depende a segurança da utilização deste tipo de substituinte ósseo.

É importante realçar que a qualidade do enxerto alógeno é completamente dependente do sujeito dador e portanto o resultado clínico nunca será exatamente previsível (104).

2.3. Osso xenógeno

O osso xenógeno é normalmente de origem biológica (bovina, equina ou porcina, podendo ter também origem no exosqueleto de certas espécies de coral marinho) ou proveniente de algas. Podem ainda dividir-se em outros dois grandes grupos, relacionados com a sua constituição química: os que são compostos por uma base de hidroxiapatite e os que são compostos por uma base de carbonato de cálcio (112). Os compostos por uma base de carbonato de cálcio têm normalmente origem coralina, embora, após processamento, seja possível trocar os iões carbonato por fosfato, produzindo hidroxiapatite coralina (113). O exosqueleto destas matrizes altamente ricas em carbonato de cálcio demonstrou ser biocompatível e biodegradável a velocidades variáveis, dependendo da porosidade do exosqueleto, do local da implantação e da espécie utilizada. Embora não sendo nem osteogénicos nem osteoindutores, os enxertos de coral podem ser utilizados como veículo de transporte

de fatores de crescimento e permitir a adesão, crescimento e diferenciação celulares (113).

Estes materiais estão disponíveis em quantidades praticamente ilimitadas, possuem grandes semelhanças com o osso humano e têm o potencial de serem reabsorvidos (114). Além destas vantagens, ainda podemos referir que evitam um segundo ato cirúrgico e que diminuem o risco de morbidade do local dador, quando comparados com o osso autólogo. A hidroxiapatite xenogénica é o material biológico preferido pela sua absorção previsível (obviamente estando dependente das características físico-químicas de cada material em particular) (62).

O processamento deste tipo de materiais implica a remoção de matéria orgânica, permanecendo apenas a sua fase mineral, amorfa.

Provavelmente o material xenógeno clinicamente mais utilizado e melhor estudado é o osso bovino desproteínizado, com nome comercial de Bio-Oss® (Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland).

Estes materiais têm uma macroestrutura e um conteúdo cristalino semelhante ao osso humano, sendo as propriedades físicas também semelhantes (115).

O uso de osso bovino ou derivado de outro animal, apesar de ser utilizado na sua forma mineral e não antigénica, tem também algumas desvantagens, nomeadamente poder não ser completamente aceite por parte de certos clínicos ou mesmo de alguns pacientes (116). Estes materiais apenas possuem características de osteocondução, não sendo osteoindutores nem osteogénicos (117-121).

Num artigo de revisão realizado por Van der Stok et al (93) acerca dos materiais de substituição óssea existentes no mercado holandês, os autores referem a existência de 18 materiais, sendo três deles xenógenos, dois de origem bovina (Cerabone® (117) e Endobon® (121, 122)) e um de origem coralina (Pro Osteon 500® (118-120)). Todos estes biomateriais são constituídos por hidroxiapatite e são comercializados na sua forma sólida.

Num outro estudo semelhante, mas realizado nos Estados Unidos da América, por Avila-Ortiz, Elangovan e Karimbux (123) referem a existência de 144 materiais, sendo 93 de origem alógena, 31 de origem sintética e 20 de origem xenógena. Destes 20, 15 são de origem bovina, três de origem equina (Equimatrix®) e um de origem bovina com colagénio porcino (BioOss Colagen®). Desta lista de materiais constam não só materiais particulados, como esponjas ou gel, denotando as várias formas de apresentação possíveis para este tipo de material.

Num artigo recente de Hsu e Wang (124), no qual os autores pretendem ajudar o clínico na escolha dos materiais de substituição óssea para as diversas indicações periodontais e implantares, é referida a indicação de utilização de materiais xenógenos em casos de peri-implantites com defeitos verticais de duas paredes ou defeitos circunferenciais com limites ósseos; em casos de preservação do alvéolo; em casos de aumentos horizontais e de forma promissora em casos de aumentos verticais.

2.4. Materiais aloplásticos

Em alternativa ao osso autólogo têm sido utilizados numerosos biomateriais de origem sintética (2, 3, 86, 87, 93). Estes materiais são estruturas minerais semelhantes ao osso humano, e incluem a hidroxiapatite (HA), o fosfato tricálcio (TCP) e o fosfato tricálcio bifásico (HA + TCP). Os compostos com ratios $\text{CaO:P}_2\text{O}_5$ 2:1 a 4:1 provaram ter a melhor biocompatibilidade, sendo o ratio óptimo de 3:1 (62). Todos eles são inorgânicos, não metálicos e com uma estrutura cristalina, normalmente processados a altas temperaturas (sinterização) (104).

Estes materiais apenas possuem características de osteocondução, não sendo nem osteoindutores nem osteogénicos.

Uma vez que todas as alternativas disponíveis apresentam desvantagens a ter em consideração, é urgente desenvolver um material que consiga conciliar as propriedades do osso fisiológico suprimindo as desvantagens dos auto e dos aloenxertos, estando disponível a qualquer momento, na quantidade pretendida e

com custos mais baixos (97). Uma perspetiva mais orientada para o futuro será procurar substitutos ósseos de origem puramente sintética, contudo, à data, nenhum material reúne todas as características necessárias, particularmente combinar as propriedades biológicas e mecânicas do osso humano (96).

Embora não existindo ainda no mercado um material sintético considerado ideal, é um facto que estes materiais se apresentam como alternativas válidas à utilização de osso autólogo, alógeno e xenógeno. A utilização clínica destes compostos é vasta, podendo assumir várias origens e várias formas de apresentação.

No artigo de Van der Stok (93) já referenciado, os autores identificaram no mercado holandês 15 materiais aloplásticos, de origens tão díspares como hidroxiapatite (Ostim® (125)), fosfato de tricálcio (Chron Os® (126) e Vitoss® (127)), compósitos de hidroxiapatite e fosfato de tricálcio (BoneSave® (128), Calcibon® (129) e Camceram® (130)), sulfato de cálcio (BonePlast®, OsteoSet® (131) e Stimulan® (132)) e vidro bioactivo (Cortoss® (133)).

No outro estudo realizado nos Estados Unidos da América, também já citado (123), foram identificados 31 materiais aloplásticos, sendo as suas origens similares aqueles já identificados no mercado holandês: fosfato de cálcio (SocketGraft®), β -TCP (Cerasorb®), sulfato de cálcio (SocketGraft®), compósitos de hidroxiapatite com β -TCP (BoneCeramic®, Osteon®), vidro bioactivo (Unigraft®). As marcas comerciais referidas são apenas exemplos, não sendo objetivo deste trabalho fazer a listagem exaustiva das mesmas, estando elas acessíveis no trabalho de origem.

No mercado português estão disponíveis o Straumman® BoneCeramic, o Bonelike®, o Biogran® da Biomet 3i, o MaxResorb®, o Perossal®, o SynthoGraft®, o Adbone®TCP, entre outros.

Numa perspetiva de sistematização de informação, Hsu e Wang (124) compilaram todos estes dados num quadro resumo (Tabela 7), que abrange as vantagens, desvantagens e principais indicações clínicas dos vários tipos de materiais anteriormente referidos.

Tabela 7 – Quadro resumo das características dos materiais autógenos, alógenos, xenógenos e sintéticos. Adaptado de (124).

Tipo de material	Propriedades	Vantagens	Desvantagens	Indicações
Autógeno	Osteogénese Osteocondução Osteoindução	Capacidade de osteogénese Sem risco de transmissão de doenças Sem problemas de histocompatibilidade	Quantidade limitada Momento cirúrgico adicional Possibilidade de complicações	Defeitos de furca Classe II Defeitos periodontais de 2 paredes Defeitos peri-implantares circunferenciais Preservação alvéolo intacto Aumento horizontal Levantamento do seio
Alógeno	Osteocondução Osteoindução	Osteogénese possível Sem necessidade de segundo momento cirúrgico	Possível transmissão de doenças	Defeitos de furca Classe II Defeitos periodontais de 2 paredes Defeitos peri-implantares circunferenciais Alvéolos pós extracção de 2 ou 3 paredes Aumento horizontal Levantamento do seio
Xenógeno	Osteocondução	Sem necessidade de segundo momento cirúrgico	Possível transmissão de doenças Taxa de reabsorção lenta	Defeitos peri-implantares circunferenciais Alvéolos pós extracção de 2 ou 3 paredes Aumento horizontal Levantamento do seio
Alopástico	Osteocondução	Sem risco de transmissão de doenças Sem necessidade de segundo momento cirúrgico	Taxa de reabsorção lenta	Defeitos peri-implantares circunferenciais Alvéolos pós extração de 2 ou 3 paredes Aumento horizontal Levantamento do seio

2.5. Combinação de materiais

O que se verifica na prática clínica é que um grande número de intervenções utiliza não só um dos materiais citados, mas antes uma combinação, sendo a mais utilizada o osso autólogo em conjugação com osso xenógeno (98, 99, 134-138). Esta combinação pode ser elaborada com várias proporções possíveis: 1:1 (98, 135), 1:2 (135) e 1:4 (134, 135) são as que encontramos mais descritas na literatura. As proporções de 1:1 e de 1:2 parecem apresentar melhores resultados, mesmo assim inferiores quando comparados com osso autólogo puro (98, 135). No entanto, existe alguma celeuma nesta questão, existindo artigos que referem que a combinação de diferentes materiais pode ter mais sucesso e apresentarem-se como mais promissoras do que o uso do osso autólogo individualmente (107).

Zinser et al (102), num estudo retrospectivo de 1045 implantes realizado na Holanda, comparou as taxas de sucesso encontradas na utilização de um material isolado ou em combinação com outro. Encontrou frequências relativas de utilização de 37,3% para osso autólogo isolado, 17,5% para osso alógeno/xenógeno e de 45,1% em que foi utilizada uma combinação. A taxa de sucesso foi mais baixa no grupo de doentes nos quais foi usado apenas osso alógeno ou xenógeno (87,9%), tendo sido encontradas taxas de sucesso de 97,2% e 92,2% para osso autólogo e combinação respetivamente. Este estudo em particular vem comprovar a teoria que a combinação de materiais pode apresentar-se como uma alternativa viável, com maiores taxas de sucesso clínico.

3. Características dos biomateriais e inflamação

A literatura mostra-nos que as propriedades físico-químicas dos materiais (composição química e morfologia das partículas, por exemplo) estão entre os fatores mais importantes que influenciam o desempenho *in vivo* do material, sendo responsáveis por respostas biológicas distintas (6, 112, 139-141).

Vários estudos exploram estas relações, sendo parte deles realizados com recurso a modelos animais e outra parte com culturas celulares humanas.

Os fatores estudados em modelos animais prendem-se com as características morfológicas das partículas: o tipo, o tamanho e a forma. Estes estudos encontram-se resumidos na Tabela 8, na qual estão patentes as conclusões retiradas pelos diversos autores.

Tabela 8 – Quadro resumo com os estudos relativos a características dos materiais levados a cabo com utilização de modelos animais.

Autor/Ano	Parâmetro estudado	Modelo	Efeito
Prudhummeaux et al (1996) (142)	Tipo das partículas	<i>In vivo</i> , rato	Partículas de HA induzem maior infiltrado inflamatório
Malard et al (1999) (143)	Tamanho das partículas	<i>In vivo</i> , rato	Partículas mais pequenas aumentam inflamação aguda
Sun et al (1997) (144)	Tamanho das partículas	<i>In vivo</i> , rato	Partículas mais pequenas aumentam TGF- β e PGE2
Sun et al (1999) (145)	Tamanho das partículas	<i>In vivo</i> , rato	Partículas mais pequenas diminuem TGF e aumentam PGE2
Grandjean et al (2007) (146)	Forma das partículas	<i>In vivo</i> , rato	Partículas com forma de agulha aumentam produção de TNF
Gauthier et al (1999) (147)	Tamanho das partículas	<i>In vivo</i> , rato	Partículas mais pequenas induzem mais degradação

Quanto aos resultados provenientes de culturas celulares sistematizámos os resultados encontrados tendo por base o fator estudado:

- Temperatura de sinterização: uma maior temperatura de sinterização de partículas de HA induz um aumento na produção de espécies reativas de oxigénio, em células polimorfonucleares (148) e um aumento na produção de IL-1, IL-6 e TNF em monócitos (149); uma menor temperatura de sinterização em partículas de HA/TCP induz um aumento de IL-1, IL-6, TNF e PGE₂, em macrófagos (150). É sabido que a temperatura de sinterização da hidroxiapatite afeta significativamente as suas respostas biológicas, quer no desempenho *in vivo* quer *in vitro*. Guo et al (151) avaliaram a estrutura cristalina de pós de HA sinterizados a diferentes temperaturas: 600, 800, 1000 e 1200°C através de difração de raio X e concluíram que a HA torna-se mais estável com o aumento da temperatura de sinterização, por aumento do tamanho dos seus cristais.

- Tipo de partículas: partículas de HA aumentam MMP-9, IL-1, IL-8 e MIP-1 em PMN (152), partículas de HA e β TCP aumentam produção de IL-1, IL-8 e TNF em células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) e partículas constituídas apenas por HA aumentam GM-CSF e RANK-L em células mononucleares (153); partículas em forma de agulha de HA: induzem produção de IL-1, IL-6, TNF e IL-10 em monócitos (154); aumentam a produção de MMP-9 em monócitos (155); aumentam a produção de IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 em monócitos (156) e aumentam a produção de IL-18 e ICE em monócitos (157), partículas de HA aumentam a produção de IL-1, IL-6, TNF e MMP-1 e MMP-3 em fibroblastos (158).

- Tamanho das partículas: as partículas maiores de β TCP aumentam a produção de IL-1, IL-8 e TNF em células mononucleares (159), as partículas pequenas de HA induzem produção de IL-1, IL-6, TNF e IL-10 em monócitos (154), as partículas grandes de HA aumentam a produção de MMP-9 em monócitos (155) e as partículas mais pequenas de HA aumentam a produção de colagenases por fibroblastos (160).

Como já é bem conhecido, o perfil das proteínas que adsorvem ao material implantado, a química de superfície do próprio material e as características topográficas têm sido considerados factores importantes e determinantes no grau e extensão da resposta por parte do hospedeiro (24, 35, 161-164). Os factores inerentes ao próprio biomaterial (produtos de degradação, topografias específicas e estruturas de poros) são responsáveis pela modulação do fenótipo dos macrófagos entre M1 e M2, como já foi referido (35).

Vários autores demonstraram que, durante a implantação, ocorrem reações na superfície do material implantado, como dissolução, precipitação e trocas iónicas. Estas reações são acompanhadas por adsorção e incorporação de moléculas biológicas, incluindo proteínas de adesão e factores de crescimento (165, 166).

Tal como numa clássica reação inflamatória aguda, os estudos realizados na interface tecido/biomaterial revelaram que existe um recrutamento inicial de PMNs, seguidas por monócitos.

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que as partículas de hidroxiapatite são fagocitadas diretamente pelos macrófagos (167). Mas além da fagocitose, existe um outro método, revelado recentemente, através do qual as partículas de fosfato de cálcio e hidroxiapatite são sequestradas pelos monócitos/macrófagos para dentro de um compartimento especializado denominado de compartimento ligado à superfície. Este compartimento é uma estrutura elaborada, semelhante a um labirinto, diretamente ligada ao espaço extracelular. Os autores propõem que seja este o método para remoção de grandes quantidades de material estranho do interior das células (168).

As partículas de hidroxiapatite são capazes de despoletar um *feedback* inflamatório positivo através do aumento da produção de citocinas e quimiocinas como a IL-1 e a IL-8 pelos PMNs (165).

A IL-1 β modula as metaloproteinases (MMP's) que são enzimas proteolíticas capazes de degradar os constituintes major da matriz extracelular. As partículas destes biomateriais também induzem a produção de TNF- α (165).

Os monócitos colonizam o local inflamado após os PMNs e produzem citocinas como o TNF- α e a IL-6, que promovem a osteoclastogênese em resposta à fagocitose das partículas, e metaloproteinases que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular. A IL-10, um inibidor potente da IL-6 e do TNF- α é produzida pelos monócitos posteriormente à fagocitose das partículas de HA.

4. Expressão genética

A análise da expressão genética é uma abordagem metodológica muito útil na investigação do comportamento transcricional de sistemas biológicos (169). Quando estudamos as interações entre materiais e células, é sempre determinante quantificar o comportamento do biomaterial, no que diz respeito às suas características, tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, para completar esta caracterização, é normalmente necessário avaliar o desempenho dos materiais ao nível molecular, recorrendo, para isso, ao estudo da quantificação de transcritos, por análise de cDNA, sintetizado a partir do RNA mensageiro (RNAm) extraído das células do tecido exposto, denominado expressão genética, permitindo avaliar as suas respostas ao ambiente que as rodeia, ao nível molecular (170).

A avaliação da expressão genética é uma parte importante de muitos estudos no âmbito das ciências da vida. A capacidade de quantificar o nível a que um determinado gene está a ser transcrito numa célula, tecido ou organismo pode fornecer informações preciosas relativamente aos processos e dinâmicas celulares.

Efetivamente, a expressão genética é atualmente muito utilizada em estudos biomédicos, quer a nível de diagnóstico quer a nível terapêutico, nomeadamente no

caso dos transplantes e na oncologia. A título de exemplo, sabemos que o principal objetivo nos casos dos transplantes renais é ser capaz de identificar os doentes que desenvolvem uma tolerância espontânea ao transplante, quando submetidos a imunossupressão clássica. Nesse sentido, existe uma necessidade crescente de desenvolver um teste para identificar e diferenciar esses doentes antes de ocorrer a rejeição, de forma a permitir uma intervenção mais precoce, no melhor interesse do doente. Existem vários estudos (171-174) cujo objetivo foi tentar discernir quais são esses biomarcadores de tolerância, graças ao perfil de expressão genética dos doentes. Os objetivos eram determinar quais são os genes expressos diferencialmente entre os vários grupos de doentes transplantados e conseguir prever o prognóstico clínico de um doente baseado no seu perfil transcriptómico. No caso da oncologia, e em particular do cancro da mama, tem sido feito um esforço enorme para tentar integrar a patologia convencional com o perfil genómico e com a genómica funcional, no sentido de identificar correlações genótipo-fenótipo nos diferentes subtipos de cancro da mama, para otimizar a orientação do tratamento. Ao conhecer as correlações genéticas que orientam o comportamento tumoral, é possível definir novas terapias para estes grupos de doentes com cancro (175-178).

No que diz respeito ao comportamento de biomateriais, ainda existem poucos dados disponíveis na literatura, mas Garrigues e colaboradores (179) usaram esta abordagem para estudar a resposta macrofágica de biomateriais particulados, analisando a expressão de vários genes. Os autores verificaram que havia *upregulation* dos genes TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MIP-1 α , em resposta à exposição com o biomaterial.

Num outro estudo recente, Markel e colaboradores (180) caracterizaram e quantificaram a reação inflamatória provocada por quatro materiais de substituição óssea diferentes (uma hidroxiapatite coralina e três produtos de matriz óssea desmineralizada). Foi apenas estudada a expressão genética da IL-1 após 14 dias de implantação subcutânea dos materiais. Como conclusão, os autores referem que encontraram evidência da existência de uma reação inflamatória significativa aquando da implantação de materiais de substituição óssea, sendo o produto de hidroxiapatite o que gerou a reação menos exuberante.

A reação da polimerase em cadeia (PCR) é um método amplamente utilizado *in vitro* para amplificar DNA, mas que, indiretamente, também pode ser aplicado na análise de sequências definidas de RNAm (170), após a conversão deste em cDNA, permitindo, assim, obter informação acerca da sua sequência e dos níveis transcricionais de um dado gene.

A PCR é, de longe, a técnica mais utilizada para amplificar uma sequência de DNA alvo e pode ser utilizada com DNA ou RNA (181). No caso do RNA, é necessário realizar previamente a transcrição reversa, usando para tal uma enzima específica, a transcriptase reversa. A RT-PCR é uma técnica que pode ser utilizada com as seguintes finalidades: comparar quantidades de RNAm em diferentes populações; caracterizar padrões de expressão de RNAm e para distinguir dois RNAm semelhantes (181). A RT-PCR pode ser feita na sua versão real-time, cuja quantificação é feita na fase exponencial da PCR ou em alternativa, a end-point PCR cuja quantificação apenas é feita no final das reações de amplificação (181). No que diz respeito a quantificação, esta pode ser relativa ou absoluta. A quantificação relativa é normalmente realizada através da normalização dos níveis de expressão dos genes alvo, mas também da que é relativa aos genes *housekeeping* (170).

A técnica da quantificação relativa com PCR em tempo real já foi utilizada para estudar biomateriais à base de osso bovino e expressão genética da fosfatase alcalina, da sialoproteína óssea e da osteopontina (182) e de colagénio tipo I, tipo II e agregano em condrócitos bovinos (183). Este tipo de técnica tem sempre em conta um quociente entre o gene alvo e o gene normalizador, de modo a garantir a uniformização dos resultados para evitar erros devidos a pequenas variações de amostra para amostra.

Todos os sistemas de amplificação em tempo real se baseiam na deteção e quantificação de uma molécula fluorescente, cujo sinal aumenta na mesma proporção do produto de amplificação gerado. O método mais simples envolve a deteção de um fluorocromo que se liga ao DNA, como o *SYBR Green*[®]. Este liga-se a cadeias duplas de DNA, sendo não específico do tipo de cadeia a ser amplificada. Na forma livre em solução, apresenta pouca fluorescência. O sinal emitido é proporcional à quantidade de DNA de cadeia dupla presente na amostra, e aumenta à medida que o alvo é

amplificado. Existem inúmeras abordagens metodológicas no que diz respeito à química usada neste tipo de reações. Outra das mais utilizadas inclui a utilização de sondas *TaqMan*[®], constituídas por um *reporter* e um *quencher*. Normalmente, o *reporter* e o *quencher* estão próximos e, portanto não há emissão de fluorescência; quando há annealing e extensão por amplificação da sequência catalisada pela DNA polimerase, a sonda liga-se ao alvo e a polimerase cliva a ligação existente entre eles, sendo o *reporter* separado do *quencher* e o sinal de fluorescência resultante é proporcional à quantidade de produto amplificado da amostra. As vantagens da utilização de sondas *TaqMan* é a especificidade, sendo a maior desvantagem o custo associado e o tempo de otimização.

Capítulo 2

Definição e Justificação dos Objetivos

Os materiais de substituição óssea são amplamente usados em procedimentos de Medicina Dentária, nas áreas de Implantologia, Periodontologia, Cirurgia Oral e Endodontia, em alternativa ou como complemento da utilização do osso autólogo. Uma vez que reúnem em si, de uma forma geral, as mesmas indicações, cabe exclusivamente ao clínico a escolha daqueles que utiliza, sob critérios que normalmente se prendem com o fator experiência clínica. Materiais tão distintos como um osso xenógeno porcino e uma hidroxiapatite sintética devem com certeza possuir diferenças no que diz respeito o seu desempenho biológico. Foi esta questão que nos catapultou para a execução deste trabalho: tentar perceber se o desempenho é realmente diferente, e tentar discernir quais são essas diferenças.

Temos sempre que fazer referência que este trabalho vem no seguimento de alguns outros estudos desenvolvidos sobre a temática da regeneração óssea, levados a cabo no Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Pretendemos, com este estudo, dar continuidade ao trabalho desenvolvido pelo grupo no qual estamos integrados, contribuindo com mais alguma informação na área do comportamento dos biomateriais. Pretendemos também ser pioneiros na colaboração com outros departamentos da Faculdade, em particular com o Laboratório de Genética da Professora Manuela Grazina, que encerra em si todo um potencial por explorar no sentido da clarificação da parte molecular das respostas do hospedeiro à implantação de biomateriais.

A elaboração desta dissertação tem como objetivo principal fazer a caracterização da resposta inflamatória pós implantação de um material xenógeno de origem porcina (Osteobiol®) e de um material de origem sintética (Bonelike®), em comparação com a reação inflamatória obtida no grupo controlo (*sham*).

Este estudo será feito essencialmente sob três perspetivas: a caracterização dos materiais, ao nível das suas propriedades físico-químicas; a avaliação histológica da resposta *in vivo* após implantação intramuscular em rato e a caracterização dessa resposta inflamatória baseada no estudo da expressão genética de determinados genes alvo e de genes de referência selecionados previamente.

Pretendemos com este estudo ajudar o clínico a estruturar a decisão de escolha do material mais adequado, segundo o perfil de inflamação que ele irá produzir e tentaremos também selecionar características passíveis de alteração, no sentido de modulação da resposta inflamatória, para que o resultado da utilização de substituintes ósseos seja o mais previsível possível, aumentando o nosso conhecimento acerca do seu desempenho.

Como objetivos específicos temos a enumerar:

- 1) Sendo ambos os materiais utilizados como equivalentes na prática clínica diária, serão as suas propriedades físicas também equivalentes? Parâmetros como a dimensão das partículas, a sua morfologia, a porosidade, a área de superfície, a densidade e a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade são semelhantes nos dois materiais?
- 2) E o que acontece com as propriedades químicas? A composição, a cristalinidade e o rácio Ca/P são iguais?
- 3) As características físico-químicas observadas na nossa análise estão de acordo com as descritas pelos fabricantes?
- 4) A nível histológico parâmetros como a quantidade de células inflamatórias por campo, a sua tipologia, a espessura da cápsula, a produção de fibrose e de colagénio são semelhantes aquando da implantação de um e do outro biomaterial?
- 5) Após a implantação intramuscular dos materiais, há uma reação sistémica associada, passível de ser medida através da alteração do número de transcritos dos genes das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias escolhidas?
- 6) E a reação local à implantação das partículas? É semelhante ou é diferente?

- 7) Fazendo o perfil da reação sistémica, há diferenças observáveis entre o material sintético e o xenógeno? Há alguns marcadores que caracterizem a resposta inflamatória?

- 8) Fazendo o perfil da resposta localizada ao tecido muscular, há diferenças entre os dois materiais?

Capítulo 3

Material e Métodos

O trabalho experimental desta Dissertação explanado foi realizado no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (sob supervisão da Professora Doutora Margarida Figueiredo), no Serviço de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (cujo responsável é o Professor Doutor António Cabrita) e no Laboratório de Bioquímica Genética – LBG – do Centro de Neurociências e Biologia Celular (cuja responsável é a Professora Doutora Manuela Grazina).

1. Materiais utilizados

Os dois biomateriais que avaliámos (Figura 10) foram selecionados a partir das múltiplas opções disponíveis no mercado português e foram os seguintes:

- um material xenógeno de origem porcina, formado por hidroxiapatite (HA) e colagénio do tipo I, com 80% de osso esponjoso e 20% de osso cortical (nome comercial Osteobiol® Gen-Os Mix (Tecness, Giaveno, Itália). Devido à baixa temperatura de processamento (130°C), acredita-se que o material preserve a estrutura e composição do osso natural (184). Esta temperatura é suficiente para eliminar completamente todos os elementos patogénicos potencialmente presentes.
- um substituto ósseo sintético patenteado, sendo formado por hidroxiapatite reforçada por partículas de vidro (185) (nome comercial: Bonelike®, Medmat Innovation, Porto, Portugal). Este material é preparado através da incorporação de um vidro de P₂O₅ na HA por meio de um processo de sinterização a altas temperaturas (1300°C durante 1 hora) em fase líquida (186, 187), o qual supostamente aumenta simultaneamente as propriedades mecânicas da HA e introduz iões comumente encontrados no tecido ósseo, em particular o magnésio, o sódio e o flúor (188-190). De acordo com os fabricantes, é composto por uma fase cristalina principal de HA e duas fases secundárias de α- e β-fosfato de tricálcio (191). O desempenho deste material deve-se à otimização da relação entre a fase menos solúvel da hidroxiapatite e a fase mais solúvel do fosfato tricálcio (186).

Quer os grânulos de xenoenxerto, com um tamanho relatado de 0,25 mm a 1,00 mm (versão indicada para utilização em procedimentos de Medicina Dentária), quer os grânulos do material sintético com uma gama de tamanho de partícula reportada entre 0,25 mm e 0,5 mm, foram caracterizados na forma exata como foram rececionados dos fabricantes.



Figura 10 – Materiais escolhidos para o estudo: Osteobiol® Gen-Os e Bonelike®.

2. Caracterização físico-química

A morfologia de ambos os materiais de enxerto foi avaliada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) num JEOL JSM 35C (Jeol Ltd, Tóquio), espalhando alguns grânulos dos materiais sobre uma fita condutora de carbono de dupla face. Os grânulos foram revestidos com spray de ouro e examinados sob uma tensão de aceleração de 10 kV. Além disso, a energia dispersiva de raios-X de espectroscopia (EDS), foi utilizada para determinar a razão Ca/P aproximada global em três pontos das amostras selecionados aleatoriamente.

A distribuição dos tamanhos das partículas foi determinada por espectrometria de difração a laser num Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra). Pelo menos três medições foram realizadas para cada amostra. O *software* do equipamento utilizado calculou automaticamente o tamanho médio das partículas e os respetivos parâmetros estatísticos, com nível de confiança de 0,95.

As informações sobre a porosidade e a distribuição de tamanho dos poros das amostras foram obtidas por porosimetria de intrusão de mercúrio (Poresizer 9320, Micromeritics Instrument Corp, EUA) numa gama de pressão entre 0,05 atm e cerca de 2,00 atm (correspondente a uma gama de diâmetros de poros entre 400 μm e 0,006 μm , respectivamente). A porosidade foi calculada como a razão entre o volume total de mercúrio intruído e o volume total da amostra (medido à pressão de intrusão mais baixa e que inclui o material sólido e os espaços vazios (isto é, interstícios e os poros abertos mais pequenos do que 400 μm)). Duas amostras de cada um dos materiais foram analisadas por esta técnica. Uma terceira amostra foi adicionalmente analisada se os valores de medição de porosidade diferiram em mais de 5%. Deve notar-se que esta técnica utiliza uma quantidade relativamente grande de material (assegurando assim a sua representatividade) que não pode voltar a ser utilizado (uma vez que é contaminado pelo mercúrio).

A densidade real das partículas (massa por volume de sólido, excluindo os espaços vazios), foi determinada por picnometria de gás (AccuPyc 1330, Micromeritics Instrument Corp, EUA), utilizando hélio. Pelo menos 10 corridas foram realizadas para cada amostra, e, no mínimo três amostras diferentes foram analisadas para cada material.

A superfície específica das amostras foi medida pela técnica de adsorção de azoto (ASAP 2000, Micromeritics Instrument Corp, EUA), utilizando o método de BET. As amostras analisadas por este método foram as mesmas que haviam sido submetidas ao teste para avaliação da porosimetria. Como foi anteriormente mencionado, pelo menos duas amostras independentes foram medidas para cada material, utilizando os mesmos critérios de validação.

Para a análise de ângulo de contacto, os materiais foram prensados na forma de pastilha com uma prensa hidráulica manual. Cerca de 100 mg de grânulos foram compactados numa matriz de 8 mm e comprimidos com uma força de 100 bar aplicada durante 30s. Os ângulos de contato estático foram obtidos usando o método da gota sésil com um analisador de ângulo de contacto Dataphysics OCA-20 (DataPhysics

Instruments, Alemanha). O valor do ângulo de contacto final obtido para cada material é a média de pelo menos cinco medições independentes.

As informações sobre a composição química foram obtidas por espectroscopia de infravermelhos Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Os espectros foram registados na faixa de 400-4000 cm^{-1} utilizando um espectrómetro JASCO 4200 (Jasco Analytical Instruments, EUA) a operar no modo de transmissão. Os materiais foram misturados com brometo de potássio (KBr) e comprimidos em forma de discos, com uma prensa manual. A recolha de dados foi realizada com uma resolução espectral de 4 cm^{-1} e 32 scans, à temperatura ambiente.

Os padrões de difração de raios X (XRD) foram colhidos utilizando um difratómetro X-PERT (Philips, Holanda), calibrado na configuração Bragg-Brentano com radiação Co-Ka ($\lambda=1,78897 \text{ \AA}$). Os espectros foram registados no intervalo de $10^\circ < 2\theta < 100^\circ$ com um intervalo de $0,025^\circ$ e um tempo de 0,5 s. A identificação das fases foi realizada por comparação dos padrões de difração obtidos com os da base de dados fornecida pelo ICDD (International Centre for Diffraction Data).

3. Avaliação *in vivo*

3.1. Amostra

Foram utilizados 15 ratos Wistar (Laboratórios Charles River, Espanha), com 12 semanas e peso médio de 320 gramas, criados e mantidos nas condições exigidas pela legislação da União Europeia em vigor, no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os animais foram aleatoriamente distribuídos por 3 grupos experimentais, cada um com 5 animais: Grupo I – aplicação de material xenógeno (Osteobiol®), Grupo II – aplicação de material sintético (Bonelike®) e Grupo III – grupo de controlo. Os animais dos grupos I e II receberam os respetivos materiais e o grupo controlo foi sujeito ao mesmo protocolo, mas injetado com solução salina, com o

objetivo de analisar a resposta inflamatória gerada pelo próprio procedimento de injeção do material.

3.2. Procedimento experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de acordo com a portaria nº 1005/92 de 23/10/1992, que regulamenta as normas técnicas de proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.

Previamente à realização do protocolo anestésico, procedeu-se à colheita de sangue utilizando a veia da cauda dos ratos. Foram colhidos cerca de 2 ml de sangue por cada rato dos grupos I e II e imediatamente colocados em tubos PAXgene Blood RNA System® (PreAnalytix, Hombrechtikon, Alemanha) (Figura 11).



Figura 11 – Colheita de sangue da veia da cauda do rato e colocação em tubos PAXgene Blood RNA System®.

Após a anestesia (10 ml de ketamina 10 mg/ml (Ketalar®) e 2ml de clorpromazina 50mg/2ml (Largactil®)), foi executada a desinfecção do campo operatório com solução

de clorhexidina a 2%. Para melhor identificação dos locais de injeção, foi feita a tricotomia na zona de aplicação, sendo posteriormente injetados 5 mg de cada biomaterial nos músculos lombares de cada rato. Os materiais foram comprimidos na seringa de injeção, sem a adição de nenhum veículo por ser menos traumático para o animal e para minimizar a interferência de outras substâncias na reação inflamatória.

A eutanásia foi executada uma semana mais tarde respeitando protocolos éticos (sobredosagem anestésica).

Procedeu-se novamente à colheita de sangue utilizando a veia da cauda dos ratos. Foram colhidos cerca de 5 ml de sangue por cada rato da amostra e imediatamente colocados em tubos PAXgene Blood RNA System® (PreAnalytix, Hombrechtikon, Alemanha).

Imediatamente após o sacrifício, colheu-se uma amostra dos tecidos da região sujeita à implantação, juntamente com tecido peri-implantar circundante, e fixou-se em solução formalina a 4% (pH 7,4), durante 24 horas. Posteriormente, os fragmentos foram descalcificados, durante 72 horas, em EDTA 10% a 37°C e subsequentemente desidratados por imersão em soluções alcoólicas de concentração crescente. Foram incluídos em parafina e posteriormente cortados com recurso a um micrótomo Shandon Finesse 325® (Thermo Electron Corporation, EUA) e as lâminas histológicas coradas segundo as técnicas hematoxilina e eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM). Paralelamente à colheita de amostras para estudo histológico, foi realizada a colheita de amostras para estudos de expressão génica (3.4.1).

Para além da colheita dos implantes no tecido muscular lombar, foram também colhidos os órgãos que constituem uma necropsia normal, para eliminar a existência de possíveis infeções sistémicas, que alterem os resultados obtidos, ou qualquer outro fator passível de interferência. Desta lista fazem parte amostras de fígado, baço, pulmão direito, pulmão esquerdo, rim direito, rim esquerdo e coração para análise histológica de rotina (coloração HE) e medição do baço. Foram também registadas as informações constantes na ficha de necropsia do Serviço de Patologia Experimental: peso no momento do sacrifício, comprimento focinho-ânus e focinho-ponta da cauda,

hora do sacrifício, número do rato na gaiola e número que identifica o rato no estudo experimental, bem como o grupo do qual faz parte (teste I, teste II ou controlo).

A análise histológica foi realizada por dois investigadores independentes, com recurso a um microscópio de diagnóstico Nikon Eclipse E200® (Nikon Corporation, Japão). O resultado da interface tecido-biomaterial foi avaliado atendendo não só ao leito de implantação mas também ao tecido peri-implantar. A extensão da resposta inflamatória foi descrita usando os seguintes parâmetros: número de células inflamatórias por campo, fibrose, hemorragia, produção de colagénio, vascularização e espessura da cápsula.

Como a inflamação é normalmente caracterizada pela presença de múltiplos tipos de células, como macrófagos, monócitos e linfócitos, células plasmáticas e células gigantes multinucleadas (192), uma metodologia semi-quantitativa com base no número total destas células por campo foi implementada, a fim de classificar a intensidade da resposta inflamatória provocada por ambos os materiais, concretizando as diferenças observadas. Realizámos a contagem do número total das referidas células por campo, e classificámos o grau de inflamação segundo os critérios descritos na tabela 4 (193):

Tabela 9 - Critérios utilizados para classificar o grau de inflamação despoletado pelos materiais de regeneração óssea.

Score	Grau de inflamação	Número de células inflamatórias por campo
0	Ausência de inflamação	Nenhuma
1	Inflamação leve	< 25
2	Inflamação moderada	25-125
3	Inflamação grave	>125

As fotografias das lâminas foram realizadas com recurso a uma câmara digital com unidade de controlo Nikon Coolscope® (Nikon Corporation, Japão).

Na necropsia, além da colheita dos fragmentos-alvo, foram também registados os dados referentes à observação do hábito externo, observação detalhada do hábito interno e fragmentos de tecidos colhidos e respetiva finalidade, em modelo próprio em utilização no Laboratório do Serviço de Patologia Experimental. Também foram colhidas amostras de pulmão, fígado, baço, coração e rim para eliminar qualquer outra patologia sistémica que pudesse interferir com os resultados obtidos.

3.3. Processamento e Isolamento de RNA total das amostras

3.3.1. Tratamento do material

Todo o material utilizado para o estudo de RNA foi previamente tratado com dietilpircarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), com o objetivo de eliminar as RNases. Este tratamento consistiu em colocar o material numa solução 0,1% de DEPC, durante 2 horas, a 37°C, tendo este sido de seguida autoclavado durante 15 minutos a 120°C.

3.3.2. Processamento das amostras de músculo

As amostras de músculo lombar dos ratos Wistar foram extraídas imediatamente após a eutanásia do animal por sobredosagem anestésica, e colocadas em RNAlater RNA Stabilization Reagent® (Qiagen, Ambion, Texas), para preservação do RNA, com uma quantidade de aproximadamente 10 µl de reagente por 1 mg de tecido conforme recomendação do fabricante. As amostras foram posteriormente congeladoras e mantidas a -20°C até à extração.

O RNA total dos músculos foi extraído recorrendo ao RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Ambio, Texas) numa área reservada para o efeito. Depois de removido o fragmento de tecido do *RNA Later*®, procedeu-se à disrupção e homogeneização celular, usando tampão

RLT (600 µl) com β-mercaptoetanol como solvente. O lisado foi centrifugado durante 3 minutos, após o que o sobrenadante foi removido e foi adicionado o mesmo volume (600 µl) de etanol a 70%. Transferiram-se 700 µl para uma coluna colocada e procedeu-se à centrifugação durante 15'' a 10.000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento até utilização do volume disponível. Adicionaram-se 700 µl de tampão RW1 à coluna e submeteu-se a centrifugação durante 15'' a 10.000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante. Adicionaram-se 500 µl de tampão RPE e centrifugou-se durante 15'' a 10.000 rpm. Adicionaram-se 50 µl de água livre de RNase e centrifugou-se durante 1' a 10.000 rpm eluir o RNA. As amostras foram armazenadas -20°C, até à determinação da sua concentração e integridade.

3.3.3. Processamento das amostras de sangue

O sangue foi recolhido para tubos *PAXgene Blood RNA System*[®] (PreAnalytix, Hombrechtikon, Alemanha). A extração de RNA total do sangue foi realizada recorrendo ao *PAXgene Blood RNA Kit*[®] (PreAnalytix, Hombrechtikon, Alemanha). Os tubos Paxgene[®] foram centrifugados durante 10' a 5.000 rpm. Adicionaram-se 5 ml de água livre de RNase free. Ressuspenderam-se os sedimentos em 360 µl de tampão BR1 e adicionaram-se 300 µl de tampão BR2 e 40 µl de Proteinase K. As amostras foram incubadas a 55°C, sob agitação, durante 10 minutos, tendo sido centrifugadas a 16.100 rpm. Adicionaram-se 350 µl de Etanol (96-100%) ao sobrenadante. A mistura foi colocada em colunas *PAXgene RNA spin Column*[®] e sujeita a centrifugação durante 1 minuto a 9.300 rpm. Adicionaram-se 700 µl de tampão BR3 ao sobrenadante, repetindo-se o processo. Adicionaram-se 500 µl de tampão BR4 e repetiu-se a centrifugação. Adicionaram-se 40 µl de tampão BR5 e repetiu-se a centrifugação. A solução de RNA foi guardada, devidamente identificada, a -20°C, até determinação da sua concentração e integridade.

3.4. Análise da pureza, integridade e quantificação de RNA

3.4.1. Análise da pureza e quantificação de RNA por espectrofotometria

As soluções de RNA foram quantificadas num espectrofotómetro Nanodrop 1000® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), medindo-se a concentração de RNA e a pureza de todas as amostras (músculo e de sangue), relativamente à presença de proteínas, por leitura das densidades óticas adequadas (260 e 280 nm). Desta análise obteve-se a informação da concentração de RNA presente, a 260 nm e do quociente 260/280 nm, tendo sido este valor usado para aferir a pureza do RNA, sendo geralmente aceitável um valor de 1,8-2,0 para ser considerado “puro”. Se o resultado fosse inferior, poderia indicar a presença de contaminantes que absorvam numa gama próxima dos 280 nm, como é o caso das proteínas.

3.4.2. Avaliação de integridade de RNA através da determinação do RIN

A integridade e qualidade das amostras de RNA extraídas é crucial para a validade dos resultados obtidos em estudos de avaliação da expressão genética através dos transcritos. No presente trabalho, as amostras de sangue periférico e de tecido muscular foram analisadas usando o RNA 6000 Nano LabChip® kit, o aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Walbronn, Alemanha) e o software 2100 Expert®, o que permitiu obter informação sobre a integridade do RNA e quocientes ribossómicos (rRNA18S/rRNA28S), bem como da sua concentração, sendo este um segundo método para determinar a quantidade de RNA presente numa amostra.

Este método baseia-se numa separação eletroforética capilar das amostras de RNA nos *RNA 6000 Nano chips*®, sendo a deteção realizada por fluorescência e traduzida num eletroferograma. São apresentados os valores de quocientes ribossómicos, número de integridade de RNA (RIN) e de concentração de RNA (exemplo na Figura 12). O RIN é

calculado através de um algoritmo que permite obter a indicação da integridade do RNA. Foram definidas 10 categorias para a avaliação do RIN, desde 1, que representa RNA completamente degradado, até 10 que representa RNA íntegro. Os valores de RIN compreendidos entre 8 e 10 são considerados como indicadores para prosseguir os estudos nas amostras biológicas a analisar (194).

Para o ensaio, usou-se 1 µl de cada amostra e do marcador de peso molecular “RNA Ladder”.

As amostras que apresentavam baixos valores de RIN ou em que era observada a presença de contaminantes, foram sujeitas a um tratamento com DNase seguido de re-extração, de acordo com o método referido anteriormente.

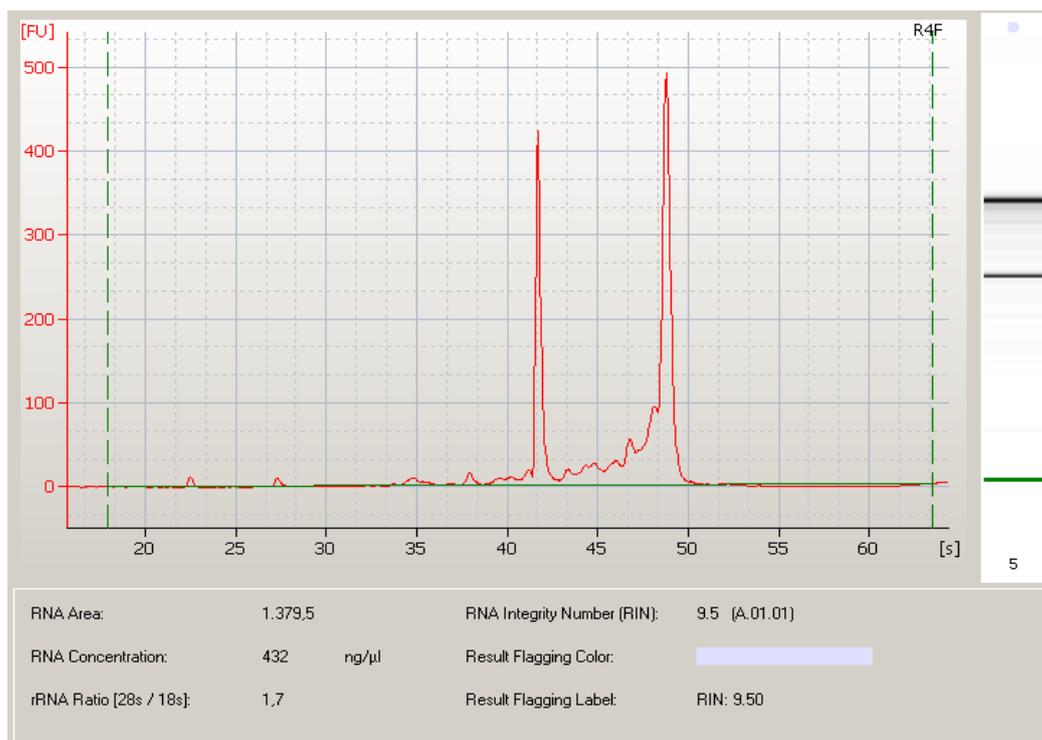


Figura 12 – Exemplo de electroferograma, onde são visíveis informações dos valores de quocientes ribossómicos, do número de integridade de RNA (RIN) e da concentração de RNA em ng/µl.

3.5. RT-PCR

A reação de transcrição reversa permite sintetizar DNA complementar (cDNA) a partir de amostras de RNA total e foi realizado para utilização posterior das amostras de cDNA na quantificação de expressão genética por PCR em tempo real. A síntese de cDNA foi realizada com o *High Capacity RNA-to-cDNA Kit*[®] (Applied Biosystems). Ao RNA (9 µl) foi adicionada a Master Mix (10 µl) e 1 µl de enzima (transcriptase reversa), para totalizar 20 µl por reação. Utilizou-se uma combinação de mistura aleatória de hexâmeros (random hexamers) com oligonucleótidos. Para realizar as reações de síntese, foi usado um termociclador com programação de 60 minutos a 37°C e 5 minutos a 95°C. Foi utilizado um controlo negativo para controlar a possível existência de contaminação na amplificação posterior por PCR em tempo real). As amostras de cDNA foram guardadas a -20°C até à análise posterior.

3.6. Normalização

Para proceder à normalização dos resultados obtidos na análise por PCR em tempo real, é absolutamente necessário selecionar genes de referência (controlos endógenos). Para isso foi utilizado o *Rat geNorm kit*[®] que contém um painel de 12 genes (Primerdesign, Inglaterra): *18S RNA ribossomal* (codifica RNA ribossomal 18S), *ATP5B* (codifica sintetase de ATP), *TOP1* (codifica topoisomerase I), *MDH1* (codifica malato desidrogenase I), *CYC1* (codifica citocromo c-1), *CANX* (codifica calnexina), *RPL13A* (codifica proteína ribossomal L13), *YWHAZ* (codifica tirosina 3-monooxigenase), *B2M* (codifica beta-2 microglobulina), *UBC* (codifica ubiquitina), *GAPD* (codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e *ACTB* (codifica actina beta).

Para a determinação dos genes de referência a usar, foram analisadas de forma aleatória 4 amostras aleatórias de sangue (2 pares inicial/final) e 3 de tecido muscular (uma do grupo controlo, injetado com solução salina; uma do grupo do material

xenógeno e uma do grupo do material sintético), de acordo com a metodologia de PCR em tempo real descrita na secção 3.7. PCR em tempo real.

Após a realização destas reações interpretaram-se os resultados obtidos recorrendo aos *softwares* *geNorm*[®] e *qbasePLUS*[®]. A informação obtida permitiu determinar quais os controlos a utilizar como genes de referência no ensaio. Após este procedimento, procedeu-se à análise dos transcritos, por PCR em tempo real, para todas as amostras em estudo, usando os genes selecionados como controlos endógenos de referência para normalização da expressão.

3.7. PCR em tempo real

No presente trabalho, estudaram-se cinco genes de interesse, três citocinas: *IL-1 β* , *IL-6* e *TNF- α* , e duas quimiocinas: *CCL2* e *CCL3*, todos importantes e determinantes no processo de inflamação.

Os genes *CYC1* e *RPL13A* foram utilizados como controlos endógenos para as amostras de sangue e os genes *CYC1* e *ATP5B* como controlos endógenos para as amostras de músculo, após aplicação do ensaio de normalização (ver secção 3.6. Normalização).

A PCR em tempo real (qPCR-RT) permite avaliar a expressão genética, na medida em que possibilita a quantificação de mRNA numa grande variedade de amostras biológicas. Este método é recente, sendo cada vez mais usado devido à sua alta sensibilidade e boa reprodutibilidade.

Em contraste com a PCR convencional, a PCR quantitativa permite a acumulação dos produtos amplificados de forma exponencial, permitindo a sua deteção e quantificação enquanto a reação está a ocorrer, isto é, em tempo real. Assim, mede-se a acumulação de produtos de PCR durante a fase exponencial da reação, sem ser necessária a sua manipulação, diminuindo o risco de contaminação (195, 196). A técnica baseia-se no uso da *Taq DNA polimerase*, uma enzima com atividade de exonuclease 5' → 3', e no uso de dois *primers* específicos para cada gene em estudo. Estas moléculas são *DNA-*

binding dyes e incorporam-se nas cadeias duplas de DNA, que se formam durante a reação de PCR, emitindo fluorescência apenas após se intercalarem no DNA (Figura 13). Inicialmente a fluorescência permanece no nível basal (só existe DNA de cadeia simples). À medida que se acumula o produto amplificado, começa a ser emitido um sinal de fluorescência detetável, que é proporcional à quantidade de produto amplificado na amostra. A maior vantagem deste método de deteção é que se pode usar SYBR® Green com qualquer par de *primers* e com qualquer sequência alvo. A maior desvantagem deste método é o facto do SYBR® Green se ligar a qualquer cadeia dupla de DNA, não detetando apenas a sequência alvo, mas marcando também produtos não específicos de PCR e dímeros de *primers* (197). Nesse sentido, a otimização dos ensaios é crucial para a fiabilidade dos resultados obtidos.

Utilizou-se uma mistura 2x *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* e os *primers*, específicos para os genes em estudo, 10x *QuantiTect Primer Assay*.

As reações de amplificação de cDNA realizaram-se com 40 ciclos de amplificação: 15'' a 94°C, para a desnaturação, 30'' a 55°C, para o emparelhamento dos *primers*, e 30'' a 72°C, para a extensão e captação da fluorescência do SYBR Green.

Após a reação, é obtido o Ct (*cycle treshold*), que corresponde ao ciclo em que a quantidade de fluorescência ultrapassa um limiar definido. A quantidade de mRNA relativa é dada por ΔCt , que é a diferença entre os valores de Ct para a amostra alvo e o controlo endógeno.

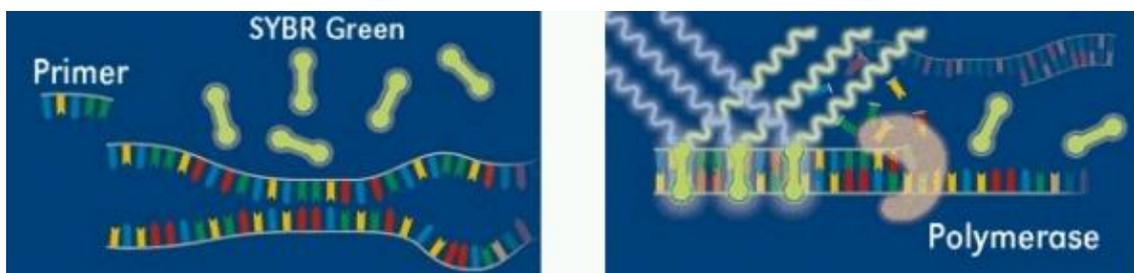


Figura 13 – Forma de atuação do SYBR Green: quando se encontra livre não emite qualquer fluorescência; quando ligado ao DNA de cadeia dupla, emite fluorescência, sendo esta diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado. Adaptado de <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>.

A quantificação relativa utilizando os genes de referência foi realizada pelo método de Livak, também conhecido como o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (198).

3.8. Análise estatística

Os resultados são apresentados na forma de média \pm erro padrão, mínimo e máximo para cada grupo. O teste de normalidade de Agostino e Pearson omnibus foi realizado para investigar se os dados seguiam uma distribuição Gaussiana. Nos casos em que os resultados seguiam uma distribuição de Gauss, o teste paramétrico de t foi utilizado para analisar as diferenças entre os dois grupos. Nos casos em que os resultados não obedeciam à curva de Gauss, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar as diferenças entre os dois grupos de amostras (emparelhando o nível de transcrição inicial e final para cada gene e para cada material). A análise de One-way ANOVA foi utilizada para avaliar comparações múltiplas paramétricas. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para realizar a comparação não paramétrica entre três ou mais grupos.

A diferença foi considerada estatisticamente significativa se $p \leq 0,05$ (asteriscos nos gráficos indicam diferenças significativas em comparação com os controles: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$; **** para $p < 0,0001$). A análise estatística foi efetuada com recurso ao software GraphPad Prism® versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) (199).

Capítulo 4

Resultados

1. Caracterização físico-química

Na Figura 14 é dada uma visão geral da forma e do tamanho dos grânulos de xenoenxerto (Osteobiol®) e de hidroxiapatite sintética (Bonelike®), enquanto que os detalhes da sua morfologia de superfície podem ser observados nas Figura 15 e Figura 16. As últimas figuras também incluem espectros EDS representativos de ambos os materiais. A análise por SEM revela que as partículas de Bonelike® são aproximadamente cilíndricas, de contornos redondos, com uma superfície lisa e quase monodispersa. Por outro lado, os grânulos de Osteobiol® são maiores, altamente irregulares, com extremidades afiadas e polidispersas.

A composição química da superfície obtida através de análise EDS (Figura 15 d) e Figura 16 d)) comprova a presença dos elementos normalmente encontrados no tecido ósseo, sendo a mais relevante a presença de cálcio (Ca) e de fósforo (P). A proporção Ca/P determinada (em % atômica; média de três medições realizadas em diferentes pontos da amostra) está sumarizada na Tabela 10.

Tabela 10 – Razões Ca/P obtidas para os dois biomateriais testados: Osteobiol® e Bonelike®, através de EDS.

Material	Razão Ca/P
Bonelike®	1.28 – 1.42
Osteobiol®	1.55 – 1.95

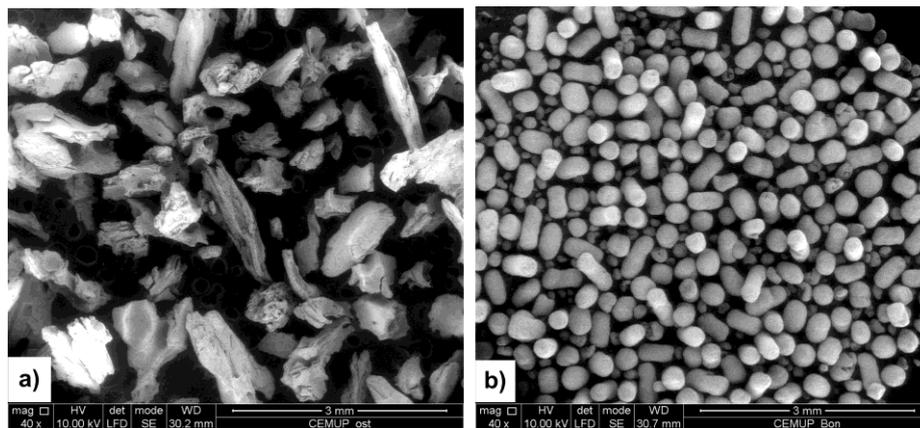


Figura 14 – Imagens de SEM: a) Osteobiol™; b) Bonelike™ (ampliação de 40×).

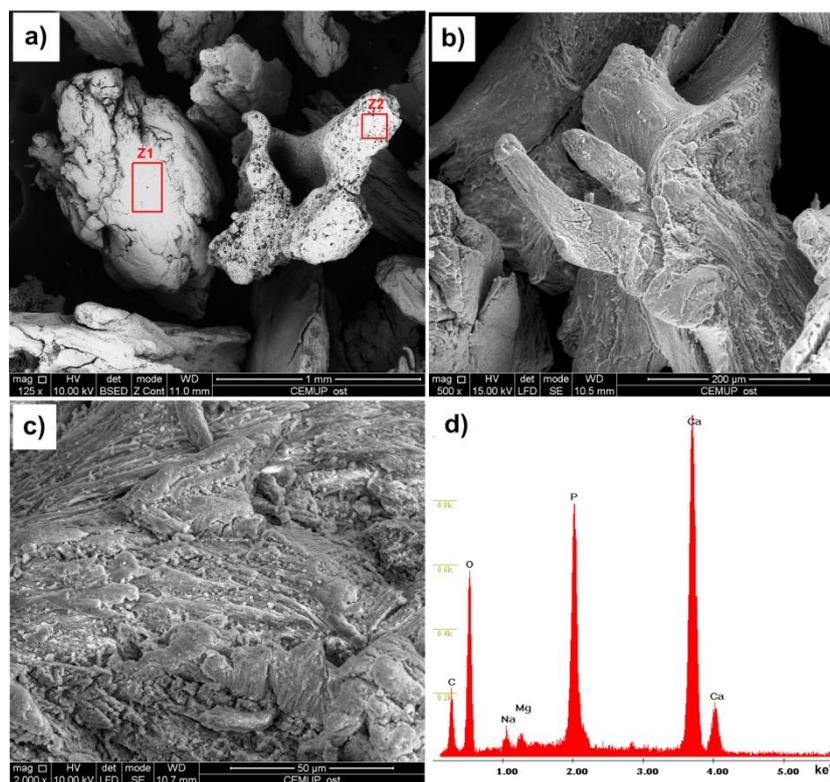


Figura 15 – Imagens das partículas de Osteobiol™ com diferentes ampliações: a) 125x; b) 500x; c) 2000× espectro EDS representativo (d).

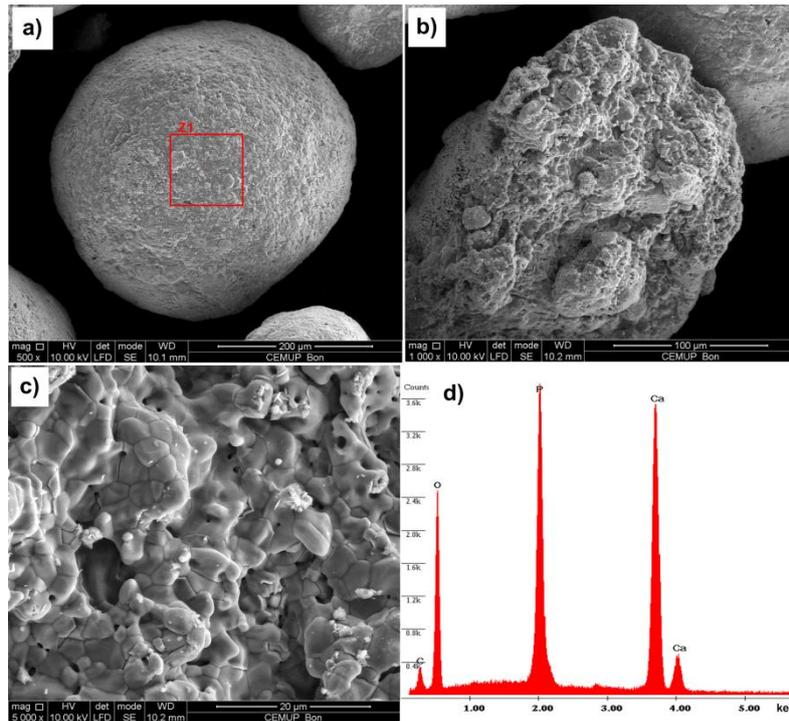


Figura 16 - Imagens das partículas de Bonelike™ com diferentes ampliações: a) 500x; b) 1000x; c) 5000× e espectro EDS representativo (d).

As propriedades dos dois materiais, no que diz respeito a distribuição do tamanho das partículas, a área de superfície específica, a porosidade, a distribuição do tamanho dos poros e a densidade estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11 – Distribuição dos tamanhos das partículas, área de superfície específica, porosidade e densidade dos grânulos de Osteobiol® e Bonelike®.

Técnica	Informação obtida	Parâmetros	Osteobiol®	Bonelike®
Difração laser	Distribuição do tamanho das partículas*	D ₁₀ (µm)	298	14.3
		D ₅₀ (µm)	672	326
		D ₉₀ (µm)	1330	510
Adsorção nitrogénio	Área de superfície	Área de superfície específica (m ² g ⁻¹)	9.404	0.636

		Volume intruído ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	0.54	0.35
Porosimetria por intrusão de mercúrio	Distribuição do tamanho dos poros, porosidade	Volume intruído em poros menores que $10 \mu\text{m}$ ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	0.068	0.046
		Porosidade [#] (%)	53	48
		Densidade esquelética [§] (g cm^{-3})	2.11	2.69
	Picnometria com hélio	Densidade	Densidade real (g cm^{-3})	2.39

* D_{10} , D_{50} , D_{90} – Diâmetros das partículas correspondentes a 10, 50 and 90% da curva de distribuição normal.

[#] Correspondente a poros < $400 \mu\text{m}$.

[§] Calculada com base no volume de mercúrio intruído na pressão máxima (2000 atm).

As curvas de distribuição dos tamanhos das partículas encontram-se ilustrados na Figura 4, enquanto a Tabela 11 apresenta os resultados obtidos no que respeita ao tamanho das partículas, em termos de diâmetro médio (D_{50}), bem como a gama de tamanhos na qual as partículas se inserem, expressa pelos 10% e 90% (percentil D_{10} e D_{90}). Estes resultados mostram que as partículas de Osteobiol[®] são consideravelmente maiores do que as do Bonelike[®] ($672 \mu\text{m}$ e $326 \mu\text{m}$ de tamanho médio, respetivamente), confirmando as observações microscópicas. Além disso, a distribuição de tamanho do Osteobiol[®] é essencialmente monomodal, enquanto que no caso do Bonelike[®] apresenta uma moda secundária de cerca de $15 \mu\text{m}$.

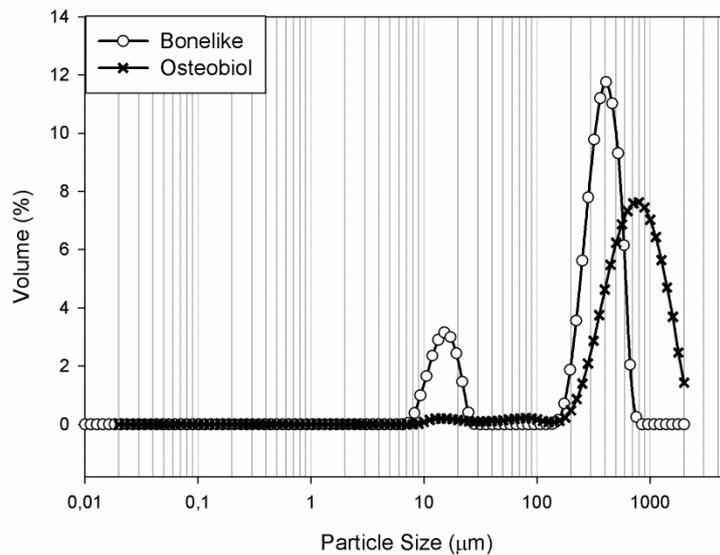


Figura 17 – Distribuição do tamanho das partículas dos grânulos de Osteobiol® e de Bonelike®, medido por espectrometria de difração laser.

A área de superfície específica dos dois materiais foi determinada pela adsorção de N₂. Os valores obtidos utilizando os métodos BET estão listados na Tabela 11. Como se demonstra, a área de superfície específica do Osteobiol® é consideravelmente mais elevada do que a do Bonelike®, apesar do menor tamanho das partículas dos grânulos de Bonelike®.

As curvas da porosimetria por intrusão de mercúrio (volume cumulativo intruído vs diâmetro dos poros) estão representadas na Figura 18. O volume de mercúrio intruído em conjunto com os valores da porosidade estão listados na Tabela 11. Como pode ser realçado, valores próximos de 50% foram determinados para ambas as amostras. No entanto, como também está quantificado na Tabela 11, a maior parte desta porosidade refere-se a espaços interparticulares e não aos poros internos das partículas (somente cerca de 12% da porosidade total corresponde a poros menores que 10 µm).

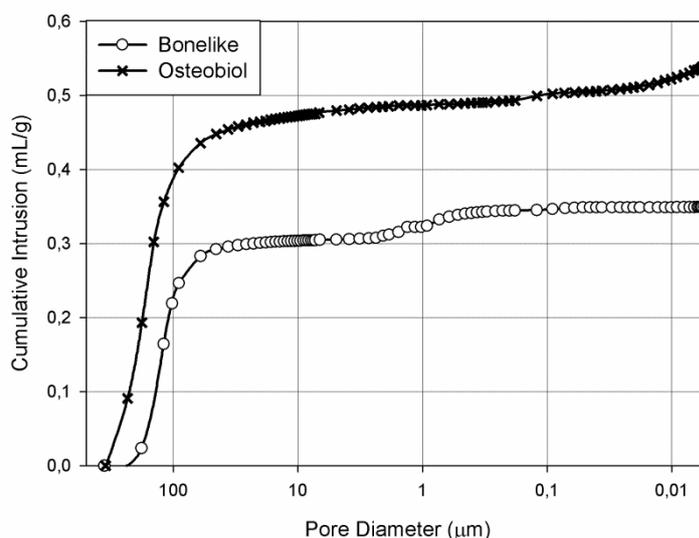


Figura 18 – Curvas de intrusão cumulativa de mercúrio do Bonelike® e do Osteobiol®.

A densidade real (também chamada de densidade absoluta) foi determinada por picnometria de gás (Tabela 11). Os valores medidos parecem ser consistentes com a composição das amostras: no caso do Osteobiol® é inferior ao da hidroxiapatite ($3,16 \text{ g cm}^{-3}$) (200), tal como era esperado para uma amostra colagenada; no caso do Bonelike® um menor valor do que o da hidroxiapatite foi também verificado, devido à sua constituição (fases secundárias de α - e β -TCP com densidades teóricas de $2,86 \text{ g cm}^{-3}$ e $3,07 \text{ g cm}^{-3}$, respetivamente (64)).

Os padrões de difração de raios X do Bonelike® e do Osteobiol® estão representados nas Figura 19 a) e Figura 19 b), respetivamente. Estes padrões obtidos foram comparados com os padrões de difração da hidroxiapatite pura (JCPDS n.º 09-432), do α -TCP (JCPDS n.º 29-0359) e do β -TCP (JCPDS n.º 86-1585) e os picos atribuídos a estas três fases foram sinalizados.

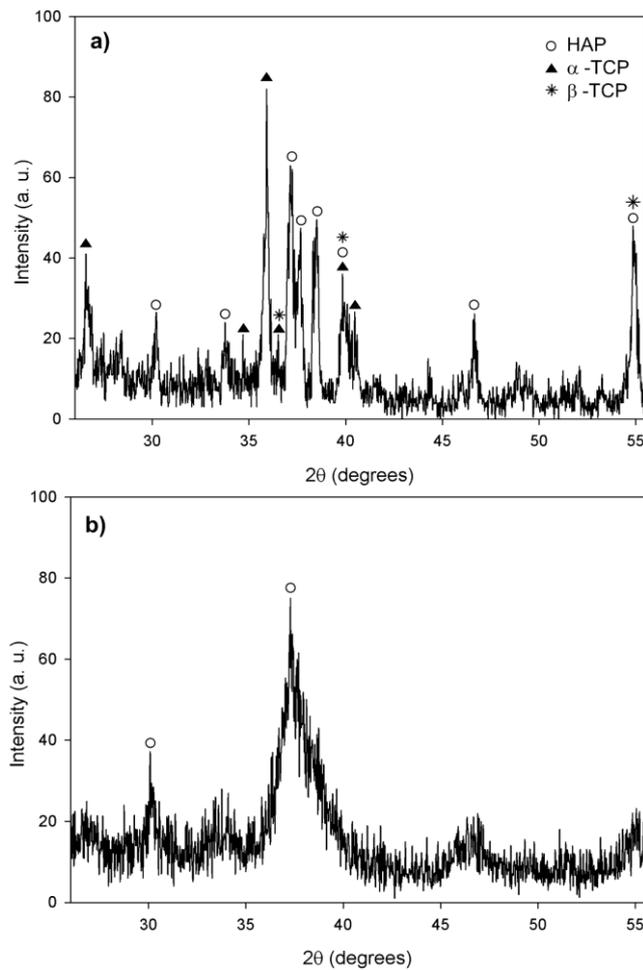


Figura 19 - Difractogramas de: a) Bonelike®; b) Osteobiol®.

Os espectros de FTIR dos dois materiais de enxerto estão ilustrados na Figura 20. No espectro respetivo ao Bonelike® (Figura 20 a), é possível identificar as bandas características do grupo fosfato (PO_4^{3-}), presentes em ambos os materiais HA e TCP (bandas ν_3 em 1089 e 1044 cm^{-1} , bandas ν_1 a 968 cm^{-1} , bandas ν_4 a 600 e a 570 cm^{-1} e banda ν_2 a 470 cm^{-1} (201, 202). Também detetáveis são as bandas atribuídas ao ião hidroxilo (OH^-), na hidroxiapatite, que aparecem como um pico acentuado aos 3577 cm^{-1} (alongamento de vibração) e aos $\sim 635\text{ cm}^{-1}$ (banda de libertação) (64, 65). A banda larga entre $3600\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ corresponde à vibração do grupo O-H nas moléculas de água presentes no material. Também é interessante notar a presença de duas bandas de baixa intensidade na região das vibrações C-H ($2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$). Isto é

provavelmente originado por algumas impurezas de natureza orgânica. A presença de carbono residual foi também detetado no espectro EDS deste material (Figura 16 d).

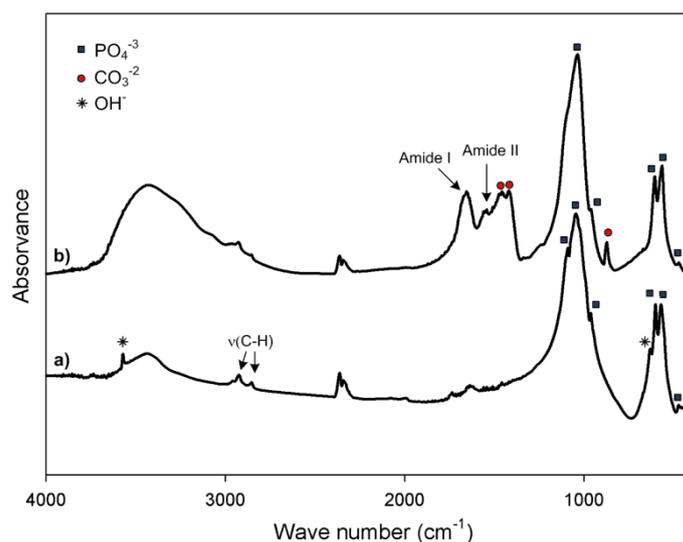


Figura 20 – Espectros de FTIR de: a) Bonelike®; b) Osteobiol®.

Tal como esperado, o espectro de FTIR do Osteobiol® (Figura 20 b) é muito semelhante aqueles previamente registados de amostras de suínos ou amostras de ossos humanos (63), mostrando as bandas típicas do colagénio (bandas da amida I ($\sim 1660\text{ cm}^{-1}$) e da amida II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) (64)) e da hidroxiapatite (as vibrações do grupo PO_4^{3-}). Ao contrário do espectro do Bonelike®, neste espectro são também visíveis algumas bandas atribuídas às vibrações do grupo carbonato (a banda ν_3 , que aparece como uma banda dupla entre 1400 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} , e a banda $\nu_2 \sim 878\text{ cm}^{-1}$), o que revela a estrutura carbonatada (natural) da hidroxiapatite presente neste material (66). Por outro lado, as bandas de vibração do OH^- não são detetáveis.

O carácter hidrofílico / hidrofóbico do Osteobiol® e do Bonelike® foi, como descrito anteriormente, avaliado através da medição do ângulo de contacto pelo método da gota séssil. Para o Bonelike®, foi obtido um valor de ângulo de contato de $26,7 \pm 4,3^\circ$, enquanto que para o Osteobiol® o valor medido foi de $51,4 \pm 7^\circ$. Estes resultados indicam que ambos os materiais são hidrofílicos.

2. Avaliação da resposta *in vivo*

A amostra utilizada no estudo experimental é caracterizada pelo seguinte conjunto de informações.

Tabela 12 – Resumo das características dos animais utilizados neste estudo experimental. T1 – Grupo teste 1 (Osteobiol®), T2 – Grupo teste 2 (Bonelike®), C – Grupo controlo (injetado com solução salina).

Rato	Grupo	Peso no sacrifício (g)	Comprimento focinho-ponta da cauda (cm)	Comprimento focinho-ânus (cm)	Fígado (g)	Baço (g)	Pulmão direito (g)	Pulmão esquerdo (g)	Rim Direito (g)	Rim esquerdo (g)	Coração (g)
1	T1	315,19	42,0	22,5	13,32	0,75	1,00	0,48	1,07	1,10	0,96
2	T1	306,93	41,5	22,0	10,75	0,64	0,97	0,44	0,99	1,03	0,90
3	T1	287,10	41,0	22,5	10,69	0,68	0,75	0,40	1,01	0,99	0,92
4	T1	283,48	41,0	22,0	11,56	0,63	1,14	0,63	1,09	1,12	0,97
5	T1	351,19	42,0	23,5	14,30	1,08	0,92	0,52	1,19	1,09	1,20
6	T2	252,95	42,0	23,5	15,71	0,87	0,89	0,51	1,29	1,22	1,31
7	T2	312,65	40,0	23,0	11,48	0,53	1,06	0,48	1,05	1,01	1,03
8	T2	293,18	39,5	23,0	10,49	0,68	0,83	0,42	0,97	0,89	1,14
9	T2	317,26	42,5	23,0	12,93	0,73	1,16	0,49	0,95	0,96	1,26
10	T2	332,27	41,0	23,0	13,71	1,02	1,23	0,66	1,33	1,22	1,06
11	C	252,78	37,0	21,0	13,56	0,79	1,02	0,56	1,29	1,27	1,62
12	C	261,30	36,5	21,0	14,05	0,73	1,15	0,51	1,41	1,39	1,32
13	C	302,60	41,0	22,5	14,35	0,83	0,98	0,54	1,07	1,08	1,34
14	C	305,65	41,5	23,0	10,78	0,96	0,87	0,49	1,12	1,12	1,22
15	C	290,50	42,0	23,5	11,43	1,02	1,06	0,45	1,24	0,98	1,09

Aquando da necropsia foram colhidos os órgãos presentes na Tabela 12, nomeadamente o fígado, baço, pulmão (direito e esquerdo), rim (direito e esquerdo) e coração, para descartar alguma possível patologia não induzida.

Para todos os animais utilizados não foi encontrada nenhuma outra patologia sistêmica, passível de interferir com os resultados obtidos.

Escolhemos uma lâmina histológica representativa de cada órgão colhido para exemplo (Figura 21).

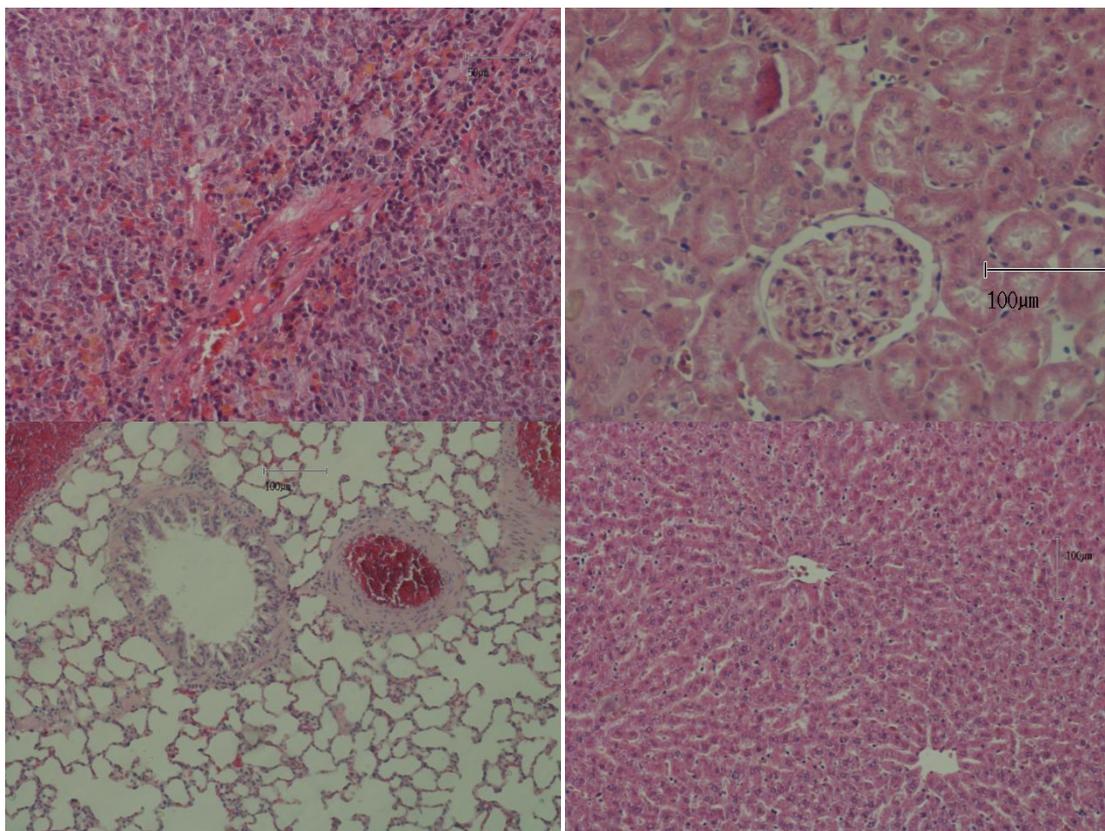


Figura 21 – Imagens histológicas (coloração de hematoxilina-eosina) respetivamente de baço, rim, pulmão e fígado de animais pertencentes ao grupo controlo (injetados com solução salina), selecionados aleatoriamente.

A reação dos tecidos para o grupo controlo (injetado com solução salina, G3) e para cada grupo experimental (Osteobiol® (G1) e Bonelike® (G2)), uma semana após a implantação, é ilustrada por algumas micrografias de cortes histológicos representativos nas Figura 22, Figura 23 e Figura 24 coradas pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrómico de Masson (TM). O grupo controlo, de tratamento simulado (Figura 22) não apresentou nenhum tipo de inflamação, sendo

apenas evidentes fibras musculares que sofreram ruptura devido ao processo de injeção do biomaterial.

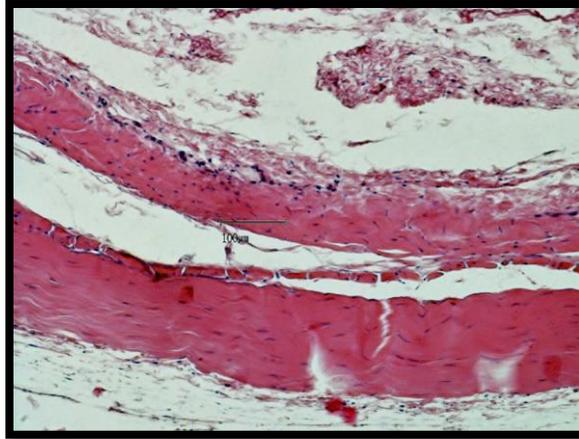


Figura 22 - Imagem de microscopia ótica representativa de lâmina do grupo controle, de rato injetado com solução salina. É evidente que há ruptura de fibras musculares, devido ao próprio procedimento de injeção, mas não são visualizadas células inflamatórias (ampliação de 20x).

A resposta inflamatória registada ao material xenógeno (nome comercial Osteobiol®) (Figura 23) é caracterizada pela presença de um grande número de fibroblastos. Há uma discreta presença de leucócitos polimorfonucleares, bem como algumas células gigantes multinucleadas. Além disso, podem ser encontrados alguns capilares com hemáceas e alguns eosinófilos ao redor das partículas. Foi formada uma cápsula no limite exterior dessas partículas e foi detetado também colagénio (coloração verde na Figura 23 b). De acordo com os critérios utilizados para classificar a resposta inflamatória (descrita anteriormente no capítulo dos Materiais e Métodos), esta pode ser considerada como moderada (84 ± 7 células inflamatórias por campo, média de dez medições).

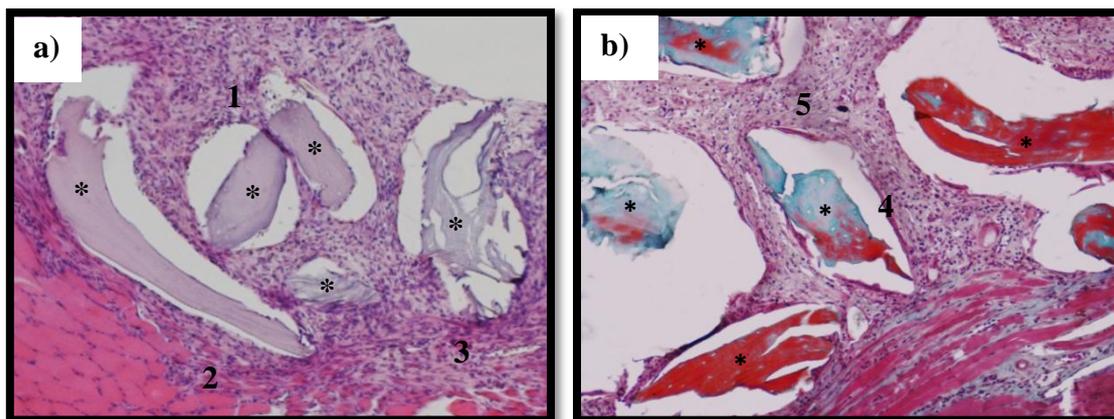


Figura 23 - Imagens de microscopia ótica representativas do leito de implantação dos grânulos do material xenógeno (G2). a) Coloração HE: 1. Partículas do material de substituição óssea (*) envolvidas por infiltrado inflamatório rico em células mononucleares. 2. Fibras musculares fragmentadas devido ao procedimento de injeção. 3. Vaso sanguíneo com algumas hemáceas (ampliação de 20x); b) Coloração TM: Partículas do material de substituição óssea (*). 4. Cápsula formada ao redor do grânulo. 5. Fibras de colagénio coradas de verde (ampliação de 20x).

Os grânulos do material sintético (nome comercial Bonelike®) (Figura 24) quando implantados, desencadeiam uma resposta inflamatória mais intensa, ainda que classificada como moderada (112 ± 10 total de células inflamatórias por campo, média de 10 medições), com predomínio de fibroblastos. A análise histológica também mostra várias células gigantes multinucleadas, com poucos capilares sanguíneos e alguns eosinófilos ao redor das partículas. No entanto, neste caso, as cápsulas em torno dos grânulos eram mais espessas do que aquelas originadas pelo material Osteobiol®. Por outro lado, uma reação mais intensa em relação ao colagénio foi também encontrada (Figura 24 b).

Para ambos os biomateriais, no entanto, não houve evidência de necrose nem sinais de hemorragia importante.

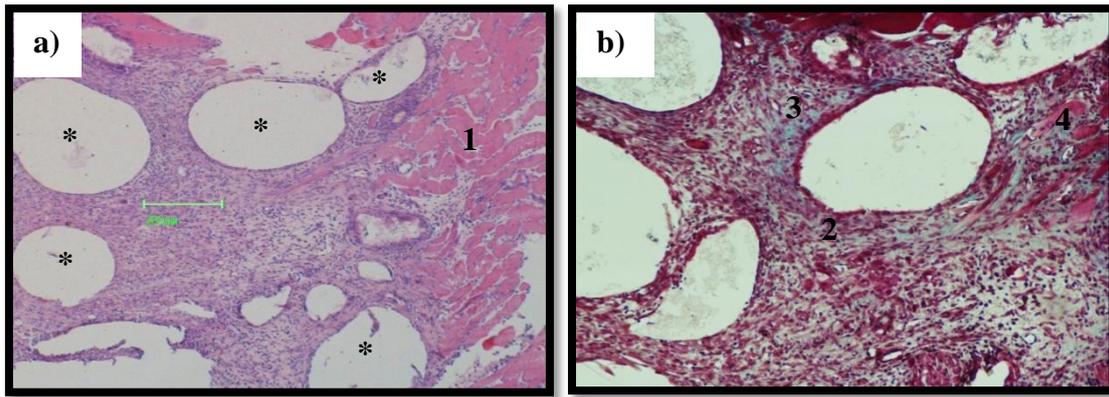


Figura 24 - Imagens de microscopia ótica representativas do leito de implantação dos grânulos do material sintético (G3). a) Coloração HE: Partículas do implante (ausentes) rodeadas por infiltrado inflamatório rico em células mononucleares (*) 1. Fibras musculares fragmentadas devido ao procedimento de injeção (ampliação de 20x); b) Coloração TM: 2. Cápsula formada ao redor da partícula. 3. Fibras de colagénio coradas de verde. 4. Área de fibroblastos (ampliação de 20x).

Além disso, a reação tecidual posterior à implantação dos biomateriais foi avaliada de acordo com a caracterização do processo de reparação: grau de fibrose e proliferação de fibroblastos. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para os diferentes parâmetros de acordo com os critérios descritos, depois de um exame cuidadoso de uma média de 10 lâminas para cada amostra de tecido. Como pode ser visto nas Figura 23 b) e Figura 24 b), existe evidência de uma resposta mais intensa de fibrose, um elevado teor de colagénio e de uma cápsula mais espessa em torno das partículas de enxerto em amostras Bonelike[®], quando comparados com aqueles de Osteobiol[®].

Na tentativa de distinguir os tipos celulares presentes em cada uma das respostas, foi feita a análise histológica cuidada de todas as lâminas, tiradas fotografias com ampliações de 40x e contabilizadas as células inflamatórias presentes. O rácio de células encontradas é semelhante para ambos os materiais, sendo notório um claro predomínio de fibroblastos, existindo alguns linfócitos, alguns eosinófilos e algumas células gigantes multinucleadas. A relação é da ordem dos 10:2:1:1, não havendo diferenças entre o material de origem xenógena e o material de origem sintética.

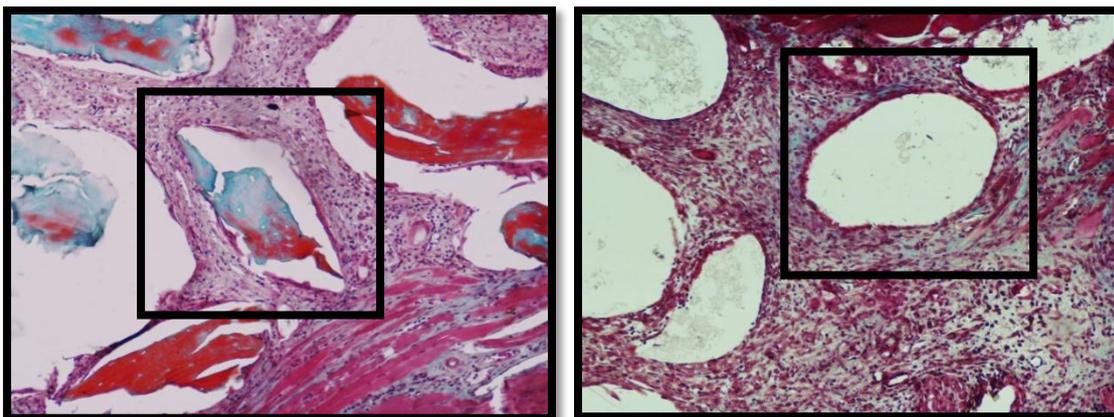


Figura 25 – Pormenor da espessura da camada fibrosa formada ao redor dos grânulos dos biomateriais respetivamente Osteobiol® e Bonelike®. Ampliação de 20x.

Tabela 13 – Valores obtidos na avaliação do processo de reparação despoletado por cada um dos biomateriais: 0 – ausente, 1 – moderado e 2 – elevado.

Parâmetro/Biomaterial	Osteobiol®	Bonelike®
Fibrose	1	2
Hemorragia	0	0
Colagénio	1	2
Vascularização	1	1
Espessura da cápsula	1	2

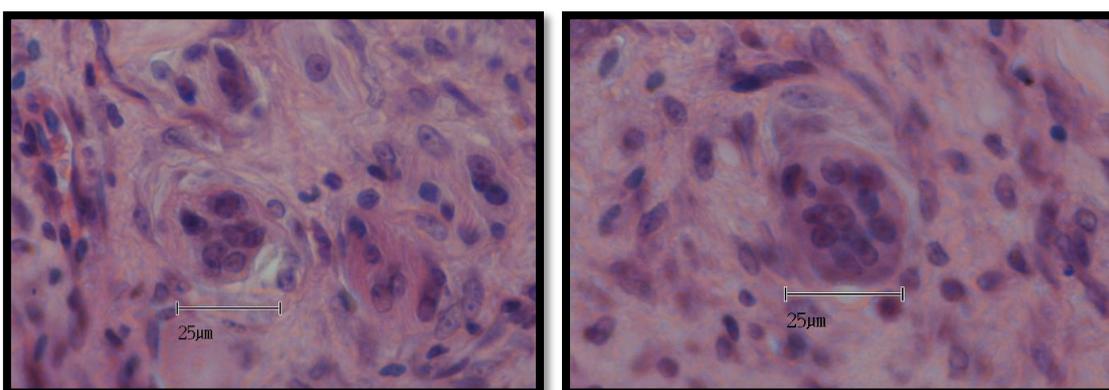


Figura 26 – Células gigantes multinucleadas, presentes quer em lâminas do material xenógeno, quer naquelas do material sintético. Ampliação de 100x.

3. Estudo da expressão genética

3.1. Ensaio de normalização

3.1.1. Das amostras de sangue periférico

Após a realização do processo de normalização com os 12 genes constituintes do *Rat geNorm kit*[®] (Primerdesign, UK), e aplicado o *software geNorm*[®], obtiveram-se os resultados mostrados nas Figura 27 e Figura 28, correspondentes à seleção dos genes mais adequados para controlo endógeno. A sequência de genes candidatos permite obter a respetiva distribuição de acordo com a sua estabilidade: os mais instáveis encontram-se à esquerda do gráfico (com valor M alto) e os genes mais adequados para serem utilizados como referência no extremo direito (com valor M baixo). É de realçar o facto de apenas estarem presentes no gráfico 11 genes (Figura 27), faltando o gene *18S* (que codifica RNA ribossomal 18S). Este gene foi excluído, uma vez que, durante a realização dos ensaios de PCR em tempo real, foi observada amplificação a partir do 2^o-3^o ciclos, o que demonstra a existência de grande quantidade de cDNA correspondente a este gene, facto este que é indicador de que não se trata de um gene adequado para controlo endógeno nas amostras biológicas em estudo.

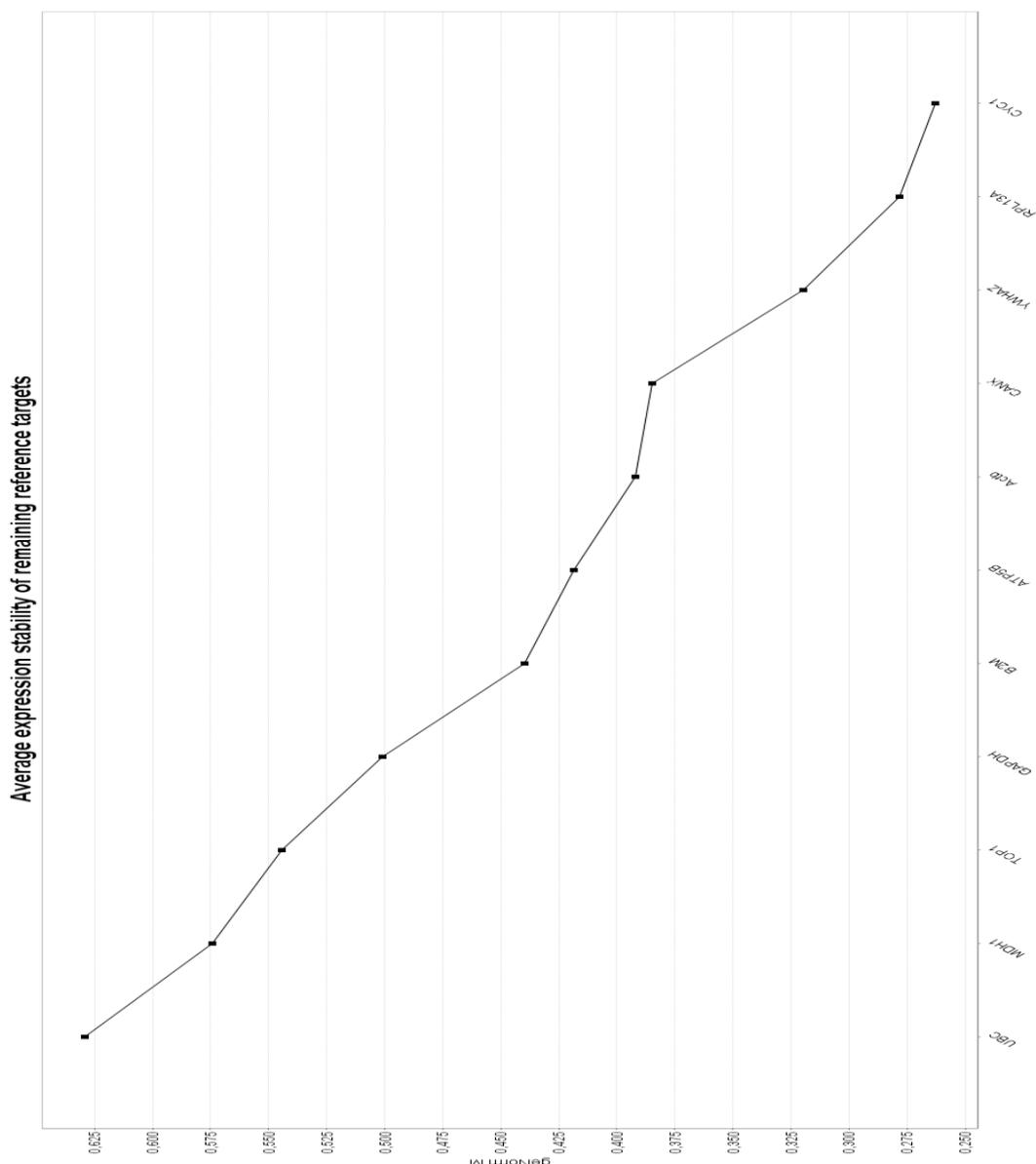


Figura 27 – Estabilidade relativa dos genes de referência, ordenados por ordem crescente.

O passo seguinte consistiu na decisão relativa ao número de genes a utilizar como referência. Da análise, obtém-se um gráfico (Figura 28) relativo à determinação do número mais apropriado de genes a testar. Um valor de $V_n/n+1$ é calculado para a comparação entre cada par de genes consecutivos (n e $n+1$). Como regra geral, determina-se que o benefício de utilizar um gene de referência extra ($n+1$) é limitado aos casos nos quais o valor de $V_n/n+1$ se encontre abaixo do limiar 0,15, normalmente marcado no gráfico por uma linha verde.

Como é visível na Figura 28, são disponibilizados os quocientes $V_n/n+1$ para cada par de genes consecutivos. Como o valor de $V_2/3$ foi inferior a 0,15 para todos os casos, foram selecionados como genes de referência os dois mais estáveis, ou seja, o *CYC1* (codifica o citocromo c-1) e o *RPL13A* (codifica a proteína ribossomal L13).

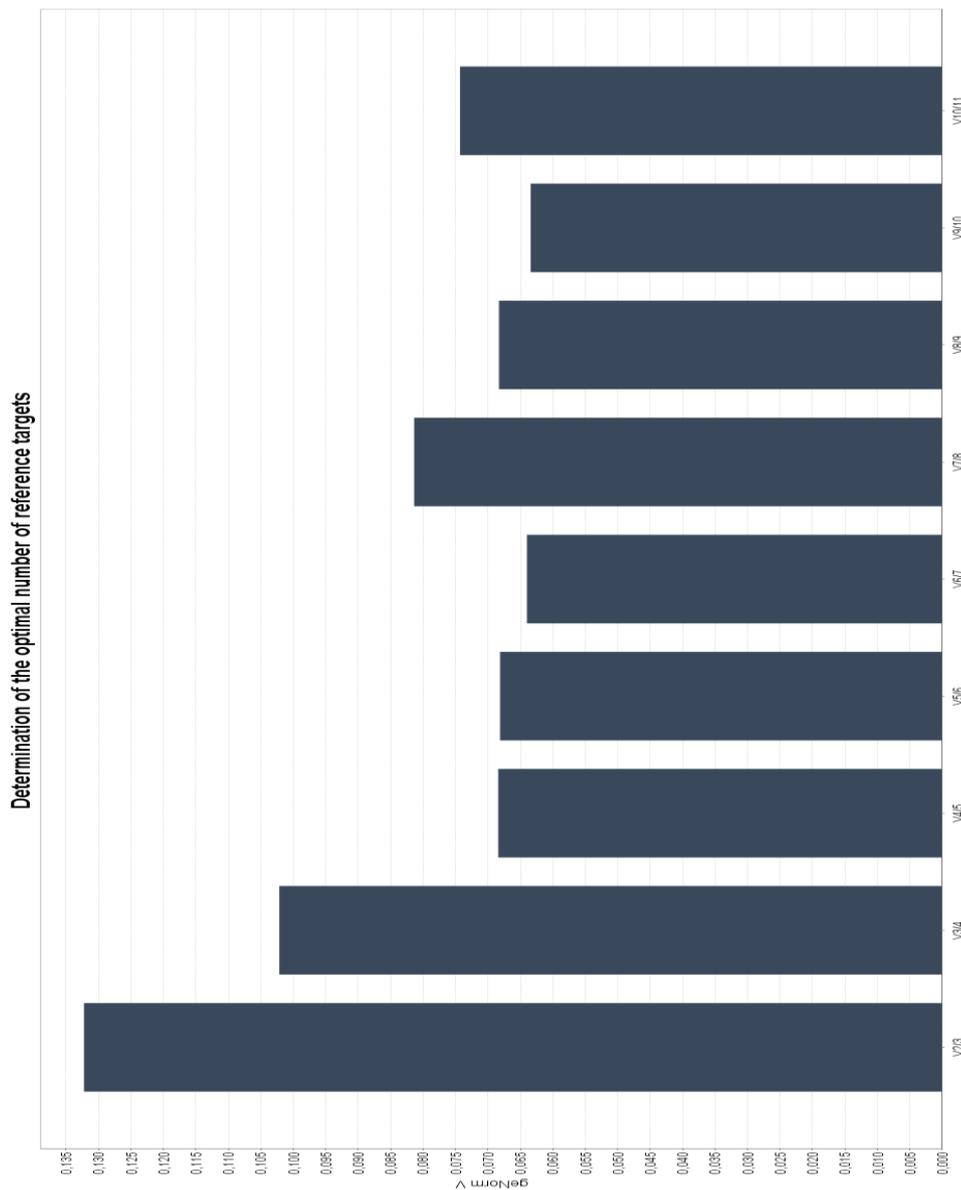


Figura 28 – Valores de quocientes de $V_n/n+1$ para todos os genes de referência testados.

3.1.2. Das amostras de tecido muscular

Da mesma forma, procedeu-se ao estudo de normalização para as amostras de cDNA derivadas de RNAm de músculo, com os 12 genes constituintes do *Rat geNorm kit*[®] (Primerdesign, UK), e utilizando o *software geNorm*[®]. Os resultados encontram-se ilustrados nas Figura 29 e Figura 30.

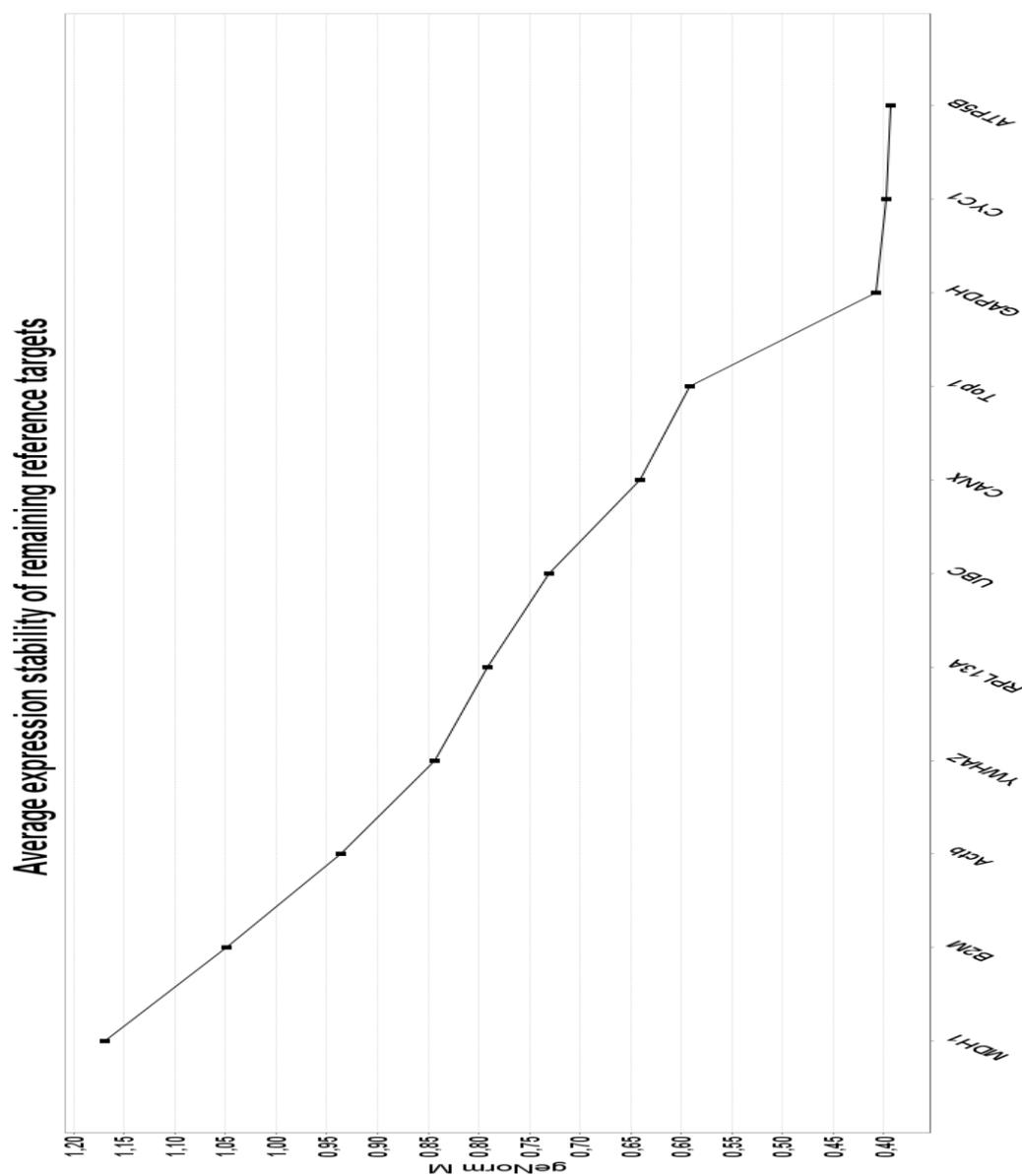


Figura 29 – Estabilidade relativa dos genes de referência, ordenados por ordem crescente.

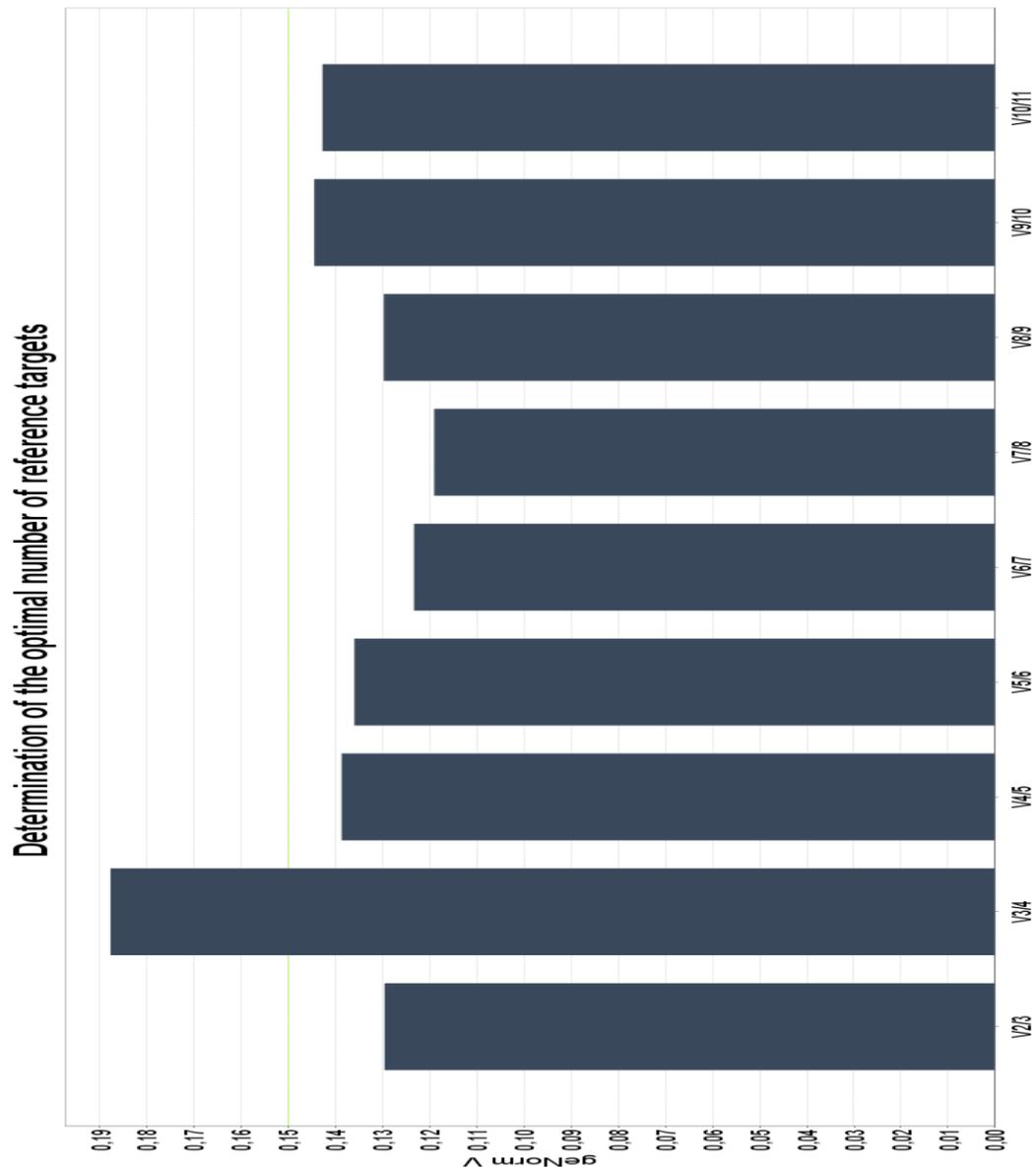


Figura 30 – Valores de quocientes de $V_n/n+1$ para todos os genes de referência testados.

Com base nos critérios referidos anteriormente, os genes selecionados para o estudo dos transcritos nas amostras provenientes de tecido muscular foram o *ATP5B* (codifica a sintetase de ATP) e o *CYC1* (codifica o citocromo c-1).

Após a realização da quantificação relativa utilizando os genes de referência selecionados para o sangue (*CYC1* e *RPL13A*) e para o músculo (*ATP5B* e *CYC1*), foram calculados os valores de transcritos, para os genes alvo em estudo: *CCL2*, *CCL3*, *IL-1 β* ,

IL-6 e *TNF- α* , através do método de Livak (ou método de $2^{-\Delta\Delta CT}$), conforme mencionado anteriormente no capítulo da Metodologia.

3.2. Análise de transcritos

3.2.1. Nas amostras de sangue periférico

Na Tabela 14 encontram-se indicados os níveis de transcritos obtidos no estudo das amostras de sangue, para os dois materiais estudados, o material xenógeno (nome comercial Osteobiol®) e o material sintético (nome comercial Bonelike®).

Tabela 14 – Níveis de transcritos obtidos (expressão relativa) para os cinco genes alvos em estudo, em amostras de sangue, e para os dois materiais estudados.

		Transcrito inicial (média \pm EP)	Transcrito pós- implantação (média \pm EP)	Nível de expressão diferencial (média \pm EP)
CCL2	Osteobiol®	9,44 \pm 0,126	8,90 \pm 0,185	1,46 \pm 0,094
	Bonelike®	10,89 \pm 0,188	9,22 \pm 0,164	3,68 \pm 0,336
CCL3	Osteobiol®	2,56 \pm 0,075	3,85 \pm 0,122	0,41 \pm 0,065
	Bonelike®	2,93 \pm 0,163	4,23 \pm 0,318	0,43 \pm 0,157
IL-1β	Osteobiol®	0,55 \pm 0,242	-0,25 \pm 0,221	1,77 \pm 0,089
	Bonelike®	1,04 \pm 0,052	0,77 \pm 0,039	1,19 \pm 0,082
IL-6	Osteobiol®	9,61 \pm 0,237	11,09 \pm 0,201	0,44 \pm 0,289
	Bonelike®	9,93 \pm 0,388	11,06 \pm 0,344	0,45 \pm 0,135
TNF-α	Osteobiol®	6,84 \pm 0,149	6,02 \pm 0,133	1,99 \pm 0,139
	Bonelike®	7,87 \pm 0,099	6,75 \pm 0,049	2,17 \pm 0,119

Após análise da Tabela 14 e tendo em conta a forma como são calculados os níveis de transcritos baseados no método de Livak, conclui-se que os valores de expressão diferencial (que correspondem à diferença entre o valor de transcritos final ou pós

implantação e o valor de transcritos inicial ou pré implantação dos materiais) que assumem valor numérico superior a 1 são tendências positivas ou de aumento e, por oposição, aqueles que assumem valor numérico inferior a 1 são tendências negativas ou de diminuição.

Assim é possível organizar os genes em dois grandes grupos: os genes *CCL2*, *IL-1 β* e *TNF- α* que assumem uma tendência crescente, e os genes *CCL3* e *IL-6* que assumem a tendência contrária, ou seja, de diminuição do número de transcritos quando comparamos os momentos final e inicial (antes e depois da implantação dos biomateriais nos músculos dos ratos).

O valor que mais se destaca com maior expressão corresponde ao gene *CCL2*, para o material sintético, sendo o de menor expressão o gene *CCL3*, para o material xenógeno.

Para o gene *CCL2* (Figura 31) observa-se uma tendência de subida do número de transcritos no sangue periférico dos ratos, para ambos os materiais. O material sintético assume valores de cerca de três vezes e meia superiores ao do material xenógeno ($3,682 \pm 0,336$ e $1,455 \pm 0,094$, respetivamente). A diferença entre os resultados relativos aos dois biomateriais é estatisticamente significativa ($p=0,0011$).

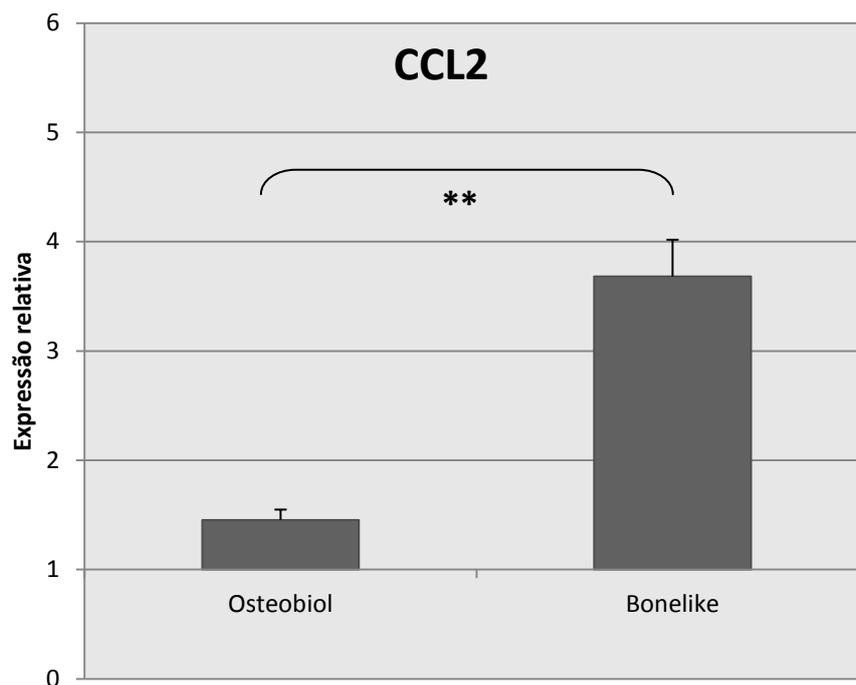


Figura 31 – Resultados de expressão relativa do gene *CCL2*, no sangue, para os dois materiais estudados (média + erro padrão).

Para o gene *IL-1 β* (Figura 32) observa-se, como já foi referido, a mesma tendência de subida do número de transcritos no sangue periférico dos ratos para ambos os materiais. O material xenógeno assume valores de cerca de uma vez e meia superiores ao do material sintético ($1,770 \pm 0,089$ e $1,184 \pm 0,082$, respetivamente). A diferença entre os resultados relativos aos dois biomateriais é estatisticamente significativa ($p=0,0016$).

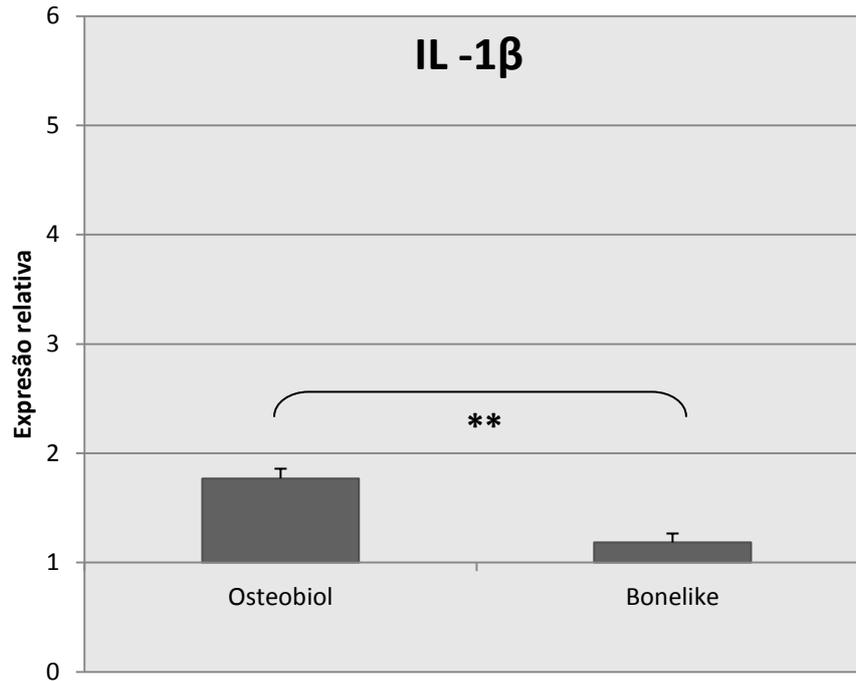


Figura 32 – Resultados de expressão relativa do gene *IL-1 β* , no sangue, para os dois materiais estudados (média + erro padrão).

Para o gene *TNF- α* (Figura 33) observa-se também a mesma tendência de subida do número de transcritos no sangue periférico dos ratos para ambos os materiais. Os valores obtidos para o material xenógeno e sintético são muito semelhantes ($1,987 \pm 0,139$ e $2,166 \pm 0,119$, respetivamente). A diferença entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa ($p=0,3263$).

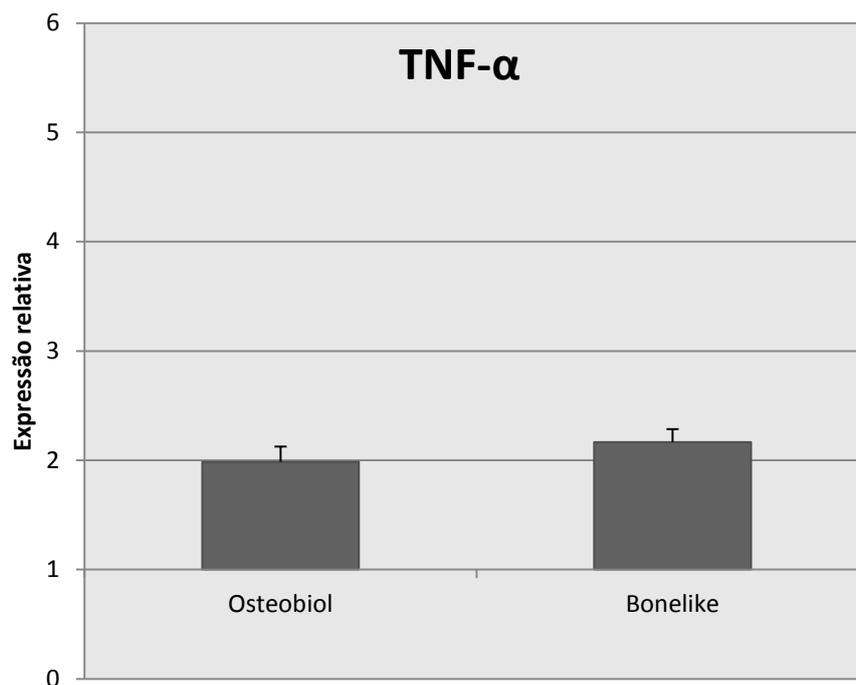


Figura 33 – Resultados de expressão relativa do gene *TNF-α*, no sangue, para os dois materiais estudados (média + erro padrão).

Ao contrário dos três casos anteriores, os genes *CCL3* e *IL-6* apresentam uma tendência inversa, ou seja, de diminuição de número de transcritos após a implantação de ambos os materiais, conforme se mostra nas Figura 34 e Figura 35.

Para o gene *CCL3* (Figura 34) observa-se, como já foi referido, uma tendência de descida do número de transcritos no sangue periférico dos ratos para ambos os materiais. O material xenógeno e o material sintético assumem valores bastante semelhantes ($0,437 \pm 0,289$ e $0,453 \pm 0,135$ respetivamente). A diferença entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa ($p=0,3537$).

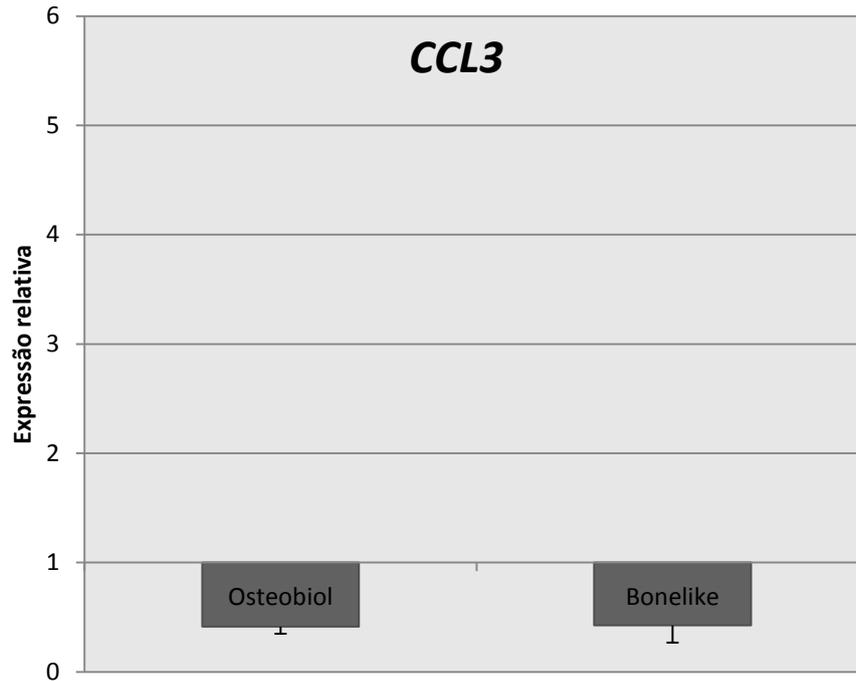


Figura 34 – Resultados de expressão relativa do gene *CCL3*, no sangue, para os dois materiais estudados (média + erro padrão).

Para o gene *IL-6* (Figura 35) observa-se também uma tendência de descida do número de transcritos no sangue periférico dos ratos para ambos os materiais. O material xenógeno e o material sintético assumem valores bastante parecidos, à semelhança do que acontece com o *CCL3* ($0,414 \pm 0,065$ e $0,425 \pm 0,157$ respetivamente). A diferença entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa ($p=0,3379$).

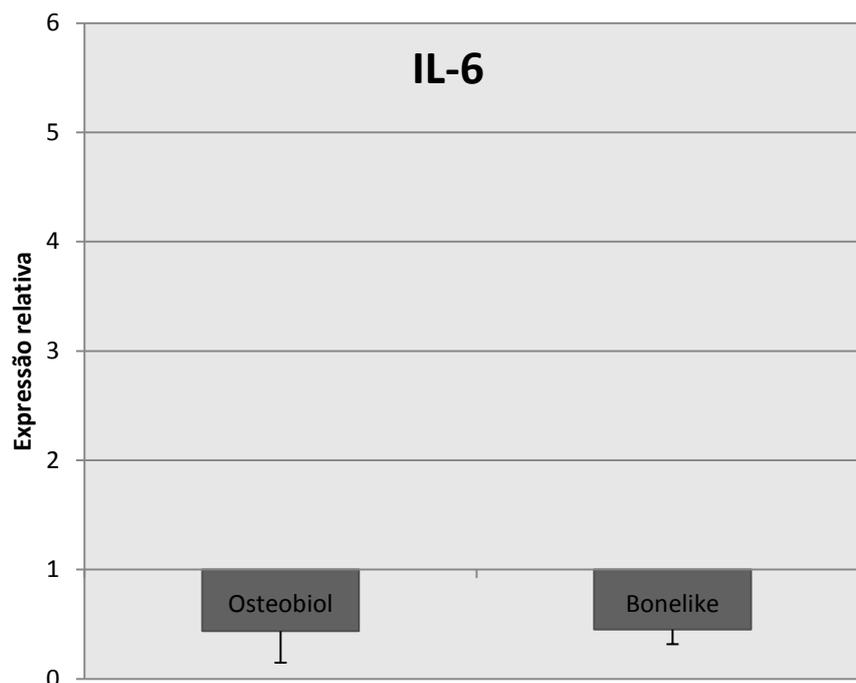


Figura 35 – Resultados de expressão relativa do gene *IL-6*, no sangue, para os dois materiais estudados (média + erro padrão).

O perfil de expressão encontrado para os materiais em análise é mostrado na Figura 36, onde se apresentam os resultados para todos os genes estudados, bem como os valores de transcritos encontrados. É clara a tendência distinta entre os dois grupos de genes já referidos.

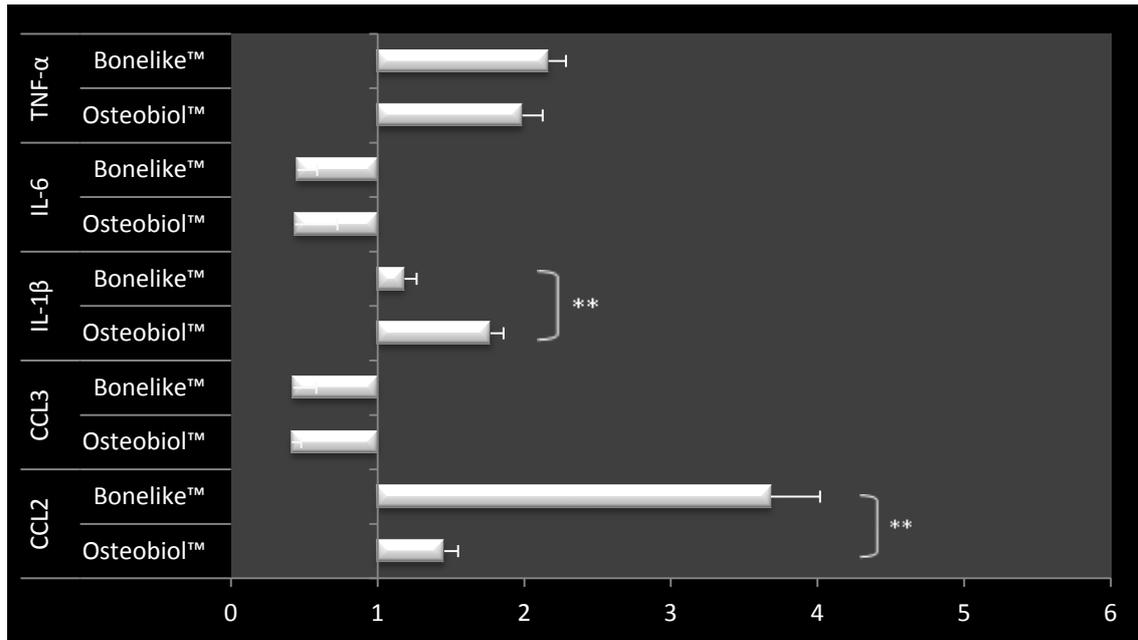


Figura 36 – Perfil de valores de transcritos, encontrado para os materiais em estudo.

Para o gene *TNF- α* verifica-se uma tendência de aumento, com valores de transcritos ligeiramente superiores para o material sintético. Para o gene *IL-6* verifica-se uma tendência de diminuição, com ambos os materiais a apresentarem níveis semelhantes de transcritos. Para o gene *IL-1 β* verifica-se uma tendência de aumento, com diferenças estatisticamente significativas entre os materiais, apresentando o material xenógeno um número maior de transcritos do que o material sintético. Para o gene *CCL3* verifica-se uma tendência de diminuição, com ambos os materiais a apresentarem níveis semelhantes de transcritos. No caso do gene *CCL2* verifica-se uma tendência de aumento, com diferenças estatisticamente significativas entre os materiais, apresentando o material sintético um número maior de transcritos do que o material xenógeno.

Após análise estatística detalhada, tal como foi descrito na secção de metodologia, foi feita a comparação entre os valores de transcritos iniciais e finais para cada material e cálculo do valor de p associado a este par de resultados, bem como a comparação entre os dois materiais, com respetivo cálculo do valor de p. Os valores encontrados encontram-se descritos na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados da análise estatística para os cinco genes alvo e relativos valores de p.

		Valor de p		
		Osteobiol [®] vs inicial	Bonelike [®] vs inicial	Osteobiol [®] vs Bonelike [®]
CCL2	Osteobiol [™]	0,0002 ***		0,0011 **
	Bonelike [™]		0,0313 *	
CCL3	Osteobiol [™]	<0,0001 ****		0,3537
	Bonelike [™]		<0,0001 ****	
IL-1β	Osteobiol [™]	<0,0001 ****		0,0016 **
	Bonelike [™]		0,0625	
IL-6	Osteobiol [™]	0,0003 ***		0,3379
	Bonelike [™]		<0,0001 ****	
TNF-α	Osteobiol [™]	0,0006 ***		0,3263
	Bonelike [™]		0,0313 *	

3.2.2. Nas amostras de tecido muscular

Para o gene *CCL2* (Figura 37) observa-se uma tendência de subida do número de transcritos nas amostras de tecido muscular dos ratos, para ambos os materiais. Os valores obtidos para os dois materiais são muito semelhantes (95,24 e 108,18 para o material xenógeno e sintético, respetivamente).

A diferença verificada entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa.

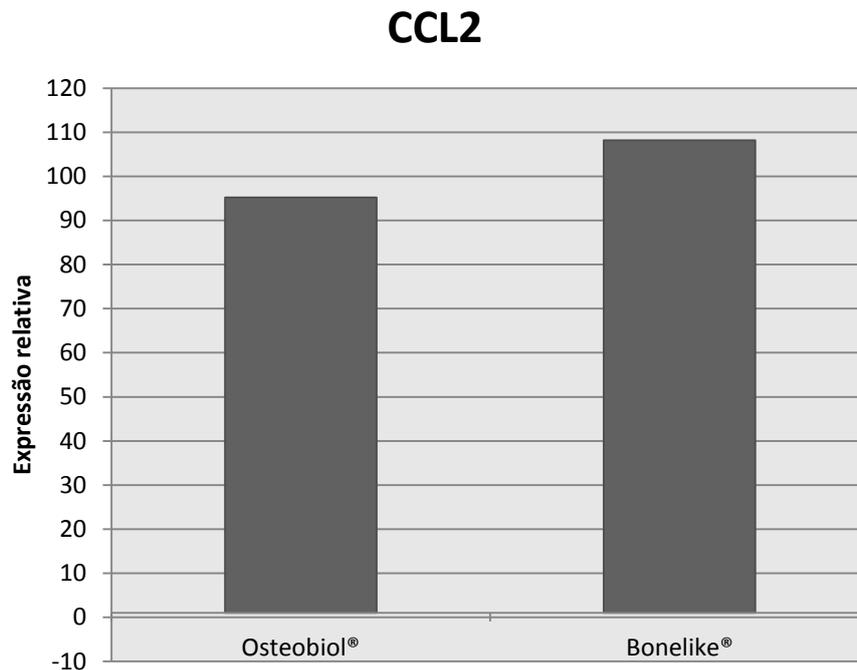


Figura 37 – Resultados de expressão relativa do gene *CCL2* nas amostras de tecido muscular, para os dois materiais estudados (média).

Para o gene *CCL3* (Figura 38) observa-se uma tendência de subida do número de transcritos nas amostras de tecido muscular dos ratos para ambos os materiais.

O material xenógeno apresenta um aumento do número de transcritos relativamente ao material sintético (média de 38,20 para 29,47 respetivamente).

A diferença verificada entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa.

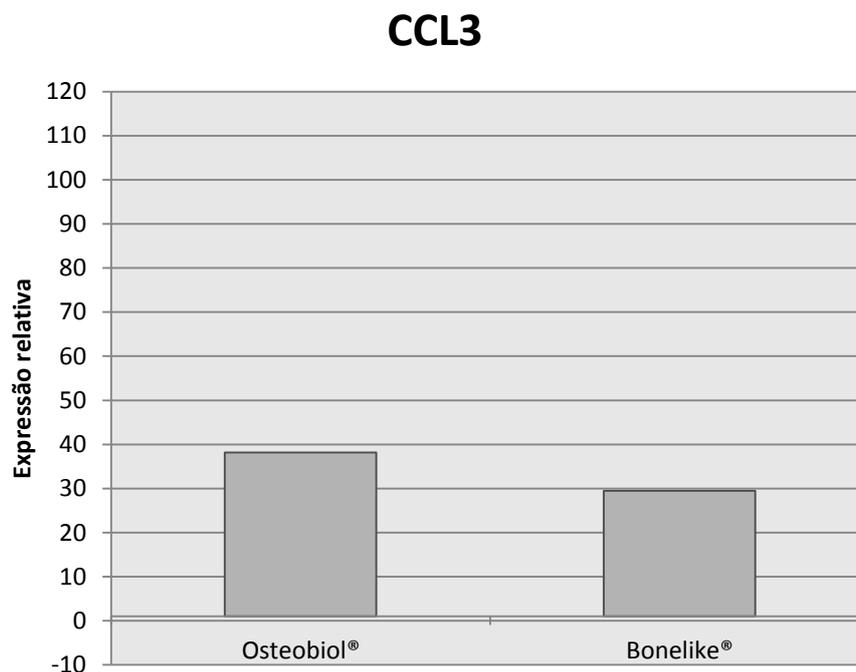


Figura 38 - Resultados de expressão relativa do gene *CCL3* nas amostras de tecido muscular, para os dois materiais estudados (média).

Para o gene *IL1-β* (Figura 39) observa-se uma tendência de subida do número de transcritos nas amostras de tecido muscular dos ratos para ambos os materiais.

O material sintético assume valores superiores quando comparado com o material xenógeno (valor médio de 66,32 para 58,69, respetivamente).

A diferença verificada entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa.

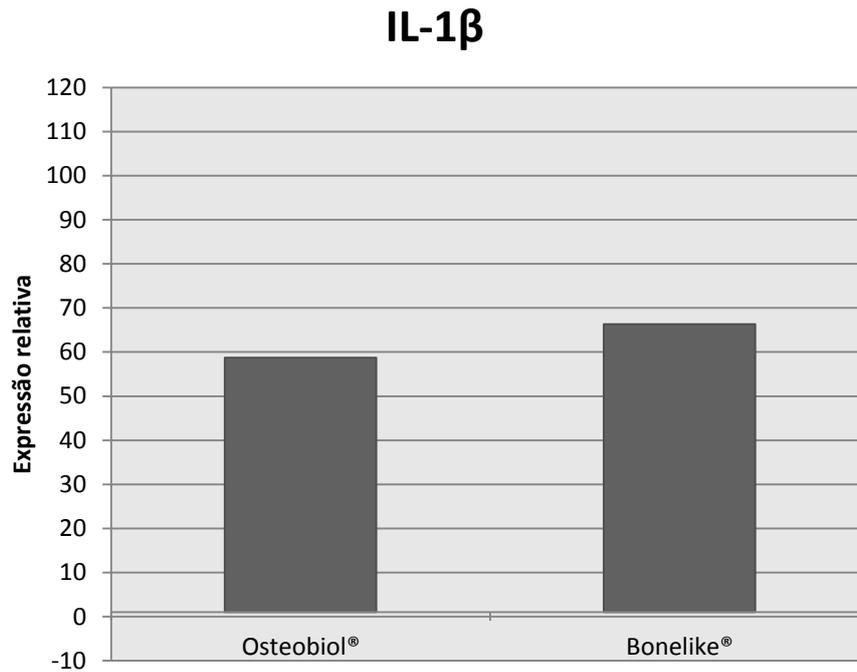


Figura 39 - Resultados de expressão relativa do gene *IL-1 β* nas amostras de tecido muscular, para os dois materiais estudados (média).

Para o gene *IL-6* (Figura 40) observa-se uma tendência de subida do número de transcritos nas amostras de tecido muscular dos ratos para ambos os materiais.

O material sintético assume valores superiores quando comparado com o material xenógeno (valor médio de 55,97 para 46,57 respetivamente).

A diferença verificada entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa.

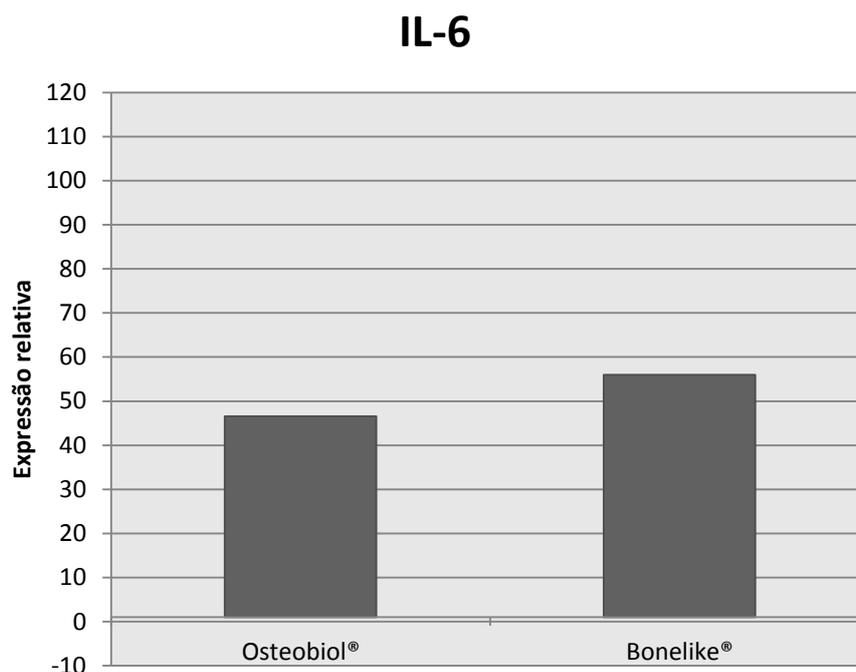


Figura 40 - Resultados de expressão relativa do gene *IL-6* nas amostras de tecido muscular, para os dois materiais estudados (média).

Para o gene *TNF- α* observa-se uma tendência de subida do número de transcritos nas amostras de tecido muscular dos ratos para ambos os materiais.

O material sintético assume valores superiores quando comparado com o material xenógeno (valor médio de 44,29 para 35,68 respetivamente).

A diferença verificada entre os resultados relativos aos dois biomateriais não é estatisticamente significativa.

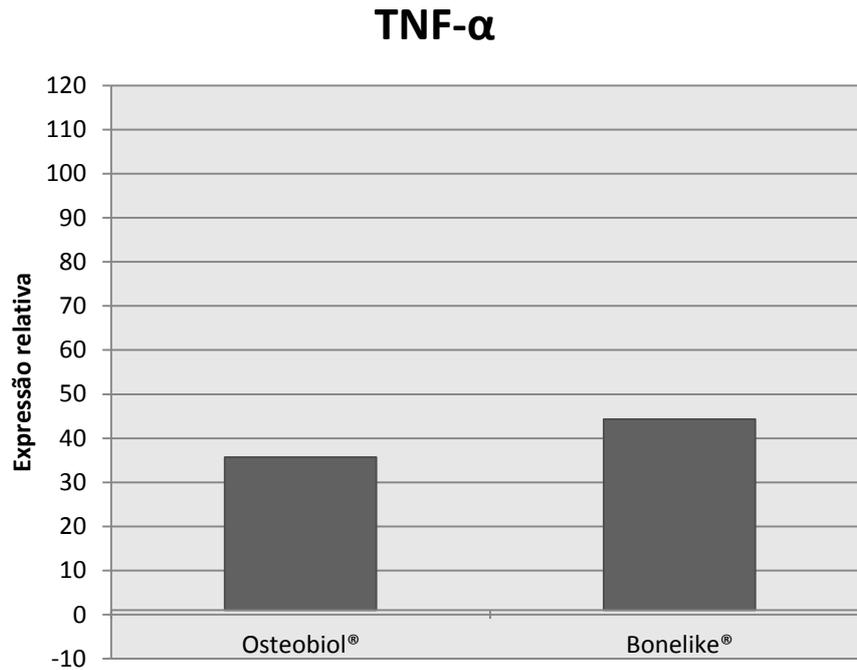


Figura 41 - Resultados de expressão relativa do gene *TNF- α* nas amostras de tecido muscular, para os dois materiais estudados (média).

Para ser mais fácil a comparação entre os perfis inflamatórios dos dois biomateriais estudados, as Figura 42 e Figura 43 sistematizam a informação relativa aos cinco genes alvo.

Para o material xenógeno (nome comercial Osteobiol®) verificámos uma subida generalizada nos transcritos relativos aos cinco genes alvo, quando comparados com o grupo controlo.

O valor mais alto refere-se ao *CCL2*, seguido do *IL-1 β* , *IL-6*, *CCL3* e *TNF- α* .

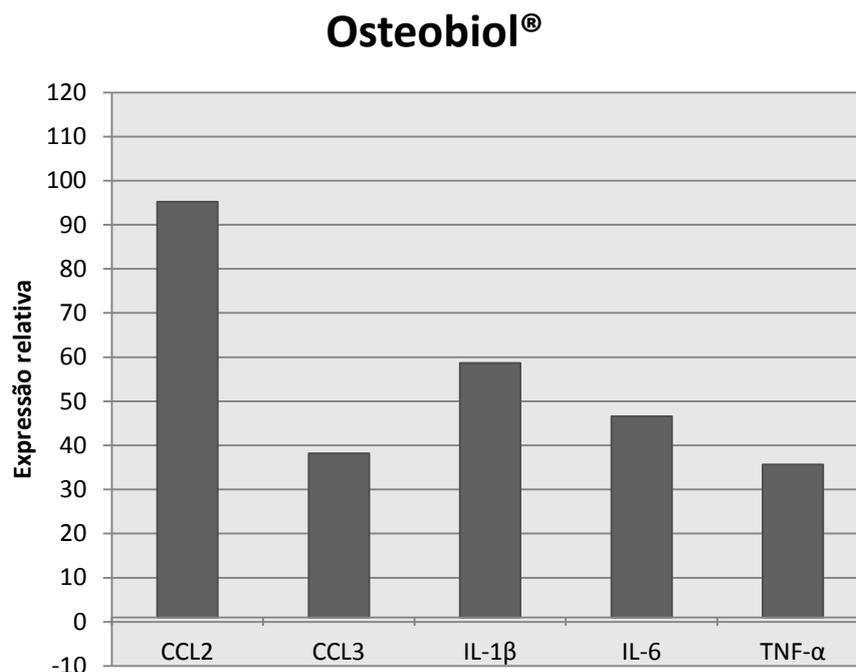


Figura 42 – Perfil inflamatório da análise das amostras de tecido muscular para o material xenógeno.

Para o material sintético (nome comercial Bonelike®) verificámos também uma subida generalizada nos transcritos relativos aos cinco genes alvo, quando comparados com o grupo controlo.

O valor mais alto refere-se ao *CCL2*, seguido do *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* e *CCL3*.

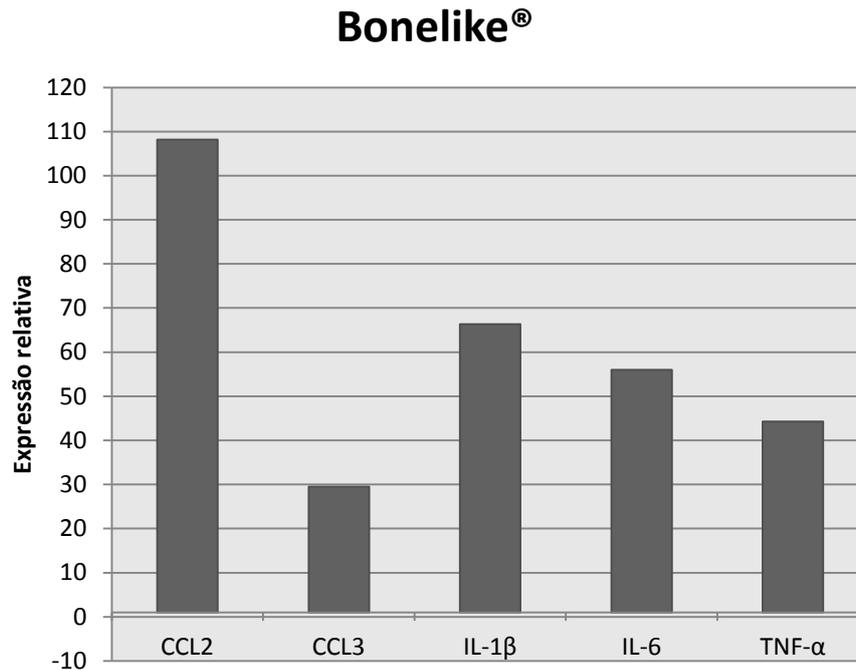


Figura 43 - Perfil inflamatório da análise das amostras de tecido muscular para o material sintético.

3.3. Relação entre a resposta localizada e a resposta sistémica

No sentido de realizar a comparação entre os resultados obtidos na avaliação entre a resposta localizada (amostras de tecido muscular) e sistémica (amostras de sangue periférico), analisou-se a expressão relativa nos dois tecidos em estudo para o material xenógeno (nome comercial Osteobiol®) e para o material sintético (nome comercial Bonelike®) (Figura 44 e Figura 45, respetivamente).

Osteobiol®

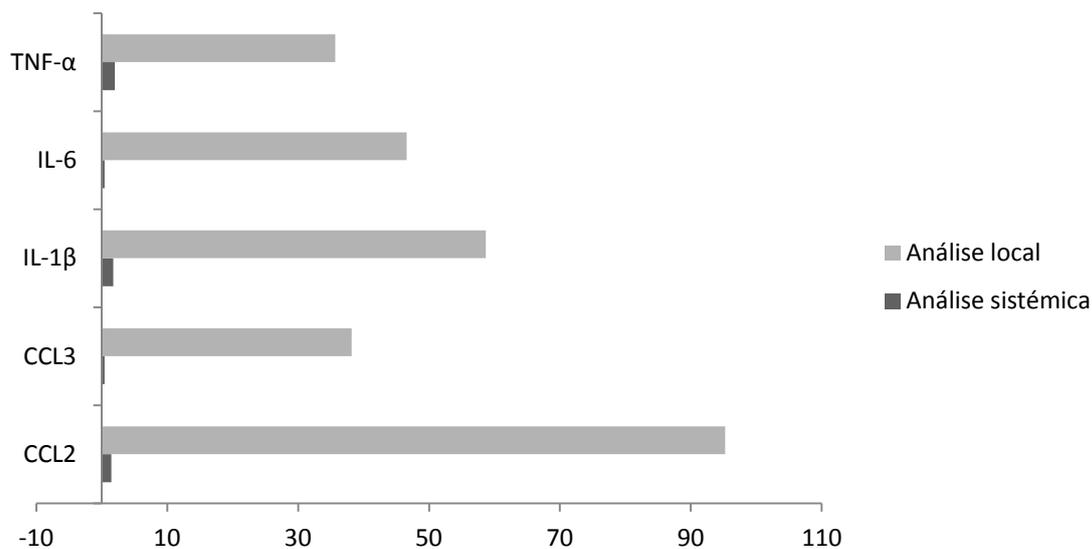


Figura 44 – Comparação da expressão relativa nos dois tecidos analisados, para avaliar os resultados entre a área local (tecido muscular) e a análise sistêmica (sangue periférico) para o material de origem xenógena.

Bonelike®

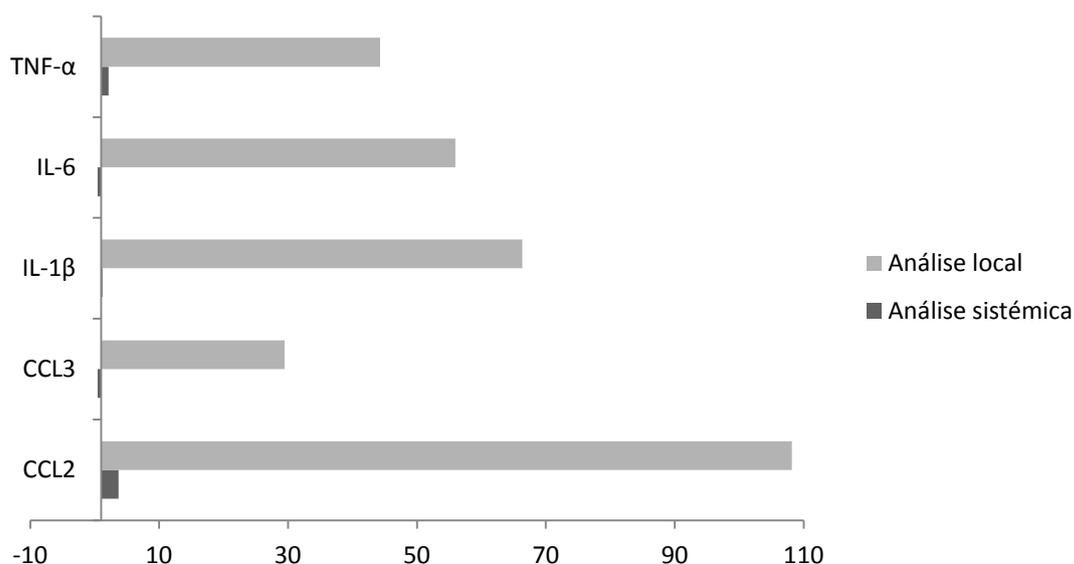


Figura 45 - Comparação da expressão relativa nos dois tecidos analisados, para avaliar os resultados entre a área local (tecido muscular) e a análise sistêmica (sangue periférico) para o material de origem sintética.

Depois de realizada a análise de ambos os materiais estudados, observa-se que a expressão relativa para a análise local (tecido muscular) é muito superior àquela verificada para a análise sistémica (sangue), facto observado nos dois perfis de resposta. Para o material xenógeno (nome comercial Osteobiol® - Figura 44) observa-se que o maior nível de expressão relativa é para o gene *CCL2*, tal como acontece para o material sintético (nome comercial Bonelike® - Figura 45). Os níveis de expressão relativa mais baixos, para a análise local, são o gene *TNF- α* para o material xenógeno e o gene *CCL3* para o material sintético. No que diz respeito a análise local observa-se que os genes *IL-6* e *CCL3* diminuem a sua expressão relativa em ambos os materiais. O gene *IL-1 β* tem uma expressão relativa superior no material xenógeno e o gene *CCL2* no material sintético, analisando a expressão relativa a nível muscular.

Capítulo 5

Discussão dos Resultados

1. Escolha do modelo

Os modelos para o estudo da reação inflamatória envolvem geralmente a injeção subcutânea ou intramuscular do biomaterial a testar, porque tanto a derme como o músculo são tecidos altamente vascularizados, promovendo assim um contacto íntimo do biomaterial com células do sangue. São estas células do sangue que vão originar e potenciar a quantidade e qualidade da resposta inflamatória. Por outro lado, a implantação nos músculos dos ratos é um modelo estabelecido utilizado por outros autores, com o objetivo de estudar a resposta inflamatória secundária à implantação de materiais (54, 56-58, 203, 204). Como já foi referido anteriormente, adotou-se para este estudo o modelo realizado por Walschus (54), envolvendo a implantação dos biomateriais nos músculos lombares dos ratos.

A sequência de reações do hospedeiro após a implantação de biomateriais é descrita por Anderson (5) (Tabela 1) e envolve as seguintes fases: lesão, interações sangue-material, formação de matriz provisória, inflamação aguda, inflamação crónica, formação de tecido de granulação, reação de corpo estranho e fibrose-desenvolvimento de cápsula fibrosa. Depois de atingida a corrente sanguínea estas reações serão semelhantes em todas as partes do organismo. Como o tecido muscular é um tecido bem vascularizado, podemos assegurar que os mediadores inflamatórios atingem os vasos sanguíneos quase imediatamente após o procedimento de implantação.

No que diz respeito ao período de avaliação, após a implantação dos biomateriais, deve mencionar-se que a literatura refere períodos manifestamente distintos. Há estudos que mencionam 1 dia (205), 2 dias (56), uma semana (56, 57, 205, 206), 2 semanas (56, 57), 3 semanas (205), 4 semanas (57, 207), 6 semanas (203), 8 semanas (57), 12 semanas (56, 57, 203, 204), 16 semanas (208) ou 26 semanas (57, 206). Todos estes períodos são passíveis de adoção para o estudo da resposta inflamatória, dependendo dos parâmetros que são objetos de estudo. Além disso, muitos estudos envolvem duas fases para comparação (uma avaliação precoce e outra depois de mais

de 1 mês), mas também existem trabalhos que utilizam apenas um período de tempo (180, 208-210).

No nosso caso, no entanto, escolhemos um curto período já que o objetivo foi avaliar a resposta inflamatória e não a regeneração óssea. Por outro lado, é bem sabido que a interação inicial de células inflamatórias com um biomaterial é crucial para as fases seguintes da resposta inflamatória. Além disso, pensamos que, quando comparamos dois biomateriais, nas mesmas condições, é suficiente estabelecer um único período de tempo (num artigo recente foi também adotado apenas um período de tempo (2 semanas) para fazer a caracterização da resposta inflamatória utilizando a quantificação da expressão genética de genes de citocinas (180)).

2. Escolha dos materiais

A escolha dos materiais a testar neste trabalho foi realizada tendo como base o histórico de investigação na linha de materiais de regeneração óssea do Departamento de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Há mais de 10 anos começaram a estudar-se biomateriais de regeneração óssea e o seu comportamento *in vivo* e escolheu-se para isso o ABM e o ABM/P15 (211), seguido do estudo entre duas formulações de ABM: ABM/P15 granulado e ABM/P15 hidrogel (212), depois o PepGen P15® (213), seguido de uma hidroxiapatite sintética nanocristalina não comercializada e Bio-Oss® (214) e depois, num estudo mais abrangente, o Bio-Oss®, o PepGen P15®, o Osteobiol® e o Biocoral (112).

Nesta sequência de estudos, introduzimos um material sintético aprovado e utilizado em humanos - o Bonelike®, que é fruto do trabalho de investigação nacional, sintetizado pelo Professor José Domingos Santos, Professor na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto e Investigador do INEB – Instituto de Engenharia Biomédica.

Nesta linha de pensamento, escolhemos portanto como materiais teste o Osteobiol® e o Bonelike® porque representam as duas classes de material de enxerto com maior representatividade clínica, em alternativa ao osso autólogo: os materiais xenógenos e os materiais sintéticos, respectivamente. Quando seleccionámos os materiais que queríamos testar também foram critérios de inclusão terem as mesmas indicações clínicas e existirem na forma de grânulos, sendo a granulometria semelhante. O material xenógeno que escolhemos estudar já foi alvo de algumas publicações (112, 114, 215-225), assim como o material sintético (186, 188, 190, 226-229).

Não estudámos o osso autólogo por duas questões essenciais. A primeira prende-se com o facto de o objetivo principal do trabalho ser o estudo de alternativas à utilização de osso autólogo, uma vez que se acredita que o futuro passará, indubitavelmente, pela utilização de materiais alternativos. O uso de osso autólogo necessita de um segundo momento cirúrgico, tem uma morbilidade associada e não é um procedimento isento de riscos e complicações, tal como já foi referido anteriormente. A segunda questão prende-se com a colheita de osso autólogo no rato, para posterior colocação no leito implantar. Este tipo de procedimento é crítico em termos práticos, e não dispomos de recursos técnicos para o fazer de forma exemplar.

Quanto à questão da escolha do material xenógeno, optámos por um que conhecemos da prática clínica, mas tendo absoluta consciência de que o BioOss® será o material xenógeno (bovino) de referência. Sabemos que existem algumas diferenças na sua composição química (devidas aos diferentes tipos de processamento a que estão sujeitos), para além da questão major da origem. No entanto, e porque ambos os materiais já foram avaliados em termos de tamanho dos grânulos, forma, morfologia e área de superfície específica, tendo apresentado resultados muito similares (112), entendemos preterir o BioOss®, escolhendo para material teste o Osteobiol®. Além disso, ambos os materiais são utilizados com as mesmas indicações clínicas e pelo menos um estudo na literatura indica que também têm resultados clínicos idênticos (230).

Infelizmente não encontramos nenhum estudo acerca da resposta inflamatória do Bio-Oss® ou outros materiais de enxerto ósseo comerciais para os conseguirmos comparar com os resultados obtidos neste trabalho.

3. Características físico-químicas

Nos dias que correm é sabido que as propriedades físicas e químicas dos materiais influenciam e determinam o tipo de resposta inflamatória produzida pelo organismo vivo no qual são implantados (6, 112, 139-141). Por esta razão é de importância crucial conhecer em detalhe algumas características dos materiais que utilizamos em procedimentos clínicos, particularmente aquelas que podem influenciar o prognóstico, como o sejam o tamanho das partículas que constituem a amostra, a sua forma, a área de superfície, a porosidade, entre outras. No entanto, esta informação não está facilmente acessível, mesmo no que diz respeito a materiais já comercializados. Além disso, antes de selecionar um dado biomaterial, os médicos dentistas muitas vezes enfrentam o problema de ter uma panóplia de materiais disponíveis no mercado com as mesmas indicações clínicas, mas pouca (ou nenhuma) informação é fornecida sobre a sua comparação (70). Van der Stok (93) afirma que uma *guideline* baseada na evidência que auxiliasse os profissionais na seleção do melhor produto para cada indicação clínica não está ainda disponível e seria de importância fundamental. Na melhor das hipóteses estarão disponíveis apenas alguns estudos *in vitro* que envolvem determinadas linhas celulares específicas (por exemplo, utilizando monócitos ou macrófagos) (154, 156, 231). Estas linhas são utilizadas por serem estes tipos celulares os primeiros a colonizar os locais da inflamação (156, 157, 231).

A título de exemplo, foi feito o estudo dos materiais de substituição óssea disponíveis no mercado holandês (93) e foram identificados dezoito marcas comerciais relativas a materiais de hidroxiapatite, fosfato tricálcio, compósitos sintéticos, sulfato de cálcio sintético e vidro bioativo, num total de 1138 artigos relativos a estes materiais. As formas disponíveis também são distintas: sólida, pasta e pellets. Os autores concluem que alguns destes materiais, já disponíveis no mercado, foram exaustivamente

estudados, no entanto, para outros, a informação disponível é muito limitada. E deixam o repto: para haver suporte à decisão no que diz respeito a escolher o material para tratar um defeito ósseo específico, mais investigação é necessária. Um outro estudo alemão (94) faz a descrição de catorze marcas comerciais de diferentes biomateriais, com diferentes constituições e morfologias, concluindo haver grandes diferenças entre eles e presumindo que cubram um leque de aplicações clínicas distintas, desde serem utilizados como implantes permanentes a serem usados como implantes rapidamente degradáveis.

Um terceiro estudo, brasileiro (232), caracterizou em termos de propriedades físico-químicas doze biomateriais utilizados na Implantologia concluindo que estes apresentavam diferenças substanciais em características como morfologia e tamanho das partículas, cristalinidade, área de superfície e porosidade, alertando os profissionais para a certeza que estas diferenças observadas irão influenciar o comportamento biológico *in vivo* dos biomateriais.

4. Morfologia

Os dados morfológicos obtidos por SEM revelaram que estes dois materiais testados são, de facto, bastante diferentes no que diz respeito o tamanho, forma e topografia de superfície dos seus grânulos. As partículas de Osteobiol® são mais irregulares e possuem extremidades com ângulos agudos, ao contrário do que acontece com as partículas de Bonelike® que se apresentam com uma forma bastante regular, aproximadamente cilíndrica e com contornos redondos. As características de superfície são também distintas, sendo os grânulos de Bonelike® mais suaves, certamente como resultado do seu processo de fabrico.

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (112), que analisaram não só o Osteobiol®, mas também o BioOss® e o PepGen P-15® (todos materiais xenógenos) relatando também a existência de partículas irregulares e de pontas afiadas, tal como observámos. Relativamente à caracterização de materiais sintéticos, encontrámos imagens de microscopia electrónica relativas a dois materiais sintéticos:

o Bone Ceramic® da Straumann e o NanoBone® (233). Ambos os materiais nos parecem bastante diferentes do nosso material de estudo. Enquanto os grânulos do nosso material teste (Figura 46) possuem contornos redondos, sem pontas afiadas, sendo praticamente todos uniformes, os grânulos dos outros materiais sintéticos (Figura 47) são irregulares, possuindo ângulos agudos e pontas afiadas.

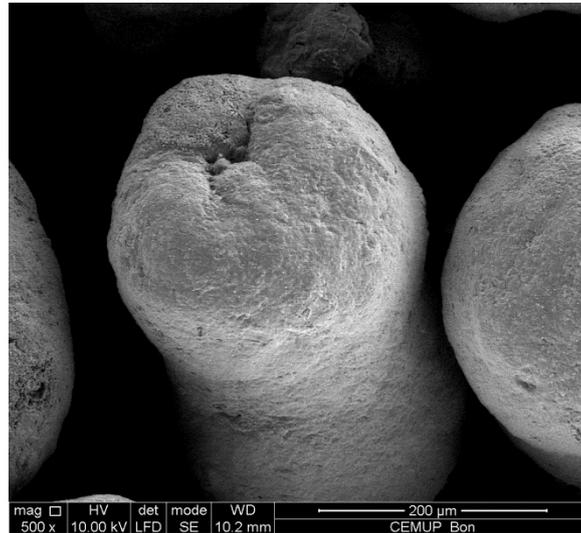


Figura 46 – Imagem obtida por SEM de grânulos de Bonelike®.

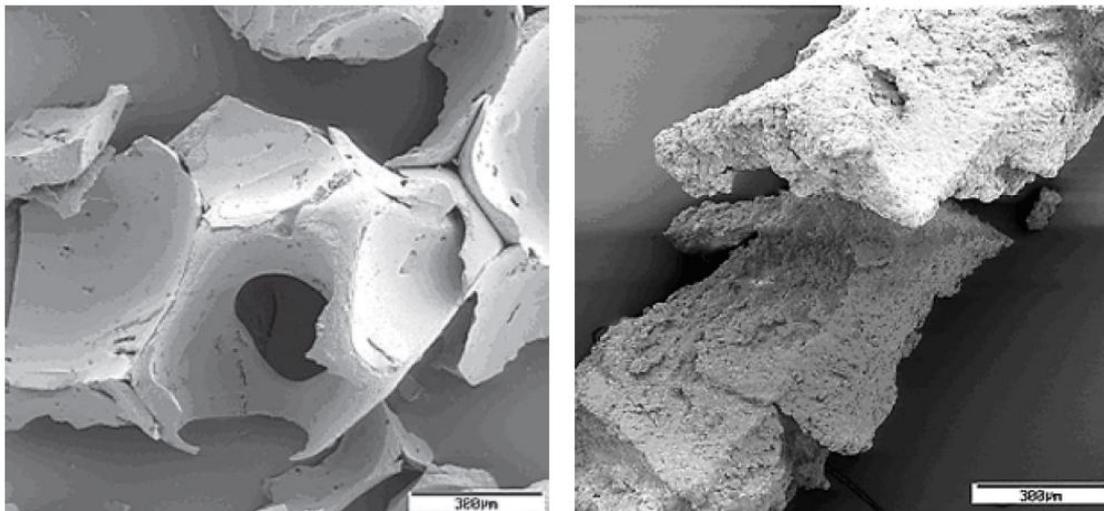


Figura 47 – Imagens obtidas por SEM de grânulos de Bone Ceramic® e de NanoBone®, adaptado de (233).

Estas alterações podem ser devidas à composição e ao processo de fabrico dos vários materiais. Enquanto o Bonelike® é um composto de hidroxiapatite trifásico reforçado com partículas de vidro (CaO-P₂O₅) e sinterizado a altas temperaturas (1300°C) (187, 229), o que conduz à produção de fosfato de tricálcio α e β, além da HA (234); o Bone Ceramic® é um fosfato de cálcio bifásico com 60% de hidroxiapatite e 40% de fosfato de tricálcio β, sinterizado a temperaturas de 1100 a 1500°C (233) e o NanoBone® é constituído por 76% de hidroxiapatite cristalina e 24% de sílica, produzido a 200°C (233). De acordo com estes dados, seria de esperar uma maior proximidade morfológica entre o Bonelike® e o Bone Ceramic®, o que de facto não se verifica. Acreditamos que tal facto dever-se-á à adição das partículas de vidro no caso do Bonelike®.

Estas diferenças a nível morfológico são corroboradas pela adsorção de nitrogénio, que demonstra que as partículas de Osteobiol® possuem uma área de superfície específica quinze vezes maior do que o Bonelike®, facto que é explicado pela forma das próprias partículas. Este parâmetro é favorável ao Osteobiol® em termos de respostas biológica. Laquerriere (231) demonstrou, em trabalhos realizados em culturas celulares de monócitos, e estudando a influência das características dos materiais no comportamento de alguns mediadores inflamatórios, que partículas com área de superfície reduzida aumentam a produção de IL-6 (citocina pró-inflamatória), indicando que esta característica em particular desempenha um papel importante na sua produção.

Também sabemos que a vascularização é promovida pela existência de áreas de superfície maiores, assim como pela existência de poros (235).

5. Tamanho das partículas

Relativamente ao tamanho das partículas, verificámos que os grânulos de Osteobiol® têm aproximadamente o dobro do tamanho dos grânulos de Bonelike®: D₅₀ de 670 e

325 μm respetivamente. Para além deste valor médio, a curva de granulometria do Osteobiol® compreende grânulos dos 298 aos 1330 μm , e a do Bonelike® grânulos dos 14,3 aos 510 μm . Acreditamos que as partículas mais pequenas do material sintético são devidas aos fragmentos dos próprios grânulos. Estas informações vêm contradizer de alguma forma os dados fornecidos pelos fabricantes dos respetivos materiais. No endereço eletrónico da Tecnos (236) está descrita para o Osteobiol Gen-Os® uma granulometria de 250-1000 micra. Podemos concluir que quer o valor mínimo quer o valor máximo por eles descritos não estão, de facto, em concordância com o que verificámos. Este facto está consonante com o descrito anteriormente na literatura (112), tendo sido encontrados os valores de 455-1260 μm para D_{10} e D_{90} , com D_{50} de 810 μm . As diferenças verificadas entre os estudos podem ser devidas a alguma variabilidade do lote do material utilizado para o trabalho experimental.

Relativamente ao Bonelike® a granulometria referenciada pelo produtor é de 250 a 500 micra e os valores que determinámos de 14,3 aos 510 μm . Embora o limite máximo esteja realmente concordante com o que esperávamos, o limite mínimo é francamente menor do que o reportado pelo fabricante. Este facto pode ter repercussões ao nível não só da reação inflamatória provocada aquando da implantação dos materiais, bem como dos fenómenos de osteointegração.

Laquerriere (154) defende que as características mais importantes das partículas na produção de uma reação inflamatória são a forma e o tamanho. As partículas *needle shaped* induzem a maior produção de citocinas inflamatórias, assim como as partículas com menor tamanho. Ghanaati (235) estudou um material sintético, o Cerasorb®, em cinco formulações distintas, que diferem na morfologia, no tamanho das partículas, na porosidade total e no tamanho dos poros. Concluiu que partículas com um tamanho médio de 150-500 μm e com uma forma poligonal dão origem a células gigantes multinucleadas mais rapidamente do que grânulos esféricos e polimorfos, de maior tamanho. A questão no nosso trabalho experimental é que as partículas mais pequenas são também aquelas que possuem contornos redondos. Na nossa opinião, há uma reação inflamatória mais exuberante no caso do Bonelike® devido essencialmente ao tamanho das partículas (sobretudo aquelas de 15 μm), e não tanto à forma e ao contorno por elas apresentados.

6. Porosidade

No que diz respeito a porosidade, medida por intrusão de mercúrio, ambos os materiais atingiram valores de cerca de 50%, resultado devido sobretudo aos espaços existentes entre as partículas. Este facto é mais claro para os resultados obtidos para o Bonelike®, uma vez que as partículas de Osteobiol® são constituídas por uma maior percentagem de osso esponjoso, que por definição, possui poros intraparticulares (esta característica é manifestamente visível nas imagens de microscopia eletrónica de varrimento - Figura 15). A percentagem de microporos (< 10 µm) é relativamente baixa em ambos os materiais (cerca de 12% da porosidade total).

Acerca da porosidade, sabemos que os macroporos com interconexões são importantes na medida em que permitem a penetração de células e evitam a obstrução física, permitindo a migração celular, neovascularização, circulação de água, nutrientes e gases e remoção de resíduos metabólicos (228). Relativamente ao tamanho dos poros necessários para que tal aconteça existe alguma variação: há autores que referem uma dimensão mínima de 100 µm (228, 237-239), outros que referem a importância dos poros terem entre 100 a 150 µm (240), outros que falam de poros superiores a 150 µm (140) e ainda outros que determinam um tamanho médio de 150-200 µm (235). Relativamente aos resultados que encontramos, o Osteobiol® possui uma porosidade de 53% e o Bonelike® de 48% (incluem-se nestes valores os poros inferiores a 400 µm).

Também sabemos que a vascularização é um requisito essencial para o sucesso de um material de enxerto ósseo, vascularização essa que é promovida pela existência de poros e de uma maior área de superfície (235). Outra questão pertinente é a influência que a porosidade tem na integração do material no leito implantar: uma alta porosidade induz o crescimento celular e de tecido conjuntivo no interior dos grânulos, enquanto materiais com baixa porosidade preenche os espaços existentes no leito implantar, atuando como uma barreira (235).

Bohner e colaboradores (241) estudaram a ligação entre a arquitetura do material e a resposta *in vivo*, salientando as dificuldades na definição de uma arquitetura ótima.

7. Composição química

Em termos de composição química, as análises realizadas confirmaram que o Bonelike® é exclusivamente composto por três fases cristalinas e inorgânicas: hidroxiapatite, fosfato tricálcio α e fosfato tricálcio β , enquanto que o Osteobiol® é composto por uma fase orgânica (colagénio tipo I) e uma fase inorgânica (hidroxiapatite carbonatada). No que diz respeito as razões Ca/P obtivemos valores ligeiramente inferiores para o Bonelike®, facto que já esperávamos, uma vez que este material contém α - e β -TCP, enquanto a fase inorgânica do Osteobiol® é apenas composta por hidroxiapatite.

Sabemos que a composição química dos materiais pode alterar o comportamento dos macrófagos em fenómenos como a adesão, apoptose, fusão e secreção de citocinas (242). No caso particular das razões Ca/P, sabemos que afetam a degradação dos materiais (243) e que também afetam a solubilidade das partículas, e consecutivamente a libertação de componentes. Adicionalmente foi reportado que os materiais compostos por hidroxiapatite e fosfato tricálcio induzem uma maior resposta inflamatória inicial quando comparados com aqueles compostos unicamente por hidroxiapatite (243), o que pode justificar, de facto, a reação mais intensa observada no caso do Bonelike®. Por outro lado, também há evidência que materiais que tenham baixa cristalinidade, como é o caso do Osteobiol®, são mais propensos à degradação (238) e portanto podem influenciar negativamente a resposta biológica por parte do organismo hospedeiro.

8. Hidrofilicidade/Hidrofobicidade

Outro aspeto investigado foi a natureza hidrofílica/hidrofóbica dos materiais, visto sabermos que as propriedades de superfície dos mesmos determinam a resposta do organismo hospedeiro, ou seja, as respostas inflamatória e imunitária. De uma forma geral os materiais hidrofílicos induzem respostas menos exuberantes quando

comparados com aqueles hidrofóbicos (11). Apesar das limitações experimentais com as quais nos deparámos na medição dos ângulos de contacto num material granular, ambas as amostras demonstraram ser hidrofílicas.

9. Resposta biológica a um material de substituição óssea

Bohner e colaboradores (241) debruçaram-se sobre a problemática de ainda não ter sido alcançado um consenso acerca do que é a arquitetura ótima de um material de substituição óssea. De acordo com os autores, as regras que derivam dos estudos realizados são vagas, e até contraditórias. Na sua opinião, a arquitetura ideal não existe, uma vez que ela é o equilíbrio entre diversos fatores: o próprio material, a biologia, as características dos poros, o doente e o tempo, numa relação que classificam por complexa. Como conclusão, os autores afirmam que definir uma arquitetura ideal é difícil por várias razões: cada material deve satisfazer vários requisitos – ser reabsorvível, permitir o crescimento ósseo e servir de suporte mecânico; é difícil caracterizar a arquitetura, quer em termos matemáticos, quer em termos técnicos; os produtos da biodegradação influenciam a resposta biológica e a degradação depende da composição do material e da sua solubilidade, assim como do paciente e da localização do enxerto. Todos estes parâmetros são mutáveis, e característicos de cada procedimento, não sendo passíveis de homogeneizar.

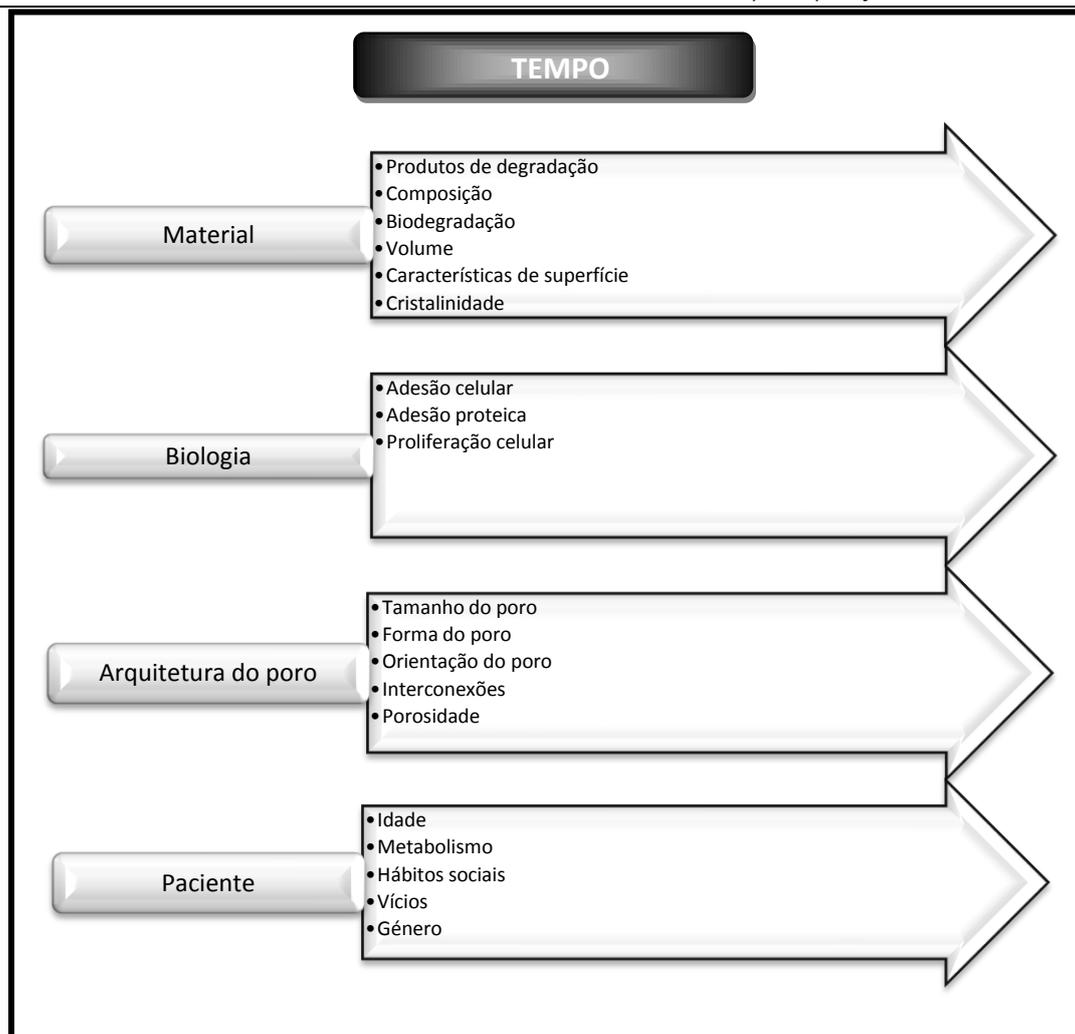


Figura 48 – Interrelação complexa entre fatores relacionados ao paciente, ao material, e às células presentes na superfície do mesmo. Adaptado de (241).

10. Inflamação – avaliação histológica

A implantação de biomateriais num qualquer organismo vivo despoleta uma resposta que compreende vários estadios, incluindo o inflamatório. Esta inflamação medeia a resposta celular que penetra o leito de implantação e que controla a integração do biomaterial, a sua degradação e a vascularização, através da secreção de citocinas modulatórias (235). A extensão desta resposta imune pode ser caracterizada pela

formação de tecido de granulação, reação de corpo estranho, fibrose e desenvolvimento de uma cápsula (141).

Develioglu (244) estudou um material xenógeno de origem bovina, implantando-o na calote de ratos durante 4 semanas. Descreve a formação de uma camada de tecido fibroso ao redor dos grânulos e também a presença de células gigantes multinucleadas. Não foi observado qualquer tipo de reabsorção, encontrando-se os grânulos intactos.

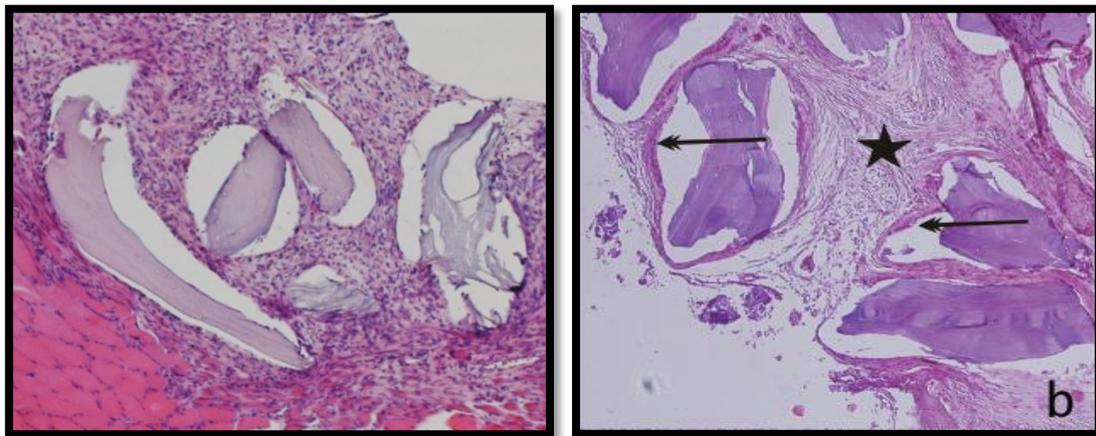


Figura 49 – Imagem histológica de uma das nossas lâminas de Osteobiol® e imagem dos resultados obtidos por Develioglu et al (244).

As imagens histológicas obtidas são em muito semelhantes, embora os modelos utilizados sejam distintos: nós implantámos o biomaterial em tecido muscular e Develioglu (244) fez a implantação em tecido ósseo, na calote craniana. São visíveis os grânulos do biomaterial com a sua forma irregular, rodeados por tecido nativo – no nosso caso, tecido muscular e no caso dos colegas, tecido ósseo. É visível o infiltrado inflamatório que rodeia as partículas do biomaterial. A camada de tecido fibroso ao redor dos grânulos é menor no nosso caso, facto que atribuímos à duração do ensaio (1 semana para 4 semanas). No entanto consideramos interessante o facto de, apenas passada uma semana, já ser claramente visível uma delimitação de cada grânulo por parte do organismo hospedeiro. Os cortes destas lâminas são particularmente difíceis, podendo originar a saída do grânulo da sua localização original ou a sua fragmentação.

Costa e colaboradores (242) estudaram a reação tecidual após a implantação de biomateriais sintéticos, mas usando uma alternativa de modelo (calote) e um período de tempo (1 mês) diferentes. Mesmo usando essas premissas, obtiveram resultados semelhantes: predomínio de células inflamatórias mononucleares, com distribuição homogênea de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo e proliferação celular discreta e sugestiva de células inflamatórias. Também observaram células gigantes multinucleadas ao redor dos grânulos do biomaterial, sugerindo uma tentativa por parte do organismo recetor de reabsorção.

Cruz e colaboradores (97) tinham feito uma avaliação semelhante ao objetivo do nosso estudo, durante 15 dias. Estudaram um material xenógeno (Gen-Ox[®]) e um material sintético (HA-U[®]) após implantação subcutânea em ratos. Verificaram que no xenoenxerto havia presença de edema e proliferação vascular, reação de corpo estranho, presença de linfócitos polimorfonucleares, fibrose e proliferação de fibroblastos à volta dos grânulos, referindo que no caso do material sintético, a inflamação era mais grave do que no Gen-Ox[®], sendo a diferença estatisticamente significativa. Os autores avaliaram a reação inflamatória não pela contagem total de células inflamatórias, mas através da medição da distância ocupada por estas células.

No estudo que realizámos observámos uma reação histológica mais exuberante no caso do biomaterial sintético, tal como seria expectado tendo em conta as características físico-químicas analisadas. O facto de este material apresentar grânulos de muito baixa dimensão (da ordem dos 15 µm), uma área de superfície específica menor e uma menor porosidade são parâmetros que podem ajudar a justificar este achado. Encontrámos também células gigantes multinucleadas (Figura 26), tal como descrito por outros autores. A camada fibrosa formada ao redor dos grânulos também é mais notória no caso do material sintético (Figura 25).

No nosso caso, e adotando a metodologia usada por El-Rouby e colaboradores (193), optámos por fazer a contagem de células inflamatórias por campo, uma vez que pensamos ser uma medida mais objetiva do que o espaço ocupado por elas. Obtivemos também uma diferença, sendo o valor encontrado mais elevado no material sintético. No entanto a diferença não é passível de mudança no grau de

inflamação, sendo ambas classificadas como inflamação moderada (entre 25 a 125 células inflamatórias por campo). Quanto às células gigantes multinucleadas contamos menos de 1 célula por campo, quer num biomaterial quer no outro, não havendo diferenças estatisticamente significativas.

11. Expressão genética

Quando implantamos um material num organismo vivo, sabemos *a priori* que vão ser despoletados uma série de eventos, devido ao facto do material ser considerado "*not-self*". A primeira resposta por parte do hospedeiro é iniciar uma reação inflamatória. As características desta reação podem ser múltiplas. As primeiras células que chegam à zona afetada são os neutrófilos, seguidos pelos macrófagos. Estes macrófagos são células que apresentam uma fagocitose aumentada e libertam mediadores e citocinas, que contribuem para a manutenção da resposta inflamatória. Os macrófagos ativados segregam três citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), que induzem muitas das alterações observadas na resposta inflamatória aguda localizada e sistémica. A formação de células gigantes multinucleadas, a produção de colagénio e a formação de uma cápsula fibrosa são consequências referidas na literatura (24), sendo entidades encontradas no local da implantação em estudos histológicos.

Mas sabemos que, após atingir a corrente sanguínea, as células inflamatórias, bem como as citocinas e quimiocinas podem produzir um outro tipo de resposta: a resposta sistémica ou generalizada. A produção de proteínas de fase aguda, febre e mobilização de metabolitos são exemplos de possíveis efeitos sistémicos.

12. Análise sistémica (das amostras de sangue periférico)

Os resultados obtidos não são passíveis de comparação com outros, uma vez que não encontramos, publicada na literatura, nenhuma avaliação sistémica pós-implantação de biomateriais. No entanto, discutiremos os resultados obtidos fazendo a comparação com estudos realizados a nível local.

Como resultado principal da avaliação realizada, verificou-se que ambos os materiais se comportam de forma análoga. A tendência de aumento ou diminuição no número de transcritos de cada gene avaliado segue exatamente a mesma lógica para o material xenógeno e para o material sintético. Mais concretamente, os transcritos do gene *IL-6* e *CCL3* diminuem para ambos os materiais e os transcritos dos genes *IL-1 β* , *TNF- α* e *CCL2* aumentam, também para ambos os materiais.

As diferenças obtidas entre a avaliação antes e depois da colocação do biomaterial são, para todos genes e para ambos os materiais, estatisticamente significativas, seguindo a tendência já referida.

A diferença entre a produção de *IL1- β* e *CCL2* também é estatisticamente significativa, sendo de realçar que o material xenógeno produz mais transcrito de *IL1- β* e o material sintético produz maiores quantidades de RNAm de *CCL2*. Assim, os resultados sugerem que o material sintético origina uma ativação dos macrófagos e uma polarização do sistema imunitário para Th2, comportamentos devidos à ação da quimiocina *CCL2*. O material xenógeno origina uma ativação dos linfócitos, por ação da citocina *IL-1 β* .

O gráfico da Figura 2, que exemplifica o que acontece numa resposta inflamatória fisiológica, permite verificar que, dos mediadores que escolhemos para genes alvo, há dois em que se observa o aumento da sua concentração numa fase mais precoce (*TNF- α* e *IL-1 β*) e outros dois que aparecem mais tardiamente (*CCL2* e *IL-6*).

No entanto, há autores (245) que consideram a *IL-6* como a citocina que regula a transição de inflamação aguda para inflamação crónica, por ser responsável pela

alteração da natureza do infiltrado inflamatório (de neutrófilos polimorfonucleares para monócitos/macrófagos), tal como se pretende explicar na Figura 50.

Considerando esta hipótese, é possível justificar a diminuição nos valores detetados no sangue, para os transcritos de *CCL3* e de *IL-6*, quando comparados com os ratos do grupo controlo, injetados com solução salina. A *IL-6* pode estar diminuída no sangue por estar aumentada a nível local, estando a ser recrutada para mediar a passagem de inflamação aguda para inflamação crónica.

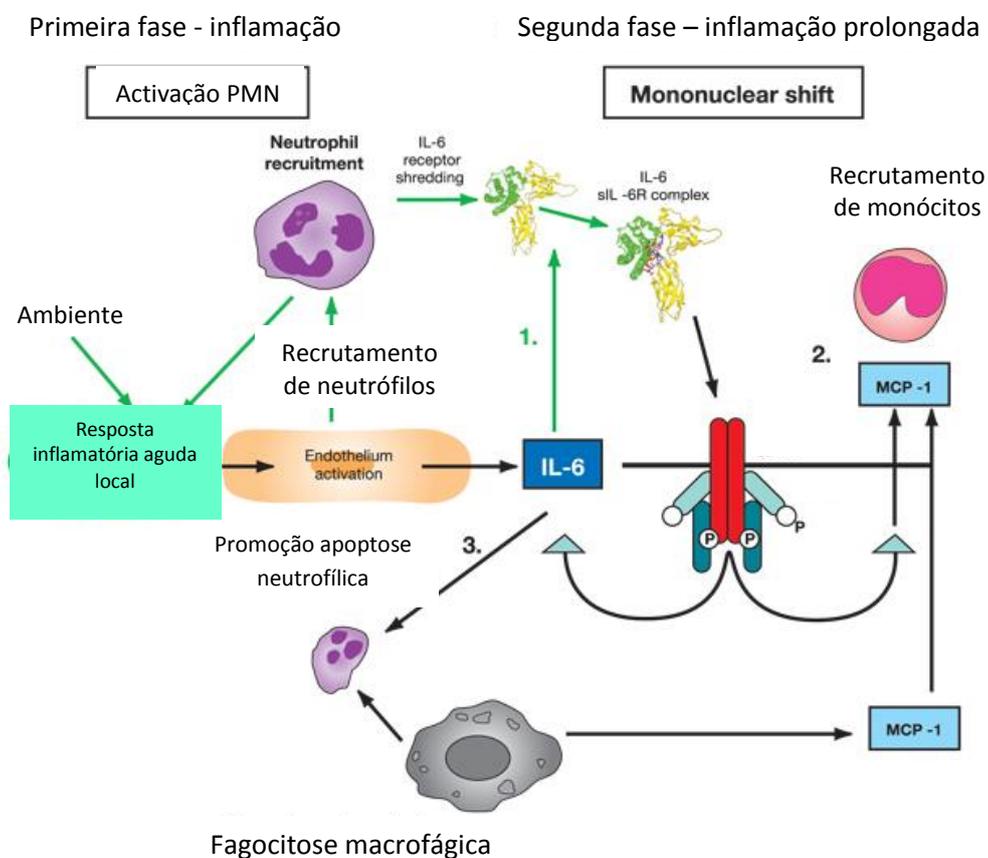


Figura 50 – Papel desempenhado pela IL-6 na passagem de inflamação aguda para inflamação crónica. Figura adaptada de (245). A IL-6 interfere com a fagocitose macrófagica e com o papel do MCP-1 no recrutamento de monócitos, o que vai perpetuar a inflamação aguda, e conduzi-la à cronicidade.

Outra questão que é relevante discutir é a origem da IL-6, cujos transcritos foram analisados no presente estudo. Sabemos que a IL-6 é também designada de “miocina”,

por poder ser sintetizada a nível muscular. Como a implantação dos materiais a estudar foi feita ao nível intramuscular, provavelmente foi potenciada a produção de IL-6 a nível local, além da IL-6 que deve ser produzida, também a nível local, pelos macrófagos ativados.

Quanto à quimiocina CCL3, sabemos que ela recruta e ativa os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). Por este motivo, ela terá uma ação prévia às citocinas TNF- α e IL-1 β referidas na Figura 2.

De modo a melhorar a compreensão dos resultados, apresenta-se na Figura 51 a hipótese mais provável para a sucessão dos mediadores inflamatórios subsequente à exposição aos biomateriais.



Figura 51 – Possível sequência de surgimento dos mediadores inflamatórios. Numa primeira fase haverá produção de CCL3. Numa segunda fase, os macrófagos ativados produzem TNF- α e IL-1 β , que vão ativar neutrófilos e linfócitos, respetivamente. A maior concentração de IL-1 β conduz a maiores produções de IL-6. A IL-6, como já foi referido, aumenta a expressão de CCL2 (ou MCP-1).

Consideramos que o esquema apresentado na Figura 51 representa com mais realismo o evento de acontecimentos, tendo em conta os resultados obtidos e algumas evidências da literatura, acrescentando ainda o facto de que a quimiocina CCL3 ou MIP-1 α recruta e ativa os leucócitos polimorfonucleares, neste caso com mais ênfase nos neutrófilos. Depois de serem recrutados e ativados, há expressão de citocinas e quimiocinas que ativam o endotélio e atuam como mediadores na migração de neutrófilos (TNF- α e IL-1 β). A IL-6 poderá ser, como já foi explicado anteriormente,

considerada uma citocina de transição. A quimiocina CCL2 ou MCP-1 será o mediador mais próximo da inflamação crónica, tido como indutor de uma imunidade polarizada para Th2 e ativador de macrófagos, o que levará a uma continuação do processo.

13. Análise local (das amostras de tecido muscular)

Esta parte do estudo deverá ser considerada “preliminar”, uma vez que os resultados apresentados correspondem apenas a 1 rato do grupo controlo (n=1), a 1 rato do grupo do material xenógeno (n=1) e à totalidade dos ratos do grupo do material sintético (n=5). Tal facto fica a dever-se à dificuldade extrema que se constatou, em extrair RNA em quantidade e qualidade (integridade) do tecido muscular, principalmente do grupo controlo. A quantidade de RNA que foi possível extrair das amostras foi muito reduzida e, naquelas que tinham uma concentração aceitável, o RNA apresentava-se degradado (com valores de RIN inaceitáveis).

No sentido de colmatar as dificuldades encontradas, recorreu-se ao uso de múltiplas técnicas: utilização de homogeneizador; brocas montadas em peça de mão portátil; equipamento TissueLyser® e extração a partir de quantidades diferentes de tecido, para testar se haveria maior rendimento da extração se, à partida, se utilizasse maior quantidade (miligramas de tecido). Todas as abordagens usadas se revelaram infrutíferas para a obtenção de RNA em quantidade e integridade adequadas para a prossecução dos ensaios de PCR em tempo real. Entendemos que a única razão que justificará este facto é o tecido muscular usado ser proveniente de um músculo postural e não desempenhar uma função preponderante para o rato, ao contrário por exemplo do que acontece com os músculos da marcha ou os músculos mastigadores. É lógico pensar que a dificuldade de extração se deverá ao conteúdo residual de RNA existente nestas células. Por esta razão, os valores apresentados referem-se apenas como médias, uma vez que não foi efetuada a análise estatística, por insuficiência de número. É de realçar que, partindo desta premissa, não é possível apresentar experiências com o número de animais necessários para apresentar estes resultados

como finais. Não se pode afirmar que o único exemplar de que foi possível extrair RNA com qualidade mínima para análise posterior corresponde à representação do que sucede em todos os animais. Além disso, uma vez que todos os resultados encontrados são normalizados para os genes endógenos e são relativos ao grupo controlo, dada a insuficiência de amostra, existindo RNA disponível de apenas um rato controlo, todos os resultados, mesmo aqueles referentes ao grupo do material sintético, serão apresentados somente como indicadores de uma tendência, com carácter preliminar.

Os resultados obtidos na análise da expressão dos transcritos dos cinco genes alvo, para ambos os materiais, vêm de encontro ao que foi verificado previamente na análise histológica, em concreto, na contagem de células inflamatórias por campo. O material sintético (nome comercial Bonelike®) apresentava uma resposta inflamatória mais intensa, ainda que classificada como moderada (112 ± 10 total de células inflamatórias por campo, média de 10 medições) e o material xenógeno (nome comercial Osteobiol®) também desencadeou uma resposta inflamatória moderada (84 ± 7 células inflamatórias por campo, média de dez medições). Assim, conclui-se que o material sintético origina uma resposta inflamatória, com o recrutamento de um maior número de células ao local, mesmo que esta diferença não seja estatisticamente significativa.

Os dados preliminares obtidos no estudo da expressão genética vêm corroborar o resultado da análise histológica. Os níveis de transcritos dos genes alvo para o material sintético, analisados no seu conjunto, são da ordem dos 304 (relativos aos cinco genes) enquanto os relativos ao material xenógeno são da ordem dos 274 (também relativos aos cinco genes alvo).

No que diz respeito à análise de cada mediador inflamatório *per se*, verificámos que os genes *CCL2*, *IL-1 β* , *IL-6* e *TNF- α* apresentam maior número de transcritos no caso dos animais implantados com o material sintético. O único mediador que surge com valores mais altos no caso do material xenógeno é o *CCL3*.

O *CCL3* (ou *MIP-1 α*) tem como efeito major a promoção de uma imunidade polarizada para Th1, ao contrário do *CCL2* (ou *MCP-1*) que polariza o sistema imunitário para Th2.

Os materiais estudados parecem, assim, responder de forma díspar aos materiais implantados.

A informação disponível na literatura, relativa à avaliação da expressão genética da reação inflamatória causada por materiais de enxerto ósseo é muito limitada. Markel et al (180) caracterizaram a resposta inflamatória local a quatro materiais comercializados com indicação de enxertos ósseos, utilizando um modelo diferente (bolsa de ar) e apenas um gene alvo: *IL-1 β* . Os autores concluíram que todos os produtos investigados provocaram uma reação inflamatória significativa, quando comparada com o grupo controlo (injetado com solução salina), uma vez que a expressão de *IL-1 β* foi mais elevada após o procedimento de implantação.

Schutte et al (30), num estudo de implantação subcutânea de biomateriais poliméricos, no interior de gaiolas de malha de aço inoxidável, concluíram que a produção local do gene *MCP-1 (CCL2)* permaneceu constante durante os primeiros 8 dias após a implantação. Estes resultados são exatamente o oposto do que se observa no presente estudo, uma vez que o mediador *CCL2* foi aquele que desencadeou um maior aumento nos transcritos de ambos os materiais, na avaliação local das amostras de tecido muscular. Estas diferenças podem ser atribuídas às propriedades físico-químicas díspares dos materiais utilizados (polímeros e materiais de hidroxiapatite são em tudo diferentes) e também no método de avaliação, uma vez que os autores avaliaram a medição de citocinas através da utilização de anticorpos secundários. Os próprios resultados são expressos na forma qualitativa, através de um mapa de calor, com cores, ao invés de ser uma avaliação quantitativa como é o caso da avaliação por PCR em tempo real.

Ryden et al (246) estudaram a resposta inflamatória, pós implantação subcutânea de implantes de titânio puro e de titânio revestido com hidroxiapatite. Os autores referem que a quimiocina *MCP-1 (CCL2)* recruta os monócitos circulantes, que depois maturam em macrófagos tecidulares e descrevem também um decréscimo rápido nos níveis deste mediador inflamatório, para todos os implantes durante o período de observação (24 e 72 horas). Embora no presente estudo não tenham sido avaliados tempos tão curtos de implantação, tendo sido realizada apenas uma avaliação aos 8

dias, estes resultados não são consistentes com aqueles por nós observados, sendo a quimiocina CCL2 aquela que demonstra as maiores subidas na análise local de ambos os materiais e também na análise sistémica do material sintético.

Capítulo 6

Conclusões

Após execução da totalidade do trabalho, e analisados os dois materiais selecionados em termos da sua caracterização físico-química, da análise histológica pós-implantação muscular e do estudo do número de transcritos dos genes *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *CCL2* e *CCL3* no sangue e no músculo, concluímos que:

1) Os dois materiais têm características físicas bastante diferentes, facto que já era esperado, tendo em conta a origem díspar de ambos. Após a realização da caracterização física, recorrendo a várias técnicas diferentes para avaliar várias características diferentes, concluímos que as partículas do material xenógeno são maiores do que as do material sintético (D_{10} 298 para $14 \mu\text{m}$; D_{50} 672 para $325 \mu\text{m}$; D_{90} 1330 para $510 \mu\text{m}$). A morfologia também é bastante diferente, com as partículas do material sintético a apresentarem-se mais cilíndricas, de contornos redondos e com superfícies lisas e monodispersas e as do material xenógeno maiores, altamente irregulares, com bordos afiados e polidispersas. Quanto à porosidade, o material xenógeno apresenta maior volume de mercúrio intruído ($0,54$ para $0,35 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), maior volume de mercúrio intruído em poros menores que $10 \mu\text{m}$ ($0,068$ para $0,046 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) e ligeiramente maior porosidade (53% para 48%). A área de superfície é maior no material xenógeno do que no material sintético ($9,404$ para $0,636 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). A densidade é maior no material sintético do que no material xenógeno ($2,77 \pm 0,05$ para $2,39 \pm 0,03 \text{ g cm}^{-3}$). Quanto à hidrofiliçidade, ambos os materiais se apresentaram como sendo hidrofílicos, sendo o valor do ângulo de contacto superior para o material xenógeno do que para o material sintético ($51,4 \pm 7^\circ$ para $26,7 \pm 4,3^\circ$).

2) Relativamente às propriedades químicas verificámos que o espectro de FTIR (que avalia a composição química) do material xenógeno é muito semelhante a outros já registados de osso humano ou animal, sendo visíveis as bandas de colagénio (amido I e amido II) e hidroxiapatite. No espectro do material sintético não é visível nenhuma banda correspondente ao colagénio, sendo detetáveis as bandas da hidroxiapatite. Quanto à cristalinidade, e avaliando os difratogramas obtidos por difração de raio X, concluímos que o material sintético apresenta picos de hidroxiapatite (JCPDS nº 09-

432), α -TCP (JCPDS nº 29-0359) e β -TCP (JCPDS nº 86-1585), enquanto que o material xenógeno apresenta apenas picos de hidroxiapatite. Quanto aos rácios Ca/P, em percentagem atómica, foram avaliados com valores superiores para o material sintético ($1,75 \pm 0,16$ para $1,35 \pm 0,07$ do material xenógeno).

3) As características físico-químicas observadas na análise por nós efetuada vão de encontro a outras já publicadas. É de salientar que a avaliação da hidrofiliidade não costuma ser efetuada e que os valores de distribuição das partículas não correspondem aqueles descritos pelos fabricantes destes materiais de enxerto ósseo. A TecnoSS[®], Giaveno, Itália anuncia o seu material como tendo tamanho de grânulos de 250 a 1000 μm , quando o verificado é de 298 a 1330 μm . A Medmat Innovation[®], Porto, Portugal relata que as suas partículas têm tamanhos entre 250 e 500 μm quando na realidade o detetado é 14,3 e 510 μm . As discrepâncias maiores verificam-se portanto no D_{10} do material sintético e no D_{90} do material xenógeno. É de referir que o tamanho médio das partículas do material xenógeno é 672 μm e do material sintético 326 μm .

4) Relativamente à resposta inflamatória avaliada através da histologia, verificámos que o material sintético despoleta uma reação inflamatória moderada, assim como o material xenógeno, tendo como base desta classificação o número total de células inflamatórias por campo (112 ± 10 para o material sintético e 84 ± 7 para o material xenógeno). No que diz respeito a tipologia destas células, para ambos os materiais é notório um predomínio claro de fibroblastos, havendo também alguns linfócitos e algumas células gigantes multinucleadas. Quanto à espessura da cápsula verifica-se que o material sintético origina uma cápsula com maior espessura, assim como potencia uma resposta com produção de maiores quantidades de colagénio e também maior fibrose. Todas estas constatações vêm de encontro ao que se tinha previsto aquando da caracterização dos materiais.

5) Após a implantação intramuscular de ambos os materiais é possível quantificar alterações no número de transcritos dos genes das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias escolhidas. No entanto, ao contrário do que inicialmente se previa, há alguns que aumentam a sua expressão no sangue periférico, havendo outros que se nota uma diminuição. Os genes *IL-6* e *CCL3* são aquelas que diminuem, sendo esta diminuição detetada em ambos os materiais. Os genes *IL-1 β* , *TNF- α* e *CCL2* aumentam a sua expressão, também para ambos os materiais. Existem diferenças estatisticamente significativas para os valores de transcritos do gene *IL-1 β* no material xenógeno quando comparado com o material sintético e nos valores de transcritos do gene *CCL2* para o material sintético quando comparado com o material xenógeno.

6) A reação local à implantação das partículas, apesar de todas as limitações e críticas passíveis de enumeração, parece ser muito mais exuberante do que a reação sistémica. Era o que se previa tendo em conta que, para atingir a corrente sanguínea, tem que haver aumento substancial nos tecidos locais. O material sintético apresenta valores superiores de expressão relativa dos genes de todos os mediadores (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* e *CCL2*), à exceção do gene *CCL3*, sendo o valor mais elevado do gene *CCL2*. Estes resultados são passíveis de alguma discussão, uma vez que tivemos, como já foi referido, algumas dificuldades em realizar a extração de RNA dos músculos controlo, mesmo recorrendo a várias técnicas possíveis. Quando comparamos a reação local com a reação sistémica, parece-nos haver uma muito maior similaridade de resposta nos dois materiais na avaliação local.

7) Fazendo o perfil da reação sistémica, observamos uma resposta diferente entre o material sintético e o material xenógeno. O material sintético provoca uma maior expressão de transcritos de *CCL2*, a quimiocina que ativa os macrófagos e que promove uma imunidade polarizada para Th2. O material xenógeno aumenta a expressão de transcritos de *IL-1 β* que ativa o endotélio vascular e que ativa também os linfócitos. Parece haver então um perfil de resposta distinto: o material xenógeno

parece ativar as células linfocitárias, enquanto que o material sintético parece ativar as células macrofágicas.

8) Fazendo o perfil da resposta localizada ao tecido muscular há pequenas diferenças entre os dois materiais, mas menos consistentes do que o verificado na resposta sistémica.

9) Em resumo, o material xenógeno, aos 8 dias, parece estar ainda numa fase inflamatória mais precoce do que acontece com o material sintético, durante o mesmo período temporal, por apresentar um nível mais elevado de transcritos de *IL-1 β* do que o material sintético. A exposição ao material sintético (nome comercial Bonelike®) apresenta valores inferiores de *IL-1 β* do que aquela origina pelo material xenógeno (nome comercial Osteobiol®), mas valores mais elevados de *CCL2*, diferença esta que é estatisticamente significativa, sugerindo que já se encontra numa fase mais avançada de reação inflamatória. Na análise local, com as ressalvas já referidas anteriormente, o material sintético apresenta valores mais elevados, quer de transcritos de *IL-6*, quer de *CCL2*, mas também de *TNF- α* e de *IL-1 β* . Estes resultados mostram que o aumento de mediadores inflamatórios no local de implantação leva a maiores concentrações dos mesmos mediadores no sangue periférico, demonstrando uma relação positiva com o que acontece numa abordagem sistémica e local.

10) É ainda relevante mencionar três limitações relevantes do modelo em estudo para testar a reação inflamatória. Em primeiro lugar, é importante ter em conta que os resultados a partir de modelos animais podem não ser facilmente transpostos para a biologia humana. Segundo, a avaliação realizada só estava focada em uma semana após a implantação, impedindo o conhecimento de outros eventos. Terceiro, foram analisados apenas cinco mediadores inflamatórios e haverá com certeza outros mediadores importantes em eventos inflamatórios.

Assim, são necessários mais estudos, nomeadamente que incluam outros materiais, mais tempos de exposição e avaliação de maior número de genes-alvo, a fim de esclarecer melhor os mecanismos moleculares subjacentes ao processo inflamatório. No entanto, este estudo é original e inovador e, apesar das referidas limitações, representa uma contribuição científica relevante na Medicina Dentária. Estudos como este podem trazer alguma luz para a compreensão da complexidade biológica e comportamento clínico dos substitutos ósseos.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

1. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;9:66.
2. McAuliffe JA. Bone graft substitutes. *J Hand Ther.* 2003 Apr-Jun;16(2):180-7.
3. Ilan DI. Bone Graft Substitutes. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery.*9(4):151-60.
4. Jensen SS, Terheyden H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24 Suppl:218-36.
5. Anderson J. Biological Responses to Materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001;31:81-110.
6. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008 Jul;29(20):2941-53.
7. Jones KS. Effects of biomaterial-induced inflammation on fibrosis and rejection. *Semin Immunol.* 2008 Apr;20(2):130-6.
8. Owen J, Punt J, Stranford S. *Kuby Immunology.* 7th ed: W. H. Freeman; 2013.
9. Kumar R, Clermont G, Vodovotz Y, Chow CC. The dynamics of acute inflammation. *J Theor Biol.* 2004 Sep 21;230(2):145-55.
10. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct;2(10):787-95.
11. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol.* 2007 Jan;44(1-3):82-94.
12. Janeway, Travers, Walpurt, Shlomchik. *Immunobiology The immune system in health and disease.* 6 ed: Churchill Livingstone; 2005.
13. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials.* 2011 Oct;32(28):6692-709.
14. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett.* 2013 Jan 28;328(2):222-5.
15. Ding T, Sun J, Zhang P. Immune evaluation of biomaterials in TNF-alpha and IL-1beta at mRNA level. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Nov;18(11):2233-6.
16. Hummel M, Czerlinski S, Friedel N, Liebenthal C, Hasper D, von Baehr R, et al. Interleukin-6 and interleukin-8 concentrations as predictors of outcome in ventricular

assist device patients before heart transplantation. *Crit Care Med.* 1994 Mar;22(3):448-54.

17. Suska F, Esposito M, Gretzer C, Kalltorp M, Tengvall P, Thomsen P. IL-1alpha, IL-1beta and TNF-alpha secretion during in vivo/ex vivo cellular interactions with titanium and copper. *Biomaterials.* 2003 Feb;24(3):461-8.
18. Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jul;2(7):527-35.
19. Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *Journal of Physiology* 2001;536(2):329-37.
20. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1379-406.
21. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005 Apr;98(4):1154-62.
22. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *Faseb J.* 2002 Sep;16(11):1335-47.
23. Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol.* 2000 Oct 1;528 Pt 1:157-63.
24. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008 Apr;20(2):86-100.
25. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.* 2005 Oct;125(4):615-28.
26. Rhodes NP, Hunt JA, Williams DF. Macrophage subpopulation differentiation by stimulation with biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 1997 Dec 15;37(4):481-8.
27. Helming L, Gordon S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.* 2009 Oct;19(10):514-22.
28. Kyriakides TR, Foster MJ, Keeney GE, Tsai A, Giachelli CM, Clark-Lewis I, et al. The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *Am J Pathol.* 2004 Dec;165(6):2157-66.
29. Hoenders CS, Harmsen MC, van Luyn MJ. The local inflammatory environment and microorganisms in "aseptic" loosening of hip prostheses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Jul;86(1):291-301.

30. Schutte RJ, Xie L, Klitzman B, Reichert WM. In vivo cytokine-associated responses to biomaterials. *Biomaterials*. 2009 Jan;30(2):160-8.
31. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and molecular Immunology*. 6^a ed: Saunders Elsevier; 2007.
32. Schmidt DR, Kao WJ. The interrelated role of fibronectin and interleukin-1 in biomaterial-modulated macrophage function. *Biomaterials*. 2007 Jan;28(3):371-82.
33. Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. 2009 Mar;30(8):1482-91.
34. Brown BN, Londono R, Tottey S, Zhang L, Kukla KA, Wolf MT, et al. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. *Acta Biomater*. 2012 Mar;8(3):978-87.
35. Brown BN, Badylak SF. Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions. *Acta Biomater*. 2012 Oct 23.
36. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005 Dec;5(12):953-64.
37. Webb DR. Animal models of human disease: Inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2013 Jun 26.
38. Wall RJ, Shani M. Are animal models as good as we think? *Theriogenology*. 2008 Jan 1;69(1):2-9.
39. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2731-8.
40. Westbrook AM, Szakmary A, Schiestl RH. Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models. *Mutat Res*. 2010 Jul-Sep;705(1):40-59.
41. Puel C, Mathey J, Agalias A, Kati-Coulibaly S, Mardon J, Obled C, et al. Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clin Nutr*. 2006 Oct;25(5):859-68.
42. Allen JE, Bischof RJ, Sucie Chang HY, Hirota JA, Hirst SJ, Inman MD, et al. Animal models of airway inflammation and airway smooth muscle remodelling in asthma. *Pulm Pharmacol Ther*. 2009 Oct;22(5):455-65.

43. Trifilieff A, El-Hashim A, Bertrand C. Time course of inflammatory and remodeling events in a murine model of asthma: effect of steroid treatment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Dec;279(6):L1120-8.
44. de Oliveira AP, Domingos HV, Cavriani G, Damazo AS, Dos Santos Franco AL, Oliani SM, et al. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Sep;293(3):C1120-8.
45. Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, Schaafsma D, Halayko AJ, Meurs H, et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison. *Eur Respir J*. 2007 Oct;30(4):653-61.
46. Kirschvink N, Leemans J, Delvaux F, Snaps F, Clercx C, Gustin P. Functional, inflammatory and morphological characterisation of a cat model of allergic airway inflammation. *Vet J*. 2007 Nov;174(3):541-53.
47. Redman TK, Rudolph K, Barr EB, Bowen LE, Muggenburg BA, Bice DE. Pulmonary immunity to ragweed in a Beagle dog model of allergic asthma. *Exp Lung Res*. 2001 Jul-Aug;27(5):433-51.
48. Mitchell HW, Turner DJ, Gray PR, McFawn PK. Compliance and stability of the bronchial wall in a model of allergen-induced lung inflammation. *J Appl Physiol*. 1999 Mar;86(3):932-7.
49. Bischof RJ, Snibson K, Shaw R, Meeusen EN. Induction of allergic inflammation in the lungs of sensitized sheep after local challenge with house dust mite. *Clin Exp Allergy*. 2003 Mar;33(3):367-75.
50. Van Scott MR, Hooker JL, Ehrmann D, Shibata Y, Kukoly C, Salleng K, et al. Dust mite-induced asthma in cynomolgus monkeys. *J Appl Physiol*. 2004 Apr;96(4):1433-44.
51. Tommila M, Jokinen J, Wilson T, Forsback AP, Saukko P, Penttinen R, et al. Bioactive glass-derived hydroxyapatite-coating promotes granulation tissue growth in subcutaneous cellulose implants in rats. *Acta Biomater*. 2008 Mar;4(2):354-61.
52. Ye Q, Ohsaki K, Li K, Li DJ, Zhu CS, Ogawa T, et al. Histological reaction to hydroxyapatite in the middle ear of rats. *Auris Nasus Larynx*. 2001 Apr;28(2):131-6.
53. Okazaki A, Koshino T, Saito T, Takagi T. Osseous tissue reaction around hydroxyapatite block implanted into proximal metaphysis of tibia of rat with collagen-induced arthritis. *Biomaterials*. 2000 Mar;21(5):483-7.

54. Walschus U, Hoene A, Neumann HG, Wilhelm L, Lucke S, Luthen F, et al. Morphometric immunohistochemical examination of the inflammatory tissue reaction after implantation of calcium phosphate-coated titanium plates in rats. *Acta Biomater.* 2009 Feb;5(2):776-84.
55. Figueiredo A, Coimbra P, Cabrita A, Guerra F, Figueiredo M. Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013 Aug 1;33(6):3506-13.
56. Hunt JA, Flanagan BF, McLaughlin PJ, Strickland I, Williams DF. Effect of biomaterial surface charge on the inflammatory response: evaluation of cellular infiltration and TNF alpha production. *J Biomed Mater Res.* 1996 May;31(1):139-44.
57. Rhodes NP, Bartolo CD, Hunt JA. Analysis of the cellular infiltration of benzyl-esterified hyaluronan sponges implanted in rats. *Biomacromolecules.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Sep;8(9):2733-8.
58. Walschus U, Hoene A, Patrzyk M, Finke B, Polak M, Lucke S, et al. Serum profile of pro- and anti-inflammatory cytokines in rats following implantation of low-temperature plasma-modified titanium plates. *J Mater Sci Mater Med.* 2012 May;23(5):1299-307.
59. Mainard. Les substituts osseux em 2001: Monographie Editée par GESTO (Association pour L'étude des Greffes et substitutes Tissulaires en Orthopédie) sous la direction de Dr. Mainard. Edition Romillat ed. Paris2001.
60. Elsalanty ME, Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 2009 Oct;2(3):125-34.
61. Jensen S, Bosshardt D, Buser D. Bone Grafts and Bone Substitute Materials. In: Buser D, editor. 20 years of guided bone regeneration in implant dentistry. 2nd ed. Singapore: Quintessence Publishing Co.; 2009. p. 71-96.
62. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Dec;40(8):706-18.
63. Cato L. Bone Graft Substitutes. West Conshohocken: ASTM International; 2003.
64. Stavropoulos A, Windisch P, Szendroi-Kiss D, Peter R, Gera I, Sculean A. Clinical and histologic evaluation of granular Beta-tricalcium phosphate for the treatment of

human intrabony periodontal defects: a report on five cases. *J Periodontol.* 2010 Feb;81(2):325-34.

65. Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater.* 2011 Jan;27(1):61-70.

66. Bashutski JD, Wang HL. Periodontal and endodontic regeneration. *J Endod.* 2009 Mar;35(3):321-8.

67. Windisch P, Szendroi-Kiss D, Horvath A, Suba Z, Gera I, Sculean A. Reconstructive periodontal therapy with simultaneous ridge augmentation. A clinical and histological case series report. *Clin Oral Investig.* 2008 Sep;12(3):257-64.

68. Oh SL, Fouad AF, Park SH. Treatment strategy for guided tissue regeneration in combined endodontic-periodontal lesions: case report and review. *J Endod.* 2009 Oct;35(10):1331-6.

69. Ferri J, Dujoncquoy JP, Carneiro JM, Raoul G. Maxillary reconstruction to enable implant insertion: a retrospective study of 181 patients. *Head Face Med.* 2008;4:31.

70. Handschel J, Simonowska M, Naujoks C, Depprich RA, Ommerborn MA, Meyer U, et al. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. *Head Face Med.* 2009;5:12.

71. Depprich RA, Handschel JG, Naujoks C, Hahn T, Meyer U, Kubler NR. Sinus lifting before Le Fort I maxillary osteotomy: a suitable method for oral rehabilitation of edentulous patients with skeletal class-III conditions: review of the literature and report of a case. *Head Face Med.* 2007;3:2.

72. Lin L, Chen MY, Ricucci D, Rosenberg PA. Guided tissue regeneration in periapical surgery. *J Endod.* 2010 Apr;36(4):618-25.

73. Sreedevi P, Varghese N, Varugheese JM. Prognosis of periapical surgery using bonegrafts: A clinical study. *J Conserv Dent.* 2011 Jan;14(1):68-72.

74. Sumer M, Keles GC, Cetinkaya BO, Balli U, Pamuk F, Uckan S. Autogenous cortical bone and bioactive glass grafting for treatment of intraosseous periodontal defects. *Eur J Dent.* 2013 Jan;7(1):6-14.

75. Riachi F, Naaman N, Tabarani C, Aboelsaad N, Aboushelib MN, Berberi A, et al. Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. *Int J Dent.* 2012;2012:737262.

76. Yilmaz S, Karaca EO, Ipci SD, Cakar G, Kuru BE, Kullu S, et al. Radiographic and histologic evaluation of platelet-rich plasma and bovine-derived xenograft combination in bilateral sinus augmentation procedure. *Platelets*. 2013;24(4):308-15.
77. Aloy-Prosper A, Maestre-Ferrin L, Penarrocha-Oltra D, Penarrocha-Diago M. Bone regeneration using particulate grafts: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar;16(2):e210-4.
78. Felice P, Piana L, Checchi L, Corvino V, Nannmark U, Piattelli M. Vertical ridge augmentation of an atrophic posterior mandible with an inlay technique and cancellous equine bone block: a case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2013 Mar-Apr;33(2):159-66.
79. Urban IA, Nagursky H, Lozada JL, Nagy K. Horizontal ridge augmentation with a collagen membrane and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 25 patients. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2013 May-Jun;33(3):299-307.
80. Block MS, Ducote CW, Mercante DE. Horizontal augmentation of thin maxillary ridge with bovine particulate xenograft is stable during 500 days of follow-up: preliminary results of 12 consecutive patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jun;70(6):1321-30.
81. Fu JH, Wang HL. Horizontal bone augmentation: the decision tree. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2011 Jul-Aug;31(4):429-36.
82. Araujo PP, Oliveira KP, Montenegro SC, Carreiro AF, Silva JS, Germano AR. Block allograft for reconstruction of alveolar bone ridge in implantology: a systematic review. *Implant Dent*. 2013 Jun;22(3):304-8.
83. Jo JH, Kim SG, Oh JS. Bone graft using block allograft as a treatment of failed implant sites: clinical case reports. *Implant Dent*. 2013 Jun;22(3):219-23.
84. Kivovics M. ["Osteobiol" and other bone graft materials used in Hungary]. *Fogorv Sz*. 2013 Mar;106(1):33-8.
85. Lindhe J, Cecchinato D, Donati M, Tomasi C, Liljenberg B. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Apr 4.

86. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.
87. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med*. 2002 Apr-Jun;48(2):142-8.
88. Gutierrez M LM, Hussain NS, Cabral AT, Almeida L, Santos JD. Substitutos Ósseos - Conceitos Gerais e Estado Actual. *ARQUIVOS DE MEDICINA*. 2006;19(4):153-62.
89. Buser D. 20 Years of Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry. 2nd ed: Quintessence Books; 2009.
90. Cawood JI, Howell RA. A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Aug;17(4):232-6.
91. Tonelli P, Duvina M, Barbato L, Biondi E, Nuti N, Brancato L, et al. Bone regeneration in dentistry. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011 Sep;8(3):24-8.
92. Hansson S, Halldin A. Alveolar ridge resorption after tooth extraction: A consequence of a fundamental principle of bone physiology. *J Dent Biomech*. 2012;3:1758736012456543.
93. Van der Stok J, Van Lieshout EM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):739-50.
94. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*. 2004 Mar;25(6):987-94.
95. Masago H, Shibuya Y, Munemoto S, Takeuchi J, Umeda M, Komori T, Kuboki Y. Alveolar Ridge Augmentation Using Various Bone Substitutes -A Web Form of Titanium Fibers Promotes Rapid Bone Development. *Kobe J Med Sci*. 2007;53(5):257-63.
96. Catros S, Guillemot F, Lebraud E, Chanseau C, Perez S, Bareille R, Amédeé J, Fricain JC. Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. *IRBM*. 2010;31:226-33.
97. da Cruz AC, Pochapski MT, Daher JB, da Silva JC, Pilatti GL, Santos FA. Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites. *J Oral Sci*. 2006 Dec;48(4):219-26.

98. Thuaksuban N, Nuntanaranont T, Pripatnanont P. A comparison of autogenous bone graft combined with deproteinized bovine bone and autogenous bone graft alone for treatment of alveolar cleft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Dec;39(12):1175-80.
99. 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 in animals: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Jan;41(1):114-20.
100. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003;5(3):154-60.
101. Cricchio G, Lundgren S. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003;5(3):161-9.
102. Zinser MJ, Randelzhofer P, Kuiper L, Zoller JE, Lange GL. The predictors of implant failure after maxillary sinus floor augmentation and reconstruction: a retrospective study of 1045 consecutive implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Dec 12.
103. Maestre-Ferrin L, Boronat-Lopez A, Penarrocha-Diago M. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Aug;14(8):e402-7.
104. Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury.* 2011 Sep;42 Suppl 2:S56-63.
105. Sbordone C, Toti P, Guidetti F, Califano L, Bufo P, Sbordone L. Volume changes of autogenous bone after sinus lifting and grafting procedures: A 6-year computerized tomographic follow-up. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Oct 17.
106. Berven S, Tay BK, Kleinstueck FS, Bradford DS. Clinical applications of bone graft substitutes in spine surgery: consideration of mineralized and demineralized preparations and growth factor supplementation. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S169-77.
107. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury.* 2011 Sep;42 Suppl 2:S16-21.
108. Blokhuis TJ, Arts JJ. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury.* 2011 Sep;42 Suppl 2:S26-9.

109. Dinopoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. Bone graft substitutes: What are the options? *Surgeon*. 2012 Aug;10(4):230-9.
110. Blokhuis TJ, Lindner T. Allograft and bone morphogenetic proteins: an overview. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S33-6.
111. Stevenson S, Horowitz M. The response to bone allografts. *J Bone Joint Surg Am*. 1992 Jul;74(6):939-50.
112. Figueiredo M, Henriques J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes--comparison with human bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Feb;92(2):409-19.
113. Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed Mater Eng*. 2002;12(1):15-35.
114. Nannmark U, Sennerby L. The bone tissue responses to prehydrated and collagenated cortico-cancellous porcine bone grafts: a study in rabbit maxillary defects. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008 Dec;10(4):264-70.
115. Simion M, Fontana F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review. *Minerva Stomatol*. 2004 May;53(5):191-206.
116. Palmer R. *Implants in Clinical Dentistry*. 2nd ed. London: Informa Healthcare; 2012.
117. Huber FX, Berger I, McArthur N, Huber C, Kock HP, Hillmeier J, et al. Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jan;19(1):33-8.
118. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996 Jan-Feb;11(1):55-66.
119. Leupold JA, Barfield WR, An YH, Hartsock LA. A comparison of ProOsteon, DBX, and collagraft in a rabbit model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006 Nov;79(2):292-7.
120. Feifel H. [Bone regeneration in Pro Osteon 500 alone and in combination with Colloss in the patellar gliding model of the rabbit]. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2000 Sep;4 Suppl 2:S527-30.

121. Schnettler R, Knoss PD, Heiss C, Stahl JP, Meyer C, Kilian O, et al. Enhancement of bone formation in hydroxyapatite implants by rhBMP-2 coating. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009 Jul;90(1):75-81.
122. Werber KD, Brauer RB, Weiss W, Becker K. Osseous integration of bovine hydroxyapatite ceramic in metaphyseal bone defects of the distal radius. *J Hand Surg Am.* 2000 Sep;25(5):833-41.
123. Avila-Ortiz G, Elangovan S, Karimbux N. Bone Graft Substitutes for Periodontal Use Available in the United States. *Clinical Advances in Periodontics.* 2012;0(0):1-15.
124. Hsu Y, Wang H. How to Properly Select Bone Replacement Grafts for Various Periodontal/Implant Indications? *Clinical Advances in Periodontics.* 2012;0(0):1-24.
125. Chitsazi MT, Shirmohammadi A, Faramarzie M, Pourabbas R, Rostamzadeh A. A clinical comparison of nano-crystalline hydroxyapatite (Ostim) and autogenous bone graft in the treatment of periodontal intrabony defects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 May;16(3):e448-53.
126. Arora R, Milz S, Sprecher C, Sitte I, Blauth M, Lutz M. Behaviour of ChronOS Inject in metaphyseal bone defects of distal radius fractures: tissue reaction after 6-15 months. *Injury.* 2012 Oct;43(10):1683-8.
127. Van Hoff C, Samora JB, Griesser MJ, Crist MK, Scharschmidt TJ, Mayerson JL. Effectiveness of ultraporous beta-tricalcium phosphate (vitoss) as bone graft substitute for cavitary defects in benign and low-grade malignant bone tumors. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 2012 Jan;41(1):20-3.
128. Kapur RA, Amirfeyz R, Wylde V, Blom AW, Nelson IW, Hutchinson J. Clinical outcomes and fusion success associated with the use of BoneSave in spinal surgery. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010 May;130(5):641-7.
129. Ooms EM, Wolke JG, van de Heuvel MT, Jeschke B, Jansen JA. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials.* 2003 Mar;24(6):989-1000.
130. Simpson RL, Wiria FE, Amis AA, Chua CK, Leong KF, Hansen UN, et al. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/hydroxylapatite and beta-tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Jan;84(1):17-25.

131. Zheng X, He J. [Effect evaluation of medical calcium sulfate--OsteoSet in repairing jaw bone defect]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2012 Jan;26(1):87-90.
132. Panagopoulos P, Tsaganos T, Plachouras D, Carrer DP, Papadopoulos A, Giamarellou H, et al. In vitro elution of moxifloxacin and fusidic acid by a synthetic crystalline semihydrate form of calcium sulphate (Stimulan). *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Dec;32(6):485-7.
133. Folsch C, Pinkernell R, Stiletto R. [Biocompatibility of polymer-bioglass cement Cortoss(R): in vitro test with the MG63 cell model]. *Orthopade*. 2013 Mar;42(3):170-6.
134. Hallman M, Sennerby L, Zetterqvist L, Lundgren S. A 3-year prospective follow-up study of implant-supported fixed prostheses in patients subjected to maxillary sinus floor augmentation with a 80:20 mixture of deproteinized bovine bone and autogenous bone Clinical, radiographic and resonance frequency analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 May;34(3):273-80.
135. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Apr;38(4):356-62.
136. Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Sep-Oct;21(5):696-710.
137. Browaeys H, Bouvry P, De Bruyn H. A literature review on biomaterials in sinus augmentation procedures. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007 Sep;9(3):166-77.
138. Nkenke E, Stelzle F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Sep;20 Suppl 4:124-33.
139. Nuss KM, von Rechenberg B. Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics. *Open Orthop J*. 2008;2:66-78.
140. Tampieri A, Celotti G, Sprio S, Delcogliano A, Franzese S. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(11):1365-70.

141. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001;31:81-110.
142. Prudhommeaux F, Schiltz C, Liote F, Hina A, Champy R, Bucki B, et al. Variation in the inflammatory properties of basic calcium phosphate crystals according to crystal type. *Arthritis Rheum.* 1996 Aug;39(8):1319-26.
143. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, et al. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jul;46(1):103-11.
144. Sun JS, Tsuang YH, Chang WH, Li J, Liu HC, Lin FH. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials.* 1997 May;18(9):683-90.
145. Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jun 15;45(4):311-21.
146. Grandjean-Laquerriere A, Tabary O, Jacquot J, Richard D, Frayssinet P, Guenounou M, et al. Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles. *Biomaterials.* 2007 Jan;28(3):400-4.
147. Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Aguado E, Daculsi G. Short-term effects of mineral particle sizes on cellular degradation activity after implantation of injectable calcium phosphate biomaterials and the consequences for bone substitution. *Bone.* 1999 Aug;25(2 Suppl):71S-4S.
148. Nagase M, Nishiya H, Abe Y. The effect of crystallinity on hydroxyapatite-induced production of reactive oxygen metabolites by polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.* 1993 Jul 5;325(3):247-50.
149. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Guenounou M, Laurent-Maquina D, Frayssinet P, Nardind M. Correlation between sintering temperature of hydroxyapatite particles and the production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2003;30(3):207-13.
150. Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, et al. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res.* 1996 May;31(1):19-26.

151. Guo L, Huang M, Zhang X. Effects of sintering temperature on structure of hydroxyapatite studied with Rietveld method. *J Mater Sci Mater Med*. 2003 Sep;14(9):817-22.
152. Velard F, Laurent-Maquin D, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec JM, et al. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta Biomater*. 2009 Jun;5(5):1708-15.
153. Lange T, Schilling AF, Peters F, Haag F, Morlock MM, Rueger JM, et al. Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(29):5312-8.
154. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M. Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials*. 2003 Jul;24(16):2739-47.
155. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Addadi-Rebbah S, Jallot E, Laurent-Maquin D, Frayssinet P, et al. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(13):2515-24.
156. Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Laurent-Maquin D, Guenounou M, Phillips TM. The effect of the physical characteristics of hydroxyapatite particles on human monocytes IL-18 production in vitro. *Biomaterials*. 2004 Dec;25(28):5921-7.
157. Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, Nedelec JM, Guenounou M, Laurent-Maquin D, et al. Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. *Biomaterials*. 2006 Jun;27(17):3195-200.
158. Ninomiya JT, Struve JA, Stelloh CT, Toth JM, Crosby KE. Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *J Orthop Res*. 2001 Jul;19(4):621-8.
159. Lange T, Schilling AF, Peters F, Mujas J, Wicklein D, Amling M. Size dependent induction of proinflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalciumphosphate in vitro. *Biomaterials*. 2011 Jun;32(17):4067-75.

160. Cheung HS, Devine TR, Hubbard W. Calcium phosphate particle induction of metalloproteinase and mitogenesis: effect of particle sizes. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997 May;5(3):145-51.
161. Chen S, Jones JA, Xu Y, Low HY, Anderson JM, Leong KW. Characterization of topographical effects on macrophage behavior in a foreign body response model. *Biomaterials*. 2010 May;31(13):3479-91.
162. Hu WJ, Eaton JW, Ugarova TP, Tang L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):1231-8.
163. Maciel J, Oliveira MI, Goncalves RM, Barbosa MA. The effect of adsorbed fibronectin and osteopontin on macrophage adhesion and morphology on hydrophilic and hydrophobic model surfaces. *Acta Biomater*. 2012 Oct;8(10):3669-77.
164. Brodbeck WG, Nakayama Y, Matsuda T, Colton E, Ziats NP, Anderson JM. Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine*. 2002 Jun 21;18(6):311-9.
165. Velard F, Braux J, Amedee J, Laquerriere P. Inflammatory cells response to calcium phosphate biomaterial particles: An overview. *Acta Biomater*. 2012 Oct 2.
166. Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater*. 2011;21:407-29; discussion 29.
167. Gopinath VK, Musa M, Samsudin AR, Lalitha P, Sosroseno W. Role of nitric oxide in hydroxyapatite-induced phagocytosis by murine macrophage cell line (RAW264.7). *Arch Oral Biol*. 2006 Apr;51(4):339-44.
168. Motskin M, Muller KH, Genoud C, Monteith AG, Skepper JN. The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment. *Biomaterials*. 2011 Dec;32(35):9470-82.
169. Loven J, Orlando DA, Sigova AA, Lin CY, Rahl PB, Burge CB, et al. Revisiting global gene expression analysis. *Cell*. 2012 Oct 26;151(3):476-82.
170. Leong DT, Gupta A, Bai HF, Wan G, Yoong LF, Too HP, et al. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials*. 2007 Jan;28(2):203-10.

171. Braza F, Soulillou JP, Brouard S. Gene expression signature in transplantation tolerance. *Clin Chim Acta*. 2012 Sep 8;413(17-18):1414-8.
172. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15448-53.
173. Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tisone G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest*. 2008 Aug;118(8):2845-57.
174. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1836-47.
175. Natrajan R, Wilkerson P. From integrative genomics to therapeutic targets. *Cancer Res*. 2013 Jun 15;73(12):3483-8.
176. Fyffe C, Falasca M. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 as an emerging target in the management of breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2013;5:271-80.
177. Chen WX, Hu Q, Qiu MT, Zhong SL, Xu JJ, Tang JH, et al. miR-221/222: promising biomarkers for breast cancer. *Tumour Biol*. 2013 Jun;34(3):1361-70.
178. Lim B, Cream LV, Harvey HA. Update on clinical trials: genetic targets in breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2013;779:35-54.
179. Garrigues GE, Cho DR, Rubash HE, Goldring SR, Herndon JH, Shanbhag AS. Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(16):2933-45.
180. Markel DC, Guthrie ST, Wu B, Song Z, Wooley PH. Characterization of the inflammatory response to four commercial bone graft substitutes using a murine biocompatibility model. *J Inflamm Res*. 2012;5:13-8.
181. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*. 2001 Dec;25(4):419-29.
182. Mauney JR, Jaquiere C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(16):3173-85.

183. Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Tateishi T. Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Lett.* 2003 May 8;542(1-3):95-9.
184. Ramirez-Fernandez M, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Mate-Sanchez del Val JE, Vicente-Ortega V, Meseguer-Olmos L. Bone response to hydroxyapatites with open porosity of animal origin (porcine [OsteoBiol mp3] and bovine [Endobon]): a radiological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Jul;22(7):767-73.
185. Santos JD, Hastings GW, Knowles JC. , inventor Sintered hydroxyapatite compositions and method for the preparation thereof European Patent WO 00681641999.
186. Gutierrez M, Lopes MA, Sooraj Hussain N, Lemos AF, Ferreira JM, Afonso A, et al. Bone ingrowth in macroporous Bonelike for orthopaedic applications. *Acta Biomater.* 2008 Mar;4(2):370-7.
187. Prado da Silva MH LA, Gibson IR, Ferreira JMF, Santos JD. Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives. *Journal of Non-Crystalline Solids.* 2002;304:286-92.
188. Gomes PS, Santos JD, Fernandes MH. Cell-induced response by tetracyclines on human bone marrow colonized hydroxyapatite and Bonelike. *Acta Biomater.* 2008 May;4(3):630-7.
189. Lopes MA KJ, Santos JD. Structural insights of glass-reinforced hydroxyapatite composites by Rietveld refinement. *Biomaterials.* 2000 Sep;21(18):1905-10.
190. Lobato JV, Hussain NS, Botelho CM, Mauricio AC, Afonso A, Ali N, Santos JD. Assessment of Bonelike graft with a resorbable matrix using an animal model. *Thin Solid Films.* 2006;515:362-7.
191. Bonelike Graft for Regenerative Bone Applications Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices. In: Jackson MJ, Ahmed W, editors.: Springer US; 2007. p. 477-512.
192. Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *J Dent Res.* 2011 Sep;90(9):1052-61.
193. El-Rouby DH A-HS. A comparative histological, histochemical and immunohistochemical study of the biocompatibility of three different nano-restorative

- materials implanted in rats' connective tissue. *Egyptian Dental Journal*. 2009;55(3.1):1-23.
194. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.
195. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002 Aug;29(1):23-39.
196. Carvalho-Gaspar M, Billing JS, Spriewald BM, Wood KJ. Chemokine gene expression during allograft rejection: comparison of two quantitative PCR techniques. *J Immunol Methods*. 2005 Jun;301(1-2):41-52.
197. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001 Dec;25(4):386-401.
198. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
199. Motulsky H. *Prism 5 Statistics Guide*. San Diego CA: GraphPad Software Inc.; 2007.
200. Figueiredo M, Fernando A, Martins G, Freitas J, Judas F, Figueiredo H. Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International*. 2010;36(8):2383-93.
201. Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*. 2002;23(24):4811-8.
202. Rapacz-Kmita A, Ślósarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiewicz C. Phase stability of hydroxyapatite–zirconia (HAp–ZrO₂) composites for bone replacement. *Journal of Molecular Structure*. 2004;704(1–3):333-40.
203. Mendes SC, Reis RL, Bovell YP, Cunha AM, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD. Biocompatibility testing of novel starch-based materials with potential application in orthopaedic surgery: a preliminary study. *Biomaterials*. 2001 Jul;22(14):2057-64.
204. Shishatskaya EI, Voinova ON, Goreva AV, Mogilnaya OA, Volova TG. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jun;19(6):2493-502.

205. Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, Thomsen P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17(6):669-87.
206. Klink CD, Junge K, Binnebosel M, Alizai HP, Otto J, Neumann UP, et al. Comparison of long-term biocompatibility of PVDF and PP meshes. *J Invest Surg.* 2011;24(6):292-9.
207. Ferreira L, Rafael A, Lamghari M, Barbosa MA, Gil MH, Cabrita AM, et al. Biocompatibility of chemoenzymatically derived dextran-acrylate hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Mar 1;68(3):584-96.
208. Crespi R, Cappare P, Gherlone E. Comparison of magnesium-enriched hydroxyapatite and porcine bone in human extraction socket healing: a histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011 Sep-Oct;26(5):1057-62.
209. Rohn A, Moslemi N, Eslami B, Abadi HK, Paknejad M. Histologic Evaluation of Bone Healing Following Application of Anorganic Bovine Bone and beta-tricalcium Phosphate in Rabbit Calvaria. *J Dent (Tehran).* 2012 Winter;9(1):35-40.
210. Jacob DA, Schug-Pass C, Sommerer F, Tannapfel A, Lippert H, Kockerling F. Comparison of a lightweight polypropylene mesh (Optilene(R) LP) and a large-pore knitted PTFE mesh (GORE(R) INFINIT(R) mesh)--Biocompatibility in a standardized endoscopic extraperitoneal hernia model. *Langenbecks Arch Surg.* 2012 Feb;397(2):283-9.
211. Guerra F. *Biomimética: Formulações haptotáticas para aplicação em regeneração óssea.* Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2003.
212. Matos S. *Aplicação de matrizes enriquecidas com moduladores biológicos na regeneração de tecidos periodontais e tecidos ósseos.* Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2008.
213. Palma P. *Estudo de novas formulações para regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica.* Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2009.
214. Martins O. *Estudo, in vivo, de uma hidroxiapatite de arquitetura otimizada.* Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2009.

215. Covani U, Ameri S, Crespi R, Barone A. Crestal ridge preservation with allogenic bone. Histological analysis. *Italian Oral Surgery*. 2004;3(1):17-23.
216. Cardaropoli D, Cardaropoli G. Preservation of the postextraction alveolar ridge: a clinical and histologic study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008;28(5):469-77.
217. Crespi R, Capparè P, Gherlone E. Dental implants laced in extraction sited grafted with different bone substitutes: radiographic evaluation at 24 months. *J Periodontol*. 2009;80(10):1616-21.
218. Rossi R, Morales RS, Frascaria M, Benzi R, Squadrito N. Planning implants in the esthetic zone using a new implant 3D navigation system. *The European Journal of Esthetic Dentistry*. 2010;5(2):172-88.
219. Covani U, Barone A, Cornelini R, Crespi R. Clinical outcome of implants placed immediately after implant removal. *J Periodontol*. 2006;77(4):722-7.
220. Barone A, Crespi R, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Covani U. Maxillary sinus augmentation: histologic and histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(4):519-25.
221. Barone A, Santini S, Sbordone L, Crespi R, Covani U. A clinical study of the outcomes and complications associated with maxillary sinus augmentation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006;21(1):81-5.
222. Pagliani L, Andersson P, Lanza M, Nappo A, Verrocchi D, Volpe S. A collagenated porcine bone substitute for augmentation at neoss implant sites: a prospective 1-year multicenter case series study with histology. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2012;14(5):746-58.
223. Del Corso M. Soft tissue response to Platelet Rich Fibrin: clinical evidences. *Cosmetic Dentistry*. 2008;3:16-20.
224. Cassetta M, Calasso S, Voza I, Dell'Aquila D. Rehabilitation of atrophic alveolar crests with cylindrical sandblasted and acid etched implants: a pilot study. *European Journal of Implant Prosthodontics*. 2005;3(1):133-44.
225. Scarano A, Murmura G, Carinci F, Assenza B, Piatelli M, Piatelli A. Vertical ridge augmentation of atrophic posterior mandible using an inlay technique with a xenograft without miniscrews and miniplates: case series. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(10):1125-30.

226. Lobato J, Hussain N, Botelho C, Mauricio A, Lobato J, Lopes M, et al. Titanium dental implants coated with Bonelike: Clinical case report. *Thin Solid Films*. 2006;515:279-84.
227. Oliveira JM, Miyazaki M, Lopes M, Ohtsuki C, Santos J. Bonelike/PLGA hybrid materials for bone regeneration: Preparation route and physicochemical characterisation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005;16:253-9.
228. Laranjeira MS, Dias AG, Santos JD, Fernandes MH. In vitro biological characterization of macroporous 3D Bonelike® structures prepared through a 3D machining technique. *Materials Science and Engineering C*. 2009;29:930-5.
229. Silva M, Lemos AF, Ferreira J, D. SJ. Mechanical Characterisation of Porous Glass Reinforced Hydroxyapatite Ceramics – Bonelike. *Materials Research*. 2003;6(3):321-5.
230. Martegani P, Silvestri M, D'Avenia F, Capri D, Landi L, Paolantoni G, et al. One Stage Sinus lift Augmentation Procedure with Implant Placement: Histomorphometric study comparing two different heterologous grafting materials. A Multi-Centre, Double Blind, Prospective Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol*. 2012; Abstracts of Europerio 7:49.
231. Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Phillips TM. Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2361-9.
232. Conz M, Campos C, Serrão S, Soares G, Vidigal G. Caracterização físico-química de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia. *Revista Implantnews*. 2010;7(4):541-6.
233. Dietze S, Bayerlein T, Proff A, Hoffman A, Gedrange T. The ultrastructure and processing properties of Straumann Bone Ceramic® and NanoBone®. *Folia Morphol*. 2006;65(1):63-5.
234. Lopes MA, Santos JD, Monteiro FJ, Knowles JC. Glass-reinforced hydroxyapatite: a comprehensive study of the effect of glass composition on the crystallography of the composite. *J Biomed Mater Res*. 1998 Feb;39(2):244-51.
235. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, et al. Influence of beta-tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater*. 2010 Dec;6(12):4476-87.

236. <http://www.osteobiol.com/dental/products.php>. [cited 2013].
237. Werner J, Linner-Krcmar B, Friess W, Greil P. Mechanical properties and in vitro cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure. *Biomaterials*. 2002 Nov;23(21):4285-94.
238. Accorsi-Mendonca T, Conz MB, Barros TC, de Sena LA, Soares Gde A, Granjeiro JM. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Braz Oral Res*. 2008 Jan-Mar;22(1):5-10.
239. Carotenuto G, Spagnuolo G, Ambrosio L, Nicolais L. Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications. *J Mater Sci Mater Med*. 1999;10:671-6.
240. Sopyan I, Melb M, Rameshc S, Khalidd KA. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2007;8:116-23.
241. Bohner M, Loosli Y, Baroud G, Lacroix D. Commentary: Deciphering the link between architecture and biological response of a bone graft substitute. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):478-84.
242. Costa N, Melo B, Brito R, Fernandes G, Bernardo V, Fonseca E, Conza M, Soares G, Granjeiro J. Quality and Intensity of the Tissue Response to Two Synthetic Granular Hydroxyapatite Implanted in Critical Defects of Rat Calvaria. *Materials Research*. 2009;12(2):245-51.
243. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, et al. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomed Mater*. 2012 Feb;7(1):015005.
244. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J*. 2009 Jul;28(4):396-400.
245. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 2:S3.
246. Ryden L, Molnar D, Esposito M, Johansson A, Suska F, Palmquist A, et al. Early inflammatory response in soft tissues induced by thin calcium phosphates. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Sep;101(9):2712-7.