**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ELCIA MARIA VARIZE SILVEIRA

**Mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamatória frente à
implantação de membrana de cortical óssea bovina no tecido
subcutâneo de camundongos: caracterização histomorfométrica,
imunoenzimática e molecular**

**BAURU
2012**

ELCIA MARIA VARIZE SILVEIRA

**Mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamatória frente à
implantação de membrana de cortical óssea bovina no tecido
subcutâneo de camundongos: caracterização histomorfométrica,
imunoenzimática e molecular**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de **DOUTOR** em Odontologia, programa Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de Concentração: Estomatologia e Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Versão corrigida

**BAURU
2012**

Silveira, Elcia Maria Varize

Si39m Mecanismos envolvidos na resposta imune e inflamatória frente à implantação de membrana de cortical óssea bovina no tecido subcutâneo de camundogos: caracterização histomorfométrica, imunoenzimática e molecular / Elcia Maria Varize Silveira. – Bauru, 2012.
138 p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo número: CEEPA 017/2008

Data: 24 de outubro de 2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido **Eduardo Loosli Silveira** e a meus filhos **Ana Paula Varize Silveira** e **Lucas Varize Silveira** pelo apoio, incentivo, paciência e principalmente pelo amor.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu orientador Prof. Dr. **Gustavo Pompermaier Garlet** que, com paciência e sabedoria, despertou em mim o fascínio pela Ciência.
Toda minha admiração, gratidão e respeito.*

AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais **Elzio Varize** e **Eliedes Ferriolli Varize** pela educação, exemplo e lealdade.*

*Às minhas irmãs e melhores amigas **Erica Maria Varize** e **Eliana Maria Varize** pela cumplicidade, força e alegria.*

*À **Lili Loosli Silveira (Leca)** e **Elisabeth Loosli Silveira** pelo constante apoio e carinho.*

*Ao professor **Dr. Rumio Taga** por compartilhar todo seu conhecimento, esclarecendo tantas e tantas dúvidas histológicas.*

*Ao professor **Dr. Gerson Francisco de Assis**, que sabe como ninguém aliar conhecimento e generosidade ao ensino.*

*Ao professor **Dr. Sebastião Luiz Aguiar Gregghi** a primeira pessoa que conheci na Faculdade de Odontologia de Bauru, de quem ouvi meu primeiro “sim”. A partir do seu apoio e orientação, os “nãos” foram superados.*

*Ao professor **Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, que soube conter minha ansiedade e me ajudou a decidir onde era meu verdadeiro lugar na Faculdade de Odontologia de Bauru.*

*À professora **Dra. Ana Paula Campanelli**, que prepara e protege seus alunos exigindo dedicação e despertando-lhes a autoconfiança.*

*Ao professor **Dr. Rui Vicente Oppermann**, por um dia ter me desafiado a fazer Ciência.*

*À **Dra. Tania Mary Cestari**, pela convivência sempre pacífica e pelos esclarecimentos principalmente relacionados à análise morfométrica.*

À querida amiga **Marcela Claudino** que, por afinidade pessoal e científica, me amparou durante os momentos únicos e solitários do processo de aprendizagem.

À querida amiga **Gabriela Gennaro** que seguiu literalmente junto comigo toda essa jornada. Dividimos cada seminário, cada disciplina, a angústia de querer entender aqueles “papers” difíceis, o preparo da tese, até nossas idas para Pasárgada.

Ao querido amigo **Carlos Eduardo Palanch Repeke** pela paciência, disponibilidade e carinho com que me salvou durante os momentos de dificuldades técnico-científicas. Ele sempre resolve tudo!

À amiga **Andreia Espíndola Vieira** pela disponibilidade e pelas nossas intermináveis conversas científicas (ou não tão científicas assim), nas quais dividimos dúvidas e conceitos, dos mais básicos aos mais complexos.

Aos amigos do Laboratório de Histologia, **Maria Teresa A.F.M. Silva (Tê)**, **Aldivina Mendes (Divine)**, **Danielle Santi Ceolin (Dani)** e **Patrícia de Sá Mortágula Germino (Paty)** pela disponibilidade e bom humor, a alegria do nosso “lab”.

Aos pós-graduandos **Bruna B. Bighetti**, **Ricardo V. N. Arantes**, **Bruno A. Viscelli**, **André Shinohara**, **Carina G. S. Melo**, **Heliton Lima**, **Samuel Ferreira Jr**, **Carolina Francischone** e **Ana Cláudia A. Pires** pelos momentos científicos e de convivência.

Aos amigos do departamento de microbiologia, **André Luís da Silva**, **Ayana Lima**, **Carine E. Oliveira**, **Cláudia Pinheiro**, **Thaís Helena Gasparoto** que, com paciência, muita paciência e gentileza me iniciaram nos estudos “in vitro”.

Ao **Ezymar Cayana**, **Flávia Benetti Piccinin** e **Tatiana Moreno**, parceiros e amigos do mestrado, com quem compartilhei momentos de cumplicidade.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À instituição **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) - USP** representada por todos os seus professores e funcionários.

À empresa BAUMER – Divisão Genius, pelo fornecimento das membranas de cortical óssea bovina, Gen-derm®.

À **CAPES**, pela bolsa de doutorado e pelo apoio a pesquisa.

Resumo

RESUMO

Os avanços relacionados à ciência dos biomateriais e engenharia tecidual buscam esclarecer os mecanismos envolvidos na resposta biológica associada ao uso desses dispositivos e sua interação com o sistema imune. Neste estudo, avaliou-se a resposta imune e inflamatória desenvolvida em camundongos frente à implantação de membrana de cortical óssea bovina no tecido subcutâneo, em implantação única e sequencial de duas membranas, assim como os possíveis mecanismos envolvidos no processo de reconhecimento e reabsorção desse biomaterial, de acordo com análise histomorfométrica, enzimática e molecular. Após a implantação da membrana, sinais de reabsorção que antes eram notados em pontos isolados, aos poucos se unem até sua completa degradação, observada somente após 15 dias. Todo o processo de reabsorção da membrana é acompanhado por uma reação inflamatória de magnitude moderada, seguida pelo declínio do número de leucócitos, surgimento de células gigantes multinucleadas e formação de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso. A cinética de TNF- α e MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 apresentou um padrão de produção decrescente, entretanto os níveis dos inibidores de metaloproteinases (TIMPs) e TGF- β parecem atuar de forma inversa. A velocidade de reabsorção após duas implantações consecutivas da membrana foi maior quando comparada ao grupo de animais que sofreu apenas uma implantação, porém os resultados do teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) demonstraram que a membrana é biocompatível, pois não elicitou resposta imunológica exacerbada após uma segunda implantação, confirmando então a natureza não imunogênica desse biomaterial. Finalmente, os animais CD14KO e MyD88KO apresentaram uma reabsorção mais lenta da membrana implantada, quando comparados aos animais C57Bl/6 (WT), demonstrando que as moléculas CD14 e MyD88 estão envolvidas no reconhecimento do biomaterial e desempenham importante papel no processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina, indicando a participação de PAMPs e/ou DAMPs na resposta biológica gerada por esse biomaterial.

Palavras-Chave: Materiais biocompatíveis. Inflamação. Sistema imunológico. Colágeno. Regeneração tecidual guiada. Citocinas. Metaloproteinases da matriz.

Abstract

ABSTRACT

Mechanisms involved in immune and inflammatory response to implantation of bovine bone cortical membrane in subcutaneous tissue of mice: characterization histomorphometric, imunoenzymatic and molecular

Advances related to the biomaterials science and tissue engineering seek to clarify the mechanisms involved in the biological response associated with the use of those devices and their interaction with the immune system. This study evaluated the inflammatory and immune response developed in mice after implantation bovine bone cortical membrane in subcutaneous tissue, in both, unique and sequential implantation of 2 membranes, as the mechanisms involved in this biomaterial recognition and resorption process, on regards to histomorphometric, enzymatic and molecular analysis. After membrane implantation, previously observed signs of resorption in isolated spots, gradually unite until their complete degradation after 15 days. The whole membrane resorption process is accompanied by a moderate inflammatory reaction, followed by a decline in the leukocytes number, appearance of multinucleated giant cells and formation of a capsule of fibrous connective tissue. The kinetics of TNF- α , MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 showed a pattern of decreasing production, however, levels of metalloproteinases inhibitors (TIMPs) and TGF- β seem to act in reverse way. The resorption rate after two successive membrane implantations was higher when compared to the group which suffered only one implantation, however, the results of delayed test hypersensitivity (DTH) demonstrated that the membrane is biocompatible, that is, it does not elicited too high immune response after a second position, confirming the non immunogenic nature of this biomaterial. Eventually, CD14KO and MyD88KO strains showed a slower membrane resorption when compared to animals C57Bl/6, demonstrating that the CD14 and MyD88 molecules are involved in biomaterial recognition and play an important role in bovine cortical bone membrane resorption process, indicating that PAMPs and/or DAMPs are involved in biological response generated by this biomaterial.

Keywords: Biocompatible materials. Inflammation. Immune system. Collagen. Guided tissue regeneration. Cytokines. Matrix metalloproteinases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	Esquema da ordem dos cortes semi-seriados abrangendo toda a extensão do disco da membrana de cortical óssea bovina	43
Figura 2	Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongo C57Bl/6 submetido à implantação de membrana de cortical óssea bovina	53
Figura 3	Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongo C57Bl/6 submetido à duas implantações subsequentes da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 3 dias	67
Figura 4	Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongo C57Bl/6 submetido à duas implantações subsequentes da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 9 dias	69
Figura 5	Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongos WT, CD14KO e MYD88KO submetidos à implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 3 dias	75
Figura 6	Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongos WT, CD14KO e MyD88KO submetidos à implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 9 dias	77

- GRÁFICOS

Gráfico 1	Densidade de volume (%) de fibras, fibroblastos, vasos, coágulo, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas (CGM) em animais WT	56
Gráfico 2	Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT	57
Gráfico 3	Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 3 dias	59
Gráfico 4	Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 9 dias	60
Gráfico 5	Níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α , TGF- β , nos tecidos de camundongos C57Bl/6	64
Gráfico 6	Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina de acordo com a comparação entre uma e duas implantações em animais WT	71
Gráfico 7	Níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α , TGF- β , nos tecidos de camundongos C57Bl/6	72
Gráfico 8	Teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) em animais WT após uma e duas implantações sequenciais da membrana de cortical óssea bovina	73
Gráfico 9	Densidade de volume (%) de fibras, fibroblastos, vasos, coágulo, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas em animais WT, CD14KO e MyD88KO	80
Gráfico 10	Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT, CD14KO e MyD88KO	81
Gráfico 11	Níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α , TGF- β , nos tecidos de camundongos C57Bl/6, CD14KO e MyD88KO	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos grupos experimentais avaliados frente à implantação da membrana de cortical óssea bovina, de acordo com o número de animais por período e tipo de análise realizada.....	40
Tabela 2	Relação dos genes analisados por PCR <i>Array</i>	46
Tabela 3	Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina nos períodos experimentais de 3 e 9 dias.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta-actina (<i>Beta-actin</i>)
AHSG	Alfa-2-HS-glicoproteína (<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>)
ALP	Fosfatase alcalina (<i>Alkaline phosphatase</i>)
AMBN	Ameloblastina (<i>Ameloblastin</i>)
APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>antigen presenting cell</i>)
BMP	Proteína morfogenética óssea (<i>Bone morphogenetic protein</i>)
CTSK	Catepsina k (<i>Cathepsin K</i>)
CCL	Quimiocina da família CC
CCR	Receptor de quimiocina da família CC
CD14	Receptor CD14 (<i>CD14 receptor</i>)
COL1A2	Colágeno tipo I alfa 2 (<i>Collagen type I alpha 2</i>)
COL2a1	Colágeno tipo II alfa 1 (<i>Collagen type II alpha 1</i>)
COL4a2	Colágeno tipo IV alfa 2 (<i>Collagen type IV alpha 1</i>)
COL5a1	Colágeno tipo V alfa 1 (<i>Collagen type V alpha 1</i>)
CXCL	Quimiocina da família CXC
CXCR	Receptor de quimiocina da família CXC
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DMP1	Proteína da matriz dentinária 1 (<i>Dentin matrix protein 1</i>)
DTH	Hipersensibilidade do tipo tardia (<i>Delayed-type hypersensitivity</i>)
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamino (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido (<i>Expanded polytetrafluorethylene</i>)
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblast growth factor</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
g	Grama
°C	Grau Celsius
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
HE	Hematoxilina e Eosina (<i>Hematoxylin and eosin</i>)
HPRT1	Hipoxantinafosforibosiltransferase 1 (<i>Hipoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
IFN	Interferon (<i>Interferon</i>)
ISO	Organização internacional para padronização (<i>International organization for standardization</i>)
KLH	Hemocianina (<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>)
KO	Animal geneticamente deficiente (<i>Knockout</i>)
LAL	Lisado de amebócito de limulus (<i>Limulus amoebocyte lysate</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo (<i>Lipopolysaccharide</i>)

LTA	Ácido lipoteicóico (<i>Lipoteichoic acid</i>)
mm	Milímetro
min	Minuto
MMP	Metaloproteinase de matriz (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
MyD88	Proteína adaptadora MyD88 (<i>Adaptor protein MyD88</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
OPG	Osteoprotegerina (<i>Osteoprotegerin</i>)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Solução Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pg/ml	Picograma por mililitro
PHEX	Endopeptidase neutra reguladora de fosfato (<i>Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked</i>)
PPRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>Pattern-recognition receptors</i>)
RANK	Receptor ativador do NF-κB (<i>Receptor activator of NF-κB</i>)
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF-κB (<i>Receptor activator of NF-κB</i>)
ROG	Regeneração óssea guiada (<i>Guided bone regeneration</i>)
RTG	Regeneração tecidual guiada (<i>Guided tissue regeneration</i>)
s	Segundo
SERPINE1	Inibidor de serino-proteases (<i>Serine protease inhibitor</i>)
SOST	Esclerostina (<i>Sclerostin</i>)
TGF-α	Fator de crescimento e transformação alfa (<i>Transforming growth factor alpha</i>)
TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase (<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TNF-R1	Receptor de TNF tipo 1 (<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>)
TNF-R2	Receptor de TNF tipo 2 (<i>Tumor necrosis factor receptor 2</i>)
TLR	Receptores semelhantes a toll (<i>Toll-like receptors</i>)
TWIST1	Proteína Twist 1 (<i>Twist-related protein 1</i>)
VDR	Receptor de vitamina D (<i>Vitamin D receptor</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
WT	Camundongo selvagem (<i>Wild-type</i>)
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA.....	17
2	PROPOSIÇÃO	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Animais de experimentação	39
3.2	Biomaterial	40
3.3	Procedimento cirúrgico.....	41
3.4	Coleta de amostras	41
3.5	Processamento histológico e coloração	42
3.6	Análise histomorfométrica	43
3.7	Extração de RNA e Transcrição Reversa	44
3.8	Reações de PCR Array	45
3.9	Dosagem da atividade enzimática por ELISA	47
3.10	Teste de Hipersensibilidade do Tipo Tardia (DTH).....	47
3.11	Análise estatística.....	48
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT	51
4.1.1	Análise histomorfométrica	51
4.1.2	Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina	57
4.1.3	Análise quantitativa da produção de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α e TGF- β durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT	63
4.2	Análise da imunogenicidade da membrana de cortical óssea bovina após duas implantações sequenciais em animais WT	65
4.2.1	Análise histomorfométrica	65
4.2.2	Análise quantitativa da produção de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α e TGF- β durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina após duas implantações sequenciais em animais WT.....	71
4.2.3	Teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)	73

4.3	Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais CD14KO e MyD88KO	74
4.3.1	Análise histomorfométrica	74
4.3.2	Análise quantitativa da produção de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α e TGF- β durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais CD14KO e MyD88KO	82
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS.....	111
	APÊNDICE	131
	ANEXOS	135

1 Revisão de **L**iteratura e **J**ustificativa

1 REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA

Um biomaterial se distingue de um material qualquer pela sua habilidade de estar em contato com tecidos do corpo humano, sem causar dano de grau inaceitável para esses tecidos. Pode ser definido como uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, por controle de interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico (WILLIAMS, 2009). É importante ressaltar que essa definição atual é oposta ao que se acreditava por muito tempo, que um biomaterial ideal seria absolutamente inerte, ou em outras palavras, que a implantação de um biomaterial não deveria resultar em nenhum tipo de resposta do hospedeiro ou receptor (RATNER, 1996). Contudo sabe-se, atualmente, que até mesmo materiais altamente biocompatíveis provocam um certo grau de resposta do hospedeiro, principalmente nas etapas iniciais (ANDERSON, 1988; REMES; WILLIAMS, 1992).

O conceito de biocompatibilidade, normalmente aplicado ao estudo de biomateriais, é associado a uma resposta favorável, caracterizada por uma reação inflamatória local transitória, de baixa ou média magnitude, e uma baixa imunogenicidade, ou seja, a capacidade do biomaterial desencadear uma resposta imunológica amena (COOPERMAN; MICHAELI, 1984; SCHLEGEL, et al., 1997; WILLIAMS, 2008; WILLIAMS, 2009). Entretanto, o conceito imunológico de imunogenicidade envolve necessariamente uma sensibilização inicial e uma subsequente segunda exposição ao mesmo antígeno. Apenas na ausência de uma resposta exacerbada nessa segunda exposição (resposta imunológica secundária), poder-se-ia realmente caracterizar a natureza não imunogênica do biomaterial (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Uma vez que os estudos avaliam geralmente implantações únicas de tais materiais, não se pode afirmar que os mesmos sejam realmente não imunogênicos. O esclarecimento de tal aspecto se mostra extremamente importante para a otimização da utilização clínica e prevenção de possíveis reações adversas devido ao uso, cada vez mais frequente, de implantações múltiplas de biomateriais como forma de tratamento para inúmeras

doenças como osteoartrite, aterosclerose e periodontite, entre outras, visando reparar tecidos perdidos.

Dessa forma, pode-se afirmar que os conceitos de biocompatibilidade aplicados rotineiramente ao estudo de biomateriais podem ser considerados incompletos do ponto de vista imunológico. De fato, embora diversos estudos tenham descrito os eventos histológicos subsequentes à implantação de biomateriais (THOMA et al., 2011; KHOUW et al., 2000; POLIMENI et al., 2008), os eventos moleculares e celulares envolvidos em tal resposta permanecem praticamente desconhecidos.

No contexto odontológico, a perda de estruturas anatômicas, defeitos congênitos, recuperação de tecido ósseo e regeneração dos tecidos periodontais destruídos são ainda problemas a serem solucionados. Em todos esses casos, após tratamento convencional, a regeneração dos tecidos originais não ocorre ou acontece de forma insatisfatória, porque células competidoras adjacentes à área a ser reparada, e que possuem maior capacidade de proliferação, invadem precocemente o local do defeito impedindo a instalação das células responsáveis pela regeneração dos tecidos originais perdidos (MELCHER, 1976; NYMAN; GOTTLOW et al., 1982; NYMAN; LINDHE et al., 1982).

Um dos principais exemplos nesse sentido é a utilização da técnica cirúrgica de regeneração tecidual guiada (RTG) ou de seu equivalente no tratamento de lesões ósseas, a da regeneração óssea guiada (ROG), procedimentos que buscam reconstituir os tecidos perdidos contribuindo de forma importante para o processo de reparo, por exemplo, dos tecidos periodontais destruídos. De acordo com essa técnica, é empregado o princípio de barreira física, utilizada na forma de uma membrana capaz de proteger o coágulo, além de impedir a invasão precoce do epitélio juncional e/ou de tecido conjuntivo na área do defeito, permitindo, então, seletivamente, a migração e proliferação seletiva de células do periodonto de sustentação e, teoricamente, à consequente regeneração dos tecidos perdidos (MELCHER, 1976; NYMAN, GOTTLOW et al., 1982; NYMAN, LINDHE et al., 1982; GOTTLOW et al., 1984; MAGNUSSON, et al., 1985).

Entre as primeiras membranas que foram comercialmente produzidas e utilizadas em técnicas de regeneração tecidual guiada está a de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) ou teflon. De acordo com os excelentes resultados experimentais e clínicos obtidos, essa membrana ainda hoje é amplamente utilizada na prática cirúrgica da área médica e odontológica (GOTTLOW et al., 1984; BECKER et al., 1987; CATON et al., 1987; PONTORIERO et al., 1987; BECKER; BECKER, 1990; CAFFESSE et al., 1990). Apesar de a membrana de e-PTFE ser considerada altamente biocompatível, clinicamente manuseável e apresentar excelente propriedade oclusiva, possui a grande desvantagem de não ser reabsorvida pelo organismo. Assim, um segundo procedimento cirúrgico faz-se necessário para sua remoção, o que causa desconforto ao paciente, interfere no reparo tecidual em curso, aumenta o custo, consequentemente limitando sua indicação (HAMMERLE; JUNG, 2003). Devido a esses inconvenientes, pesquisas são realizadas no sentido de desenvolver membranas reabsorvíveis, com propriedades similares às membranas de e-PTFE e que tenham, ainda, a vantagem da eliminação da reentrada cirúrgica, oferecendo maior conforto ao paciente, com redução da morbidade pós-operatória e melhor custo/benefício (BLUMENTHAL, 1993; BLACK et al., 1994; YUKNA; YUKNA, 1996; HAMMERLE; JUNG, 2003).

Membranas reabsorvíveis são constantemente lançadas no mercado, e os materiais utilizados para sua fabricação geralmente pertencem ao grupo dos polímeros naturais como o colágeno, ou polímeros sintéticos como os poliésteres alifáticos, tais como ácido poliglicólico e polilático (HUTMACHER; HURZELER; SCHLIEPHAKE, 1996; POLIMENI et al., 2008; van LEEUWEN et al., 2012). Mesmo sabendo que a maioria das membranas de colágeno disponíveis são basicamente desenvolvidas a partir do colágeno tipo I, e que o colágeno utilizado pode apresentar certas diferenças em relação a sua origem (bovino, suíno, equino) ou ao modo de processamento durante sua fabricação (componentes adicionais e métodos de ligação cruzada para melhorar suas propriedades), ainda assim tais membranas parecem ser a melhor opção disponível para uma barreira biológica reabsorvível utilizada em regeneração tecidual guiada (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; PATINO et al., 2002; KASAJ et al., 2008). Na clínica odontológica, a membrana reabsorvível de colágeno é a mais utilizada, uma vez que o colágeno é uma proteína natural do periodonto e do tecido ósseo, possuindo propriedades homeostáticas, de agregação

plaquetária e quimiotáticas para fibroblastos gengivais (LOCCI et al., 1997) e do ligamento periodontal (POSTLETHWAITE; SEYER; KANG et al., 1978; YAFFE; EHRLICH; SHOSHAN, 1984). Além disso, é naturalmente reabsorvida pelo organismo, de fácil manipulação, possuindo uma estrutura molecular que varia muito pouco entre espécies animais, o que lhe confere uma possível vantagem em relação à imunogenicidade (FURTHMAYR; TIMPL, 1976; COOPERMAN; CORINALDESE et al., 2011; MICHAELI, 1984; PACHENCE, 1996; SCHLEGEL et al., 1997; PIEPER et al., 2000; JANSEN et al., 2008).

Mesmo com os avanços relacionados à ciência dos biomateriais e engenharia tecidual, poucos estudos têm avaliado os mecanismos envolvidos na resposta biológica associada ao uso desses dispositivos e sua interação com o sistema imune (FURTHMAYR; TIMPL, 1976; COOPERMAN; MICHAELI, 1984).

A inflamação é um termo geral usado para descrever uma cascata de eventos que ocorrem em resposta a uma infecção ou a uma variedade de estímulos não infecciosos (ABBAS; LITCHTMAN, 2008), como por exemplo, a implantação de um biomaterial. Pode ser considerada parte do sistema imunológico devido ao acúmulo de células e fatores solúveis relacionados a esse sistema, os quais participam da resposta inflamatória no local da injúria. As células e fatores solúveis provenientes do sistema imunológico eliminam o estímulo inflamatório desencadeante e dão início ao processo de memória imunológica. Os tipos e níveis de citocinas ao redor de materiais implantados podem inicialmente elicitar reações inflamatórias agudas e crônicas e mais tarde iniciar o processo de reparo dos tecidos que receberam esse implante (BALDWIN; HUNT, 2008). Compreender essa resposta, já que a inflamação e o sistema imune estão estreitamente inter-relacionados, é essencial para o desenvolvimento de novas modalidades na medicina regenerativa, juntamente com uma tecnologia imune efetiva capaz de avaliar a biocompatibilidade desses biomateriais, gerando maior previsibilidade após o procedimento de implantação.

De forma geral, pode-se considerar que a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro envolve etapas características, entre as quais podemos destacar as fases de reconhecimento, efetuação e regulação. Existem várias classes de receptores no sistema imune, as quais são importantes para o reconhecimento antigênico inicial e para a indução de respostas pró-inflamatórias, denominados

receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (KIRSCHNING; SCHUMANN, 2002; AKIRA; TAKEDA, 2004). Através da expressão de PRRs, como por exemplo, os TLRs (receptores semelhantes a Toll) e seu co-receptor CD14, diferentes organismos são capazes de reconhecer uma variedade de moléculas derivadas de microrganismos, coletivamente denominadas PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) como o LPS, (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, et al., 2006). Uma vez que os PAMPs se ligam ao seu receptor, no caso específico do LPS o reconhecimento é mediado pelo receptor TLR4 em conjunto com o co-receptor CD14, é disparada uma cascata de sinalização intracelular que envolve moléculas como o adaptador MyD88, e que culminam com a ativação de uma série de fatores de transcrição, responsáveis pela ativação celular propriamente dita e que resultará na efetuação de uma resposta subsequente (ZHU; MOHAN, 2010).

Nesse contexto, ainda com relação à ativação da resposta do hospedeiro em relação à implantação de biomateriais, um obstáculo a ser considerado diz respeito a sua contaminação com impurezas, dentre as quais podem-se destacar componentes microbianos como lipopolissacarídeo (LPS, caracteristicamente presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas) ou ainda polifenóis e proteínas, seja durante sua fabricação e/ou manuseio (van SCHILFGAARDE; DE VOS, 1999; DUSSEAU et al., 2006; BREGER et al., 2009). A remoção de LPS mostra-se difícil devido sua natureza ubíqua e até mesmo procedimentos como autoclavagem, esterilização a gás e irradiação após o processo de fabricação desses dispositivos podem não inativar o LPS (NAKAGAWA et al., 2003; WILSON et al., 2005), sendo somente a esterilização com calor seco, a 250 °C, efetiva para sua inativação (PFEIFFER, 1990; HOLMDAHL; CHEGINI, 1997). Assim, a presença de níveis residuais de LPS, muitas vezes mais do que os componentes do próprio biomaterial (YAMAMOTO et al., 1993; KLOCK et al., 1997; NAKAGAWA et al., 2003), podem constituir um poderoso fator imunoestimulador, que pode promover a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, repercutindo tanto na velocidade de reabsorção da membrana bem como na biocompatibilidade desse biomaterial (BENAHMED et al., 1997). Ainda assim, pouca informação encontra-se disponível sobre a ação do LPS nos biomateriais, principalmente às relacionadas ao controle do nível de contaminação nesses dispositivos, bem como a uma dose mínima piogênica tolerável pelo organismo.

Além dos componentes microbianos, os PRRs também podem ser ativados por sinais não microbianos, como os DAMPs (padrões moleculares associados a danos). Os DAMPs têm função similar aos dos PAMPs na sua capacidade de ativar a via pró-inflamatória, porém na ausência de infecção, sendo assim a interação PRRs-DAMPs também chamada de “inflamação asséptica” (MATZINGER, 1994). A chamada “infecção asséptica” foi inicialmente descrita com suporte na hipótese de que o sistema imune tem a função de combater o perigo, e não simplesmente reconhecer o não-próprio frente ao próprio (MATZINGER, 1994), e vem ganhando crescente atenção (PICCININI; MIDWOOD, 2010). Moléculas previamente denominadas “padrões de perigo” ou “alarminas” hoje são agrupadas sob a terminologia DAMP. Os DAMPs são moléculas endógenas que também podem ativar mecanismos imunes e inflamatórios, cuja liberação é deflagrada por processos de estresse, lesão ou morte de células, ou ainda, lesão dos tecidos como acontece durante um trauma cirúrgico para a implantação de um biomaterial, por exemplo (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; SATO et al., 2003; LOTZE et al., 2007). Os receptores do tipo TLR, TLR2 e TLR4, classicamente relacionados ao reconhecimento de produtos bacterianos como LTA (ácido lipoteicóico) e LPS, são também considerados importantes no reconhecimento de DAMPs (SIMS et al., 2010; BALOGH; KISS; CSASZAR, 2009). Dentre os DAMPs já descritos, podem-se citar HMGB1 (SCAFFIDI; MISTELI; BIANCHI, 2002), SAP130 (YAMASAKI et al., 2008), heat shock proteins (BASU et al., 2001; OSTERLOH et al., 2008), DNA (BARRAT et al., 2005), IL-1 α (EIGENBROD et al., 2008), IL-33 (MOUSSION; ORTEGA; GIRARD, 2008), entre outros.

Logo após o reconhecimento de uma molécula, como PAMPs ou DAMPs, pelo sistema imune inato via PRRs, é disparada uma cascata de sinalização que ativa fatores de transcrição, induzindo a liberação e/ou produção de uma variedade de mediadores inflamatórios como aminas vasoativas, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas as quais, graças a efeitos pleiotrópicos, causam uma série de mudanças morfológicas e moleculares em resposta à infecção ou dano tecidual (MEDZHITOV, 2008). Tais eventos normalmente envolvem inicialmente mastócitos e macrófagos residentes, mas isso pode variar de acordo com a natureza do tecido envolvido e suas populações celulares características (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). O efeito principal e imediato desses mediadores inflamatórios é

elicitam um exsudato inflamatório no local do dano, composto basicamente por plasma e leucócitos, principalmente neutrófilos inicialmente e macrófagos posteriormente, os quais, além de ajudar a conter a injúria tecidual ou agentes infecciosos, também possibilitam o desenvolvimento subsequente da resposta imune adaptativa, um segundo ramo do sistema imune, altamente específico e efetivo, e que envolve basicamente subpopulações de linfócitos (BARTON; KAGAN, 2009). Após o reconhecimento antigênico, normalmente mediado por células apresentadoras de antígenos (APCs) nos órgãos linfóides secundários, os linfócitos proliferam e se diferenciam em células efetoras, cuja função é eliminar o antígeno, e em células de memória, que apresentam uma resposta acentuada nas exposições subsequentes ao antígeno. De forma geral, os linfócitos T auxiliares $CD4^+$ (também chamados de T helper [Th]) ajudam os macrófagos a eliminar o agente agressor (microrganismos, autoantígenos, transplantes, componentes de um biomaterial) e auxiliam as células B a produzirem anticorpos. Os linfócitos T auxiliares $CD8^+$ destroem as células que contêm patógenos intracelulares, assim eliminando os reservatórios de infecção. Os anticorpos, produtos dos linfócitos B, neutralizam a infecciosidade dos microrganismos e promovem sua eliminação pelos fagócitos e pela ativação do sistema complemento (ABBAS; LITCHTMAN, 2008). Considerando que a resposta imunológica e inflamatória é capaz de conter a injúria, mecanismos regulatórios que envolvem, por exemplo, diversas citocinas com propriedades anti-inflamatórias e mesmo reparadoras, como TGF- β , IL-4 e IL-10, atuam seletivamente no sentido de limitar tal resposta, podendo também atuar como um “link” para o processo de reparo tecidual.

Considerando a resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro, no contexto dos biomateriais, pode-se afirmar que tal resposta é considerada normal à injúria dos tecidos e à presença de objetos estranhos, sendo que a magnitude e duração desse processo inflamatório têm um impacto direto na estabilidade e compatibilidade dos biomateriais, afetando a eficácia dos mesmos (KAO; HUBBELL; ANDERSON, 1999). Desse modo, o comportamento biológico desses materiais deve ser analisado cientificamente para embasar efetivamente seu uso na prática clínica.

Imediatamente após a implantação de um biomaterial, onde ocorre uma injúria tecidual, o corpo inicia uma série de mecanismos agindo contra o dispositivo colocado. Dentre eles, podem ser citados a interação material-sangue, a formação

de uma matriz provisória (coágulo), inflamação aguda, inflamação crônica, desenvolvimento de tecido de granulação, reação de corpo estranho e formação de uma cápsula de tecido fibroso (ANDERSON; MILLER, 1984; ANDERSON, 1993; IMHOF; DUNON, 1995; LUTTIKHUIZEN; HARMSEN; van LUYN, 2006; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Esses eventos envolvem atração e ativação de componentes celulares como mastócitos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos ou até mesmo células residentes como fibroblastos.

Dentre os tipos celulares que direcionam o processo imune e inflamatório, o macrófago possui várias características que são identificadas como eventos essencialmente importantes na interação hospedeiro/biomaterial (LEIBOVICH; ROSS, 1975; ANDERSON; MILLER, 1984; KAO; HUBBELL; ANDERSON, 1999; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Macrófagos são recrutados para o sítio do implante, aderem-se ao biomaterial e sofrem um processo de fusão para formar as células gigantes de corpo estranho, as quais concentram atividades fagocitárias e de degradação na superfície do dispositivo colocado, também conhecida como reação de corpo estranho (LEIBOVICH; ROSS, 1975; ZIATS; MILLER; ANDERSON, 1988; ZHAO et al., 1991; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Essas células, presentes até que o material reabsorvível implantado seja completamente eliminado, liberam uma série de fatores que atuam na quimioatração, ativação e/ou desativação de leucócitos para o sítio de implantação (e consequentemente da injúria associada à implantação ou dano tecidual que motivou a implantação do biomaterial), agindo na degradação desses biomateriais. Assim, na reação inflamatória e imune induzida por biomateriais, acredita-se que a comunicação celular é coordenada basicamente pelas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (GRETZER et al., 2006; LUTTIKHUIZEN et al., 2006; SCHUTTE et al., 2009). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na resposta tecidual com a implantação desses dispositivos ainda permanecem desconhecidos.

Citocinas são glicoproteínas ou polipeptídeos regulatórios de baixo peso molecular, secretadas pelos linfócitos e várias outras células do organismo em resposta a um número variado de estímulos. Foram originalmente identificadas, descritas e denominadas de acordo com seu papel sobre células linfoides e hematopoéticas (METCALF, 1989), mas sabe-se que apresentam uma gama de

funções, atuando em atividades biológicas incluindo proliferação, desenvolvimento, diferenciação, inflamação, homeostase e reparo (OKADA; MURAKAMI, 1998). Estão incluídas no grupo de citocinas as interleucinas, quimiocinas, fatores estimuladores e inibidores de colônia e fatores de crescimento. As citocinas e seus receptores são classificados em famílias distintas de proteínas estruturalmente relacionadas e iniciam sua ação por ligação a receptores específicos na membrana da célula alvo, desencadeando uma via de transdução de sinais que levam a alterações da expressão gênica na célula alvo. A expressão de muitos receptores de citocinas é regulada por sinais específicos, podendo ser uma outra citocina ou a mesma que se liga ao receptor. As citocinas podem ter ações pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas ou antagônicas e geralmente participam de um sistema de indução em cascata, atuando como reguladores positivos ou negativos da resposta imune, inflamatória e reparadora do hospedeiro a lesões, danos teciduais e implantação de biomateriais, por exemplo. As ações individuais das citocinas na imunidade são complexas, uma vez que agem em um microambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estágios de ativação (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Assim, as citocinas podem ser geralmente caracterizadas como tendo efeitos pró-inflamatório, anti-inflamatório, inibidores, quimiotáticos (quimiocinas) ou de reparo (fatores de crescimento).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), por exemplo, tem importante papel no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa, o qual pode atuar desde o desenvolvimento da resposta contra patógenos até a gerada pela implantação de biomateriais (GRAVES; COCHRAN, 2003). O TNF- α age em várias etapas no mecanismo de recrutamento de leucócitos, induzindo a regulação de moléculas de adesão e a produção de quimiocinas e matriz de metaloproteinases (MMPs), além de regular a apresentação de antígeno e atividade bactericida de fagócitos (PFIZENMAIER; WAJANT; GRELL, 1996; DINARELLO, 2000). A maioria dos efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios do TNF- α são mediados através do receptor p55 (TNF-R1), enquanto o receptor p75 (TNF-R2) age atenuando a resposta inflamatória.

Em um estudo, onde foi observada a produção de citocinas como resposta a um material implantado em ratos, verificou-se um aumento principalmente nos níveis de IL-1 e TNF- α (BALDWIN; HUNT, 2008). Sabendo que a detecção de citocinas é

um importante indicador da resposta imune, sua expressão pode ser um critério de avaliação após a aplicação clínica de biomateriais, ao relacionar a expressão de uma citocina específica à biocompatibilidade de um biomaterial. Desde que a biocompatibilidade é reduzida quando biomateriais elicitam maior expressão de citocinas, sua indução pode ser usada para avaliar a intensidade de uma reação imune antibiomaterial (HUMMEL et al., 1994). Verificou-se, por exemplo, que TNF- α e IL-1 são bons indicadores de biocompatibilidade, ou seja, podem ajudar a monitorar níveis de ativação celular induzidos por diferentes biomateriais (DING; SUN; ZHANG, 2007). Além disso, pesquisadores acreditam que é possível controlar a biocompatibilidade através da modulação da reação do tecido ao biomaterial, utilizando diferentes citocinas ou anticorpos contra essas citocinas ou seus receptores ou, ainda, antagonistas para receptores (THOMPSON; DRIPPS; EISENBERG, 1992; KHOUW et al., 1998).

Existem também evidências de que características químicas, físicas e morfológicas da superfície dos biomateriais são consideradas importantes na modulação de eventos celulares que incluem adsorção de proteína, adesão e fusão de macrófagos para formar as células gigantes de corpo estranho, além da liberação de citocinas produzidas por essas células (SAINO et al., 2011; HUNT et al., 1996; BRODBECK et al., 2003; JONES et al., 2007; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; JONES et al., 2008).

Entretanto, após a colocação de um biomaterial e consequente resposta inflamatória, podem surgir também mecanismos regulatórios que tendem a inibir ou a limitar seletivamente essa resposta, além de auxiliar no reparo e devolver a homeostase do tecido que sofreu o dano (MEDZHITOV, 2008). A migração e proliferação celular são mecanismos dependentes de fatores de crescimento que auxiliam nesse processo de reparo. Um poderoso regulador do crescimento, da diferenciação e da síntese de matriz pelas células do tecido conjuntivo é o fator de crescimento de transformação β (TGF- β), que pode exercer uma variedade de efeitos dependendo do tipo de célula alvo, além da combinação de outros fatores locais e componentes da matriz após implantação de biomateriais (BENNETT; SCHULTZ, 1993a; LU; YASZEMSKI; MIKOS, 2001). Ainda que variados fatores de crescimento, como o fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento de queratinócitos

(KGF), por exemplo, determinem um grande número de ações importantes no processo de reparo, o TGF- β parece exercer uma função mais proeminente nesse processo (BENNETT; SCHULTZ, 1993b; BULUT et al., 2004). Por essa razão, baixos níveis ou a supressão de TGF- β exercem uma influência potencialmente negativa, indicando algum distúrbio no processo de reparo (BENNETT; SCHULTZ, 1993b). Um experimento *in vitro* mostrou que o TGF- β é dose-dependente para diferenciação de osteoblastos (LU; YASZEMSKI; MIKOS, 2001). Entretanto, a presença de um dispositivo sintético trouxe mudanças no processo fisiológico de cicatrização, e a secreção de TGF- β mostrou-se diminuída quando comparada ao grupo controle, ou seja, sem o dispositivo (WEYHE et al., 2007).

Toda resposta inflamatória e imune tem como finalidade principal restaurar a homeostase alterada pela implantação do biomaterial. O reparo no local implantado envolve dois processos distintos, dependendo do tipo de tecido lesionado, intensidade da lesão e da manutenção da estrutura prévia do tecido, a regeneração e a cicatrização. Na regeneração, ocorre a substituição do tecido injuriado por componentes teciduais idênticos àqueles removidos ou danificados. Isso se dá em tecidos de alta capacidade proliferativa, como as células da medula óssea, tecido hematopoético e epitélios cutâneos. Por outro lado, a cicatrização é uma resposta fibroproliferativa que não restaura fielmente os tecidos, apenas tenta corrigir as estruturas perdidas por componentes teciduais semelhantes, pois a capacidade proliferativa do tecido agredido é limitada, seja pela baixa capacidade proliferativa de suas células, elevada extensão da injúria ou ainda pela persistência do processo inflamatório (CLARK; HENSON, 1988; COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989; ANDERSON 1993).

Pode-se considerar que pouco se sabe sobre a associação entre o processo inflamatório, imune e de reparo do tecido em resposta a diferentes materiais. Entre os métodos mais intrigantes a serem investigados estão os biomateriais reabsorvíveis associados aos mecanismos biológicos básicos referentes ao seu processo de reabsorção e reparo. Esses processos podem ser influenciados por enzimas modificadoras da matriz extracelular, especialmente as metaloproteinases (MMPs). Embora a participação das MMPs e seus inibidores naturais (TIMPs) na inflamação e reabsorção de biomateriais sejam previamente pesquisados (SAID et

al., 1999; LUTTIKHUIZEN et al., 2006; JONES et al., 2008), ainda não foi esclarecido como esse processo é conduzido.

MMPs pertencem a uma família de enzimas proteolíticas dependentes do cálcio e zinco, as quais têm a função de degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular e superfície celular durante diferentes processos fisiológicos, incluindo desenvolvimento embriológico, cicatrização, reação de corpo estranho, inflamação, angiogênese e remodelação óssea, bem como os patológicos como periodontite, artrite reumatoide, câncer, osteoporose, arteriosclerose (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; RYAN; RAMAMURTHY; GOLUB, 1996; LAFLEUR; HANDSLEY; EDWARDS, 2003; VISSE; NAGASE, 2003). Essas proteases são expressas por células inflamatórias como polimorfonucleares, monócitos/macrófagos, linfócitos, além de células residentes como fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, osteoblastos, osteócitos (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; HATORI et al., 2004). As MMPs estão distribuídas baseadas na especificidade por determinados substratos e propriedades estruturais semelhantes em vários grupos distintos designados de collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), as que degradam fibras colágenas; gelatinases (MMP-2 e MMP-9), as que têm alta atividade contra o colágeno já desnaturado; estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), as que degradam componentes não colagenosos da matriz extracelular; MMPs tipo transmembrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24) e outros grupos menos caracterizados (WERB, 1997; VU; WERB, 2000).

As MMPs degradam componentes estruturais da matriz extracelular (colágeno, elastina, laminina), quebrando barreiras físicas e permitindo a migração celular, crescimento, proliferação e remodelação da matriz (VISSE; NAGASE, 2003; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; NEWBY, 2006), podendo alterar não somente o processo de regeneração ativa mas também a estabilidade dos tecidos regenerados (GROSSO et al., 1997; KERKVLiet et al., 1999). Além disso, podem regular a atividade de citocinas e de fatores de crescimento, como TNF- α e TGF- β , clivando os componentes da matriz extracelular que fisicamente vêm a sequestrá-las (IMAI et al. 1997; STERNLICHT; WERB, 2001), bem como romper a adesão célula-célula e/ou célula-superfície de adesão, liberando moléculas e outras proteases na superfície celular e/ou modulando apoptose (IMAI et al., 1997; NAGASE; VISSE; MURPHI 2006). A expressão de MMPs também é regulada por numerosos fatores,

incluindo citocinas e fatores de crescimento (TNF- α , IL-1, IL-4, IL-10, TGF- β), ampliando ainda mais suas interações (BORDEN; HELLER, 1997; JOHN et al., 2002; LIACINI et al., 2002).

De fato, os níveis de MMPs podem refletir no grau de anabolismo e catabolismo do colágeno durante os processos inflamatório e de reparo (INGMAN et al., 1993; HAERIAN et al., 1995). É interessante notar que a presença de uma membrana reabsorvível parece aumentar os níveis de MMP-3 e de MMP-8, atuando na remodelação do colágeno durante todo o processo de reabsorção desse biomaterial (SAID et al., 1999). Células isoladas de membranas de e-PTFE produzem MMPs e outras proteinases e podem estar relacionadas com o sucesso ou falha clínica desses procedimentos regenerativos (GROSSO et al., 1997). Estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), por sua vez, são expressas em níveis elevados em processos patológicos e, subsequentemente, ativadas durante o reparo (GIRARD et al., 1993; BUISSON et al., 1996). Além disso, o local de implantação e a superfície química do biomaterial podem influenciar na modulação da secreção de MMPs/TIMPs, mostrando, por exemplo, o envolvimento de MMPs na fusão dos macrófagos e na formação de células gigantes de corpo estranho, as quais culminam na reação de corpo estranho (LUTTIKHUIZEN et al., 2006; JONES et al., 2008).

As MMPs podem ser reguladas por um grupo de proteínas endógenas chamadas inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que são capazes de inibir quase todos os membros da família das MMPs de maneira não específica (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002). Existem 4 tipos conhecidos de TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) e são capazes de ligar-se à maioria das MMPs (VISSE; NAGASE, 2003). Normalmente, TIMPs estão em equilíbrio com as MMPs, de modo que a matriz extracelular é remodelada de maneira regulada, mantendo a homeostase dos tecidos, enquanto que em muitos processos patológicos, níveis elevados de MMPs, sem o concomitante aumento de TIMPs, resultam em destruição tecidual (MURPHY et al., 1991; REYNOLDS, 1996; NAWROCKI et al. 1997).

Após a implantação de um biomaterial, ocorrem mudanças no processo de cicatrização, um processo que requer um delicado equilíbrio entre atividades anabólicas e catabólicas. De acordo com a composição do biomaterial, local de

implantação, tamanho da injúria e possíveis focos de contaminação bacteriana, a expressão de fatores como TNF- α e TGF- β pode sofrer variações, repercutindo diretamente no equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores (TIMPs) nos tecidos implantados. O fator de crescimento TGF- β tem função crucial na manutenção da homeostase tecidual e possui importante papel na modulação da proliferação e migração de células, além de estimular a produção de componentes da matriz extracelular (FINE; GOLDSTEIN, 1987). Inibe também a degradação das proteínas da matriz, diminuindo a síntese de metaloproteinases (LAIHO; KESKI-OJA, 1989; OVERALL; WRANA; SODEK, 1991) e aumentando a síntese dos seus inibidores (TIMPs) (EDWARDS et al., 1987; OVERALL; WRANA; SODEK, 1989). Por outro lado, a produção excessiva e/ou contínua de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos, como TNF- α , é responsável pela remodelação ou destruição dos mesmos, induzindo ao aumento na síntese de MMPs (MEIKLE et al., 1989).

O conhecimento da função das citocinas em relação ao uso de biomateriais, até então pouco compreendido, pode servir como base para futuras intervenções terapêuticas visando a limitar o processo inflamatório e destruição tecidual, e a melhorar consequentemente, o reparo dos tecidos. Nos últimos anos, os avanços conseguidos na ciência dos biomateriais e engenharia dos tecidos vêm sendo baseados no melhor entendimento de como as doenças se desenvolvem em nível celular e molecular. Na maioria das disciplinas médicas, a substituição da abordagem do mecânico para o mais biológico privilegia embasamento de técnicas mais efetivas que, previsivelmente, promovam a habilidade natural do corpo em regenerar os tecidos perdidos (HAMMERLE; JUNG, 2003). Essa é a chave para o desenvolvimento de novas estratégias e materiais que poderão ser utilizados em todos os campos na medicina regenerativa, os biomateriais desenvolvidos com base na "engenharia inteligente". Esses biomateriais representam uma poderosa ferramenta não farmacológica na área médico-odontológica (KOU; BABENSEE, 2011), vislumbrando novas perspectivas para problemas ainda não solucionados como perda de estruturas anatômicas, defeitos congênitos, recuperação de tecido ósseo e regeneração dos tecidos periodontais destruídos.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a resposta imune e inflamatória desenvolvida por camundongos frente à implantação de membrana de cortical óssea bovina (Gen-derm®) no tecido subcutâneo, em implantação única ou sequencial de duas membranas, assim como, investigar os possíveis mecanismos envolvidos no processo de reconhecimento e reabsorção da membrana.

Detalhadamente, nossos objetivos são:

- 2.1 Analisar a cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina (Gen-derm®) em camundongos da linhagem C57Bl/6 (WT), de acordo com a análise histomorfométrica e a quantificação da produção e expressão de fatores de crescimento, marcadores ósseos, marcadores de matriz, citocinas e quimiocinas, potencialmente envolvidos nesse processo.
 - 2.2 Avaliar a possível imunogenicidade da membrana de cortical óssea bovina (Gen-derm®), de acordo com a cinética de reabsorção e desenvolvimento da resposta imune e inflamatória, após a sensibilização inicial dos camundongos da linhagem C57Bl/6 (WT), com uma membrana, e uma exposição subsequente com a implantação de uma segunda membrana, com posterior análise histomorfométrica, teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e quantificação da produção de marcadores de matriz e citocinas, potencialmente envolvidos na resposta.
 - 2.3 Caracterizar a participação das moléculas CD14 e MyD88 na cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina (Gen-derm®), utilizando camundongos da linhagem C57Bl/6 (WT) e animais geneticamente deficientes para as moléculas CD14 (CD14KO) e MyD88 (MyD88KO), de acordo com análise histomorfométrica e quantificação da produção de marcadores de matriz e citocinas, potencialmente envolvidos nesse processo.
-

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Nesse experimento foram utilizados camundongos machos, com idade de 8 semanas, pesando aproximadamente 25 g, alimentados com água e ração da marca Purina, *ad libitum* durante todo o experimento e mantidos em ambiente com controle de luz e temperatura. Os animais C57Bl/6 (WT) eram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP e os animais geneticamente deficientes (knockouts-KO) para as moléculas CD14 (CD14KO) e MyD88 (MyD88KO), fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP/USP. A execução dos procedimentos foi realizada nos laboratórios de Cirurgia Experimental e de OSTEOimunologia da disciplina de Histologia, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. N° 017/2008), sendo aprovado em 24 de outubro de 2008 (Anexos A e B).

Um total de 143 animais foram utilizados nessa pesquisa. Inicialmente, foi realizada a colocação da membrana de cortical óssea bovina em camundongos WT com posterior análise histomorfométrica, quantificação da produção (análise imunoenzimática por ELISA) e expressão (análise molecular por PCR *Array*) de fatores de crescimento, marcadores ósseos, marcadores de matriz, citocinas e quimiocinas, potencialmente envolvidos durante o processo de reabsorção da membrana, nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias. De acordo com a cinética de reabsorção das membranas observada nessa fase do experimento, estabelecemos os tempos experimentais utilizados nas etapas seguintes de 3 e 9 dias, onde a membrana se encontra em processo inicial e final de reabsorção, respectivamente. Na fase seguinte, foi avaliada a imunogenicidade da membrana de cortical óssea bovina em camundongos WT por meio de duas colocações subsequentes desse biomaterial para análise histomorfométrica, teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), quantificação da produção de marcadores de matriz e citocinas,

potencialmente envolvidos durante o processo de reabsorção da membrana de colágeno nos períodos de 3 e 9 dias. Finalmente foi realizada a colocação da membrana em camundongos Knockouts (KO) para as moléculas CD14KO e MyD88KO com análise histomorfométrica, quantificação da produção de marcadores de matriz e citocinas, potencialmente envolvidos durante o processo de reabsorção da membrana, nos períodos de 3 e 9 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos grupos experimentais avaliados frente à implantação da membrana de cortical óssea bovina, de acordo com o número de animais por período e tipo de análise realizada.

Grupos	Períodos	Tipo de análise				Total
		Histomorfometria	PCR Array	ELISA	DTH	
1 implantação	3d	4	5	5	-	14
	6d	4	-	5	-	09
	9d	4	5	5	-	14
	12d	4	-	5	-	09
WT	15d	4	-	5	-	09
	-	-	-	-	32	32
	-	-	-	-	-	-
2 implantações	3d	5	-	5	-	10
	9d	5	-	5	-	10
CD14KO	3d	4	-	5	-	09
	9d	4	-	5	-	09
MyD88KO	3d	4	-	5	-	09
	9d	4	-	5	-	09
Total		46	10	55	32	143

3.2 Biomaterial

A membrana de cortical óssea bovina desmineralizada, de nome comercial Gen-derm® (BAUMER - Mogi Mirim-SP, Divisão Genius, Lote: 4000510, Fab. 2010-02, Val. 2012-02, com registro na ANVISA nº 10345500069) é constituída basicamente de fibras colágenas ósseas estruturadas (95% colágeno Tipo I). De acordo com o fabricante, a espessura da membrana pode variar de 150 a 200 Micra, então um espessímetro digital (World Precision Instruments, Inc., USA – resolução 0,01 mm) foi usado para padronizar a espessura média desse biomaterial (0,204 mm $\pm$ 0,215 mm). As membranas foram assepticamente recortadas em câmara de fluxo,

com auxílio de um punch de 0,8 mm de diâmetro, possuindo cada unidade peso médio de $0,0050 \text{ g} \pm 0,0015 \text{ g}$ (Balança Scientech/SA).

3.3 Procedimento cirúrgico

A anestesia geral dos animais foi obtida com aplicação intramuscular de 2,32 mg/animal de cloridrato de ketamina (Dopalen® Sespo Indústria e Comércio - Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia – São Paulo, Brasil) associado a 0,46 mg/animal de cloridrato de xilazina (Anasedan® Sespo Indústria e Comércio - Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia – São Paulo, Brasil), relaxante muscular e sedativo de uso animal, respectivamente. Em seguida, realizou-se a tricotomia do dorso do animal com lâmina de bisturi nº 15 e assepsia com iodofor alcoólico. Após o isolamento da área cirúrgica, com auxílio de um bisturi com lâmina nº 15 C, foram feitas duas incisões contra laterais de 1 cm no tegumento que reveste o dorso do animal, com posterior divulsão do tecido conjuntivo, formando duas lojas cirúrgicas. Um disco de membrana de colágeno foi implantado em uma das lojas cirúrgicas (lado teste) e na loja cirúrgica oposta, onde nenhuma membrana foi colocada, designou-se o lado controle. Os retalhos foram recolocados e suturados com fio vicryl - poliglactina 910, incolor, trançado, nº 5-0 (Ethicon® - Johnson & Johnson). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais até o momento da realização do procedimento de coleta das amostras para análises posteriores.

3.4 Coleta de amostras

Após o término dos períodos experimentais, a eutanásia dos animais foi realizada por dose excessiva de anestésico via intramuscular com 6,96 mg/animal de cloridrato de ketamina associado a 1,38 mg/animal de cloridrato de xilazina. A coleta das amostras foi realizada com auxílio de um bisturi com lâmina nº 15. Para a análise histomorfométrica, as amostras foram submetidas ao processo de fixação em formol tamponado a 10 % (100 ml de formaldeído a 37-39 % diluído em 900 ml de solução tampão preparada para pH 7,0 com 5 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6,5 g de fosfato de sódio dibásico anidro

Na₂HPO₄.12H₂O diluído em água destilada) durante uma semana para processamento histológico posterior. Para a dosagem da atividade enzimática (ELISA), as amostras foram fragmentadas com o auxílio de um cinzel (autoclavado e tratado com água DEPC), sendo então pesado e homogenizado com o homogenizador de tecidos (Ultra Turrax – IKA, Alemanha) em solução de PBS 1X contendo inibidor enzimático (Protease Inhibitor – Boehringer Mannheim, Alemanha) e congeladas em ultra-freezer (-80 °C). Para a extração de RNA e posterior análise de expressão gênica (RealTimePCR Array), as amostras foram fragmentadas com o auxílio de um cinzel (autoclavado e tratado com água DEPC), e transferidas para um tubo tipo *ependorf*, ao qual foi adicionado o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA), na proporção de 1 ml de Trizol para 1 mg de tecido, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante e armazenadas a -70 °C.

3.5 Processamento histológico e coloração

Após a coleta das amostras e fixação, as peças foram submetidas a procedimentos histológicos padronizados, com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec (parafina + resina sintética - Laboratório Merck®). Um total de 7 cortes semi-seriados de 0,004 mm de espessura (4 µm) e com aproximadamente 0,9 mm de intervalo entre eles, foram obtidos por meio de um micrótomo (Jung-Leica® RM2045), abrangendo toda a extensão do disco de membrana de colágeno (0,8 cm ou 8 mm), utilizado nesse experimento. De acordo com a ordem dos cortes, o primeiro foi equivalente à porção inicial da membrana, o segundo e terceiro avançando em direção ao centro, o quarto corte correspondente a maior dimensão da membrana, o quinto e sexto mais afastados do terço médio e o sétimo e último corte abrangendo a porção final da membrana, que posteriormente foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) (Figura 1).

Figura 1. Esquema da ordem dos cortes semi-seriados abrangendo toda a extensão do disco da membrana de cortical óssea bovina: 1) equivalente à porção inicial da membrana; 2 e 3) avançando em direção ao centro; 4) corte correspondente a maior dimensão da membrana; 5 e 6) mais afastados do terço médio; 7) corte abrangendo a porção final da membrana, totalizando 7 cortes, nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias na fase inicial do experimento e 3 e 9 dias nas etapas seguintes.

3.6 Análise histomorfométrica

De acordo com a análise morfológica descritiva dos cortes histológicos utilizando um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2) e objetiva de imersão de 100x (OLYMPUS E A100), foi determinada a presença e intensidade de infiltrado inflamatório, células mononucleares, células gigantes multinucleadas (CGM), presença de cápsula de tecido conjuntivo fibroso e sinais de reabsorção da membrana na área de implantação durante seu processo de reabsorção. As imagens apresentadas foram fotografadas com uma câmera (ICC-50HD - 3 MP) acoplada a um microscópio (Leica DM500) com objetivas 10x e 40x, e as imagens capturadas, enviadas para o programa LAS EZ, evidenciando a cinética de

reabsorção da membrana, assim como detalhes microscópicos do processo de reparo tecidual, de acordo com cada tempo experimental.

Com a análise morfométrica por planimetria, foram capturadas imagens dos campos histológicos de cada amostra (7 cortes) e a área da membrana foi determinada pelo sistema de análise de imagem digitalizada, composto por um microscópio óptico binocular (Zeiss Axioskop II), objetiva com aumento de 4X, câmera (Sony - CCD-IRIS/RGB) e sistema de análise KS300 (Kontron Elektronik GmbH, Eching, Munique, Alemanha), instalado em um computador (IBM). Posteriormente, foi calculada a área média da membrana (mm^2) para cada tempo experimental, totalizando 198 cortes analisados. A análise morfométrica por densidade de volume das estruturas envolvidas no processo de reabsorção da membrana foi caracterizada quantitativamente de acordo com a presença de fibras, fibroblastos, vasos, coágulo, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas, presentes na região de implantação do biomaterial, nos diferentes períodos experimentais. De cada amostra foram obtidos 7 cortes semi-seriados de 0,004 mm de espessura e com 0,9 mm de intervalo entre eles. Com auxílio de um retículo de integração (Integrationsplatte II 100/25) colocado em uma ocular (Carl Zeiss West Germany, Kpl 8x), as contagens foram realizadas em um microscópio (OLYMPUS CH-2) com objetiva de imersão 100x e os resultados obtidos foram apresentados em porcentagem de volume das estruturas analisadas por rastreamento sequencial equivalentes a 6 cortes por período, num total de tecido processado de 54 cortes.

3.7 Extração de RNA e Transcrição Reversa

Para extração do RNA total dos fragmentos foi utilizado reagente Trizol, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, EUA), na proporção de 1 ml de Trizol para 1 mg de tecido, sendo agitado por 30 s e deixado a temperatura ambiente por 5 min. Para cada 1 ml da suspensão, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Sigma), sendo então as amostras centrifugadas a 12000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa (camada superior) foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em vortex e incubado por 20 min a -20 °C para precipitar o RNA da fase

aquosa. Novamente, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 100 %. Para permitir a secagem das amostras, os tubos foram invertidos sobre um papel de filtro e deixados em temperatura ambiente por 5 min dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir contaminação das amostras). Para redissolver o RNA total, as amostras foram suspensas em 50 µl de água deionizada e livre de RNase, sendo então armazenadas a -70 °C. Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para determinar a concentração de RNA/µl nas amostras, usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Superscript III – Invitrogen Life Technologies) utilizando 5 µg de RNA total e tendo como volume final de reação 200 µl.

3.8 Reações de PCR Array

A análise quantitativa da expressão gênica nos sítios de implantação das membranas (e sítios controle) foi analisada através de reações de PCR Array (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “Wound Healing” (PAMM-121), “Inflammatory cytokines and receptors” (PAMM-011) e “Osteogenesis” (PAMM-026). A listagem completa dos genes analisados, organizados em seus respectivos grupos, encontra-se na Tabela 2. De forma geral, esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro, juntamente com os demais reagentes do kit (SABiosciences – QIAGEN) foram misturados para a formação de um *mix*, contendo: 1250 µl do tampão 2X *SuperArray RT² qPCR Master Mix*; 100 µl de reação de síntese de cDNA; 1250 µl de água deionizada ‘DNase/RNase free’ (Invitrogen, LifeTechnologies). Na seqüência foram adicionados 25 µl desta mistura em cada poço da placa (96 poços), já contendo os pares de *primers* liofilizados. Em seguida, a reação de PCR em tempo real foi executada no aparelho da ABI7500, compreendendo basicamente 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e quarenta e cinco

ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado, utilizando-se o *Software RT² Profiler PCR Array Data Analysis (SuperArray)*, que basicamente utiliza a fórmula $2^{(-DDCt)}$ para inicial normalização pela média geométrica de três genes constitutivos (Gapdh, Actb, Hprt1) e posteriormente normalizados pelo grupo controle, sendo expressos como *fold change* em relação ao grupo controle. Genes apresentando valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 40 foram considerados não expressos. Para os ensaios de PCR Array foi utilizado um *pool* de tecido proveniente de 5 camundongos por grupo, sacrificados nos tempos de 3 e 9 dias após a colocação da membrana de cortical óssea bovina.

Tabela 2. Relação dos genes analisados por PCR Array

Fatores de crescimento	<i>Bmp3, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmp7, Egf, Fgf1, Fgf2, Fgf3, Tgfb1, Vegfa, Vegfb</i>
Marcadores ósseos	<i>Twist1, Alpl, Ahsg, Ambn, Dmp1, Phex, Sost, Vdr, Rankl, Opg, Rank, Ctsk</i>
Marcadores de matriz	<i>Col1a2, Col2a1, Col4a2, Col5a1, Mmp1a, Mmp2, Mmp8, Mmp9, Mmp10, Serpine1, Timp1, Timp3</i>
Citocinas	<i>Il1b, Il2, Il4, Il6, Il10, Il12, Il17, Ifng, Tnf</i>
Receptores de quimiocinas	<i>Ccr2, Ccr3, Ccr4, Ccr5, Ccr6, Ccr7, Ccr8, Ccr9, Cxcr1, Cxcr3</i>
Quimiocinas	<i>Ccl2, Ccl3, Ccl5, Ccl6, Ccl7, Ccl8, Ccl9, Ccl11, Ccl17, Ccl20, Ccl24, Ccl25, Cxcl1, Cxcl4, Cxcl5, Cxcl10, Cxcl11, Cxcl12, Cxcl13, Cx3cl1</i>
Controle	<i>Gapdh, Actb, Hprt1</i>

3.9 Quantificação por ELISA

A produção de citocinas, proteases e seus inibidores nos tecidos envolvidos durante o processo de reabsorção da membrana foi analisada por ELISA (TALVANI et al., 2003). Para tanto, o tecido proveniente da região onde foi implantada a membrana foi devidamente coletado (conforme previamente descrito), pesado e homogenizado com o homogenizador de tecidos (Ultra Turrax – IKA, Alemanha) em solução de PBS 1X contendo inibidor enzimático (Protease Inhibitor – Boehringer Mannheim, Alemanha). O homogenizado foi centrifugado a 2500 g por 10 min a 4 °C, sendo então o sobrenadante coletado e armazenado a -70 °C até a realização dos ensaios de ELISA. Os fatores MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α , TGF- β foram quantificados utilizando kits (R&D Systems, EUA; & Uscn Life Science Inc. Wuhan, China), de acordo com o protocolo recomendado pelos fabricantes. A concentração dos diferentes fatores nos homogenatos das amostras foi determinada a partir dos valores obtidos com as respectivas curvas-padrão. Para os ensaios de ELISA foi utilizado um *pool* de tecido proveniente de 5 camundongos por grupo, sacrificados nos tempos de 3 e 9 dias após a colocação da membrana. Os resultados apresentados foram expressos como valores da média $\pm$ desvio padrão de picogramas de citocina por miligrama de tecido, e representam os valores de duplicatas de cada amostra, obtidos em dois experimentos independentes .

3.10 Teste de Hipersensibilidade do Tipo Tardia (DTH)

A avaliação da resposta imunológica dos animais quando expostos à membrana de cortical óssea bovina foi analisada de acordo com o teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH - delayed type hypersensitivity) (TITUS; CHILLER, 1981). A sensibilização inicial dos animais foi realizada nos grupos experimentais que receberam uma única implantação da membrana, duas implantações subsequentes, nenhuma implantação e finalmente, o controle positivo com animais sensibilizados com KLH (keyhole limpet hemocyanin). Após 7 dias, o desafio antigênico foi realizado, utilizando preparado de membrana de cortical óssea bovina (membrana pulverizada em nitrogênio líquido e suspenso em PBS) (2 μ g) ou KLH (BIANCO et al., 2009). A reação de DTH foi determinada 24 horas após o

desafio, por meio da diferença da espessura das patas entre o sítio do desafio (KLH) com o sítio controle (solução salina fisiológica), aferido através da utilização de paquímetro digital (Mitutoyo, Kanagawa, Japão).

3.11 Análise estatística

Para dados que não se enquadraram na distribuição de normalidade, foram utilizados testes como Kruskal-Wallis (seguido pelo teste de Dunns) e Mann-Whitney. Análises entre três ou mais grupos experimentais, como os dados relativos às estruturas envolvidas no reparo tecidual, níveis de reabsorção da membrana, quantificação de citocinas, foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Análises entre apenas dois grupos ou amostras, teste “t”. Possíveis correlações foram analisadas através de regressão linear, ou do teste de Pearson. A significância estatística do experimento envolvendo a técnica de PCR *Array* foi avaliada pelo teste Mann-Whitney, sendo os valores submetidos ao teste de correção de Benjamini e Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Os experimentos foram realizados em triplicata. Para todas as análises, valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. A todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados os programas GraphPad InStat e Prism4 (GraphPad, San Diego, CA).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT

4.1.1 Análise histomorfométrica

Durante a fase inicial do experimento, foi realizada a colocação da membrana de cortical óssea bovina em tecido subcutâneo da região dorsal de camundongos nos períodos experimentais de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, para observação da resposta tecidual, do tempo de permanência e do processo de reabsorção desse biomaterial. No grupo experimental de 3 dias (Figura 2 - A1 e A2), a membrana apresentou-se praticamente íntegra com presença de infiltrado inflamatório. Aos 6 dias (Figura 2 - B1 e B2), sinais de reabsorção da membrana foram observados em pontos isolados, com algumas células mononucleares e cápsula de tecido conjuntivo fibroso separando a membrana do tecido conjuntivo frouxo da região. Porém, a partir do 9º dia (Figura 2 - C1 e C2), o processo de degradação atingiu toda a extensão da membrana, acompanhado de infiltrado inflamatório, tanto nas bordas como na região central do biomaterial, além do aparecimento de células gigantes multinucleadas. Após 12 dias (Figura 2 - D1 e D2) e 15 dias (Figura 2 - E1 e E2), a membrana mostrou-se em estágio mais avançado de invasão e degradação, com resquícios desse biomaterial em pontos isolados, visíveis somente em maiores aumentos, acompanhado de aumento significativo de células gigantes multinucleadas.

Figura 2. Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongo C57Bl/6 submetido à implantação de membrana de cortical óssea bovina: A1 e A2) 3 dias, membrana praticamente íntegra com presença de infiltrado inflamatório. B1 e B2) 6 dias, sinais de reabsorção da membrana em pontos isolados, com algumas células mononucleares e presença de cápsula de tecido conjuntivo fibroso. C1 e C2) 9 dias, degradação em toda extensão da membrana e aparecimento de células gigantes multinucleadas. D1 e D2) 12 dias e E1 e E2) 15 dias, reabsorção em fase mais adiantada com infiltrado inflamatório e aumento significativo de células gigantes multinucleadas. Membrana (*); Áreas de reabsorção da membrana (seta); cápsula de tecido conjuntivo fibroso (cabeça de seta preta); células gigantes multinucleadas (cabeça de seta vermelha). Objetiva de 10x e 40x. HE

A quantificação de fibras, fibroblastos, vasos, coágulo, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas envolvidos após implantação da membrana de cortical óssea bovina foram avaliadas nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias. A densidade de volume de fibras colágenas em todos os períodos analisados não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0.05$), sendo marcada com discreto aumento após 15 dias da colocação da membrana. Resultado similar foi encontrado após análise da densidade de volume de fibroblastos, detectada nas lâminas através da presença do seu núcleo. Em relação ao coágulo e vasos, observamos um leve aumento dessas estruturas nos períodos de 3 e 6 dias, coincidindo com a fase inicial de cicatrização. A porcentagem de células inflamatórias foi significativamente maior nos períodos iniciais após a implantação da membrana, diferença observada em relação às células gigantes multinucleadas (CGM), que ao contrário, apresentaram-se significativamente aumentadas nos períodos mais tardios da cicatrização (Gráfico 1).

Gráfico 1. Densidade de volume (%) de fibras, fibroblastos, vasos, coágulo, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas (CGM) em animais WT: implantação da membrana de cortical óssea bovina, nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, nos cortes corados pela técnica de HE. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os grupos analisados ($p < 0.05$).

De acordo com a análise morfométrica por planimetria, a área da membrana e seu percentual de reabsorção nos períodos de 3, 6, 9, 12 e 15 dias foram analisados pelo sistema de análise digitalizada Kontron KS300 (Carl Zeiss® – Alemanha). Nos períodos iniciais de 3 dias (área $0,764 \text{ mm}^2 \pm 0,024 \text{ mm}^2$) e 6 dias (área $0,543 \text{ mm}^2 \pm 0,029 \text{ mm}^2$) a membrana mostrou-se bastante preservada, porém com o passar do tempo, 9 dias (área $0,302 \text{ mm}^2 \pm 0,024 \text{ mm}^2$), 12 dias (área $0,005 \text{ mm}^2 \pm 0,024 \text{ mm}^2$)

e 15 dias ($\text{área } 0,003 \text{ mm}^2 \pm 0,001 \text{ mm}^2$), uma crescente elevação na taxa de reabsorção desse biomaterial e conseqüente diminuição da sua área foram observados (Gráfico 2). De acordo com a cinética de reabsorção da membrana, confirmarmos os tempos experimentais utilizados nas etapas seguintes desse estudo, 3 e 9 dias, onde a membrana se encontra em processo inicial e final de reabsorção, respectivamente.

Gráfico 2. Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT: avaliação morfológica (análise digitalizada Kontron KS300) nos cortes corados pela técnica de HE, quanto à área da membrana (mm^2) nos períodos experimentais de 3, 6, 9, 12 e 15 dias. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os grupos analisados ($p < 0.05$).

4.1.2 Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina

Camundongos C57Bl/6 foram utilizados para observação do perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo após implantação da membrana de cortical óssea bovina, nos períodos de 3 e 9 dias. A análise exploratória de PCR *Array*, utilizando uma matriz personalizada de qPCR teve como alvos marcadores dos principais fatores de crescimento, marcadores ósseos, marcadores de matriz, citocinas, receptores de quimiocinas e quimiocinas, potencialmente envolvidos nesse processo.

No período de 3 dias após a colocação da membrana, observou-se aumento nos fatores de crescimento TGF- β (fator de crescimento transformante β), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), EGF (fator de crescimento epidermal) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), além do marcador ósseo como o receptor de vitamina D (VDR). Em relação aos marcadores de matriz, níveis aumentados foram encontrados para as proteases MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9, seus inibidores TIMP-1, TIMP-3, além das proteínas colagenosas COL1a2 e COL2a1 e SERPINE1. Finalmente, as citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α (fator de necrose tumoral α), quimiocinas CCL-2, CCL-5, CXCL-1, CXCL-4, CXCL-12 e seus receptores CCR-2, CCR-5 e CXCR-1 apresentaram níveis elevados após a implantação desse biomaterial (Gráfico 3). O grupo Sham mostrou valores similares aos encontrados no grupo onde a membrana foi implantada, principalmente nos períodos iniciais, indicando que a resposta inflamatória provocada durante esse período não é dependente exclusivamente da implantação desse biomaterial.

Durante os períodos mais adiantados (9 dias) do processo de degradação da membrana de cortical óssea bovina, mostraram-se aumentados os fatores de crescimento TGF- β , FGF e VEGF, além dos marcadores ósseos como RANK (receptor ativador do NF- κ B), RANKL (ligante do receptor ativador do NF- κ B), VDR e CTSK, bem como as citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α , quimiocinas CCL-2, CCL-3, CCL-5, CCL-11, CXCL-4, CXCL-12, CX3CL1 e seus receptores CCR2, CCR-3, CCR-5, CXCR-1 e CXCR-3. Porém quando se analisou os marcadores de matriz, nenhuma diferença foi encontrada nos níveis de expressão referentes aos períodos iniciais e finais do processo de reparo tecidual posterior à implantação da membrana (Gráfico 4).

Gráfico 3. Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 3 dias: análise por PCR Array (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “Wound Healing” (PAMM-121), “Inflammatory cytokines and receptors” (PAMM-011) e “Osteogenesis” (PAMM-026). Resultados descritos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir de medições triplicado em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos *Gapdh*, *Hprt* e *Actb* utilizando o método de limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizados pelas amostras controle. Resultados expressos como “fold change” em relação aos controles. * indica valores estatisticamente diferentes entre o grupo indicado e o grupo controle, $p < 0,05$, Mann-Whitne com correção de Benjamini e Hochberg.

Gráfico 4. Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 9 dias: análise por PCR Array (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “Wound Healing” (PAMM-121), “Inflammatory cytokines and receptors” (PAMM-011) e “Osteogenesis” (PAMM-026). Resultados descritos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir de medições triplicado em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos *Gapdh*, *Hprt* e *Actb* utilizando o método de limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizados pelas amostras controle. Resultados expressos como “fold change” em relação aos controles. * indica valores estatisticamente diferentes entre o grupo indicado e o grupo controle, $p < 0,05$, Mann-Whitne com correção de Benjamini e Hochberg.

Tabela 3. Perfil geral da expressão gênica no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos WT após implantação da membrana de cortical óssea bovina nos períodos experimentais de 3 e 9 dias: a expressão dos genes foi avaliada usando a técnica de PCR Array, e os valores normalizados pela média geométrica de três genes constitutivos (*Gapdh*, *Hprt* e *Actb*) e calibrados pelo grupo exposto ao veículo em cada período. Os dados são mostrados como expressão relativa onde valores em asterísco indicam aumento da expressão de cada gene avaliado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa 3 dias	Expressão Relativa 9 dias
		Fold	Fold
Fatores de crescimento			
<i>Bmp3</i>	Bone morphogenetic protein 3	0,98	0,99
<i>Bmp4</i>	Bone morphogenetic protein 4	1,11	1,16
<i>Bmp5</i>	Bone morphogenetic protein 5	0,95	1,03
<i>Bmp6</i>	Bone morphogenetic protein 6	0,99	0,96
<i>Bmp7</i>	Bone morphogenetic protein 7	0,89	0,93
<i>Egf</i>	Epidermal growth factor	3,64*	2,89
<i>Fgf1</i>	Fibroblast growth factor 1	5,34*	6,24*
<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2	6,25*	6,87*
<i>Fgf3</i>	Fibroblast growth factor 3	6,70*	5,75*
<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor beta 1	9,97*	8,67*
<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A	4,21*	3,96*
<i>Vegfb</i>	Vascular endothelial growth factor B	4,05*	2,86
Marcadores ósseos			
<i>Twist1</i>	Twist-related protein 1	0,93	0,95
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	1,09	1,31
<i>Ahsg</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein	1,14	1,07
<i>Ambn</i>	Ameloblastin	0,93	0,97
<i>Dmp1</i>	Dentin matrix protein 1	0,93	1,11
<i>Phex</i>	Phosphate regulating endopeptidase homolog	1,08	0,96
<i>Sost</i>	Sclerostin	0,96	0,91
<i>Vdr</i>	Vitamin D receptor	3,32*	3,94*
<i>Rankl</i>	Receptor activator of NF-κB	1,97	3,12*
<i>Opg</i>	Osteoprotegerin	1,70	2,14
<i>Rank</i>	Receptor activator of NF-κB	2,31	5,67*
<i>Ctsk</i>	Cathepsin K	2,07	4,59*
Marcadores de matriz			
<i>Col1a2</i>	Collagen type I alpha 2	6,31*	7,89*
<i>Col2a1</i>	Collagen type II alpha 1	2,80*	3,50*
<i>Col4a2</i>	Collagen type IV alpha 2	1,33	2,22
<i>Col5a1</i>	Collagen type V alpha 1	1,70	1,41
<i>Mmp1</i>	Matrix metalloproteinase 1	8,66*	7,96*
<i>Mmp2</i>	Matrix metalloproteinase 2	7,93*	6,97*
<i>Mmp8</i>	Matrix metalloproteinase 8	5,12*	3,75*
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	9,33*	8,75*
<i>Mmp10</i>	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	1,36	1,22
<i>Serpine1</i>	Serine protease inhibitor	4,88*	5,79*
<i>Timp1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	5,02*	4,03*
<i>Timp3</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	5,21*	4,93*

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa 3 dias Fold	Expressão Relativa 9 dias Fold
Citocinas			
<i>Il1b</i>	Interleukin 1b	11,24*	9,64*
<i>Il2</i>	Interleukin 2	1,42	1,31
<i>Il4</i>	Interleukin 4	1,51	1,11
<i>Il6</i>	Interleukin 6	8,21*	7,88*
<i>Il10</i>	Interleukin 10	4,44*	5,61*
<i>Il12</i>	Interleukin 12	3,14*	2,97
<i>Il17</i>	Interleukin 17	5,93*	3,33*
<i>Ifn</i>	Interferon	4,21*	3,97*
<i>Tnfa</i>	Tumor necrosis factor alpha	7,59*	5,91*
Receptores de quimiocina			
<i>Ccr2</i>	Chemokine receptor CCR2	3,17*	5,21*
<i>Ccr3</i>	Chemokine receptor CCR3	2,12	3,61*
<i>Ccr4</i>	Chemokine receptor CCR4	1,18	1,63
<i>Ccr5</i>	Chemokine receptor CCR5	3,99*	4,61*
<i>Ccr6</i>	Chemokine receptor CCR6	1,41	1,07
<i>Ccr7</i>	Chemokine receptor CCR7	1,05	0,97
<i>Ccr8</i>	Chemokine receptor CCR8	0,96	0,94
<i>Ccr9</i>	Chemokine receptor CCR9	1,12	1,21
<i>Cxcr1</i>	Chemokine receptor CXCR1	7,14*	4,51*
<i>Cxcr3</i>	Chemokine receptor CXCR3	2,13	3,67*
Quimiocinas			
<i>Ccl2</i>	Chemokine CCL2	5,51*	4,67*
<i>Ccl3</i>	Chemokine CCL3	2,33	3,68*
<i>Ccl5</i>	Chemokine CCL5	3,86*	5,63*
<i>Ccl6</i>	Chemokine CCL6	1,03	0,94
<i>Ccl7</i>	Chemokine CCL7	0,89	0,93
<i>Ccl8</i>	Chemokine CCL8	1,03	1,01
<i>Ccl9</i>	Chemokine CCL9	0,94	1,08
<i>Ccl11</i>	Chemokine CCL11	1,86	3,71*
<i>Ccl17</i>	Chemokine CCL17	0,93	0,96
<i>Ccl20</i>	Chemokine CCL20	1,34	1,28
<i>Ccl24</i>	Chemokine CCL24	0,97	1,11
<i>Ccl25</i>	Chemokine CCL25	1,34	2,02
<i>Cxcl1</i>	Chemokine CXCL1	3,86*	2,35
<i>Cxcl4</i>	Chemokine CXCL4	3,04*	5,69*
<i>Cxcl5</i>	Chemokine CXCL5	0,96	1,92
<i>Cxcl10</i>	Chemokine CXCL10	1,70	1,37
<i>Cxcl11</i>	Chemokine CXCL11	1,11	1,85
<i>Cxcl12</i>	Chemokine CXCL12	6,68*	7,63*
<i>Cxcl13</i>	Chemokine CXCL13	1,07	1,08
<i>Cx3cl1</i>	Chemokine CX3CL1	2,03	5,33*

4.1.3 Análise quantitativa da produção de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α e TGF- β durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT

A cinética relacionada à produção de citocinas, proteases e seus inibidores nos tecidos envolvidos durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina foi analisada por ELISA. Após a colocação da membrana, todos os parâmetros analisados sofreram aumento significativo quando comparados aos respectivos grupos controle, que por sua vez, não receberam esse biomaterial.

Gráfico 5. Níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β, nos tecidos de camundongos C57Bl/6: amostras de tecido subcutâneo de animais WT foram coletadas, pesadas e homogenizadas, nos períodos experimentais de 3, 6, 9, 12 e 15 dias após colocação da membrana de cortical óssea bovina, sendo o sobrenadante analisado quanto aos níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β por ELISA. Os resultados foram expressos em pg de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β, por mg de tecido por animal, e representam os valores (média ± desvio padrão), provenientes de 5 animais por grupo em cada tempo, representativos de 2 experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os grupos analisados ($p < 0.05$).

Os níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 na presença do biomaterial mostraram-se aumentados logo nos períodos iniciais à implantação, decrescendo gradativamente até a completa degradação da membrana de cortical óssea bovina. Entretanto, quando foram analisados os valores dos seus inibidores TIMP-2 e de TIMP-3 observou-se oscilação nas suas concentrações, com níveis maiores nos períodos de 3 e 12 dias após a colocação da membrana, coincidindo com os tempos iniciais e mais tardios do processo de reabsorção, respectivamente. Em relação à produção da citocina pró-inflamatória TNF- α , seus níveis apresentaram-se maiores nos primeiros 3 dias, diminuindo de forma gradativa com o passar do tempo e diferindo da cinética observada para o fator de crescimento e transformação- β (TGF- β), que obteve seu pico de produção aos 9 dias, uma fase mais avançada do processo de reabsorção da membrana (Gráfico 5).

4.2 Análise da imunogenicidade da membrana de cortical óssea bovina após duas implantações sequenciais em animais WT

4.2.1 Análise histomorfométrica

Para avaliar a possível imunogenicidade da membrana, uma subsequente segunda exposição ao mesmo desafio antigênico foi realizada com intervalo de 15 dias após a primeira colocação. Comparando as duas fases experimentais, com uma ou duas implantações, diferenças marcantes não foram encontradas com a análise morfológica. Aos 3 dias, ambas as fases, demonstraram integridade da membrana, com infiltrado inflamatório, algumas células mononucleares e presença de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, separando a membrana do tecido conjuntivo frouxo característico da região (Figura 3). Em períodos mais tardios, o processo de degradação já atinge toda a extensão da membrana de cortical óssea bovina, acompanhado de processo inflamatório e aparecimento de células gigantes multinucleadas, observados tanto no grupo que sofreu uma implantação como no que recebeu duas implantações consecutivas (Figura 4).

Figura 3. Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongo C57Bl/6 submetido à duas implantações subsequentes da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 3 dias: em ambos os grupos experimentais, com uma implantação (**A1 e A2**) ou duas implantações (**B1 e B2**) da membrana, os períodos iniciais são marcados pela integridade da membrana, com presença de infiltrado inflamatório, algumas células mononucleares e presença de cápsula de tecido conjuntivo fibroso. Membrana (*). Objetiva de 10x e 40x. HE

Figura 4. Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongo C57Bl/6 submetido à duas implantações subsequentes da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 9 dias: os períodos mais tardios apresentaram ainda infiltrado inflamatório, presença de cápsula de tecido conjuntivo fibroso e um processo mais adiantado de degradação da membrana, observados tanto no grupo com uma implantação (**A1 e A2**) como no grupo que sofreu duas implantações (**B1 e B2**) da membrana. Membrana (*). Objetiva de 10x e 40x. HE

Entretanto, de acordo com a análise morfométrica, verificou-se após a segunda implantação seqüencial no mesmo animal, aumento significativo na velocidade de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina, com uma área total de $1,168 \text{ mm}^2 (\pm 0,027 \text{ mm}^2)$ e $0,752 \text{ mm}^2 (\pm 0,015 \text{ mm}^2)$ nos períodos de 3 e 9 dias, quando comparadas às áreas onde apenas uma membrana foi implantada com $1,772 \text{ mm}^2 (\pm 0,011 \text{ mm}^2)$ e $1,625 \text{ mm}^2 (\pm 0,062 \text{ mm}^2)$, nos tempos experimentais de 3 e 9 dias, respectivamente (Gráfico 6). Dessa forma, observamos que houve uma resposta inflamatória mais exacerbada após uma consecutiva segunda exposição ao mesmo desafio antigênico, nesse caso, a membrana de cortical óssea bovina, indicando uma possível natureza imunogênica desse biomaterial.

Gráfico 6. Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina de acordo com a comparação entre uma e duas implantações em animais WT: avaliação morfométrica (análise digitalizada Kontron KS300), nos cortes corados pela técnica de HE, quanto à área da membrana (mm²) nos períodos experimentais de 3 e 9 dias ($p < 0.05$).

4.2.2 Análise quantitativa da produção de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α e TGF- β durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina após duas implantações sequenciais em animais WT

A produção de proteínas nos tecidos envolvidos durante o processo de reabsorção da membrana após duas colocações sequenciais indicou que todas as proteases analisadas tais como MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 mostraram-se aumentadas quando comparadas com os níveis onde ocorreu apenas uma única implantação desse biomaterial ($p < 0,05$). Os inibidores das metaloproteinases como TIMP-2 e TIMP-3, também apresentaram níveis aumentados nos períodos de 3 e 9 dias nos diferentes grupos experimentais, porém sem significância estatística entre eles. A quantificação de TNF- α mostrou-se aumentada nos períodos iniciais do processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina, diferente dos níveis de TGF- β aumentados somente nos períodos mais tardios (Gráfico 7).

Gráfico 7. Níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β, nos tecidos de camundongos C57Bl/6: amostras de tecido subcutâneo de animais WT foram coletadas, pesadas e homogenizadas, nos períodos experimentais de 3 e 9 dias após uma e duas implantações sequenciais da membrana de cortical óssea bovina, sendo o sobrenadante analisado quanto aos níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β por ELISA. Os resultados foram expressos em pg de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β, por mg de tecido por animal, e representam os valores (média ± desvio padrão), provenientes de 5 animais por grupo em cada tempo, representativos de 2 experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os grupos analisados ($p < 0.05$).

4.2.3 Teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH)

Para caracterizar a resposta imunológica provocada pela membrana de cortical óssea bovina, foi realizado o teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), em animais que receberam uma única implantação da membrana, duas implantações subsequentes, nenhuma implantação e finalmente, o controle positivo com animais sensibilizados com KLH (keyhole limpet hemocyanin). Após o desafio com injeção subcutânea na pata traseira esquerda, utilizando o preparado de dois antígenos diferentes, da membrana de cortical óssea bovina e KLH, observou-se aumento progressivo da espessura da pata dos animais com uma implantação e duas implantações subsequentes, respectivamente, porém sem resultado estatisticamente significativo ($p>0,05$), indicando que a membrana não elicitou resposta imunológica exacerbada, mesmo após uma segunda colocação. Esses resultados foram confirmados pelo controle positivo, nos animais que receberam KLH e que também foram previamente sensibilizados ($p<0,05$) (Gráfico 8).

Gráfico 8. Teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) em animais WT após uma e duas implantações sequenciais da membrana de cortical óssea bovina: os animais foram sensibilizados inicialmente com uma implantação da membrana, duas implantações subsequentes, nenhuma implantação e com KLH. O desafio antigênico foi realizado após 7 dias da sensibilização inicial com injeção subcutânea com inoculodo de membrana e KLH (keyhole limpet hemocyanin) e após 24 horas, a resposta do DTH foi analisada pela medição da pata traseira esquerda dos animais (mm) ($p<0,05$).

4.3 Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais CD14KO e MyD88KO

4.3.1 Análise histomorfométrica

Os mecanismos envolvidos no reconhecimento biológico à implantação da membrana de cortical óssea bovina em tecido subcutâneo da região dorsal de camundongos, foram analisados comparativamente de acordo com a resposta em animais da linhagem selvagem C57Bl/6 (WT) e knockouts (KO) para as moléculas CD14KO e MyD88KO nos períodos de 3 e 9 dias.

A análise morfológica evidencia que nos animais knockouts o padrão de cicatrização mostrou-se semelhante aos WT, com infiltrado inflamatório ao redor da membrana que se encontra praticamente íntegra nos períodos iniciais após sua implantação (Figura 5). O período de 9 dias, que corresponde aos estágios mais avançados de degradação é seguido de infiltrado inflamatório e cápsula de tecido conjuntivo fibroso, com sinais de reabsorção distribuídos em toda a extensão da membrana, tanto nas bordas como na região central, além do aparecimento de células gigantes multinucleadas (Figura 6).

Figura 5. Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongos WT, CD14KO e MYD88KO submetidos à implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 3 dias: os animais WT (A1 e A2) apresentaram padrão de cicatrização semelhante ao dos animais CD14KO (B1 e B2) e MyD88KO (C1 e C2) onde a membrana mostrou-se praticamente íntegra com presença de infiltrado inflamatório nos períodos iniciais após implantação. Membrana (*). Objetiva de 10x e 40x. HE

Figura 6. Fotomicrografia de tecido subcutâneo de camundongos WT, CD14KO e MyD88KO submetidos à implantação da membrana de cortical óssea bovina no período experimental de 9 dias: os animais WT (A1 e A2) apresentaram padrão de cicatrização semelhante ao observado nos animais CD14KO (B1 e B2) e MyD88KO (C1 e C2), com sinais de reabsorção distribuídos em toda extensão da membrana, tanto nas bordas como na região central, com presença de cápsula de tecido conjuntivo fibroso, células mononucleares e células gigantes multinucleadas. Membrana (*); Área de reabsorção da membrana (seta); cápsula de tecido conjuntivo fibroso (cabeça de seta preta); células gigantes multinucleadas (cabeça de seta vermelha). Objetiva de 10x e 40x. HE

A análise dos componentes envolvidos na resposta inflamatória frente à implantação da membrana como fibras, fibroblastos, vasos, coágulo, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas no período de 3 dias, mostrou que a resposta inflamatória é semelhante em ambos os grupos, com tendência ao aumento de células inflamatórias, coágulo e fibroblastos no grupo WT ($p>0.05$). Porém, a partir de 9 dias após implantação desse biomaterial, os animais knockouts apresentaram um aumento significativo na porcentagem de fibras, fibroblastos, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas, quando comparados aos WT (Gráfico 9).

Gráfico 9. Densidade de volume (%) de fibras, fibroblastos, vasos, coágulo, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas em animais WT, CD14KO e MyD88KO: implantação de membrana de cortical óssea bovina, nos períodos de 3 e 9 dias, nos cortes corados pela técnica de HE. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os grupos analisados ($p < 0.05$).

Entretanto, de acordo com a análise morfométrica para avaliação da área da membrana de cortical óssea bovina, observou-se que no período de 3 dias após sua implantação, os animais CD14KO ($1,424 \text{ mm}^2 \pm 0,023 \text{ mm}^2$) e MyD88KO ($1,431 \text{ mm}^2 \pm 0,013 \text{ mm}^2$) apresentaram uma reabsorção menor da membrana quando comparados aos animais WT ($0,764 \text{ mm}^2 \pm 0,024 \text{ mm}^2$). Após 9 dias, diferenças estatisticamente significativas em relação à degradação mais lenta das membranas, foram observadas novamente nos animais CD14KO ($0,595 \text{ mm}^2 \pm 0,045 \text{ mm}^2$) e MyD88KO ($1,076 \text{ mm}^2 \pm 0,219 \text{ mm}^2$) quando comparadas aos WT ($0,302 \text{ mm}^2 \pm 0,024 \text{ mm}^2$). Dessa forma, verificou-se que o processo de degradação da membrana ocorre de forma mais lenta em animais CD14KO e MyD88KO quando comparados aos animais WT (Gráfico 10).

Gráfico 10. Cinética de resposta e reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais WT, CD14KO e MyD88KO: avaliação morfométrica (análise digitalizada Kontron KS300) nos cortes corados pela técnica de HE, quanto à área da membrana (mm^2) nos períodos experimentais de 3 e 9 dias. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os grupos analisados ($p < 0.05$).

4.3.2 Análise quantitativa da produção de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF- α e TGF- β durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em animais CD14KO e MyD88KO

Durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina, a produção das proteases MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, das citocinas TNF- α e TGF- β nos animais WT mostraram em geral, níveis mais elevados quando comparados aos CD14KO e MyD88KO, porém com uma cinética semelhante para todos os grupos. Logo nos períodos iniciais após a colocação da membrana, tanto os animais WT como os CD14KO e MyD88KO apresentaram níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13 e TNF- α aumentados, diferindo do fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) que mostrou níveis mais elevados de produção aos 9 dias e que correspondem aos estágios mais tardios do processo de reabsorção da membrana. Quando foram analisadas as concentrações dos inibidores das proteases, TIMP-2 e TIMP-3, observou-se que os animais CD14KO e MyD88KO apresentavam concentrações semelhantes aos WT, tanto nos tempos de 3 dias como de 9 dias (Gráfico 11).

Gráfico 11. Níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β, nos tecidos de camundongos C57Bl/6, CD14KO e Myd88KO: amostras de tecido subcutâneo desses animais foram coletadas, pesadas e homogenizadas, nos períodos experimentais de 3 e 9 dias após implantação da membrana de cortical óssea bovina, sendo o sobrenadante analisado quanto aos níveis de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β por ELISA. Os resultados foram expressos em pg de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, TIMP-2, TIMP-3, TNF-α, TGF-β, por mg de tecido por animal, e representam os valores (média ± desvio padrão), provenientes de 5 animais por grupo em cada tempo, representativos de 2 experimentos independentes. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre os grupos analisados ($p < 0.05$).

5 *Discussão*

5 DISCUSSÃO

Os avanços relacionados à ciência dos biomateriais e engenharia tecidual buscam esclarecer os mecanismos envolvidos na resposta biológica associada ao uso desses dispositivos e sua interação com o sistema imune (FURTHMAYR; TIMPL, 1976; COOPERMAN; MICHAELI, 1984). Devido à quantidade limitada de trabalhos científicos na área de biomateriais, com enfoque puramente molecular, essa discussão será conduzida sem a intenção de comparar materiais, resultados e metodologias, mas realizando um paralelo entre a resposta imune e inflamatória frente à implantação de um biomaterial com os resultados obtidos, desde a sua colocação, passando pelo processo de reabsorção até a fase de reparo dos tecidos envolvidos.

Para o entendimento de como o organismo reage após a colocação de um biomaterial, foram avaliados a resposta imune, inflamatória e os possíveis mecanismos envolvidos no processo de reabsorção e reconhecimento de uma membrana de cortical óssea bovina implantada em tecido subcutâneo de camundongo, analisando-se parâmetros histomorfométricos, enzimáticos e moleculares.

Camundongos foram utilizados neste experimento devido à facilidade e praticidade no seu manuseio, baixo custo de manutenção, além de apresentarem tecidos semelhantes aos de humanos e pelo fato de possuírem acelerado metabolismo, possibilitando a obtenção de resultados em um curto espaço de tempo. Apenas camundongos machos fizeram parte desse estudo, para evitar a influência de variações hormonais as quais, comprovadamente, podem modular a resposta imune e inflamatória (OERTELT-PRIGIONE et al., 2011). Além disso, o camundongo é o animal experimental com utilização mais difundida em imunologia, uma vez que propicia a modificação genética para a expressão ou ausência de determinados fatores, o que permite o estabelecimento de relações diretas de causa e efeito entre tais fatores e os eventos biológicos/patológicos verificados, permitindo, então, o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na regulação do tecido durante

o reparo em condições homeostáticas (KORPI et al. 2009; TOMOMATSU et al. 2009).

Membranas não reabsorvíveis, ainda hoje, são consideradas *gold standard* para a utilização em regeneração tecidual/óssea guiada (GOTTLOW et al., 1984; BECKER et al., 1987; CATON et al., 1987; PONTORIERO et al., 1987; BECKER; BECKER, 1990; CAFFESSE et al., 1990). Entretanto possuem a grande desvantagem de não serem reabsorvidas pelo organismo; assim, um segundo procedimento cirúrgico faz-se necessário para sua remoção, o que causa desconforto ao paciente, interfere no reparo tecidual em curso, aumenta o custo, consequentemente limitando sua indicação (HAMMERLE; JUNG, 2003). Devido a esses inconvenientes, a membrana reabsorvível à base de colágeno é atualmente uma das barreiras biológicas mais usadas. Em favor de tal utilização, estudos descrevem que o colágeno é uma proteína natural do periodonto e do tecido ósseo, possuindo propriedades homeostáticas, de agregação plaquetária e quimiotáticas para fibroblastos (YAFFE; EHRLICH; SHOSHAN, 1984; LOCCI et al., 1997), além de sua estrutura molecular variar muito pouco entre espécies animais, o que lhe confere uma possível vantagem em relação à imunogenicidade (FURTHMAYR; TIMPL, 1976; COOPERMAN; MICHAELI, 1984; PACHENCE, 1996; SCHLEGEL et al., 1997; PIEPER et al., 2000; JANSEN et al., 2008). Também se deve considerar a vantagem da eliminação da reentrada cirúrgica, oferecendo maior conforto ao paciente, com redução da morbidade pós-operatória e melhor custo/benefício (BLUMENTHAL, 1993; BLACK et al., 1994; YUKNA; YUKNA, 1996; HAMMERLE; JUNG, 2003). Do ponto de vista biológico, também parece, a princípio, mais interessante o estudo de uma membrana reabsorvível, uma vez que outros mecanismos biológicos estão potencialmente envolvidos na resposta a materiais dessa natureza se comparados a materiais não reabsorvíveis.

Na etapa inicial deste experimento, após a colocação da membrana de cortical óssea bovina em tecido subcutâneo da região dorsal de animais da linhagem C57Bl/6 (WT), nos períodos experimentais de 3, 6, 9, 12 e 15 dias, observaram-se, inicialmente, a resposta tecidual, o tempo de permanência e o processo de reabsorção desse biomaterial.

De forma geral, os resultados da análise histológica demonstraram a ocorrência de uma reação inflamatória de magnitude moderada após a implantação da membrana, a qual foi seguida pelo declínio do número de leucócitos (células mononucleares) nas proximidades da membrana e surgimento de células gigantes multinucleadas em paralelo ao processo progressivo de reabsorção desse biomaterial. Tais resultados são compatíveis com estudos prévios (KOU; BABENSEE, 2011; ANDERSON, 1993; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; POLIMENI et al., 2008) que normalmente correspondem a descrições consensuais dos eventos teciduais associados à implantação das membranas, não permitindo, dessa forma, a construção de discussões e hipóteses mais elaboradas. Na sequência, aprofundou-se a discussão sobre os dados deste trabalho, com base nos resultados histomorfométricos, enzimáticos e moleculares.

A partir da análise histomorfométrica, pode-se afirmar que os períodos iniciais (3 dias) após implantação da membrana de cortical óssea bovina, confirmam os processos que caracterizam a inflamação aguda como aumento na porcentagem de vasos e de células mononucleares, explicando a presença de infiltrado inflamatório logo após sua colocação. A migração celular durante o processo de resposta imune e inflamatória, além dos eventos vasculares, alguns deles perceptíveis ao microscópio óptico como a proliferação de células endoteliais e neoformação de vasos no sítio, envolve diversos mediadores como citocinas e quimiocinas. De fato, esses resultados demonstraram que, nos tempos iniciais, diversos desses fatores são expressos nos sítios de implantação da membrana, tais como as citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , quimiocinas CCL-2, CCL-5, CXCL-12 e seus receptores CXCR-1 e CCR-5.

De forma geral, as citocinas inflamatórias se caracterizam por possuírem ação pleiotrópica, redundante, sinérgica ou antagônica e geralmente participam de um sistema de indução em cascata. Atuam como reguladores positivos ou negativos da resposta imune, inflamatória e reparadora do hospedeiro a lesões. Suas ações individuais na imunidade são complexas, uma vez que elas agem em um microambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estágios de ativação (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Assim, as citocinas podem ser geralmente caracterizadas como tendo efeitos pró-inflamatório, anti-inflamatório ou inibidores, quimiotáticos (quimiocinas) ou de reparo (fatores de crescimento). As

quimiocinas, que caracteristicamente têm sua expressão induzida por citocinas inflamatórias, apresentam propriedades quimiotáticas altamente específicas, as quais estimulam o movimento dos leucócitos e sua migração do sangue para os tecidos (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

Além de elementos quimiotáticos, a expressão de fatores de crescimento TGF- β , FGF, EGF e VEGF e dos marcadores ósseos, como VDR, RANK, RANKL e CTSK, são evidentes nos tecidos que circundam a membrana implantada. De forma geral, pode-se considerar tal expressão um indicativo de que o processo de reparo se inicia de forma precoce, em paralelo ao processo inflamatório. Por outro lado, o aumento da expressão de proteases como MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9, seus inibidores TIMP-1 e TIMP-3, além de COL1a2 e SERPINE1, parecem participar do processo de degradação da membrana e da destruição tecidual presentes logo nos períodos iniciais da implantação desse biomaterial. Essa variedade de mediadores inflamatórios, logo após a colocação da membrana, dispara uma cascata de sinalização que, devido a seus efeitos pleiotrópicos, causam uma série de mudanças morfológicas e moleculares na tentativa de reabsorver esse material e reparar o tecido circunjacente. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento são secretados agindo como mensageiros moleculares que promovem eventos inflamatórios como a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (BONECCHI et al., 1998; GORDON, 2003), assim como recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos por meio de IL-1, IL-6, TNF α , CCL-2, CCL-5, além de outros que auxiliam no reparo do tecido, tais como síntese de colágeno por TGF- β , FGF e neovascularização auxiliados por VEGF (XIA; TRIFFITT, 2006; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

Com o passar do tempo, no período de 9 e 12 dias pós-implantação, sinais de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina, que antes eram observados em pontos isolados, aos poucos vão atingindo toda sua extensão e se unem até a completa degradação do material, que é observada somente após 15 dias. Todo esse processo de reabsorção da membrana é acompanhado de aumento significativo de fibroblastos, fibras e células gigantes multinucleadas, que passam a preencher o espaço até então ocupado pela membrana. Com relação à magnitude do processo inflamatório, neste estágio da resposta, pode-se afirmar que o número de células inflamatórias encontra-se diminuído quando comparado aos períodos iniciais após a implantação do biomaterial. Esses eventos são auxiliados por fatores

que podem dirigir (CCL-5, CXCL4, CX3CL1, CXCL-12, CCR2, CCR5, CXCR-1), ativar e desativar (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , FGF, IL-10) células inflamatórias e responsáveis pelo reparo do sítio de implantação desse biomaterial e que se mostram aumentados durante esse período. Ainda com relação à expressão gênica nos períodos mais tardios da resposta, pôde-se verificar que a expressão de marcadores de matriz como MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9, TIMP-1 e TIMP-3, além de COL1a2 e SERPINE1 é similar àquela descrita nas fases iniciais do processo de cicatrização da membrana.

Já na fase mais adiantada do processo inflamatório, normalmente ocorre aumento acentuado de macrófagos, provavelmente a célula mais importante na inflamação crônica, devido à quantidade de produtos ativos liberados por eles nesse processo (KOU; BABENSEE, 2011). Os macrófagos estão entre as células do corpo com maior diversidade fenotípica e realizam um grande número de funções na imunidade, inflamação, cicatrização e homeostase tecidual (LEIBOVICH; ROSS, 1975; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Macrófagos também têm a função de orquestrar a reação de corpo estranho, uma série de eventos que são iniciados quando um material é implantado (ANDERSON; MILLER, 1984). As funções dos macrófagos são realizadas através da secreção de citocinas, fatores de crescimento e sua ativação pode ser classificada de acordo com as vias clássica, de cicatrização e regulatória (MOSSER; EDWARDS, 2008). Após a implantação de um biomaterial, de acordo com a ativação clássica, macrófagos respondem a citocinas Th1, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-1 com reação tecidual ao redor desse dispositivo e posterior degradação. Na ativação pela via de cicatrização, os macrófagos são ativados pelas citocinas Th2, como IL-4, IL-13, com aumento da atividade arginase e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies nitrogênio e oxigênio reativas, os quais levam à produção de matriz extracelular e cicatrização (Martinez, Sica et al. 2008). Finalmente, a ativação regulatória é conseguida pela estimulação de complexos imune, frequentemente caracterizada pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (EDWARDS et al., 2006). Apesar disso, entende-se que a ativação de macrófagos pode ser descrita como uma interação entre essas três fases ao invés de fenótipos distintos e separados (MOSSER; EDWARDS, 2008). Normalmente um macrófago responde a um biomaterial

inicialmente pela via clássica, seguido por uma resposta imunorregulatória (LYNN; BRYANT, 2011).

Em modelos em que os macrófagos são depletados ou neutralizados, poucas células gigantes multinucleadas foram formadas, e a degradação do biomaterial mostrou-se atrasada (van ROOIJEN; SANDERS, 1994; KHOUW et al., 1998). Além disso, macrófagos são capazes de secretar fatores que promovem a regulação da angiogênese e fibroproliferação. Na angiogênese secretam VEGF, tipicamente produzido durante a cicatrização, como um potente regulador da vasodilatação. Na regulação da fibroproliferação, agem estimulando a atividade de fibroblastos correlacionada *in vivo* com a resposta fibrótica, ou seja, macrófagos aderentes ao biomaterial podem também secretar proteínas que modulam a fibrose desenvolvida ao redor do material implantado (MILLER; ROSE-CAPRARA; ANDERSON, 1989). Alternativamente também secretam proteínas da matriz extracelular, que estão envolvidas na remodelação tecidual (GRATCHEV et al., 2001), além de IL-10, que é uma potente citocina anti-inflamatória e age na redução da secreção de TNF- α entre outras citocinas.

Logo após o recrutamento e adesão ao biomaterial, os macrófagos sofrem um processo de fusão para a formação das células gigantes de corpo estranho. As células gigantes multinucleadas são observadas em tecido ósseo, granulomas e em resposta à implantação de materiais. São formadas pela fusão repetida de macrófagos e divididas em 3 tipos: osteoclastos, células gigantes de Langhans e células gigantes de corpo estranho. Este último é formado em reação inflamatória a biomateriais e concentram atividades fagocitárias e de degradação na superfície do dispositivo colocado, também conhecida como reação de corpo estranho (LEIBOVICH; ROSS, 1975; ZIATS; MILLER; ANDERSON, 1988; ZHAO et al., 1991; ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008).

Em materiais reabsorvíveis, as células gigantes multinucleadas permanecem no local até que o material seja completamente degradado (HONMA; HAMASAKI, 1996). De acordo com alguns estudos, elas têm pouca participação na angiogênese e em processos fibróticos, devido aos baixos níveis produzidos de VEGF e FGF após a colocação de biomateriais (LUTTIKHUIZEN et al., 2007). No entanto, são capazes de expressar altos níveis de citocinas e quimiocinas, como quimioatraentes

para neutrófilos, e estão envolvidas na fagocitose e eliminação do colágeno (van WACHEM et al., 1991). Com relação à degradação da membrana, com o provável envolvimento de macrófagos e/ou células gigantes multinucleadas, evidências de diversos estudos apontam para um importante papel das MMPs nesse processo.

As MMPs são proteínas proteolíticas que hidrolisam componentes da matriz extracelular, afetando o comportamento celular por meio da liberação de fatores de crescimento e citocinas que podem influenciar na composição da matriz extracelular (STERNLICHT; WERB, 2001). Estudos observaram que macrófagos e células gigantes multinucleadas aderentes ao biomaterial produzem MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 *in vitro* e que a inibição farmacológica de MMP-1, MMP-8, MMP-13 não afeta a adesão, mas reduz a fusão dos macrófagos (JONES et al., 2008). Macrófagos e células gigantes multinucleadas aderentes à superfície do biomaterial podem modular a remodelação e fibrose da matriz extracelular e afetar o desempenho do biomaterial.

Uma vez discutida a sequência de eventos celulares e moleculares envolvida na resposta à implantação da membrana e sua consequente reabsorção e reparo do tecido envolvido, pode-se considerar a expressão local de algumas citocinas como potenciais moduladores desses processos. Após a ativação de macrófagos com a colocação de um biomaterial, inicialmente são observados maiores níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias e concomitante diminuição de proteínas de cicatrização e imunorregulatórias. Porém com o tempo, ocorre uma inversão dessas vias, afirmação essa que pode ser observada quando se avaliam os níveis de citocinas liberados durante todo o processo de degradação da membrana de cortical óssea bovina, sendo que logo após sua implantação a cinética da produção de TNF- α e MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 apresentaram um padrão de produção decrescente. Entretanto, os níveis dos inibidores de metaloproteinases e TGF- β parecem atuar de forma inversa.

Como a citocina pró-inflamatória TNF α está diretamente relacionada à indução da secreção de MMPs, que degradam componentes estruturais da matriz extracelular como colágeno, por exemplo, a destruição tecidual logo após a implantação da membrana é, em parte, explicada pelo aumento dessa citocina no tecido implantado. A influência do TNF- α sobre a resposta a um material pode

representar um equilíbrio entre sua ação promotora de biocompatibilidade como o acúmulo de células não inflamatórias tais como fibroblastos (VILCEK et al., 1987) e regulação na produção de collagenase (PANAGAKOS; KUMAR, 1994), que age na degradação da matriz extracelular, e consequente rejeição do implante. Assim como neste experimento, outros estudos confirmam que, durante o processo de reabsorção de um biomaterial, os níveis de TNF- α e também de IL-1 mostram-se aumentados, pois são importantes mediadores da resposta inflamatória, podem atuar de maneira sinérgica e exercem amplos efeitos biológicos sobre muitas células em resposta ao material colocado (CARDONA; SIMMONS; KAPLAN, 1992; BALDWIN; HUNT, 2008). Embora essas citocinas sejam frequentemente associadas à resposta inflamatória a biomateriais, são também envolvidas no processo de reparo (BALDWIN; HUNT, 2008), ou seja, se seus níveis se excederem aos valores desejados, a cicatrização pode de fato ser inibida, mais do que ativada (RAPALA, 1996; ZHANG et al., 2004).

Entretanto, quando a membrana está em processo mais adiantado de degradação, os níveis de TGF- β e inibidores de proteases aumentados indicam sua participação no processo de reparo dos tecidos. De fato, quando comparado com outros fatores de crescimento, o TGF- β parece exercer uma ação mais proeminente nesse processo (BENNETT; SCHULTZ, 1993a; BENNETT; SCHULTZ, 1993b; BULUT et al., 2004), estimulando a síntese de componentes da matriz do tecido conjuntivo como o colágeno (FINE; GOLDSTEIN, 1987; SCHWEIGERER et al., 1988), fibronectina (VARGA; ROSENBLOOM; JIMENEZ, 1987), proteoglicana (CHEN; HOSHI; MCKEEHAN, 1987), glicosaminoglicana (WESTERGREN-THORSSON et al., 1990), osteonectina (PFEILSCHIFTER; et al., 1990) e osteopontina. Ele também inibe a degradação de proteínas da matriz por inibir a síntese de MMPs, como as collagenases (LAIHO; KESKI-OJA, 1989; OVERALL; WRANA; SODEK, 1989), e por aumentar a síntese de inibidores de proteinases (EDWARDS et al., 1987; OVERALL; WRANA; SODEK, 1989). Dessa forma, para que ocorra o reparo e homeostase do tecido após a implantação de um biomaterial, deve existir o equilíbrio entre a neossíntese e degradação da matriz extracelular (WEYHE et al., 2007).

Outra citocina que também inibe a resposta inflamatória e promove a cicatrização é a IL-10, que pode modular os efeitos das citocinas pró-inflamatórias

por meio da inibição da produção de outras citocinas e/ou bloqueando receptores celulares (DONNELLY et al., 1990; FENTON; BURAS; DONNELLY, 1992; GORDON, 2003). Podem também atuar alternativamente nos macrófagos suprimindo a produção de IL-6, TNF- α , IL-1 (DE WAAL MALEFYT et al., 1991; GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2004).

Assim, em um contexto geral, pode-se considerar que a implantação da membrana induziu tanto fatores pró-inflamatórios como anti-inflamatórios nos períodos iniciais e finais. No entanto, o padrão geral da expressão de citocinas segue normalmente uma sequência. Inicialmente, após a implantação do biomaterial, níveis semelhantes de citocinas pró-inflamatórias e associadas ao reparo tecidual são observados, indicando uma intensa resposta inflamatória. Com o passar do tempo, os níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias diminuem, enquanto os níveis de citocinas pró-cicatriciais permanecem consistentes, favorecendo uma resposta cicatricial nos períodos mais tardios (BRODBECK et al., 2003).

Considerando os resultados até aqui discutidos, juntamente com os demais estudos prévios (KOU; BABENSEE, 2011; HUNT et al., 1996; DING; SUN; ZHANG, 2007; WEYHE et al., 2007; BALDWIN; HUNT, 2008; POLIMENI et al., 2008; SCHUTTE et al., 2009), pode-se entender que a membrana implantada se enquadra como um material biocompatível, ou que apresenta biocompatibilidade, dentro do conceito normalmente aplicado para tais definições quando do estudo de biomateriais. O conceito de biocompatibilidade aplicado aos biomateriais é destinado a uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, pode ser usada para direcionar, por controle de interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico (WILLIAMS, 2009).

Se os biomateriais são destinados a possuir uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo, o que se espera é que eles sejam biocompatíveis, isto é, que apresentem o mínimo de reações inflamatórias, alérgicas e tóxicas, quando em contato com os tecidos. Em geral, a biocompatibilidade é avaliada em termos da resposta inflamatória aguda e crônica e ainda pela formação de uma cápsula fibrosa

observada após a implantação de um dispositivo. Pesquisadores demonstram que há uma importante interação entre os biomateriais e o sistema imune, sendo que diferentes biomateriais induzem a graus variados de resposta imune (DING; SUN; ZHANG, 2007). A análise histológica dos tecidos adjacentes ao material implantado, durante algum tempo, foi um dos métodos mais comumente utilizados para avaliar a biocompatibilidade (TOMIDA et al., 2011). Partindo do princípio de que a biocompatibilidade é reduzida quando biomateriais induzem a expressão de maior quantidade de citocinas, essa indução pode também ser usada para analisar a intensidade de reações contra os biomateriais (HUMMEL et al., 1994; HUNT et al., 1996; DING; SUN; ZHANG, 2007). Atualmente, muitos pesquisadores têm avaliado a biocompatibilidade de biomateriais de acordo com a resposta imune, ou seja, têm focado na relação entre a expressão de uma citocina específica e a biocompatibilidade do biomaterial. As citocinas TNF- α e IL-1 são consideradas bons indicadores de estimulação imune e podem ajudar a monitorar os níveis de ativação celular induzidos por diferentes biomateriais (DING; SUN; ZHANG, 2007).

Assim, o conceito de biocompatibilidade aplicado ao estudo dos biomateriais é caracterizado por uma reação inflamatória local transitória, de baixa ou média magnitude, e uma baixa imunogenicidade, ou seja, a capacidade de o biomaterial desencadear uma resposta imunológica amena (COOPERMAN; MICHAELI, 1984; SCHLEGEL et al., 1997; WILLIAMS, 2008; WILLIAMS, 2009). Entretanto, o conceito imunológico de imunogenicidade envolve necessariamente uma sensibilização inicial e uma subsequente segunda exposição ao mesmo antígeno, e apenas na ausência de uma resposta exacerbada nessa segunda exposição, poderia ser caracterizada a natureza não imunogênica do biomaterial (ABBAS; LITCHTMAN, 2008).

Mesmo sabendo que a ISO (International Organization for Standardization) desenvolveu um conjunto de normas embasadas cientificamente e subdivididas em 20 tópicos (ISO 10.993) para a avaliação de dispositivos e materiais de uso médico (TOMIDA et al., 2011), ainda assim o questionamento sobre o conceito de biocompatibilidade aplicado rotineiramente ao estudo de biomateriais pode ser considerado incompleto do ponto de vista imunológico, uma vez que os estudos analisam geralmente implantações únicas de tais materiais.

Para auxiliar no esclarecimento de tal aspecto, avaliou-se, nesta pesquisa, a possível imunogenicidade da membrana de cortical óssea bovina, de acordo com a cinética de reabsorção e desenvolvimento da resposta imune e inflamatória, após a sensibilização inicial dos camundongos da linhagem C57Bl/6 (WT), com uma membrana, e uma exposição subsequente com a implantação de uma segunda membrana. Através da análise morfométrica, a velocidade de reabsorção, após duas implantações consecutivas desse biomaterial, foi maior quando comparada ao grupo de animais que sofreu apenas uma implantação, indicando uma possível natureza imunogênica desse biomaterial.

Uma das formas clássicas para a investigação de substâncias imunogênicas e sua capacidade de geração de resposta, em um determinado organismo, corresponde ao teste de DTH, ou hipersensibilidade do tipo tardia. O termo hipersensibilidade é aplicado quando uma resposta adaptativa ocorre de forma exagerada ou inapropriada, causando reações inflamatórias e dano tecidual. A hipersensibilidade é uma característica do indivíduo e não se manifesta no primeiro contato com o antígeno indutor da reação de hipersensibilidade, geralmente aparecendo em contatos subsequentes. As reações de hipersensibilidade podem ser divididas didaticamente em quatro tipos (I, II, III e IV). Os três primeiros tipos são mediados por anticorpos, enquanto que o quarto tipo é mediado primariamente por células T e macrófagos. As reações de hipersensibilidade do tipo IV, ou de hipersensibilidade tardia (celular), dependem de diversos eventos que caracterizam a resposta imunológica celular e envolvem um número significativo de células recrutadas. As células T, necessárias para a resposta tardia são células que se tornaram sensibilizadas (linfócitos T de memória) a um antígeno em particular através de um encontro prévio. A reação de hipersensibilidade tardia, consiste em um processo sequencial, onde uma célula apresentadora de antígeno entra em contato com um linfócito T específico, ocorrendo sensibilização. A partir desse contato, o linfócito T ativado expande-se em número e diferencia-se em células efetoras e células T de memória. No segundo contato, após o reconhecimento do antígeno, ocorre a ativação das células T de memória previamente sensibilizadas, que recrutam uma pequena quantidade de linfócitos T efetores. Após o contato com o antígeno, moléculas de adesão e quimocinas promovem um recrutamento ainda mais numeroso de linfócitos T efetores do que antes. Na resolução, macrófagos

ativados por citocinas atuam com a finalidade de eliminar o antígeno, podendo causar lesão tecidual.

Ainda para caracterizar a resposta imunológica provocada pela membrana de cortical óssea bovina e para confirmar sua possível imunogenicidade, foi realizado o teste de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH), um método simples para a avaliação da imunidade mediada por células que se tornaram sensibilizadas a um primeiro contato com a membrana. Mesmo sabendo que após uma segunda implantação a membrana é degradada mais rapidamente, os resultados do teste DTH demonstraram que a membrana não elicitou resposta imunológica exacerbada após uma segunda colocação, sugerindo então a natureza não imunogênica da membrana de cortical óssea bovina. De fato, após a segunda implantação da membrana, o teste DTH mostrou-se aumentado quando comparado aos demais grupos, porém sem significância estatística. É importante ressaltar que o real papel de mecanismos envolvidos na resposta inata e adaptativa na resposta a biomateriais permanece desconhecido. O aumento na velocidade de reabsorção da membrana indicaria algum tipo de envolvimento de memória imunológica e, conseqüentemente, de um estímulo antigênico suficiente para ativar a resposta imune adaptativa, o que comprometeria, ou limitaria, o uso de um biomaterial devido à geração de uma resposta imunológica não desejada. Contudo, apenas observou-se uma tendência aumentada para o teste DTH após duas implantações, sendo que, se realmente o material se mostrasse imunogênico, dever-se-ia esperar uma resposta de DTH significativa em um segundo desafio antigênico. Nesse contexto, questionou-se a eficácia do teste DTH para a avaliação da resposta imunológica gerada pela membrana de cortical óssea bovina, uma vez que ainda não foi estabelecida uma dose de sensibilização padronizada, já que foi observado um aumento discreto desse teste após duas implantações; e que diversos antígenos compõem o material implantado, sendo que novas investigações devem ser realizadas para elucidar os mecanismos envolvidos na aceleração da reabsorção da membrana em uma segunda implantação.

A grande vantagem, em relação à imunogenicidade de biomateriais à base de colágeno parece confirmada com este experimento, complementando os resultados de outras pesquisas com esses biomateriais (FURTHMAYR; TIMPL, 1976; COOPERMAN; MICHAELI, 1984; PACHENCE, 1996; SCHLEGEL et al., 1997;

PIEPER et al., 2000; JANSEN et al., 2008). A membrana utilizada neste estudo é composta predominantemente colágeno tipo I, e uma vez que o colágeno é uma proteína natural de muitos tecidos do organismo, como o do periodonto e o do tecido ósseo, possui propriedades homeostáticas, de agregação plaquetária e quimiotáticas para fibroblastos (YAFFE; EHRLICH; SHOSHAN, 1984; LOCCI et al., 1997). Além disso, sua estrutura molecular varia muito pouco entre espécies animais, inferindo-se que todos esses aspectos conferem a esse biomaterial comprovada vantagem em relação à imunogenicidade (FURTHMAYR; TIMPL, 1976; COOPERMAN; MICHAELI, 1984; PACHENCE, 1996; SCHLEGEL et al., 1997; PIEPER et al., 2000; JANSEN et al., 2008).

Um dos questionamentos em relação a esse biomaterial é que o colágeno utilizado nesses dispositivos é procedente de diferentes espécies, e que seu processamento poderia alterar as propriedades do produto final. O colágeno é a principal macromolécula estrutural do corpo humano e pode facilmente ser reconstituído em diferentes formas de acordo com a necessidade exigida em várias modalidades da medicina. Entretanto, o colágeno nativo é degradado mais rapidamente, dentro de poucos dias. A desvantagem da membrana de colágeno não tratado, se utilizada em regeneração tecidual guiada (RTG) ou regeneração óssea guiada (ROG), é a perda de uma de suas funções primordiais, que é a de manter o espaço necessário para que o novo tecido seja formado, pois é degradada mais rapidamente (HOCKERS et al., 1999). Uma possível solução para esse problema é a técnica de reação cruzada, que envolve a multiplicação das ligações que ocorrem naturalmente entre as moléculas de colágeno (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001) deixando as membranas mais rígidas, diminuindo a degradação enzimática (PITARU et al., 1988). O glutaraldeído é frequentemente utilizado na técnica de reação cruzada do colágeno que, embora seja efetivo, aumenta a citotoxicidade da membrana *in vitro* e *in vivo* (SPEER et al., 1979; SPEER et al., 1980), pois é liberado durante a degradação do colágeno, comprometendo a resposta celular. A membrana utilizada neste experimento foi preparada sem a adição de glutaraldeído, justamente para evitar efeitos imunogênicos, mesmo que isso venha a comprometer seu tempo de reabsorção, o que não é o foco principal deste estudo. Outros trabalhos confirmam que os fibroblastos de diferentes espécies, assim como células precursoras ósseas, foram capazes de se aderirem às membranas, independente da

origem do colágeno e do tipo de tratamento recebido (BEHRING et al., 2008). Mesmo utilizando nesta pesquisa colágeno proveniente de apenas uma espécie animal (bovino) e sem glutaraldeído, ainda assim, possíveis efeitos da origem do colágeno e do seu processamento parecem não alterar as propriedades benéficas da membrana de cortical óssea bovina e, conseqüentemente, sua ação na resposta inflamatória e imune.

Enquanto o foco dos ensaios de imunogenicidade é centrado na ativação de células ligadas à imunidade adaptativa, uma questão central ainda permanece sem resposta: como são deflagradas as respostas à implantação de biomateriais? A questão pode parecer simples à primeira vista, ainda mais pensando em biomateriais compostos de colágeno, como a membrana aqui utilizada. Entretanto, a implantação de materiais teoricamente inertes e não antigênicos, como componentes de titânio, resulta em resposta imune e inflamatória, ainda que de baixa magnitude, *in vivo*. É importante considerar que, *in vitro*, tais materiais são considerados por determinados estudos como realmente inertes. Nesse contexto, além da resposta que envolve o reconhecimento das propriedades físico-químicas do biomaterial, a contaminação com impurezas e/ou moléculas endógenas liberadas durante o trauma cirúrgico constituem um poderoso fator imunoestimulador, que provavelmente acentua a ativação da resposta do hospedeiro, repercutindo na intensidade e na duração dos processos inflamatório e de reparo. Isso significa que essas moléculas antigênicas podem interferir tanto na velocidade de reabsorção da membrana como na biocompatibilidade e imunogenicidade desse dispositivo.

Durante a etapa de reconhecimento, o receptor semelhante a Toll (TLR) e seu co-receptor CD14 são capazes de detectar níveis residuais de LPS (PAMPs) ou até mesmo moléculas endógenas (DAMPs) (CHUN; SEONG, 2010; MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; ARANCIBIA et al., 2007) liberadas durante a colocação do biomaterial (CHUN; SEONG, 2010) e, auxiliados pela molécula adaptadora MyD88, induzem a expressão de mediadores inflamatórios que podem alterar de forma importante a resposta do organismo frente ao biomaterial.

Dessa forma, os mecanismos envolvidos no reconhecimento biológico à implantação da membrana de cortical óssea bovina foram analisados comparativamente de acordo com a resposta em animais WT, CD14KO e

MyD88KO. De acordo com avaliação morfométrica, os animais CD14KO e MyD88KO apresentaram uma reabsorção mais lenta da membrana implantada quando comparados aos animais WT. Como os WT reabsorveram a membrana mais rapidamente que os KO, consequentemente o processo inflamatório nesses animais se encontra em estágios diferentes. Assim, com 3 dias, os animais WT apresentam aumento de células inflamatórias e mostram-se em processo mais adiantado de reabsorção que os KO. Somente aos 9 dias os KO encontraram-se em processo inflamatório intenso, demonstrado pelo aumento das estruturas inflamatórias quando comparados aos WT que, por sua vez já passaram por essa etapa e agora estão em uma fase mais adiantada no processo de reparo .

Os níveis de proteases MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13, das citocinas TNF- α nos animais WT também se mostraram elevados quando comparados aos Knockouts para as moléculas CD14 e MyD88, confirmando a participação das metaloproteinases e TNF- α no processo de reabsorção da membrana. Além disso, a produção do fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) foi maior aos 9 dias, que corresponde aos estágios mais tardios do processo de reabsorção da membrana. Quando foram analisadas as concentrações dos inibidores das proteases, TIMP-2 e TIMP-3, observou-se que os animais CD14KO e MyD88KO apresentavam concentrações semelhantes aos WT, tanto nos tempos de 3 dias como de 9 dias. Os resultados demonstraram que as moléculas CD14 e MyD88 estão envolvidas no reconhecimento do biomaterial e desempenham importante papel no processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina, indicando a participação de PAMPs e/ou DAMPs na resposta biológica gerada por esse biomaterial.

Com relação ao possível envolvimento de PAMPs nesse processo, pouca informação encontra-se disponível sobre a ação do LPS nos biomateriais, principalmente as relacionadas ao controle do nível de contaminação nesses dispositivos, bem como a uma dose mínima piogênica tolerável pelo organismo e que não cause uma reação inflamatória significativa (BREGER et al., 2009). Entretanto, alguns pesquisadores sinalizam a influência de contaminantes como endotoxina e outros mitógenos mais do que os componentes do próprio biomaterial na intensidade da resposta inflamatória e biocompatibilidade (KLOCK et al., 1997; HAISHIMA et al., 2001). Em um estudo onde foram avaliados diferentes tipos de

biomateriais, citocina como TNF- α , induzida por LPS, foi similar em magnitude àquelas induzidas somente pela implantação de biomateriais, ou seja, o impacto de LPS é similar à implantação de biomateriais sobre a produção de citocinas e fatores de crescimento (SCHUTTE et al., 2009). Outro estudo mostrou que alguns produtos exibem propriedades químicas e biológicas similares às do LPS, as quais incluem indução de reação febril em coelhos, ativação do reagente LAL (lisado de amebócito de limulus) específico para LPS, indução e produção de citocinas em cultura de células e presença de moléculas que são constituintes comuns de LPS (HAISHIMA et al., 2001).

Endotoxina em dispositivos médicos, especialmente nos biomateriais feitos a partir de substâncias naturais como o colágeno, exibem pirogenicidade (PEIRÓ; KULANDER; ERIKSSON, 1990), induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (THOMAS; HARDING; MOORE, 2000) e agem como alérgeno (SHMUNES; DARBY, 1984). Em um estudo realizado com 9 tipos de biomateriais feitos com substâncias naturais, 3 deles estavam contaminados com grande quantidade de endotoxina, considerando que a dose mínima piogênica de endotoxina em humanos é de aproximadamente 4.1 EU/kg (NAKAGAWA et al., 2003) e para dispositivos médicos, de acordo com norma da FDA de 20 EU. Pesquisadores mostram que enquanto o nível de endotoxina aceitável é de 20 EU por dispositivo implantado, concentrações menores podem ser suficientes para estimular uma forte resposta inflamatória ao biomaterial implantado (BREGER et al., 2009). A remoção de LPS, caracteristicamente presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas e adquiridos durante sua fabricação e/ou manuseio (van SCHILFGAARDE; DE VOS, 1999; DUSSEAUT et al., 2006; BREGER et al., 2009), mostra-se difícil devido à sua natureza ubíqua e até mesmo procedimentos como autoclavagem, esterilização a gás e irradiação, após o processo de fabricação desses dispositivos, podem não inativar o LPS (NAKAGAWA et al., 2003; WILSON et al., 2005), sendo somente a esterilização com calor-seco a 250 °C efetiva (PFEIFFER, 1990; HOLMDAHL; CHEGINI, 1997).

Além dos componentes microbianos, os receptores do tipo TLR (incluindo o complexo TLR4/CD14) também podem ser ativados por sinais não microbianos, como os DAMPs (padrões moleculares associados a danos), moléculas endógenas intracelular ou extracelular, normalmente presentes em baixas concentrações, cuja

liberação é deflagrada por processos de estresse, lesão ou morte de células, ou ainda lesão dos tecidos, como acontece durante um trauma cirúrgico para a implantação de um biomaterial (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; SATO et al., 2003; LOTZE et al., 2007). Dessa forma, os DAMPs têm função similar aos PAMPs podem atuar em mecanismos imunes e inflamatórios, agindo como adjuvantes, ativando células dendríticas e macrófagos (GALLUCCI; LOLKEMA; MATZINGER, 1999), porém na ausência de infecção, sendo assim a interação PPRs-DAMPs também chamada de “inflamação asséptica” (MATZINGER, 1994).

Pesquisas sobre a relação de DAMPs e biomateriais desenvolvidas até o momento estão em fase inicial e muitos conceitos ainda não estão bem estabelecidos. Alguns pesquisadores têm observado que os próprios biomateriais são capazes de agir como adjuvantes induzindo uma forte resposta imune humoral na ausência de PAMP/TLR. Entretanto, em um ambiente livre de endotoxina, TLR4 pode interagir com DAMPs e propagar uma resposta inflamatória inata e explicar esse efeito adjuvante (MATZELLE; BABENSEE, 2004; SHARP et al., 2009).

Ainda não existe um consenso se DAMPs contidas em remanescentes celulares retidos em biomateriais biológicos podem ter alguma participação na resposta imune. Um estudo investigou efeitos imunomodulatórios de diferentes biomateriais e a potencial contribuição de um DAMP (HMGB1) na resposta do hospedeiro. Os resultados mostraram que a fonte tecidual, métodos de descelularização e modificação química desses biomateriais podem atuar na presença ou não desse DAMP (HMGB1) no biomaterial. Esses fatores foram correlacionados com diferenças na proliferação celular, secreção de quimiocinas CCL2 e CCL4 e regulação de TLR4 na sinalização de citocinas pró-inflamatórias, reforçando a importância do HMGB1 e outros DAMPs como moléculas bioativas presentes no interior de biomateriais (DALY et al., 2012).

Outros grupos têm estudado a função do TLR4 na resposta celular a biomateriais *in vitro* e observaram que a secreção de citocinas em resposta a um oligossacarídeo de alginato é dependente de TLR4/2 (IWAMOTO et al., 2005) e que a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α em macrófagos tratados com partículas de hidroxiapatita eram TLR-4 dependentes (GRANDJEAN-LAQUERRIERE

et al., 2007). Pesquisas também investigam se a interação TLR/DAMP está envolvida na resposta inflamatória aguda e crônica à implantação de um biomaterial. De acordo com os resultados, TLR4 tem função na determinação do perfil adesivo de leucócitos sobre os biomateriais durante a resposta inflamatória aguda, e esse perfil de adesão pode ser mediado pela interação com DAMPs adsorvidos na superfície do material ou indiretamente afetado por outros tipos de células. Além disso, concluíram que o bloqueio de TLR4 pode ser benéfico para dirigir a resposta aguda que minimiza adesão de monócito/macrófago ao biomaterial. Outrossim, o encapsulamento fibroso após a implantação de um biomaterial pode acontecer na ausência de TLR4, indicando outro receptor compensatório para ativação e suporte na resposta tecidual de corpo estranho (ROGERS; BABENSEE, 2010).

As principais moléculas adaptadoras no reconhecimento de PAMPs e DAMPs incluem MyD88 e TRIF, entretanto a maioria dos TLRs usam MyD88. TLR4 usa ambos MyD88 e TRIF e TLR3 usa somente TRIF. Estudos indicam que macrófagos fagocitam essas partículas por meio de TLR/MyD88, agindo como PAMPs/DAMPs e sintetizam citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, que podem levar à perda de próteses. Concluem, ainda que a resposta a essas partículas é dependente de MyD88, pois a falta dessa molécula diminui a produção de TNF- α , em contraste com a ausência de TRIF que levou a um aumento dos níveis de TNF- α , possivelmente pelo aumento compensatório na expressão de numerosos componentes da via TLR. Esses resultados indicam que MyD88 pode representar um alvo terapêutico em muitas áreas relacionadas à colocação de biomateriais (PEARL et al., 2011).

Dada a necessidade de se aperfeiçoar o conhecimento sobre o processo de resposta à implantação de biomateriais, assim como o impacto do tipo, intensidade e duração de tal resposta no processo de reparo subsequente à implantação do biomaterial, os resultados do presente estudo não apenas contribuirão para o aprimoramento dos conhecimentos dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na resposta a biomateriais, mas também podem servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias para intervenção clínica conjunta à sua implantação, ou ainda, no desenvolvimento de novos biomateriais que resultem em respostas mais previsíveis, os biomateriais desenvolvidos com base na "engenharia inteligente", que podem guiar a apresentação, orientação ou conformação de proteínas adsorvidas ao biomaterial. Enquanto a modulação do processo

imune/inflamatório pode ser alvo de intervenções clínicas diretas com drogas já existentes e liberadas para uso humano, grandes avanços têm sido direcionados no campo da engenharia tecidual e medicina regenerativa para o desenvolvimento de inibidores específicos de citocinas, assim como de citocinas recombinantes aplicadas em diversos ensaios clínicos e algumas já liberadas para uso humano, além de moléculas bioativas presentes no interior de biomateriais ou biomateriais combinados com células, proteínas, e/ou outros componentes biológicos, criando híbridos para regeneração funcional de doenças e tecidos destruídos.

6 *Conclusões*

6 CONCLUSÕES

- **6.1** A membrana de cortical óssea bovina implantada em tecido subcutâneo da região dorsal de camundongos C57Bl/6 (WT) apresenta uma cinética de degradação compatível com o aumento crescente na taxa de reabsorção desse biomaterial nos diferentes períodos experimentais, 3, 6, 9, 12 e 15 dias.
 - **6.2** A análise molecular do reparo tecidual durante o processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina em camundongos C57Bl/6 (WT) induziu tanto fatores pró-inflamatórios como anti-inflamatórios nos períodos analisados. As citocinas seguem um padrão geral de expressão. Inicialmente, após a implantação do biomaterial, níveis semelhantes de citocinas pró-inflamatórias e pró-cicatriciais são observadas. Com o passar do tempo, os níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias diminuem, enquanto os níveis de citocinas associadas ao reparo tecidual permanecem consistentes, favorecendo uma resposta cicatricial nos períodos mais tardios.
 - **6.3** A membrana de cortical óssea bovina é biocompatível, pois induz a uma reação inflamatória local transitória de baixa magnitude, quando em contato com o tecido, e uma baixa imunogenicidade, ou seja, desencadeia uma resposta imunológica amena.
 - **6.4** As moléculas CD14 e MyD88 desempenham um papel importante na resposta inflamatória e no processo de reabsorção da membrana de cortical óssea bovina, possivelmente agindo no reconhecimento e sinalização de DAMPs e PAMPs.
-

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.K. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nat Rev Immunol**, p. 499-511, Jul. 2004.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, n. 1, p. 783-801, Feb. 2006.

ANDERSON, J.M. Inflammatory response to implants. **ASAIO Trans**, v. 34, n. 2, p. 101-7, 1988.

ANDERSON, J.M. Chapter 4 Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. **Cardiovascular Pathology**, p. 33-41, July/Sep. 1993.

ANDERSON, J.M.; MILLER, K.M. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. **Biomaterials**, v. 5, n. 1, p. 5-10, Jan. 1984.

ANDERSON, J.M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D.T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin Immunol**, v. 20, n. 2, p. 86-100, Apr. 2008.

ARANCIBIA, S. A. et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**, v. 40, n. 2, p. 97-112, Nov. 2007.

BAKER, A.H.; EDWARDS, D.R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci**, v. 115, p. 3719-3727, Oct. 2008.

BALDWIN, L.; HUNT, J.A. The in vivo cytokine release profile following implantation. **Cytokine**, v. 41, n. 3, p. 217-22, Mar. 2008.

BALOGH, S.; KISS, I.; CSASZAR, A. Toll-like receptors: link between "danger" ligands and plaque instability. **Curr Drug Targets**, v. 10, n. 6, p. 513-8, Jun. 2009.

BARRAT, F.J. et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. **J Exp Med**, v. 202, n. 8, p. 1131-9, Oct. 2005.

BARTON, G.M.; KAGAN, J.C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 535-42, Aug. 2009.

BASU, S. et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. **Immunity**, v. 14, n. 3, p. 303-13, Mar. 2001.

BECKER, W.; BECKER, B.E. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: surgical techniques and case report. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 10, n. 5, p. 376-91, 1990.

BECKER, W. et al. Root isolation for new attachment procedures. A surgical and suturing method: three case reports. **J Periodontol**, v. 58, n. 12, p. 819-26, Dec. 1987.

BEHRING, J. et al. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. **Odontology**, v. 96, n. 1, p. 1-11, Jul. 2008.

BENAHMED, M.D. et al. LPS increases biomaterial degradation by human monocytes in vitro. **J Biomed Mater Res**, v. 34, n. 1, p. 115-9, Jul. 1997.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Statist Soc B**, v. 57, n.1, p. 289-300, 1995.

BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G.S. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. **Am J Surg**, v. 165, n. 6, p. 728-37, 1993a.

BENNETT, N.T.; SCHULTZ, G. S. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. **Am J Surg**, v. 166, n. 1, p. 74-81, 1993b.

BIANCO, N.R. et al. Therapeutic effect of exosomes from indoleamine 2,3-dioxygenase-positive dendritic cells in collagen-induced arthritis and delayed-type hypersensitivity disease models. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 2, p. 380-9, Feb. 2009.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 64, p. 474-84, 1993.

BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BLACK, B.S. et al. Comparative study of collagen and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of human class II furcation defects. **J Periodontol**, v. 65, n. 6, p. 598-604, Jun. 1994.

BLUMENTHAL, N.M. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. **J Periodontol**, v. 64, n. 10, p. 925-33, Oct. 1993.

BONECCHI, R. et al. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. **Blood**, v. 92, n. 8, p. 2668-71, Oct. 1998.

BORDEN, P.; HELLER, R.A. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v.7, n. 1-2, p. 159-78, 1997.

BREGER, J.C. et al. Defining critical inflammatory parameters for endotoxin impurity in manufactured alginate microcapsules. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.91, n. 2, p. 755-65, Nov. 2009.

BRODBECK, W.G. et al. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. **J Biomed Mater Res A**, v. 64, n. 2, p. 320-9, Feb. 2003.

BUISSON, A.C. et al. Wound repair-induced expression of a stromelysins is associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype in human respiratory epithelial cells. **Lab Invest**, v. 74, n. 3, p. 658-69, Mar. 1996.

BULUT, K. et al. Glucagon-like peptide 2 improves intestinal wound healing through induction of epithelial cell migration in vitro-evidence for a TGF--beta-mediated effect. **Regul Pept**, v. 121, n. 1-3, p. 137-43, Sep. 2004.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H.L. Collagen membranes: a review. **J Periodontol**, v. 72, n. 2, p. 215-29, Feb. 2001.

CAFFESSE, R.G. et al. Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans: case reports. **J Periodontol**, v. 61, n. 8, p. 510-4, Aug. 1990.

CARDONA, M.A.; SIMMONS, R.L.; KAPLAN, S.S. et al. TNF and IL-1 generation by human monocytes in response to biomaterials. **J Biomed Mater Res**, v. 26, n. 7, p. 851-9, Jul. 1992.

CATON, J.G. et al. Periodontal regeneration via selective cell repopulation. **J Periodontol**, v. 58, n. 8, p. 546-52, Aug. 1987.

CHEN, J.K.; HOSHI, H.; MCKEEHAN, W.L. Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 15, p. 5287-91, Aug. 1987.

CHUN, K.H.; SEONG, S.Y. CD14 but not MD2 transmit signals from DAMP. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 1, p. 98-106, Jan. 2010.

CLARK, R.; HENSON, P.M. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1988.

COOPERMAN, L.; MICHAELI, D. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. **J Am Acad Dermatol**, v. 10, n. 4, p. 638-46, Apr. 1984.

CORINALDESE, G. Treatment of intrabony defects a after impacted mandibular third molar removal with bioabsorbable and non-resorbable membranes. **J Periodontol**, v. 82, n. 10, p. 1404-13, Apr. 2011.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Inflammation and repair. In: Pathologic Basis of Disease**, 4rd ed. Philadelphia: WB. Saunders Co, 1989.

DALY, K.A. et al. Damage associated molecular patterns within xenogeneic biologic scaffolds and their effects on host remodeling. **Biomaterials**, v. 33, n. 1, p. 91-101, Jan. 2012.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med**, v. 174, n. 5, p. 1209-20, Nov. 1991.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-8, 2000.

DING, T.; SUN, J.; ZHANG, P. Immune evaluation of biomaterials in TNF-alpha and IL-1beta at mRNA level. **J Mater Sci Mater Med**, v. 18, n. 11, p. 2233-6, Nov. 2007.

DONNELLY, R.P. et al. Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN-gamma and IL-4. **J Immunol**, v. 145, n. 2, p. 569-75, Jul. 1990.

DUSSEAULT, J. et al. Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. **J Biomed Mater Res A**, v. 76, n. 2, p. 243-51, Feb. 2006.

EDWARDS, D.R. et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **EMBO J**, v. 6, n. 7, p. 1899-904, Jul. 1987.

EDWARDS, J.P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1298-307, Dec. 2006.

EIGENBROD, T. et al. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8194-8, Dec. 2008.

FENTON, M.J.; BURAS, J.A.; DONNELLY, R.P. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. **J Immunol**, v. 149, n. 4, p. 1283-8, Aug. 1992.

FINE, A.; GOLDSTEIN, R.H. The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 262, n. 8, p. 3897-902, Mar. 1987.

FURTHMAYR, H.; TIMPL, R. Immunochemistry of collagens and procollagens. **Int Rev Connect Tissue Res**. v. 7, p. 61-99, 1976.

GALLUCCI, S.; LOLKEMA, M.; MATZINGER, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. **Nat Med**, v. 5, n. 11, p. 1249-55, Nov. 1999.

GIRARD, M.T. et al. Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling. **J Cell Sci**, v. 104, n. 4, p. 1001-11, Apr. 1993.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan. 2003.

GOTTLOW, J.S. et al. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. **J Clin Periodontol**, v. 11, n. 8, p. 494-503, Sep. 1984.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A. et al. Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles. **Biomaterials**, v. 28, n. 3, p. 400-4, Jan. 2007.

GRATCHEV, A. et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3. **Scand J Immunol**, v. 53, n. 4, p. 386-92, Apr. 2001.

GRAVES, D.T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 74, n. 3, p. 391-401, Mar. 2003.

GRETZER, C. et al. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 17, n. 6, p. 669-87, 2006.

GROSSO, L.T. et al. Protease profiles of cells isolated from regenerative membranes are associated with clinical outcomes. **J Periodontol**, v. 68, n. 9, p. 809-18, Sep. 1997.

HAERIAN, A. et al. Gingival crevicular stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases levels in healthy and diseased sites. **J Clin Periodontol**, v. 22, n. 7, p. 505-9, Jul. 1995.

HAISHIMA, Y. et al. Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products. **J Biomed Mater Res**, v. 55, n. 3, p. 424-32, Jun. 2001.

HAMMERLE, C.H.; JUNG, R.E. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol 2000**, v. 33, p. 36-53, 2003.

HATORI, K. et al. Osteoblasts and osteocytes express MMP2 and -8 and TIMP1, -2, and -3 along with extracellular matrix molecules during appositional bone formation. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 277, n. 2, p. 262-71, Apr. 2004.

HOCKERS, T. et al. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 10, n. 6, p. 487-98, Dec. 1999.

HOLMDAHL, L.; CHEGINI, N. Endotoxin and particulate matter on surgical gloves. **J Long Term Eff Med Implants**, v. 7, n. 3-4, p. 225-34, 1997.

HONMA, T.; HAMASAKI, T. Ultrastructure of multinucleated giant cell apoptosis in foreign-body granuloma. **Virchows Arch**, v. 428, n. 3, p. 165-76, Jun. 1996.

HUMMEL, M. et al. Interleukin-6 and interleukin-8 concentrations as predictors of outcome in ventricular assist device patients before heart transplantation. **Crit Care Med**, v. 22, n. 3, p. 448-54, Mar. 1994.

HUNT, J.A. et al. Effect of biomaterial surface charge on the inflammatory response: evaluation of cellular infiltration and TNF alpha production. **J Biomed Mater Res**, v. 31, n. 1, p. 139-44, May 1996.

HUTMACHER, D.; HURZELER, M.B.; SCHLIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 11, n. 5, p. 667-78, Sep. 1996.

IMAI, K. et al. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. **Biochem J**, v. 322, p. 809-14, Mar. 1997.

IMHOF, B.A.; DUNON, D. Leukocyte migration and adhesion. **Adv Immunol**, v. 58, 345-416, 1995.

INGMAN, T. et al. Salivary collagenase, elastase- and trypsin-like proteases as biochemical markers of periodontal tissue destruction in adult and localized juvenile periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, n. 5, p. 298-305, Oct. 1993.

International Organization for Standardization. ISO 10.993 - Biological testing of medical and dental material devices. Part 1 – 20, 2010.

IWAMOTO, M. et al. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. **FEBS Lett**, v. 579, n. 20, p. 4423-9, Aug. 2005.

JANSEN, R.G. et al. Tissue reactions to collagen scaffolds in the oral mucosa and skin of rats: environmental and mechanical factors. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 4, p. 376-87, Apr. 2008.

JOHN, M. et al. Increased production of matrix metalloproteinase-2 in alveolar macrophages and regulation by interleukin-10 in patients with acute pulmonary sarcoidosis. **Exp Lung Res**, v. 28, n. 1, p. 55-68, Jan/Feb. 2002.

JONES, J.A. et al. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. **J Biomed Mater Res A**, v. 83, n. 3, p. 585-96, Dec. 2007.

JONES, J.A. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the foreign body reaction on biomaterials. **J Biomed Mater Res A**, v. 84, n. 1, p. 158-66, Jan. 2008.

KAO, W.J.; HUBBELL, J.A.; ANDERSON, J.M. Protein-mediated macrophage adhesion and activation on biomaterials: a model for modulating cell behavior. **J Mater Sci Mater Med**, v. 10, n. 10/11, p. 601-5, Oct/Nov. 1999.

KASAJ, A.C. et al. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head Face Med**, v. 4, n. 22, Oct. 2008.

KERKVLIT, E.H. et al. Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase. **Matrix Biol**, v. 18, n. 4, p. 373-80, Aug. 1999.

KHOUW, I.M. et al. Inhibition of the tissue reaction to a biodegradable biomaterial by monoclonal antibodies to IFN-gamma. **J Biomed Mater Res**, v. 41, n. 2, p. 202-10, Aug. 1998.

KHOUW, I.M. et al. The foreign body reaction to a biodegradable biomaterial differs between rats and mice. **J Biomed Mater Res**, v. 52, n. 3, p. 439-46, Dec. 2000.

KIRSCHNING, C.J.; SCHUMANN, R.R. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 270, n. 121-44, 2002.

KLOCK, G. et al. Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. **Biomaterials**, v.18, n. 10, p. 707-13, May 1997.

KORPI, J.T. et al. Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice. **Eur J Oral Sci**, v. 117, n. 3, p. 248-54, Jun. 2009.

KOU, P.M.; BABENSEE, J.E. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. **J Biomed Mater Res A**, v. 96, n. 1, p. 239-60, Jan. 2011.

LAFLEUR, M.A.; HANDSLEY, M.M.; EDWARDS, D.R. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. **Expert Rev Mol Med**, v. 5, n. 23, p. 1-39, Sep. 2003.

LAIHO, M.; KESKI-OJA, J. Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. **Cancer Res**, v. 49, n. 10, p. 2533-53, May 1989.

LEIBOVICH, S.J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am J Pathol**, v. 78, n. 1, p. 71-100, Jan. 1975.

LIACINI, A. et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. **Matrix Biol**, v. 21, n. 3, p. 251-62, Apr. 2002.

LOCCI, P. et al. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. **J Periodontol**, v. 68, n. 9, p. 857-63, Sep. 1997.

LOTZE, M.T. et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. **Immunol Rev**, v. 220, n. 60-81, Dec. 2007.

LU, L.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G. TGF-beta1 release from biodegradable polymer microparticles: its effects on marrow stromal osteoblast function. **J Bone Joint Surg Am**, v. 83, p. 82-91, 2001.

LUTTIKHUIZEN, D.T. et al. Material dependent differences in inflammatory gene expression by giant cells during the foreign body reaction. **J Biomed Mater Res A**, v. 83, n. 3, p. 879-86, Dec. 2007.

LUTTIKHUIZEN, D.T.; HARMSSEN, M.C.; van LUYN, M.J. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. **Tissue Eng**, v. 12, n. 7, p. 1955-70, Jul. 2006.

LUTTIKHUIZEN, D.T. et al. The correlation between difference in foreign body reaction between implant locations and cytokine and MMP expression. **Biomaterials**, v. 27, n. 34, p. 5763-70, Dec. 2006.

LYNN, A.D.; BRYANT, S.J. Phenotypic changes in bone marrow-derived murine macrophages cultured on PEG-based hydrogels activated or not by lipopolysaccharide. **Acta Biomater**, v. 7, n. 1, p. 123-32, Jan. 2011.

MAGNUSSON, I. et al. Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. **J Periodontal Res**, v. 20, n. 2, p. 201-8, Mar. 1985.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec. 2004.

MARTINEZ, F.O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front Biosci**, v. 13, n. 453-61, Jan, 2008.

MATZELLE, M.M. BABENSEE, J.E. Humoral immune responses to model antigen co-delivered with biomaterials used in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 295-304, Jan. 2004.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annu Rev Immunol**, v. 12, n. 991-1045, 1994.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul. 2008.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A, JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-7, Jul. 1997.

MEIKLE, M.C. et al. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin 1: evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. **J Periodontal Res**, v. 24, n. 3, p. 207-13, May 1989.

MELCHER, A.H. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**, v. 47, n. 5, p. 256-60, May 1976.

METCALF, D. Haemopoietic growth factors 1. **Lancet**, v. 1, n. 8642, p. 825-7, Apr. 1989.

MILLER, K.M.; ROSE-CAPRARA, V.; ANDERSON, J.M. Generation of IL-1-like activity in response to biomedical polymer implants: a comparison of in vitro and in vivo models. **J Biomed Mater Res**, v. 23, n. 9, p. 1007-26, Sep. 1989.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec. 2008.

MOUSSION, C.; ORTEGA, N.; GIRARD, J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? **PLoS One**, v. 3, n. 10, Oct. 2008.

MURPHY, G. et al. Metalloproteinases and tissue damage. **Br J Rheumatol**, v. 30, p. 25-31, 1991.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. et al. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 562-73, Feb. 2006.

NAKAGAWA, Y. et al. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 66, n. 1, p. 347-55, Jul. 2003.

NAWROCKI, B. et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. **Int J Cancer**, v. 72, n. 4, p. 556-64, Aug. 1997.

NEWBY, A.C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovasc Res**, v. 69, n. 3, p. 614-24, Feb. 2006.

NYMAN, S. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 3, p. 257-65, May 1982.

NYMAN, S. et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 9, n. 4, p. 290-6, Jul. 1982.

OERTELT-PRIGIONE, S. Immunology and the menstrual cycle. **Autoimmun Rev**, Dec. 2011.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 3, p. 248-66, Dec. 1998.

OSTERLOH, A. et al. Hsp60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. **Int Immunol**, v. 20, n. 3, p. 433-43, Mar. 2008.

OVERALL, C.M.; WRANA, J.L.; SODEK, J. et al. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. **J Biol Chem**, v. 264, n. 3, p. 1860-9, Jan. 1989.

OVERALL, C.M.; WRANA, J.L.; SODEK, J. et al. Induction of formative and resorptive cellular phenotypes in human gingival fibroblasts by TGF-beta 1 and concanavalin A: regulation of matrix metalloproteinases and TIMP. **J Periodontal Res**, v. 26, p. 279-82, May 1991.

PACHENCE, J. M. Collagen-based devices for soft tissue repair. **J Biomed Mater Res**. v. 33, n. 1, p. 35-40, 1996.

PANAGAKOS, F.S.; KUMAR, S. Modulation of proteases and their inhibitors in immortal human osteoblast-like cells by tumor necrosis factor-alpha in vitro. **Inflammation**, v. 18, n. 3, p. 243-65, Jun. 1994.

PATINO, M.G. et al. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. **J Oral Implantol**, v. 28, n. 5, p. 220-5, 2002.

PEARL, J.I. et al. Role of the Toll-like receptor pathway in the recognition of orthopedic implant wear-debris particles. **Biomaterials**, v. 32, n. 24, p. 5535-42, Aug, 2011.

PEIRÓ, S.A.; KULANDER, L.; ERIKSSON, O. Quantitative determination of endotoxins on surgical gloves. **J Hosp Infect**, v. 16, n. 2, p. 167-72, Aug. 1990.

PFEIFFER, M. Testing medical disposables using the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test. *Med Device Technol*. v. 1, n. 3, p. 37-41, 1990.

PFEILSCHIFTER, J. et al. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. **Endocrinology**, v. 127, n. 1, p.69-75, Jul. 1990.

PFIZENMAIER, K.; WAJANT, H.; GRELL, M et al. Tumor necrosis factors in 1996. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 3, p. 271-7, Oct. 1996.

PICCININI, A.M.; MIDWOOD, K.S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators Inflamm**, 2010.

PIEPER, J.S. et al. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. **Biomaterials**, v. 21, n. 16, p. 1689-99, Aug. 2000.

PITARU, S. et al. Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. **J Periodontol**, v. 59, n. 6, p. 380-6, Jun. 1988.

POLIMENI, G. et al. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 10, n. 2, p. 99-105, May 2008.

PONTORIERO, R. et al. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. **J Clin Periodontol**, v. 14, n. 10, p. 618-20, Nov. 1987.

POSTLETHWAITE, A.E.; SEYER, J.M.; KANG, A.H. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 2, p. 871-5, Feb. 1978.

RAPALA, K. The effect of tumor necrosis factor-alpha on wound healing. An experimental study. **Ann Chir Gynaecol Suppl**, v. 211, p. 1-53, 1996.

RATNER, B.D. The engineering of biomaterials exhibiting recognition and specificity. **J Mol Recognit**, v. 9, n. 5-6, p. 617-25, Sep/Dec. 1996.

REMES, A.; WILLIAMS, D.F. Immune response in biocompatibility. **Biomaterials**, v. 13, n. 11, p. 731-43, 1992.

REYNOLDS, J.J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. **Oral Dis**, v. 2, n. 1, p. 70-6, Mar. 1996.

ROGERS, T.H.; BABENSEE, J.E. Altered adherent leukocyte profile on biomaterials in Toll-like receptor 4 deficient mice. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 594-601, Feb. 2010.

RYAN, M.E.; RAMAMURTHY, S.; GOLUB, L.M. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. **Curr Opin Periodontol**, v. 3, p. 85-96, 1996.

SAID, S. et al. GCF levels of MMP-3 and MMP-8 following placement of bioresorbable membranes. **J Clin Periodontol**, v. 26, n. 11, p. 757-63, Nov. 1999.

SAINO, E. et al. Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1900-11, May 2011.

SATO, S. et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **J Immunol**, v. 171, n. 8, p. 4304-10, Oct. 2003.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 191-5, Jul. 2002.

SCHLEGEL, A.K. et al. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). **Biomaterials**, v. 18, n. 7, p. 535-8, Apr. 1997.

SCHUTTE, R.J. et al. In vivo cytokine-associated responses to biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 2, p. 160-8, Jan. 2009.

SCHWEIGERER, L. et al. Basic fibroblast growth factor: expression in cultured cells derived from corneal endothelium and lens epithelium. **Exp Eye Res**, v. 46, n. 1, p. 71-80, Jan. 1988.

SHARP, F.A. et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 3, p. 870-5, Jan. 2009.

SHMUNES, E.; DARBY, T. Contact dermatitis due to endotoxin in irradiated latex gloves. **Contact Dermatitis**, v. 10, n. 4, p. 240-4, Apr. 1984.

SIMS, G.P. et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 367-88, Mar. 2010.

SPEER, D.P. et al. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. **J Biomed Mater Res**, v. 14, n. 6, p. 753-64, Nov. 1980.

SPEER, D.P. et al. Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. **Clin Orthop Relat Res**, v. 144, p. 326-35, Oct. 1979.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001.

TALVANI, A. et al. Experimental Trypanosoma cruzi infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice. **Microbes Infect**, v. 5, n. 9, p. 789-96, Jul. 2003.

THOMA, D.S. et al. Biodegradation, soft and hard tissue integration of various polyethylene glycol hydrogels: a histomorphometric study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 11, p. 1247-54, Nov. 2011.

THOMAS, A.; HARDING, K.G.; MOORE, K. Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor-alpha. **Biomaterials**, v. 21, n. 17, p. 1797-802, Sep. 2000.

THOMPSON, R.C.; DRIPPS, D.J.; EISENBERG, S.P. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) as a probe and as a treatment for IL-1 mediated disease. **Int J Immunopharmacol**, v. 14, n. 3, p. 475-80, Apr. 1992.

TITUS, R.G.; CHILLER, J.M. A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. **J Immunol Methods**, v. 45, n. 1, p. 65-78, 1981.

TOMIDA, M. et al. Comparative examination of subcutaneous tissue reaction to high molecular materials in medical use. **Eur J Med Res**, v. 16, n. 6, p. 249-52, Jun. 2011.

TOMOMATSU, N. et al. LPS-induced inhibition of osteogenesis is TNF-alpha dependent in a murine tooth extraction model. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 10, p. 1770-81, Oct. 2009.

van LEEUWEN, A. C. et al. Guided bone regeneration in rat mandibular defects using resorbable poly (trimethylene carbonate) barrier membranes. **Acta Biomater**, v. 8, n. 4, p. 1422-9, Apr. 2012.

van ROOIJEN, N.; SANDERS, A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. **J Immunol Methods**, v. 174, n. 1-2, p. 83-93, Sep. 1994.

van SCHILFGAARDE, R.; DE VOS, P. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. **J Mol Med (Berl)**, v. 77, n. 1, p. 199-205, Jan. 1999.

van WACHEM, P.B. et al. In vivo degradation of processed dermal sheep collagen evaluated with transmission electron microscopy. **Biomaterials**, v. 12, n. 2, p. 215-23, Mar. 1991.

VARGA, J.; ROSENBLOOM, J.; JIMENEZ, S.A. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. **Biochem J**, v. 247, n. 3, p. 597-604, Nov. 1987.

VILCEK, J. et al. Tumor necrosis factor: receptor binding and mitogenic action in fibroblasts. **J Cell Physiol Suppl**, v. 5, p. 57-61, 1987.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res**. v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2003.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, v. 14, n. 17, p. 2123-33, Sep. 2000.

WEINBERG, A. et al. Effect of menstrual cycle variation in female sex hormones on cellular immunity and regulation. **J Reprod Immunol**, v. 89, n. 1, p. 70-7, Apr. 2011.

WERB, Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 439-42, Nov. 1997.

WESTERGREN-THORSSON, G. et al. TGF-beta enhances the production of hyaluronan in human lung but not in skin fibroblasts. **Exp Cell Res**, v. 186, n. 1, p. 192-5, Jan. 1990.

WEYHE, D. et al. The role of TGF-beta1 as a determinant of foreign body reaction to alloplastic materials in rat fibroblast cultures: comparison of different commercially available polypropylene meshes for hernia repair. **Regul Pept**, v. 138, n. 1, p. 10-4, Jan. 2007.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterial**, v. 29, n. 20, p. 2941-53, Jul. 2008.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-909, Oct. 2009.

WILSON, C.J. et al. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. **Tissue Eng**, v. 11, n. 1-2, p. 1-18, Jan/Fev. 2005.

XIA, Z.; TRIFFITT, J.T. A review on macrophage responses to biomaterials. **Biomed Mater**, v. 1, n. 1, Mar. 2006.

YAFFE, A.; EHRLICH, J.; SHOSHAN, S. Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. **J Periodontol**, v. 55, n. 11, p. 623-8, 1984.

YAMAMOTO, K. et al. Unusual inflammatory responses around a collagen-impregnated vascular prosthesis. **Artif Organs**, v. 17, n. 12, p. 1010-6, Dec. 1993.

YAMASAKI, S. et al. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 10, p. 1179-88, Oct. 2008.

YUKNA, C.N.; YUKNA, R.A. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human Class II furcations. **J Periodontol**. v. 67, n. 7, p. 650-7, Jul. 1996.

ZHANG, X. et al. Short- and long-term effects of IL-1 and TNF antagonists on periodontal wound healing. **J Immunol**, v. 173, n. 5, p. 3514-23, Sep. 2004.

ZHAO, Q. et al. Foreign-body giant cells and polyurethane biostability: in vivo correlation of cell adhesion and surface cracking. **J Biomed Mater Res**, v. 25, n. 2, p. 177-83, Feb. 1991.

ZHU, J.; MOHAN, C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. **Mediators Inflamm**, v. 2010, 2010.

ZIATS, N.P.; MILLER, K.M.; ANDERSON, J.M. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. **Biomaterials**, v. 9, n. 1, p. 5-13, Jan. 1988.

Apêndice

APÊNDICE

Símbolos e descrição dos genes presentes na placa de PCR Array

Símbolo	Descrição
Fatores de crescimento	
<i>Bmp3</i>	Bone morphogenetic protein 3
<i>Bmp4</i>	Bone morphogenetic protein 4
<i>Bmp5</i>	Bone morphogenetic protein 5
<i>Bmp6</i>	Bone morphogenetic protein 6
<i>Bmp7</i>	Bone morphogenetic protein 7
<i>Egf</i>	Epidermal growth factor
<i>Fgf1</i>	Fibroblast growth factor 1
<i>Fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2
<i>Fgf3</i>	Fibroblast growth factor 3
<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor beta 1
<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A
<i>Vegfb</i>	Vascular endothelial growth factor B
Marcadores ósseos	
<i>Twist1</i>	Twist-related protein 1
<i>Alpl</i>	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
<i>Ahsg</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein
<i>Ambn</i>	Ameloblastin
<i>Dmp1</i>	Dentin matrix protein 1
<i>Phex</i>	Phosphate regulating endopeptidase homolog
<i>Sost</i>	Sclerostin
<i>Vdr</i>	Vitamin D receptor
<i>Rankl</i>	Receptor activator of NF-κB
<i>Opg</i>	Osteoprotegerin
<i>Rank</i>	Receptor activator of NF-κB
<i>Ctsk</i>	Cathepsin K
Marcadores de matriz	
<i>Colla2</i>	Collagen type I alpha 2
<i>Col2a1</i>	Collagen type II alpha 1
<i>Col4a2</i>	Collagen type IV alpha 2
<i>Col5a1</i>	Collagen type V alpha 1
<i>Mmp1</i>	Matrix metalloproteinase 1
<i>Mmp2</i>	Matrix metalloproteinase 2
<i>Mmp8</i>	Matrix metalloproteinase 8
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9
<i>Mmp10</i>	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
<i>Serpine1</i>	Serine protease inhibitor
<i>Timp1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
<i>Timp3</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2

Símbolo	Descrição
Citocinas	
<i>Il1b</i>	Interleukin 1b
<i>Il2</i>	Interleukin 2
<i>Il4</i>	Interleukin 4
<i>Il6</i>	Interleukin 6
<i>Il10</i>	Interleukin 10
<i>Il12</i>	Interleukin 12
<i>Il17</i>	Interleukin 17
<i>Ifn</i>	Interferon
<i>Tnfa</i>	Tumor necrosis factor alpha
Receptores de quimiocina	
<i>Ccr2</i>	Chemokine receptor CCR2
<i>Ccr3</i>	Chemokine receptor CCR3
<i>Ccr4</i>	Chemokine receptor CCR4
<i>Ccr5</i>	Chemokine receptor CCR5
<i>Ccr6</i>	Chemokine receptor CCR6
<i>Ccr7</i>	Chemokine receptor CCR7
<i>Ccr8</i>	Chemokine receptor CCR8
<i>Ccr9</i>	Chemokine receptor CCR9
<i>Cxcr1</i>	Chemokine receptor CXCR1
<i>Cxcr3</i>	Chemokine receptor CXCR3
Quimiocinas	
<i>Ccl2</i>	Chemokine CCL2
<i>Ccl3</i>	Chemokine CCL3
<i>Ccl5</i>	Chemokine CCL5
<i>Ccl6</i>	Chemokine CCL6
<i>Ccl7</i>	Chemokine CCL7
<i>Ccl8</i>	Chemokine CCL8
<i>Ccl9</i>	Chemokine CCL9
<i>Ccl11</i>	Chemokine CCL11
<i>Ccl17</i>	Chemokine CCL17
<i>Ccl20</i>	Chemokine CCL20
<i>Ccl24</i>	Chemokine CCL24
<i>Ccl25</i>	Chemokine CCL25
<i>Cxcl1</i>	Chemokine CXCL1
<i>Cxcl4</i>	Chemokine CXCL4
<i>Cxcl5</i>	Chemokine CXCL5
<i>Cxcl10</i>	Chemokine CXCL10
<i>Cxcl11</i>	Chemokine CXCL11
<i>Cxcl12</i>	Chemokine CXCL12
<i>Cxcl13</i>	Chemokine CXCL13
<i>Cx3cl1</i>	Chemokine CX3CL1
Controle	
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>Actb</i>	Beta-actin
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

Anexos

ANEXO A

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 017/2008

Bauru, 24 de outubro de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **"Estudo do papel de citocinas na resposta imune e inflamatória à implantação de biomateriais (membrana de cortical óssea bovina)"**, de autoria de Elcia Maria Varize Silveira, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito **"ad referendum"** desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 017/2008

Bauru, 12 de março de 2012.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa "**Estudo do papel de citocinas na resposta imune e inflamatória à implantação de biomateriais (membrana de cortical óssea bovina)**" de autoria de Elcia Maria Varize Silveira, sob sua orientação, para **MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA FRENTE À IMPLANTAÇÃO DE MEMBRANA DE CORTICAL ÓSSEA BOVINA NO TECIDO SUBCUTÂNEO DE CAMUNDONGOS: CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, IMUNOENZIMÁTICA E MOLECULAR**, informamos a aprovação *ad referendum* desta Comissão, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73

e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356

<http://www.fob.usp.br>