

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Michelle Pereira Costa Mundim Soares

Análise *in vitro* da biocompatibilidade de três membranas bioabsorvíveis.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Uberlândia-MG
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Michelle Pereira Costa Mundim Soares

Análise *in vitro* da biocompatibilidade de três membranas bioabsorvíveis.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação da
Faculdade de Odontologia da
Universidade de Uberlândia, como
requisito parcial para obtenção de título
de Mestre em Odontologia. Área de
Concentração: Clínica Odontológica
Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Uberlândia-MG
2012

Michelle Pereira Costa Mundim Soares

Análise *in vitro* da biocompatibilidade de três membranas bioabsorvíveis.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães

Co-Orientadora: Dr^a Camilla C. Gomes Moura

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Denildo de Magalhães – Faculdade de Odontologia –UFU

Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Sousa – Faculdade de Odontologia -UFU

Prof. Dr. Rodrigo Borges Fonseca – Faculdade de Odontologia –UFG

Dr^a Camilla C. Gomes Moura – Faculdade de Odontologia - UFU

Uberlândia-MG

2012

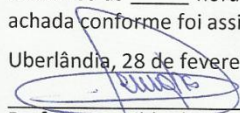


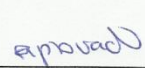
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA


ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA 227ª DEFESA DE MESTRADO DO (A) CD MICHELLE PEREIRA COSTA MUNDIM SOARES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

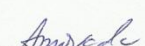
Às quatorze horas do dia vinte e oito de fevereiro do ano de dois mil e doze, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno (a) **MICHELLE PEREIRA COSTA MUNDIM SOARES** com o título: "Análise in vitro da biocompatibilidade de três membranas bio-absorvíveis". O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora. Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às ____ horas e ____ minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

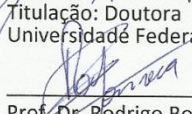
Uberlândia, 28 de fevereiro de 2012

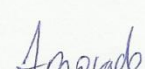

Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia – UFU


Aprovado/Reprovado


Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza
Titulação: Doutora
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


Aprovado/Reprovado


Prof. Dr. Rodrigo Borges Fonseca
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Goiás - UFG


Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

À **Deus**, muito obrigada por me amparar em todos os momentos da minha vida, iluminar meus passos e escolhas. Agradeço a oportunidade de estar realizando mais um sonho e pela presença de todas as pessoas maravilhosas que participaram e me encorajaram a concluir. Muito obrigada!

A minha **família**, ao meu pai Edivaldo e mamãe Edna Maura, obrigada pelo apoio e compreensão. Obrigada pela dedicação incomparável. Agradeço pela aprendizagem de todos os princípios que tiveram a paciência e sabedoria em me ensinar. Ao meu irmão Márden, minha cunhada Carol, e minha linda afilhada Isabella, que me proporciona momentos inexplicáveis de alegria e união. Todas as minhas conquistas são dedicadas a vocês. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu **esposo**, Paulo Vinícius, obrigada pelo amor, carinho e dedicação para conclusão de mais uma etapa. Agradeço o apoio, companheirismo, orientações, e noites de sono perdidas para realização deste trabalho. Foi mais uma etapa vencida, de muitas que vamos conquistar juntos. Esta vitória também é sua, meu amor! Amo muito você. Agradeço também, ao meu sogro Paulo Vitor, minha sogra Maria Aparecida, meu cunhado João Vitor, minhas cunhadas Carol, Clara e Rita, e também ao meu concunhado Lucas, que me adotaram como filha e mais uma irmã nesta família acolhedora.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao professor **Dr. Denildo de Magalhães**, obrigada pela confiança! Agradeço à oportunidade, o companheirismo, a amizade, e a preocupação com minha formação profissional. Agradeço por todo aprendizado, e por cada dia que pude estar sob sua orientação.

A **Profª. Drª. Camilla Moura**, agradeço toda a dedicação, palavras de apoio e paciência. Obrigada por me fazer concluir mais uma etapa. Se hoje estou aqui, é por grande parte de sua ajuda. Agradeço muito sua confiança. Que Deus ilumine toda sua vida.

A **Profª. Ms. Priscilla Barbosa F. Soares**, obrigada pela confiança e oportunidade. Sempre muito dedicada e atenciosa. Uma pessoa maravilhosa que pude conhecer. Agradeço a disposição em me ajudar e todo seu apoio. Esta vitória também devo a você. Que Deus ilumine toda sua família, o Prof. Carlos, a Bruninha e o Marcelo.

Ao **Dr. Lucas Zago**, agradeço toda a disposição, o tempo e dedicação. Obrigada pela transferência de conhecimentos, pelo apoio e também pela hospedagem! Desejo muito sucesso a você.

Ao **Prof. Dr. Murilo Menezes**, um exemplo de pessoa e profissional, muito correto e dedicado, agradeço todos os conselhos e todas suas ajudas para conclusão desta etapa.

Aos **Prof. Marcelo Beleti, Prof Alisson**, muito obrigada pela confiança, apoio e orientação, foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos alunos de pós-graduação: **Rosiane, Daniel e Moline**, agradeço o tempo, confiança e disposição por terem colaborado para a realização do experimento.

Ao **Dr. Bruno Barreto**, pela colaboração no processo de qualificação e pela amizade, sempre otimista e muito dedicado.

Aos **professores da FOUFU**, agradeço toda dedicação e momentos desde a graduação, pós-graduação, e hoje. Todos serão eternamente lembrados, obrigada!

Ao meu amigo **Rodrigo Dantas**, vulgo Jaiba, agradeço todo o apoio, tempo e dedicação, pela amizade e por colaborar na interpretação dos dados do trabalho. Torço muito por você!

Aos amigos, **Bruno Reis, Raposo, Fabrícia** pelo apoio desde o fim da graduação, na confecção de trabalhos para as jornadas e congressos e orientações durante minha formação.

Aos amigos, **Aline, Manuela e Fabiana**, pela ajuda na realização dos experimentos, pela colaboração no laboratório e pela amizade

Aos amigos da graduação, **Roberta, Lorraine, Crisnicaw e Luis Fernando**. Que continuaram amigos da pós-graduação e que eternamente serão chamados de amigos.

A toda **turma da pós-graduação** que entre tantos seminários, e dificuldades, conseguimos levantar uma grande amizade, construindo sonhos juntos. Obrigada a todos e muito sucesso a cada um de vocês.

A **PROPP**, pelo apoio financeiro para a compra das membranas do trabalho.

A **Edilza Felice**, e a todos os **funcionários** que colaboraram nos oferecendo condições para realizar o trabalho.

A **UFU, FOUFU, E TODOS OS PROFESSORES** agradeço pela formação e estrutura disponibilizada, e por todos que pude conhecer.

Ao meu amigo: **Marco Vinícios**, parceiro de clínica, padrinho de casamento e companheiro, me dando apoio e se mostrando sempre presente apesar da distância.

As minhas amigas: **Maira, Lilliam e Lays**, por todos os momentos juntas, por todas as palavras e por tudo que vamos viver, contar e alcançar juntas.

A **todos** que direta ou indiretamente me acompanharam e permitiram concluir mais um sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS E ENGENHARIA DOS TECIDOS	18
2.2 APLICABILIDADES CLÍNICA E ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	22
2.3 CARACTERÍSTICAS DOS BIOMATERIAIS UTILIZADOS NA RTG	27
3. PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 OBTENÇÃO, ANÁLISE E CARACTERÍSTICAS DAS MEMBRANAS	38
4.2 CORTE DAS MEMBRANAS	38
4.3 CULTURA DE FIBROBLASTOS E OSTEÓBLASTOS	39
4.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	42
4.5 DOSAGEM DE TGF β 1 NOS SOBRENADANTE	43
4.6 ANÁLISE DAS CULTURAS AO MEV	44
5.RESULTADOS	46
5.1 VIABILIDADE CELULAR	47
5.2 TGF β 1	48
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	49
6.DISSCUSSÃO	52
7.CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – MICROLITROS

μM- MICRÔMETROS

ANVISA – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

BCRJ - BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO

D.O - DENSIDADE ÓTICA

DMEN – MEIO DE CULTURA

DMSO - DIMETILSULFÓXIDO

ePTFE - POLITETRAFLUORETILENO

ETO - ÓXIDO DE ETILENO

MEV - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

mm – MILÍMETROS

MTT - 3 - (4,5-DIMETIL-2-IL) -2,5-DIFENILTERTRAZOLIM BROMETO

nm – NANOMETROS

PBS-TWEEN - SOLUÇÃO TAMPÃO ASSOCIADA A UM SABÃO

PELET - CÉLULAS DECANTADAS

ROG - REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

RPM - ROTAÇÕES POR MINUTO

RTG - REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA

SFB - SORO FETAL BOVINO

TGF B 1 - TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1

TMB - TETRAMETILBENZIDINO

RESUMO

Características físicas e químicas específicas das membranas podem influenciar na regeneração dos tecidos periodontais utilizando os princípios da regeneração tecidual guiada (RTG). O objetivo do presente estudo foi analisar a viabilidade celular e a presença do fator de crescimento de fibroblastos e osteoblastos imortalizados em contato com três membranas bioabsorvíveis comerciais, com diferentes composições e estruturas, sendo uma membrana importada, de ácido polilático (PLA), considerada padrão ouro, e duas de colágeno bovino tipo I, (COL1 e COL2), membranas de fabricação nacional, e comparar os resultados entre os grupos em diferentes tempos de cultura (04 e 24 horas), para verificar se as membranas de colágeno apresentam um comportamento favorável ao desenvolvimento celular. O grupo controle foi o fundo da placa de cultura, sem nenhum biomaterial. Foi realizada a cultura de células permanentes, com osteoblastos humanos (SAOS-2) e com fibroblastos FGH, ambas cultivadas utilizando o meio de cultura. Foi avaliada a viabilidade das células cultivadas sobre as membranas utilizando o teste do MTT. A quantidade de fator de crescimento TGF- β 1 foi determinada pelo ensaio de ELISA, utilizando os sobrenadantes das células em cultura. As amostras foram examinadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), para verificar comportamento e adesão celular. Todos os biomateriais analisados são biocompatíveis, já que nenhuma das membranas no estudo, tiveram resultados inferiores aos do grupo controle. No entanto, as membranas PLA permitiram maior viabilidade celular e apresentaram valores maiores de níveis de crescimento e a membrana COL1 apresentou resultados semelhantes a PLA na viabilidade celular com fibroblastos e na liberação de fator de crescimento dos osteoblastos.

ABSTRACT

Physical and chemical characteristics of specific membranes may influence the regeneration of periodontal tissues using the principles of guided tissue regeneration (GTR). The aim of this study was to analyze cell viability and the presence of growth factor with immortalized osteoblasts and fibroblasts in contact with three commercial bioabsorbable membranes with different compositions and structures. An imported membrane made of polylactic acid (PLA), considered the gold standard, and two of bovine collagen type I (COL1 and COL2), membranes of national manufacture. The results were compared between the groups at different times of culture (04 and 24 hours), to verify that the collagen membranes have a favorable cell development. The control group was the bottom of the culture plate, without any biomaterial. Was performed permanent cell culture with human osteoblasts (SAOS-2) and fibroblast HGF, using both cultured medium. The viability of cells cultured on the membranes were evaluated using the MTT assay. The amount of growth factor TGF- β 1 was determined by ELISA assay using the supernatants of cultured cells. The samples were examined using a scanning electron microscope (SEM) to verify behavior and cell adhesion. All analyzed biomaterials are biocompatible, since none of the membranes in the study had lower results than the control group. However, the PLA membranes allowed higher cell viability and showed higher values of growth rates and the membrane COL1 showed similar results with PLA cell viability and release of fibroblast growth factor osteoblasts.

Introdução

1.INTRODUÇÃO

A doença periodontal é muito comum na população em geral e é a principal causa para a perda do suporte dental (Inanc et al., 2009). Os objetivos da terapia periodontal tem sido descritos de muitas maneiras ao longo dos anos. O conceito-chave é melhorar a saúde periodontal e, assim, satisfazer as necessidades estéticas e funcionais do paciente (Needleman et al., 2002; Thangakumaran et al., 2009).

A regeneração tecidual guiada (RTG) é definida como: procedimento utilizado na tentativa de regenerar estruturas periodontais perdidas. Além disso, também é indicada para regenerar os defeitos ósseos ao redor de implantes, cirurgia de lesões endodônticas, cirurgias mucogengivais e bucomaxilo-faciais. O uso de membranas na terapia periodontal tem como finalidade formar uma barreira, excluindo epitélio e tecido conjuntivo e permitir que células osteoprogenitoras proliferem e diferenciem dentro da área isolada (Lekovic et al., 2001). As principais células encontrados no ligamento periodontal são cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos, e os seus precursores(Isaka et al., 2001; Lekovic et al., 2001; Needleman et al., 2002).

A regeneração periodontal requer a restituição do aparelho de inserção periodontal, alcançada por meio da formação de novo osso, nova deposição de cimento na superfície radicular descontaminada, e inserção de fibras colágenas com orientação funcional, dando origem a um novo ligamento periodontal(Kasaj et al., 2008; Inanc et al., 2009).

A RTG é considerada um procedimento de boa previsibilidade e sucesso, desde que corretamente indicada e pode apresentar sucesso nos procedimentos de tratamento dos defeitos ósseos verticais. Porém, o sucesso da regeneração é dependente de múltiplos fatores, como tamanho e tipo de defeito, idade e fatores genéticos (Inanc et al., 2009). Além disso, o material utilizado na regeneração deve apresentar algumas características desejáveis, como biocompatibilidade, propriedades de oclusão celular, permeabilidade de nutrientes, a integração com os tecidos do hospedeiro, capacidade de induzir a proliferação e diferenciação celular, apresentar fácil manipulação clínica e manutenção de espaço (Thangakumaran et al., 2009).

O uso de membranas como barreira tornou-se um padrão de tratamento na regeneração óssea guiada (ROG). Esta modalidade terapêutica exclui os tecidos epiteliais e conjuntivos permitindo a proliferação de células osteoprogenitoras e diferenciação na área isolada (Moses et al., 2008).

Diversos materiais são usados como barreiras, tais como politetrafluoretileno (ePTFE), colágeno, ácido poliglicólico, ácido polilático e copolímeros (Moses et al., 2008; Parrish et al., 2009). As primeiras membranas comercialmente disponíveis foram feitas de politetrafluoretileno expandido e são não-absorvíveis. Entretanto, seu uso foi limitado pela necessidade da segunda cirurgia para a remoção da membrana e sua taxa elevada de exposição na cavidade oral, com risco de contaminação desencadeando infecção pós-cirúrgica (Oh et al., 2003). Conseqüentemente, um grande número de materiais reabsorvíveis foi introduzido na terapia periodontal, oferecendo vantagens sobre os materiais não-absorvíveis tradicionais (Bashutski & Wang, 2009). As membranas absorvíveis atualmente testadas e usadas podem ser feitas de ácido polilático, ácido poliglicólico, ou colágeno, embora não exista consenso quanto ao melhor material, pois mesmo entre tantos biomateriais disponíveis, ainda não existe uma membrana ideal (Bottino et al., 2011).

As membranas devem apresentar habilidade quimiotática de atrair os fibroblastos e osteoblastos, e semi-permeabilidade, o que favorece a passagem de nutrientes (Oh et al., 2003). As membranas reabsorvíveis são uma alternativa promissora na regeneração tecidual guiada (Sculean et al., 2001). Biocompatibilidade e capacidade de proliferação são exigências para as membranas. Conseqüentemente, as membranas usadas para RTG devem ser projetadas com a função de promover a tolerância da célula, impedindo a ativação das reações imunes (Schlegel et al., 1997).

E meio a tantas membranas bioabsorvíveis disponíveis no mercado, dentre elas as membranas de ácido polilático e de colágeno, quais delas apresentam maior capacidade de induzir as células na produção de fatores de crescimento e permite maior proliferação celular. Baseado nestas suposições, o objetivo deste estudo foi investigar a biocompatibilidade, capacidade de

proliferação, produção de fator de crescimento, morfologia celular, de osteoblastos-like e fibroblastos FGH, em contato com três tipos de membranas comerciais bioabsorvíveis em diferentes tempos.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Princípios biológicos e engenharia dos tecidos

Ranney 1991,descreveu sobre o diagnóstico diferencial da doença periodontal, abordando princípios e classificações. Definindo como gengivite, uma inflamação limitada à gengiva, e a periodontite, uma inflamação com perda das estruturas de suporte.

Hefti, 1997, em um estudo sobre sondagem periodontal, definiu que o conjunto de estruturas que circundam o dente é denominado periodonto, composto por gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. A gengiva recobre o osso alveolar, e faz um selamento dinâmico em torno do dente. Ela é composta por epitélio e tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervos. O tecido conjuntivo é composto por fibras colágenas.

Isak e colaboradores, 2001 relataram que entre as técnicas utilizadas em procedimentos regenerativos, a regeneração tecidual guiada (RTG) é uma técnica de exclusão tecidual usada no controle de migração apical de células epiteliais, objetivando restabelecer as condições de um tecido saudável. O uso das barreiras induz a formação de um novo tecido conjuntivo e novo osso alveolar. O autor verificou em seu estudo a importância de células do ligamento periodontal (cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos) na regeneração tecidual. A regeneração periodontal pode ser ativada pela migração de células de dentro do defeito e com a proliferação e diferenciação de células do ligamento e do osso alveolar. Algumas células do ligamento periodontal humano e animal podem exibir fenótipo de osteoblastos, e induzir a mineralização, e estimular ações de regeneração do osso alveolar. Foi realizado um estudo *in vitro*, utilizando membranas, que mostrou que a capacidade do ligamento periodontal influenciar na neo formação óssea, porém com capacidade limitada.

Minozzi e colaboradores, 1997, afirmaram que o comprometimento das estruturas teciduais, seja por trauma ou doença, pode prejudicar o desenvolvimento normal de uma função, sendo assim, os defeitos ósseos estão presentes desde o Império Romano, até os dias de hoje, e com a

necessidade de suprir uma demanda funcional, tem se como objetivo realizar o reparo do tecido comprometido.

Em 2009, Poiate et al. utilizaram o ligamento periodontal, como foco de estudo, que é um tecido macio, vascularizado e rico em tecido conjuntivo revestindo a superfície radicular do dente e unindo o cimento ao osso alveolar. Estrutura essa para suportar, distribuir e absorver forças mastigatórias, transmitir reações biológicas e fisiológicas. O estudo analisou pelo método de elementos finitos, utilizando modelos tridimensionais, a capacidade do ligamento periodontal sobre diferentes condições fisiológicas e biológicas, em suportar aplicação de forças, sobre as seguintes superfícies: oclusal, incisal e vestibular. Concluiu que a distribuição de tensões demonstradas neste estudo pode prejudicar a integridade da estrutura periodontal, permitindo compreender o comportamento biomecânico do ligamento periodontal em condições de saúde ou doença.

Helow, e colaboradores 2008, realizaram uma revisão da literatura, sobre o uso de membranas em técnicas regenerativas na instalação de implantes imediatos. Deiscências, fenestrações e perda do osso alveolar são comuns na prática clínica. O objetivo da engenharia tecidual é reduzir o tempo clínico, preservar osso alveolar e devolver estética ao paciente. O uso de membranas após extrações isola a área das outras estruturas, ajuda estabilizar o coágulo e mantêm o espaço para regenerar osso e futuramente instalar o implante. Existem vários tipos de materiais utilizados na fabricação de membranas, neste estudo, comparam-se membranas não absorvíveis, absorvíveis, e associação de outros biomateriais para ajudar na regeneração. A degradação desses materiais pode liberar fragmentos e ocasionar uma resposta local do tecido, podendo prejudicar a regeneração. Mesmo tendo a mesma composição, os materiais apresentam diferentes formas de processamento, estrutura, propriedades mecânicas, potencial antigênico e tempo de degradação. Como resultado, o autor define que as membranas favorecem a regeneração tecidual, principalmente quando associado com outros tipos de biomateriais.

Pagliari et al., 2008, em uma revisão de literatura, determinaram parâmetros sobre eficácia, complicações e relatos de pacientes, e aplicabilidade das melhores técnicas cirúrgicas sobre defeitos ósseos maiores que três milímetros. A doença periodontal afeta de 5 a 15% da população de 35 aos 44 anos. A periodontite é uma doença infecciosa associada à população bacteriana presente na placa, que desencadeia resposta inflamatória nos tecidos periodontais de suporte. Alguns mecanismos podem influenciar no favorecimento da proliferação de algumas bactérias, como fumo, diabetes, condições genéticas e hereditárias. A evolução da doença periodontal pode destruir os tecidos periodontais de suporte, como tecido conjuntivo e osso alveolar, podendo apresentar clinicamente sinais de recessão e/ ou bolsas. Alguns sinais da doença são: sangramento, mobilidade, supuração, migração, exposição da raiz, e perda dental. Varias técnicas cirúrgicas são propostas para resolver as seqüelas da doença periodontal. A revisão comparou o emprego de técnicas de debridamento cirúrgico, regeneração tecidual guiada, (membranas absorvíveis e não absorvíveis), matriz derivada de esmalte, osso autógeno e enxertos ósseos. As condições dos defeitos foram analisadas e foi concluído que é aconselhável utilizar técnicas de raspagem e debridamento cirúrgico associada à regeneração tecidual guiada.

Bshutski & Wang, em uma revisão, em 2009 definiu: reparo é a substituição de um tecido de uma área danificada por outro que não devolve a mesma arquitetura e função. Regeneração é definida como reprodução ou reconstituição funcional de uma parte perdida, é dependente das condições e da capacidade regenerativa das células. Regeneração tecidual guiada (RTG) tem capacidade de parar a destruição óssea e tecidual e promover neo-formação de tecido e osso. A regeneração periodontal, entretanto refere-se à restauração do osso, cemento e ligamento periodontal. Para que ocorra a RTG, várias técnicas e materiais tem sido desenvolvidos, a revisão mostrou várias membranas tanto de origem sintética ou biológica, comercializadas, sendo a membrana de ácido polilático da Gore-tex, uma das representantes do grupo das sintéticas. Cada um dos biomateriais possui fatores que podem influenciar na terapia regenerativa.

Inanc, et al., 2009, explicaram que a doença periodontal inflamatória está presente na população em geral e é uma das maiores causas da perda do suporte dentário. A partir da perda de estruturas de suporte, devido à periodontite, trauma oclusal, entre outros fatores, a engenharia tecidual, desenvolveu técnicas com o objetivo de regenerar estruturas perdidas, como osso alveolar, cimento e ligamento periodontal. Essas técnicas de regeneração são possíveis pela exclusão celular e manutenção do espaço pelo tempo necessário, o qual pode variar de 3 a 11 meses, dependendo da dimensão do defeito ósseo. Vários biomateriais, de origem natural ou sintética, tem sido pesquisado, sobre biocompatibilidade, biodegradação, interação celular e propriedades mecânicas. Prepara-se um arcabouço com várias estruturas que carregam células, promovendo um suporte inicial, facilitando a nutrição e o metabolismo, verificado por difusão em teste *in vitro* e por angiogênese *in vivo*. O autor realizou um estudo *in vitro*, utilizou células do ligamento periodontal, e membranas de ácido polilático-glicólico, além disso, realizou teste mecânico: verificando a deformação da membrana. Avaliou a viabilidade após 24 horas da sedimentação celular e a capacidade de adesão celular destas células em contato com membrana, após 7/14/21 dias do início do experimento. O estudo mostrou que as células do ligamento periodontal têm capacidade de formar estruturas teciduais e de se diferenciarem.

Darby, 2011, relatou que por muitos anos o tratamento da doença periodontal foi controlar o biofilme, resultando num reparo tecidual e epitélio juncional longo. Logo, com o avanço da engenharia dos tecidos, foi alcançada a capacidade de regenerar os tecidos periodontais de suporte perdidos pela doença. O tecido epitelial tem a maior capacidade de proliferação em um defeito, porém, com a introdução das membranas na regeneração tecidual guiada, é possível reconstruir o ligamento periodontal, osso alveolar, e cimento. Existem vários biomateriais que podem trabalhar na regeneração tecidual guiada, como, enxerto, membranas, fator de crescimento, e materiais constituídos de células. As membranas estabilizam o coágulo, protegem a neoformação e concentram fatores de crescimento e células osteoprogenitoras. Elas devem ser biocompatíveis, promover oclusividade celular, permitir

integração tecidual, e manter o espaço, além de exibir função de barreira para favorecer a regeneração. A membrana de ácido polilático da Gore tex foi citada como uma das marcas comerciais neste estudo. O sucesso do tratamento é dependente do tamanho do defeito, das condições dos pacientes e do tipo de material utilizado.

2.2 Aplicabilidade clínica e estudos *in vivo*

Schlegel, et al, 1997, relataram que as membranas são utilizadas para guiar as células e preencher um defeito e ativar reações de regeneração. Realizaram um estudo sobre membranas colágenas, avaliando a morfologia de uma membrana específica de colágeno suíno por microscopia eletrônica de varredura. Analisou reações imunológicas em coelhos, pelo teste de ELISA e realizou um estudo clínico prospectivo com seis pacientes, com análise radiográfica após 3, 6 e 9 meses da cirurgia. O autor concluiu que a membrana de colágeno apresentou resultados favoráveis ao uso.

Trejo e colaboradores, em 2000, realizaram um estudo clínico no tratamento de defeitos ósseos, associando técnicas regenerativas, com enxerto alográfico e membranas bioabsorvíveis, comparando com o uso de membranas. Foram selecionados 30 pacientes com perda óssea, nos quais técnicas regenerativas eram realizadas comparando dois grupos, sendo o primeiro grupo realizado a cirurgia associando duas técnicas regenerativas, com o uso de membranas de ácido polilático(PLA) e enxerto alógeno, e o grupo controle, no qual era tratado somente com as membranas PLA. Os resultados não mostraram diferença significativa no tratamento dos defeitos ósseos, quando comparado as duas modalidades de técnicas regenerativas.

Em 2001, Lekovic e colaboradores, realizaram um estudo utilizando várias modalidades e materiais regenerativos: membrana bioabsorvível(colágena ou ácido polilático), osso bovino particulado, e proteínas da matriz de esmalte, buscando regenerar defeitos ósseos em humanos, comparando com a técnica de debridamento cirúrgico sem o uso de biomaterial. A membrana inibe a migração de células indesejáveis na regeneração tecidual, e ela deve ser colocada entre o retalho tecidual e o

defeito a ser regenerado. Após seis meses, a associação de técnicas regenerativas mostrou melhores resultados clínicos na resolução de defeitos ósseos, quando comparada com a debridamento cirúrgico.

Sculean e colaboradores, 2001, relataram que uma das técnicas regenerativas mais documentadas é a RTG, utilizando membranas, recobrimo defeitos periodontais e superfície radicular, formando novo ligamento periodontal e osso alveolar. O autor realizou um experimento clínico comparando o uso de proteínas da matriz de esmalte e membranas bioabsorvíveis, no tratamento de defeitos ósseos, no qual 20 pacientes foram selecionados, apresentando defeitos ósseos similares, e em seguida foram tratados utilizando as duas técnicas. Os mesmos pacientes, após um e quatro anos do tratamento apresentaram manutenção das estruturas regeneradas.

Needleman e colaboradores, 2002 avaliaram em uma revisão sistemática a regeneração tecidual guiada em defeitos ósseos periodontais. Embora existam protocolos para terapias periodontais, o seu uso exclusivo, sem adição de biomateriais, não permite devolver todas as estruturas perdidas pela doença periodontal. Já na regeneração tecidual guiada, tem se a regeneração de todos os tecidos periodontais de suporte. Vários procedimentos incluindo o uso de enxerto ósseo e materiais que substituem osso, condicionamento da superfície radicular, e fatores de crescimento, têm sido sugeridos para alcançar a regeneração esperada. O uso de biomateriais tem alto custo e demanda de habilidade técnica. O autor concluiu que todos os procedimentos de RTG, mostraram melhores resultados quando comparados com a terapia cirúrgica periodontal convencional. No entanto os níveis de sucesso variam de acordo com a indicação correta do procedimento.

Oh e colaboradores, em 2003, realizaram um estudo comparando o uso de dois tipos de membranas colágenas no tratamento de deiscência em implantes, utilizando regeneração óssea guiada. Ele definiu que cinco fatores são predados para obter resultados satisfatórios: uso de membranas apropriadas, cicatrização com primeira intenção, criação de um espaço e a manutenção do mesmo com a proteção de uma membrana, fechamento e estabilização da membrana circundando o tecido ósseo, e período de

regeneração semelhante ao de degradação da membrana. Foi realizado um estudo *in vivo*, e observou que a regeneração pode ser alcançada com aumento significativo na 16ª semana após a cirurgia, e que a manutenção do espaço e o recobrimento da membrana são os dois fatores mais importantes que podem influenciar na regeneração óssea guiada.

Sanz, e colaboradores em 2004, realizaram um estudo comparando técnicas regenerativas, no tratamento de defeitos ósseo, utilizando proteínas da matriz de esmalte e membranas bioabsorvíveis. Foram selecionados 70 pacientes, apresentando defeitos ósseos maiores que três milímetros. Foi realizado o acesso cirúrgico conservando papilas, e a descontaminação radicular com raspagem, em seguida as proteínas da matriz de esmalte eram aplicadas, ou o defeito era recoberto com a membrana bioabsorvível. Os resultados foram analisados após um ano, em 67 pacientes, e mostraram que ambas levaram a regeneração óssea, reduzindo a profundidade de sondagem, não houve diferença estatística entre as técnicas, e muitas complicações pós-cirúrgicas aconteceram, como contaminação da membrana pela exposição no meio oral precocemente.

Em 2008, Pretzl e colaboradores, compararam resultados após 10 anos do tratamento de defeitos ósseos utilizando terapia da regeneração tecidual guiada, com membranas não absorvíveis (ePTFE) e bioabsorvíveis (poligalactina 910). O estudo falhou em tentar mostrar diferença comparando os dois grupos, porém mostrou que todo o aumento ósseo vertical, obtido nos 12 meses após a cirurgia regenerativa, foi mantido após 10 anos, e recomenda o uso da membrana bioabsorvível, pois não precisa de uma segunda cirurgia para sua remoção.

Parrish, et al., 2009, em uma revisão sistemática compararam a eficácia clínica de membranas não-absorvíveis e membranas absorvíveis, no tratamento de defeitos ósseos interproximais. Foram selecionados 49 artigos, utilizando membranas de politetrafluoretileno(ePTFE), poligalactina, ácido polilático, sulfato de cálcio, e colágeno com o objetivando a regeneração de estruturas periodontais perdidas. RTG tem mostrado uma melhora no nível da inserção clínica, promovendo também a formação de um novo cemento junto

com novas fibras do ligamento periodontal, quando comparada com acesso cirúrgico somente com debridamento. Além disso, não verificou diferenças estatísticas significantes comparando membranas colágenas e de ácido polilático. Santana, 2009, comparou a eficácia de procedimentos regenerativos combinados, no tratamento de lesões de furca classe II, em mandíbula humana. A probabilidade de sucesso em tratar este tipo de lesão é muito variável. Para realizar este estudo, 60 pacientes foram selecionados, e divididos em dois grupos de tratamento, sendo um grupo tratado com procedimento cirúrgico periodontal incluindo retalho, raspagem e debridamento, e o outro grupo, associando a este protocolo, o uso de enxerto, antibiótico e o recobrimento com membrana. O segundo grupo mostrou resultados melhores com diferença estatisticamente significativa, apresentando resultados clínicos como regeneração óssea e alta frequência de fechamento da lesão de furca.

Kelsey e colaboradores, 2009, em um relato de caso associado a uma revisão de literatura, sobre a remoção de um cisto gengival com exposição radicular em adulto, tratado com terapia regenerativa. O cisto gengival em adulto, não é freqüente, mas quando aparece se localiza entre caninos e pré-molares da mandíbula. Era um paciente do sexo masculino, com 54 anos de idade e doença periodontal. Na remoção do cisto, houve exposição radicular do segundo pré-molar. Foi utilizado tratamento regenerativo combinando enxerto alográfico e recobrimento com membrana colágena. O resultado foi favorável ao uso da associação de técnicas.

Oh, et al, 2009, em um relato de caso e uma revisão, mostraram o uso de regeneração tecidual guiada no tratamento de doença periodontal associada com lesão endodôntica, onde a lesão afetava a furca de molares superiores. O tratamento empregava procedimentos regenerativos com membranas bioabsorvíveis. Obtendo resultados de sucesso no tratamento de lesões combinadas. O sucesso é dependente da estratégia cirúrgica, do tamanho do defeito e da capacidade de acesso para descontaminação, associando quatro etapas: fase pré-cirúrgica, para definir o prognóstico do tratamento, fase endodôntica, cirurgia periodontal regenerativo, e pós-operatório da regeneração tecidual guiada.

Thangakumaran, e colaboradores, em 2009 avaliaram o comportamento de osteoblastos em contato com membranas associado ao uso de derivados da matriz de esmalte. Foram avaliadas quatro membranas: sendo três membranas colágenas, duas com ligações cruzadas e uma não, e uma membrana sintética. Os tempos para a realização dos testes foram: 24 / 72 horas e uma semana. Foi realizado teste de viabilidade, com MTT, e níveis de fosfatase alcalina. A adesão dos osteoblastos sobre a superfície das membranas colágenas se mostrou reduzida, com o uso da matriz de esmalte. A membrana sintética mostrou adesão inferior dos osteoblastos quando comparada com as membranas colágenas, associado ao uso da matriz.

Retzepi & Donos, 2010, em uma revisão de literatura sobre a regeneração óssea guiada das últimas duas décadas relataram que a regeneração de defeitos ósseos é possível pela capacidade das membranas em promover a exclusão mecânica de células indesejáveis, não osteogênicas, que se localizam no tecido mole da cavidade oral. O sucesso é dependente do tempo de degradação e das reações teciduais que as membranas provocam, quando liberam fragmentos. A degradação da membrana é dividida em quatro estágios: hidratação, perda de resistência, perda da integridade estrutura, e fagocitose. O tempo depende do tipo de material em uso. A regeneração é dependente da capacidade da manutenção do espaço pela membrana, não podendo ocorrer o colapso. Sendo importante sua aplicação após extrações com o objetivo de reabilitar com implantes, pois reduz a perda de osso alveolar.

Tsesis, et al, 2011, realizaram uma revisão sistemática, mostrando que a regeneração tecidual guiada, também tem aplicabilidade no tratamento cirúrgico de lesões endodônticas. O estudo verificou vários casos que comparavam RTG com grupo controle (sem membrana), porém os resultados não apresentavam diferença estatística. Mas o tamanho da lesão, o tipo de lesão e o tipo de membrana utilizada afetaram significativamente os resultados para RTG. O autor concluiu que o uso de procedimentos regenerativos, melhora a neo-formação óssea na região de acesso cirúrgico para o tratamento de lesões endodônticas.

Jung, e colaboradores, em 2011, fizeram um estudo *in vivo*, em cachorros, para comparar a capacidade de regeneração óssea guiada, utilizando membranas absorvíveis (membrana de ácido polilático e poliglicólico vs membrana colágena) associando ou não com enxerto ósseo. Foram instalados 20 implantes e realizado análise histomorfométrica após 12 meses. Quando associada com enxerto ósseo a membrana sintética se comporta como a membrana de colágeno, porém, quando não há o enxerto a membrana colágena se destaca. O autor recomenda associar o uso das membranas com enxerto ósseo.

2.3 Características dos biomateriais utilizados na RTG

Simain-Sato, et al, 1999, observaram que o uso de membranas em regeneração tecidual guiada (RTG) pode limitar a migração apical de células epiteliais, e favorecer a inserção de um novo periodonto de suporte, pela ação dos fibroblastos. A recessão gengival tem sido descrita associada à RTG, e o autor realizou um estudo *in vitro* com o objetivo de verificar se fibroblastos gengivais são afetados pela composição dos biomateriais, quando usados em regeneração mucogengival. Foram selecionadas duas membranas sintéticas bioabsorvíveis, (sendo uma delas Resolut WL da Gore Tex) para o teste *in vitro* com cultura primária de fibroblastos da gengiva de ratos. As células foram contadas com azul de tripan, foram realizados os seguintes testes: atividade da fosfatase ácida, síntese de DNA, análise em microscópio óptico, e microscopia eletrônica de varredura, após 72 horas de cultura. Foi concluído que as membranas podem afetar a morfologia dos fibroblastos, e por consequência alterar a regeneração tecidual guiada.

Carpio, e colaboradores em 2000, em um estudo randomizado que comparou membranas bio-absorvíveis, com membranas não-absorvíveis, na regeneração óssea guiada (ROG) em implantes. O autor Utilizou membranas colágenas suínas e ePTFE, enxerto xenógeno ou autógeno em defeitos que circundavam implantes, onde a fixação das membranas era realizada com pinos de ácido polilático(reabsorvíveis). Regeneração óssea guiada tem diferentes degraus para atingir o sucesso, dependendo do tipo de barreira

selecionada, presença ou ausência do enxerto, maleabilidade, técnica cirúrgica e preferência clínica. O estudo concluiu que não há diferença entre os grupos na regeneração óssea guiada, que o fator importante é fixar a membrana na primeira cirurgia.

Alpar, e colaboradores em 2000, avaliaram a citocompatibilidade de três membranas, absorvíveis e não absorvíveis, em cultura com fibroblastos e osteoblastos, observou o crescimento em microscopia eletrônica de varredura. As membranas eram de politetrafluoretileno, ácido polilático e colágeno. Foi realizado teste de viabilidade celular, pelos produtos secretados das mitocôndrias, e outro teste para quantificar proteínas, após 24 horas de incubação. Com 21 dias foi realizada microscopia eletrônica de varredura, para avaliar a morfologia e o comportamento celular. O grupo das membranas de colágeno apresentou melhor comportamento.

Milella, e colaboradores em 2001, relataram que as membranas na regeneração tecidual guiada têm como objetivo tratar defeitos ósseos, para tanto devem satisfazer critérios de biocompatibilidade, oclusividade celular, manutenção de espaço integração tecidual e maleabilidade clínica. Neste estudo, foi preparada uma membrana de ácido polilático combinada com filme de alginato. O alginato teria como objetivo atuar como fator de crescimento, e promover osteogênese. Foram avaliadas suas estruturas, morfologia, propriedades mecânicas, e sua estabilidade em meio de cultura. O autor concluiu que o fator de crescimento TGF β 1, pode ser incorporado no alginato, favorecendo o processo de regeneração.

Rothamel, e colaboradores em 2004, em um estudo *in vitro*, avaliaram a biocompatibilidade de membranas em cultura com fibroblastos do ligamento periodontal e osteoblastos-like. A técnica se baseia em criar um espaço coberto por uma membrana capaz de impedir que células epiteliais da gengiva de migrem apicalmente. E permitir a colonização de células com potencial regenerativo, como células do ligamento periodontal, cementoblastos e osteoblastos. Este material deve apresentar características físicas e químicas que permitam biocompatibilidade, integração tecidual, oclusividade celular, manutenção do espaço e ser de fácil uso clínico. As membranas foram tratadas

após sete dias de cultura e avaliadas em microscópio eletrônico de varredura. O estudo concluiu que o grupo controle, sem membrana, apresentou melhores resultados que os outros grupos, o que mostra que as membranas inibem a adesão e a proliferação celular.

Rothamel, e colaboradores em 2005, realizaram um estudo comparativo com membranas colágenas com e sem ligações cruzadas para avaliar a biodegradação. As ligações cruzadas poderiam ser glutaraldeído ou enzimas. As membranas foram colocadas nas costas de ratos, e cada grupo foi avaliado em diferentes tempos: 2, 4, 8 e 16 semanas. Seguindo parâmetros de biodegradação, vascularização, integração tecidual e reações teciduais. E pode concluir que ligações cruzadas em membranas colágenas, podem prolongar a biodegradação, diminuir a integração tecidual e vascularização, e em alguns casos desencadear reações teciduais.

Cruz, 2006, independente da origem, as membranas devem apresentar padrões de histofilia, passividade, inocuidade, plasticidade, têmpera, rigidez e resistência, e espessura que permitam sua utilização clínica de forma segura. Esses termos têm relação direta com o sucesso na escolha de um biomaterial como barreira. A histofilia é definida como a capacidade de um material biocompatível de permitir crescimento celular em íntimo contato com ele, permitindo ligações químicas com suas moléculas na interface. Passividade refere-se à capacidade de isolar, fazer espaçamento e estabilizar, sem gerar mecanismos capazes de alterar o processo de reparo. O termo inocuidade agrega a biocompatibilidade e histofilia do material e seu tratamento de superfície, não devendo carrear contaminantes. Por essa razão, as membranas devem ser tratadas de forma semelhante aos implantes. Já a Plasticidade refere-se à capacidade do material de se moldar às estruturas, sofrendo deformação plástica, isto é, de se deformar sem romper, mantendo a forma obtida. Os termos têmpera, rigidez e resistência poderiam ser agrupados em uma só categoria, referente às propriedades físicas obtidas pelo arranjo molecular dos materiais e tratamento térmico, capaz de lhes alterar algumas propriedades como dureza, plasticidade, rigidez e resistência.

Bilir, e colaboradores em 2007, avaliaram a biocompatibilidade de membranas colágenas e membranas de ácido polilático, em cultura com osteoblastos-like humanos. O método de regeneração óssea guiada é um procedimento recentemente estabelecido não só para o tratamento de defeitos ósseos periodontais, mas também para aumentar o volume ósseo antes da colocação de implantes. A técnica consiste em prevenir a proliferação de células epiteliais para dentro do defeito ósseo, criando um espaço que pode ser infiltrado por fibroblastos ou células ósseas. O autor comparou os seguintes tempos, 1, 24 e 72 horas, a capacidade de proliferação, viabilidade e número de células, e a interação dos osteoblastos com a membrana. Utilizando um teste imunohistoquímico, para proliferação, e azul de tripan, para contagem e viabilidade celular, e microscopia eletrônica de varredura, para análise morfológica. O grupo controle, onde não havia contato com nenhuma membrana, mostrou resultados maiores nos dois tempos analisados, seguido pela membrana de ácido polilático e membrana colágena. A membrana de ácido polilático apresentou melhor comportamento do que a membrana de colágeno, porém ambas mostraram capacidade de proliferação celular, porém as membranas limitam a proliferação.

Behring, et al, 2008, realizou uma revisão sistemática sobre regeneração tecidual e óssea, avaliando morfologia, proliferação e migração celular quando em contato com membranas absorvíveis. Uma membrana absorvível ideal deve facilitar a adesão, proliferação e migração de células sobre a superfície das membranas, além de selar o defeito da contaminação externa. Estudos *in vitro* mostram que células do ligamento periodontal podem se diferenciar e induzir a regeneração. Selamento bordo a bordo é essencial para este procedimento. Os fibroblastos aderem sobre a superfície da membrana após uma hora de contato, isso não quer dizer que a proliferação já inicia neste momento. O autor relata que algumas membranas com ligações cruzadas podem apresentar citotoxicidade em estudo *in vitro*, podendo representar um problema *in vivo*, este efeito pode ser reduzido se lavar a membrana antes do uso. O que pode ser comprovado *in vivo*, quando não é realizada a lavagem, pois a membrana desencadeou reações inflamatórias em dez dias. SaOs-2 , são células

humanas da linhagem de osteosarcoma, alguns estudos utilizando membranas e os este tipo de célula, mostraram que não houve proliferação nas primeiras 24 horas, porém a partir do 2º dia, já era possível visualizar proliferação. O que pode ser concluído que, na maioria dos estudos, as membranas de colágeno num primeiro contato, inibem a proliferação, pois o grupo controle apresentou melhores resultados, posteriormente, ela consegue estimular a adesão e proliferação. O autor conclui que muitos fatores, como: origem das células, tipo de tecido, topografia de superfície, ligações cruzadas podem interferir na proliferação de células sobre as membranas.

Kasaj, e colaboradores, em 2008, compararam *in vitro*, três tipos de membranas colágenas e três tipos de membranas não absorvíveis. Os principais materiais para confecção de membranas são: politetrafluoretileno, poligalactina, ácido polilático, sulfeto de cálcio e colágeno. Dependendo do material do qual são fabricadas, as membranas podem ser classificadas em absorvível e não absorvível, natural ou sintética. Ambas são efetivas na exclusão do tecido epitelial e proteção da área operada. No entanto, as membranas não absorvíveis são em sua maioria feitas de politetrafluoretileno e requerem uma segunda cirurgia para remoção. Concluiu que os materiais podem influenciar na capacidade de proliferação celular, interferido na regeneração do tecido periodontal / ósseo, sendo as membranas colágenas mais favoráveis no desenvolvimento destes resultados.

Moses, et al, em 2008, realizaram um estudo sobre a biodegradação de membranas colágenas. A regeneração tecidual guiada tem sucesso pela capacidade das membranas em fazer exclusão de células indesejáveis e pela manutenção do espaço pelo tempo necessário, que pode variar de 3 a 12 meses, dependendo o tamanho do defeito. As membranas bioabsorvíveis são preparadas a partir da dura mater, ácido polilático, ácido poliglicólico, poliuretano e colágeno. A membrana de colágeno pode ser de origem bovina ou suína, sendo colágeno tipo I ou III. As membranas promovem adesão de células progenitoras, quimiotaxia, homeostasia, degradação fisiológica, sendo de fácil manipulação e baixa imunogenicidade. As células liberam metaloproteinases durante a regeneração que contribui para a degradação da

membrana, o que pode comprometer sua estabilidade estrutural. Logo técnicas de ligações cruzadas, têm sido utilizadas, como por exemplo, impregnação em solução com tetraciclina antes da aplicação que reduz a degradação precoce da membrana. Os três tipos de membranas usados no estudo se diferenciam na estrutura e características físicas. Grande porosidade indica menos colágeno por área, pode favorecer a proliferação célula, porém reduz a função de barreira. Todas as membranas em estudo mostraram perda do colágeno com 28 dias. O autor conclui que as membranas devem ser escolhidas de acordo com a necessidade clínica.

Bornstein, e colaboradores em 2009, realizaram um estudo comparativo de duas membranas colágenas em defeitos ósseos. Trabalhando condições de preenchimento ou não do defeito com osso desproteínado sem utilizar as membranas, e defeitos com preenchimento utilizando membranas colágenas simples, e defeitos com preenchimento recobertos por membranas colágenas com tratamentos diferentes ligações cruzadas. O conceito de selar fisicamente um defeito aumenta a capacidade de regeneração. O autor selecionou membranas absorvíveis, pois as não absorvíveis estão relacionadas ao risco de exposição ao meio oral e também, posterior colonização bacteriana, além da necessidade de uma segunda cirurgia para sua remoção. Alguns aspectos são importantes para ter sucesso clínico: como longevidade da função da barreira e resposta tecidual favorável. As membranas colágenas têm sido consideradas biocompatíveis, porém apresentam rápida degradação pela atividade enzimática de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. Para prolongar a função de barreira da membrana, alguns métodos de ligações cruzadas, têm sido utilizados. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os dois tipos de membranas colágenas em estudo.

Em 2009, Gupta e seus colaboradores, estudaram os biomateriais e sua capacidade de promover capacidade osteofílica, para induzir a proliferação e mineralização dos osteoblastos. O autor trabalhou condições de porosidade, tratamento com hidroxiapatita (HA), o que pode colaborar na adesão celular, proliferação, além de poder melhorar propriedades mecânicas. O estudo utilizou técnicas empregando nanofibras, com o objetivo de melhorar o

processamento, propriedades mecânicas, mimetizar a matriz extracelular, melhorar biocompatibilidade, osteoindução, adesão e proliferação dos osteoblastos. O bio-composto imita a condição natural do osso, podendo organizar a resposta celular, nos tempos de 5, 10, 15 e 30 dias. Foi realizada a cultura e teste de viabilidade celular, observando a capacidade mitocondrial, observou diferença estatística significativa para o grupo tratado com hidroxiapatita.

Gebdart, e colaboradores, 2009, mensuraram a capacidade de sobrevivência celular e a degradação utilizando células da polpa e do ligamento, sobre três tipos de membranas; colágena bovina, sintética e membrana de fosfato de cálcio, durante a cultura foram realizados teste no 3º, 7º e 14º dia. A viabilidade foi satisfatória em membranas colágenas e sintéticas, porém com resultados inferiores nas de fosfato de cálcio.

Klinger, et al., 2010, avaliaram a degradação de membranas colágenas *in vivo* quando expostas ao meio oral. No entanto uma das principais limitações das membranas colágenas é sua rápida degradação, o que pode ser melhorado através de tratamentos que permitiam o estabelecimento de múltiplas ligações cruzadas, aumentando as ligações já existentes entre as moléculas de colágeno, tornando a membrana mais rígida e diminuindo a degradação enzimática da mesma. No estudo três membranas colágenas sendo, uma com ligação cruzada com ribose, outra com glutaraldeído e outra sem ligação cruzada. As membranas foram colocadas em 20 voluntários humanos, na maxila, região apical e vestibular de pré-molares e molares. As membranas foram recobertas com cimento cirúrgico e os voluntários orientados. Após 10 dias as membranas foram removidas. Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, com significância para o tratado com ribose.

Berahir, e colaboradores, 2011, avaliaram a interação de fibroblastos do ligamento periodontal, na regeneração tecidual guiada, quando em contato com membranas de colágeno e membranas sintéticas, bioabsorvíveis. Foram realizados testes de viabilidade, após 5/10/15/20 dias após o plaqueamento, ensaio imunohistoquímico e microscopia eletrônica de varredura, ambos no

quinto dia após a cultura. A membrana sintética e a membrana colágena, apresentaram comportamentos semelhantes, porém a membrana de colágeno mostrou maior proliferação celular.

Chandrasekhar, e colaboradores, 2011, compararam a capacidade de proliferação em três tipos de membranas, de ácido polilático, colágeno e fosfato de cálcio. As membranas foram colocadas em contato com polpa dental de 7 a 30 dias. A viabilidade celular foi obtida utilizando o teste com vermelho neutro, foi realizado teste histológico das amostras. As proliferações das células da polpa tiveram um fenótipo de fibroblastos. Os biomateriais podem favorecer a proliferação celular, que é dependente da composição química das membranas. A membrana de ácido polilático apresentou melhor comportamento, seguida da membrana de colágeno e por último a de fosfato de cálcio.

Bottino, et al, 2011, descreveram sobre um novo desenho funcional de membrana para desenvolver regeneração periodontal. A periodontite é uma doença que pode levar a perda dental. Terapias periodontais incluem raspagem e debridamento rebatendo o retalho. Mas somente estas terapias não conseguem regenerar estruturas perdidas, para tanto, tem se as membranas. Existe uma variedade de materiais a base de poliésteres, copolímeros ou derivados de colágeno. Membranas colágenas mostram resultados de regeneração favoráveis, com boa afinidade e biocompatibilidade celular, porém são pobres mecanicamente e com relação à estabilidade dimensional, estão associadas à rápida biodegradação. Membranas de poliésteres são biodegradáveis, permitem integração tecidual, são de fácil manipulação, mas apresentam pouca resposta celular e com as membranas de ePTFE, não absorvíveis, que necessitam de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, fica claro que ainda não existe uma membrana com características ideais. O autor desenvolveu um material de poliéster com diferente tratamento de fibras, que deu uma morfologia individual, capacidade de incorporar medicações em sua trama, com alta resistência e comportamento elástico, sendo osteocondutivo, podendo ser um material promissor de fácil manipulação e com risco reduzido de colabar.

Proposição

3. PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar a viabilidade e morfologia de fibroblastos e osteoblastos imortalizados após o contato com membranas bioabsorvíveis e sua influência na liberação do fator de crescimento TGF β 1.

Foram analisados três fatores para o experimento:

FATOR 1 – Tipo de membrana bioabsorvível:

- membrana de ácido polilático
- duas membranas de Colágeno Bovino tipo I

FATOR 2 – Célula

- Fibroblastos
- Osteoblastos

FATOR 3 – Tempo

- 04horas
- 24horas

Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção, análise e caracterização das membranas

Este estudo utilizou membranas comerciais bioabsorvíveis e células oriundas do Banco de Células do Rio de Janeiro-RJ (BCRJ-RJ), e empregou três métodos para análise da biocompatibilidade das mesmas. Para tanto, na Tabela 1 descreveu-se os respectivos grupos empregados em todos os testes.

Tabela 1. Descrição dos grupos e membranas utilizadas no estudo.

GRUPOS	COMPOSIÇÃO	MEMBRANA	FABRICANTE
PLA	ÁCIDO POLILÁTICO	GORE RESOLUT ADAPT LT	WL GORE and Associates Inc Flagstaff AZ, AR, USA.
COL1	COLÁGENO BOVINO TIPO I	GEN DERM	Baumer SA, SP, Brasil
COL2	COLÁGENO BOVINO TIPO I	SURGIDRY DENTAL F	TechoDry Liofilizados Médicos Ltda, MG, Brasil
CONTROLE	PLACA DE POLIESTIRENO	-	BIOSYSTEMS, PR,Brasil

A membrana bioabsorvível de ácido polilático selecionada para o estudo foi amplamente pesquisada por diferentes grupos na literatura, sendo considerada padrão ouro. As duas membranas colágenas são produzidas nacionalmente e encontram-se registradas na ANVISA.

4.2 Corte das membranas

As membranas foram cortadas, utilizando um dispositivo circular, próprio, em condições de assepsia. As amostras apresentaram um tamanho

padrão de 3,5mm de diâmetro, e em seguida foram esterilizadas em óxido de etileno (ETO), para que não prejudicasse sua estrutura.

4.3 Cultura de fibroblastos e osteoblastos.

Neste estudo, foram utilizadas culturas de fibroblastos humanos da linhagem FGH (Banco de Células do Rio de Janeiro-BCRJ) e osteoblastos-like (SAOS-2) (BCRJ), originárias de osteosarcoma.

Tubos contendo as células foram descongelados. Toda manipulação celular foi realizado em câmara de fluxo laminar (Airstream, Isocide) respeitando as normas de biossegurança, e reduzindo efeitos de contaminação. As células descongeladas foram inseridas em garrafas para cultura de poliestireno de 25 cm², adicionado o meio de cultura DMEM-high Glicose (DMEM, Cultilab, SP, Brasil), contendo sulfato de gentamicina e anfitericina B, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e levadas para incubação, em condições de 37°C, 5% CO₂, 95% ar (Smart cell, Heal Force). O meio foi trocado a cada dois-três dias, até que as células atingissem confluência, a cada etapa, as garrafas eram analisadas em microscópio invertido para verificar o crescimento celular. (Figura 1).



Figura 1. Seqüência de tratamento das linhagens celulares desde o congelamento, até o período de confluência.

Ao atingirem 80% de confluência, as células foram liberadas utilizando tripsina-EDTA, por 5 min. A enzima foi neutralizada utilizando DMEM 10%, e a suspensão celular transferida para tubos contendo DMEM 10% e centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o botão celular foi lavado e ressuspendido em DMEM 10%. (Figura2).

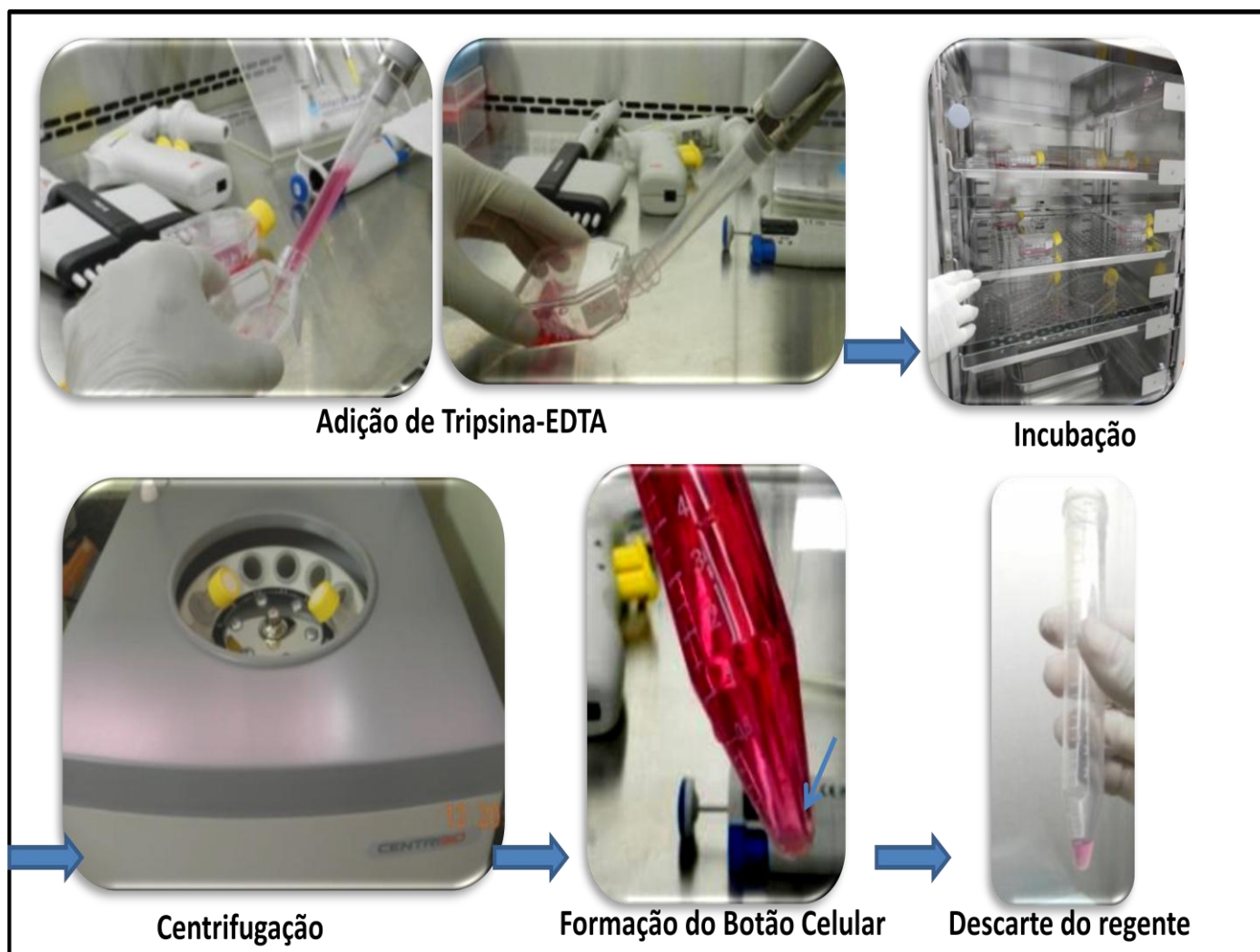


Figura 2. Imagens ilustrando o processo de tripsinização na garrafa de cultura, e a centrifugação da suspensão no tubo. A seta no tubo mostra a formação do botão celular.

Uma alíquota da suspensão celular foi separada e utilizada para contagem pelo método de exclusão pelo azul de tripan. As células foram contadas em hemocitômetro, estabelecendo uma densidade de plaqueamento de 1×10^5 células por poço. (Figura 3).

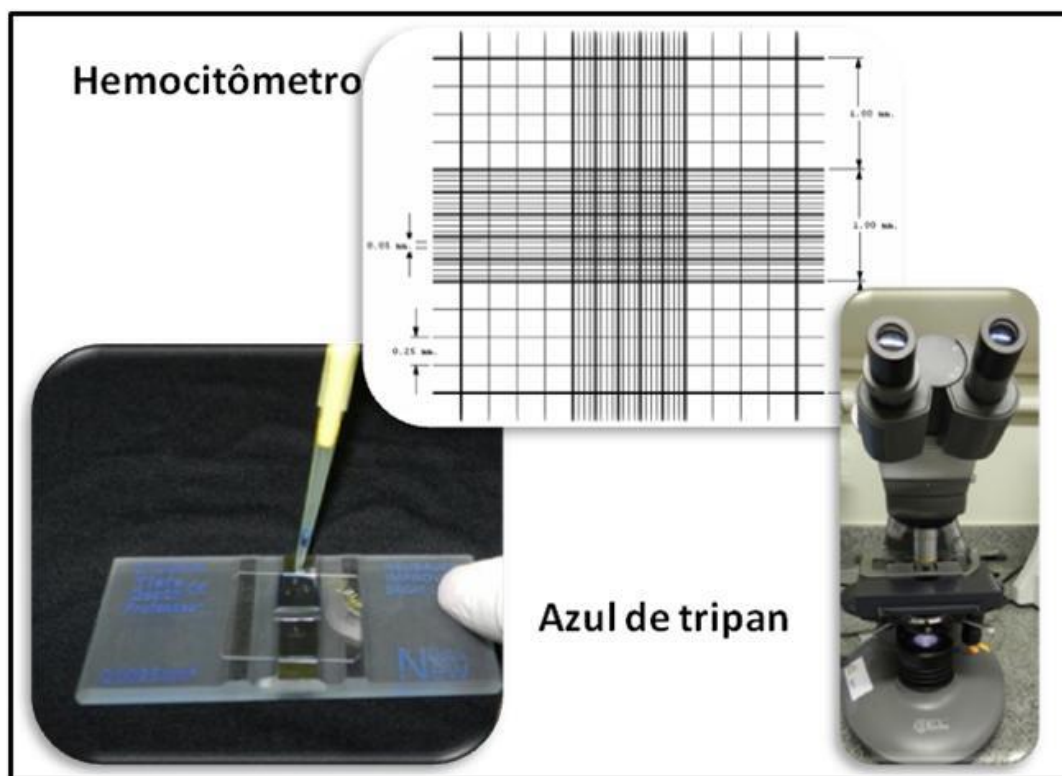


Figura 3. Contagem de células com o uso do reagente azul de tripan, mostrando a Câmara de Neubauer, ou hemocitômetro, e seu esquema ilustrativo. (metodoslabideanellydiazpuentes.blogspot.com)

Antes do plaqueamento as membranas, cortadas e estéreis, foram inseridas nos poços das placas de poliestireno com 96 poços. Sobre cada membrana foi adicionado 50 μ L de meio sem células, por 15 minutos. Em seguida, o meio foi aspirado e foi depositado 100 μ L de suspensão de celular em cada poço. As microplacas, foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, durante 4 e 24 horas. Os experimentos foram realizados em quintuplicata (Figura 4). Foram realizadas análises da morfologia celular utilizando microscopia eletrônica de varredura, análise da viabilidade, e quantificação de TGF β 1.

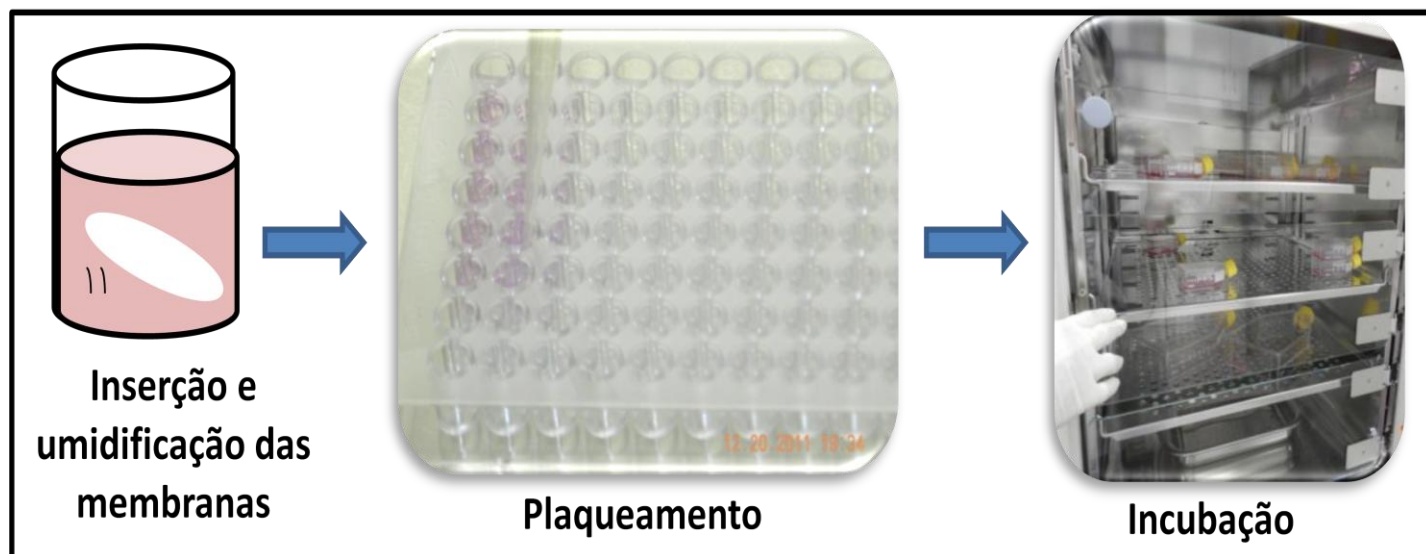


Figura 4. Processo de plaqueamento, onde cada amostra era inserida no poço da placa, as células eram plaqueadas(1×10^5 células/100 μ L), e posteriormente as células eram levadas para incubação por 4 e 24 horas.

4.4 Determinação da viabilidade celular

Depois de completados os períodos de 4, e 24 horas, as placas foram removidas da incubadora, os sobrenadantes foram coletados e congelados para posterior dosagem de TGF β 1. Em seguida, foi adicionado 100 μ l de DMEM 10% sem vermelho de fenol, em cada poço para evitar interferências no ensaio de viabilidade. Cada poço, contendo 100 μ l de meio, recebeu 10 μ l de uma solução de MTT, (5mg/ml). As placas foram novamente colocadas na estufa de CO₂ onde permaneceram por 3 horas. Após este período as placas foram levadas ao fluxo, o meio foi cuidadosamente removido, e os cristais de formazan dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). O sobrenadante foi transferido para uma nova placa, e a absorbância das amostras lida em 570 nm (Biochrom Asys UVM340). As análises foram realizadas em quintuplicata (Figura 5).

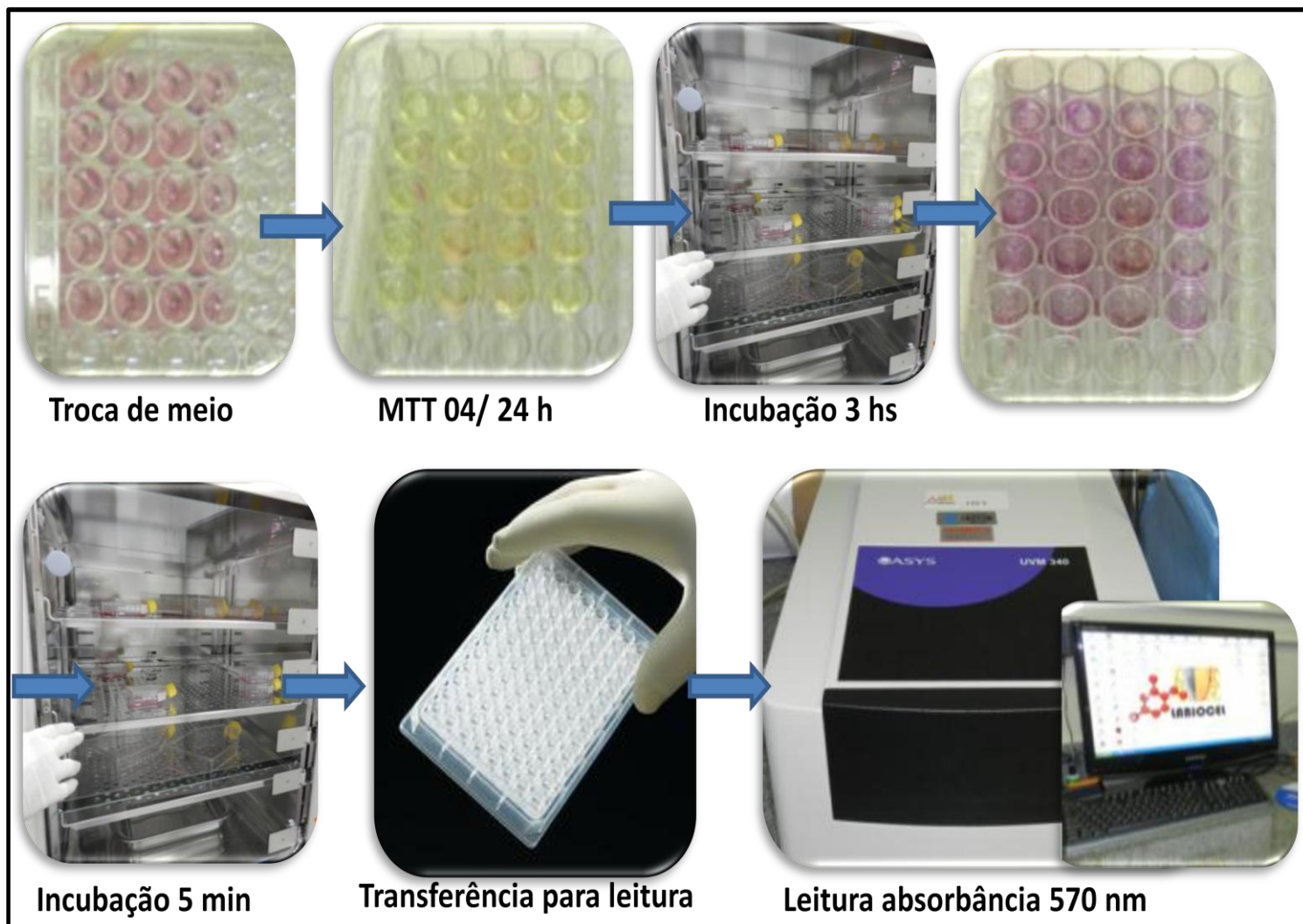


Figura5: Seqüência da realização do teste de viabilidade, mostrando a diferença de cor entre as etapas e saturação após adição do DMSO.

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste para análise de variância, ANOVA, e realizados testes de Tukey. ($\alpha < 0,05$).

4.5 Dosagem de TGF β 1 no sobrenadante das culturas

As amostras previamente congeladas foram utilizadas para o ensaio. As dosagens de TGF β 1, foram realizadas utilizando kit Human/Mouse TGF β 1 ELISA Ready-set-go! (eBioscience, San Diego, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas utilizando-se anticorpo de captura anti- TGF β 1 e incubadas “overnight a 4°C”. Em seguida foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com albumina de soro bovino 3% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado

anticorpo de detecção ligado a peroxidase e incubado por 1 hora, seguido pela adição do substrato enzimático, tetrametilbenzidino (TMB) incubado e protegido da luz por 30 minutos. Entre todas as etapas experimentais a placa foi lavada com PBS 0,01M. A densidade óptica de cada poço foi determinada por meio de um leitor automatizado com comprimento de onda de 450 nm (Biochrom Asys UVM340). A concentração correspondente a cada valor da densidade ótica (D.O.) obtido foi determinada pela comparação com curva-padrão (Figura 6).

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste para análise de variância, ANOVA, e realizados testes de Tukey, Kruskal- Wallis e Mann Whitney. (software SPSS) ($\alpha < 0,05$).

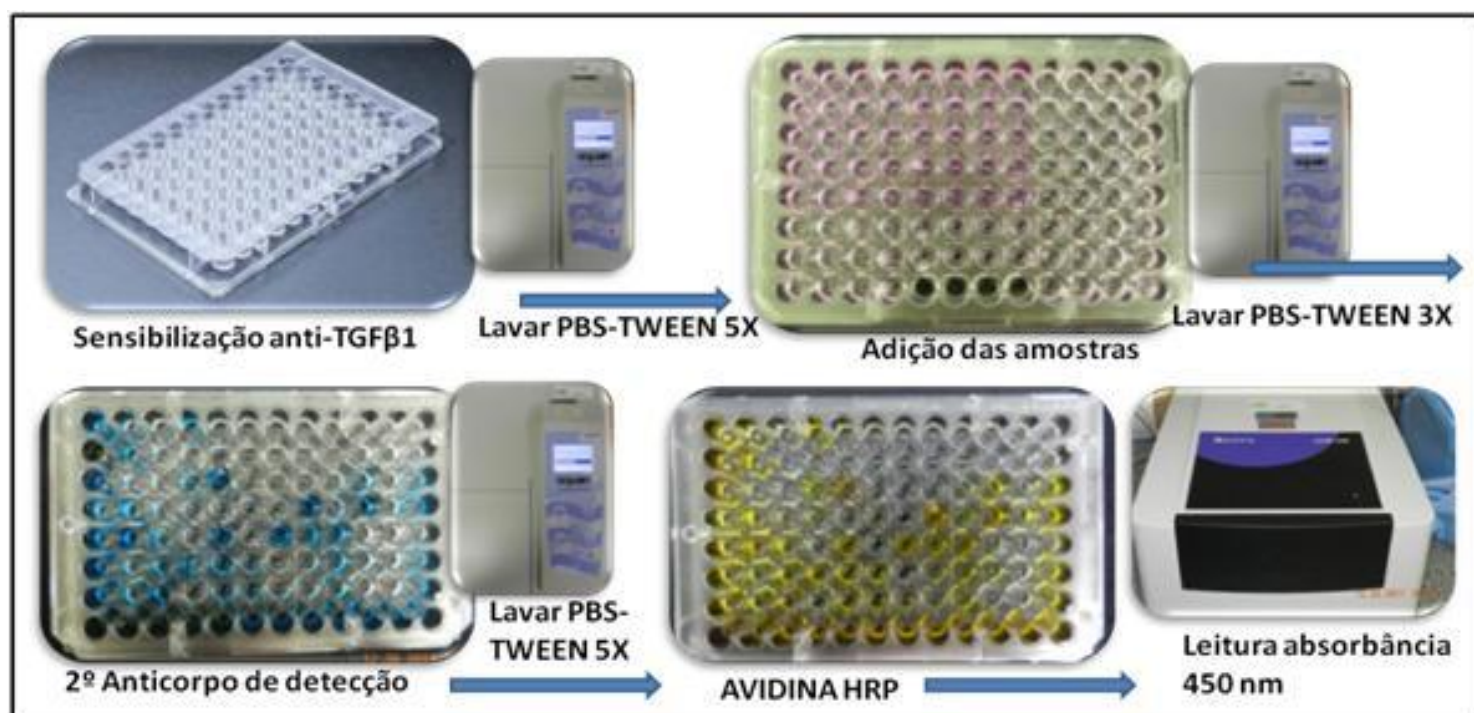


Figura 6. Sequência ilustrativa da dosagem de TGFβ1.

4.6 Análise das culturas ao MEV

A morfologia das células aderidas às membranas foi avaliada nos períodos de 24 horas. As membranas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em

tampão cacodilato de sódio 0,15M, pós fixadas em tetróxido de ósmio 1%, por uma hora, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, de 50, 60, 70, 80 e 90% por cinco minutos e a 100% por 15 minutos. Após a desidratação, as membranas foram secas utilizando hexametildizilazano (HMDS), utilizando 50% de álcool e 50% de HMDS, por 15 minutos, em seguida 25% de álcool e 75% de HMDS, por 15 minutos e por ultimo HMDS a 100% por 15 minutos. As membranas foram transferidas para novos frascos, deixando secar livremente sob o ar, em ambiente parcialmente aberto, por quatro horas.

As membranas foram fixadas em tira de carbono sob os suportes de alumínio, e levadas para a metalização com ouro, com 20nm de espessura. As imagens ilustrativas foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura, com vácuo médio, com aumentos padronizados em 2500x e 5000x. (Phenom) (Figura 7).

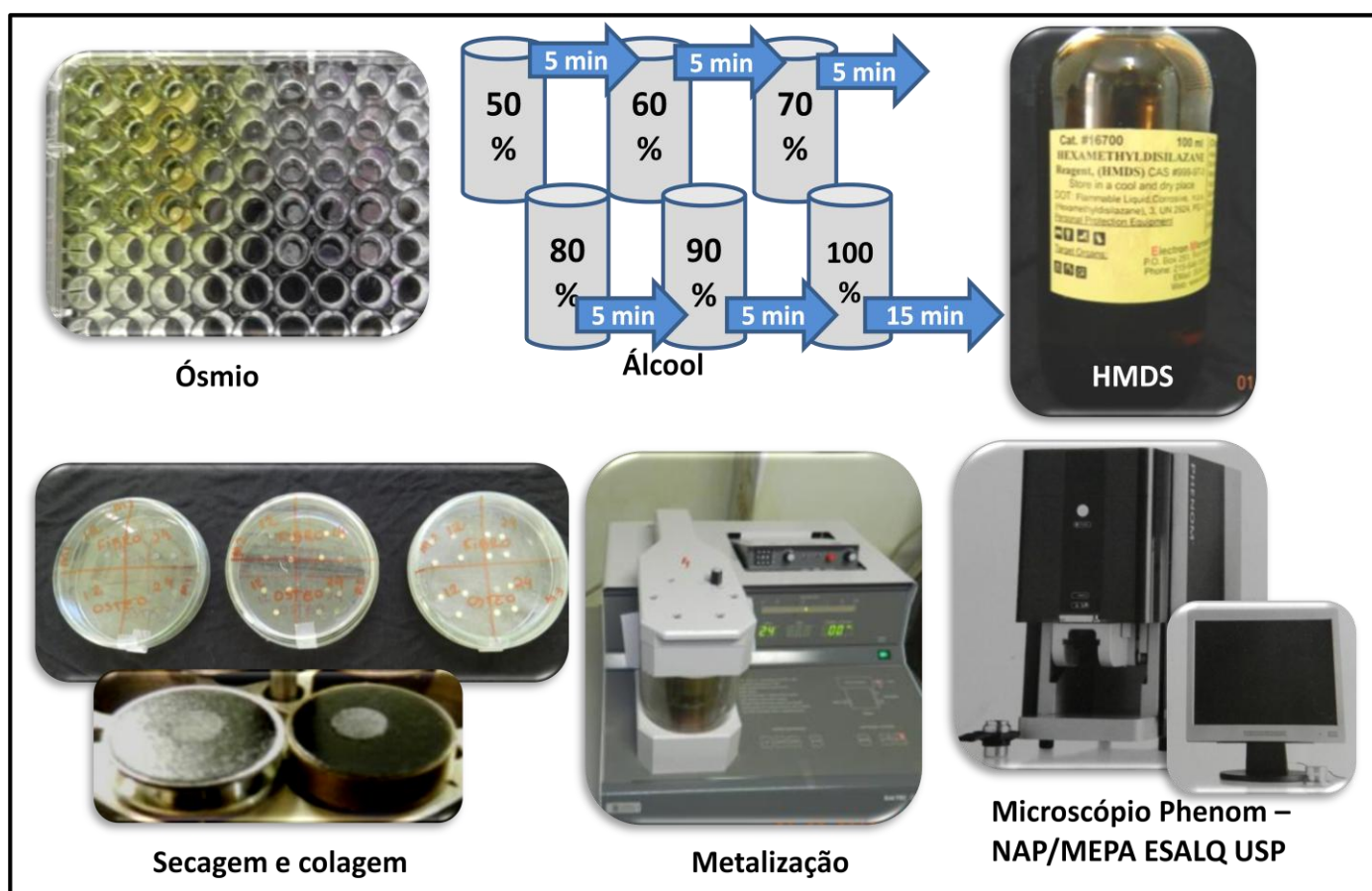


Figura 7: Seqüência dos procedimentos realizados para obtenção das imagens morfológicas das células em 24h e a topografia das membranas.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidade celular

Os dados apresentavam normalidade, e para análise dos resultados, foi realizado análise de variância Two-way e teste de Tukey $(p < 0,05)$. As tabelas mostram resultados da análise dos grupos em relação aos tempos expressos em média e desvio padrão.

No grupo dos osteoblastos na análise entre os tempos, 4 e 24 horas, foi observada diferença estatística significativa, para 24 horas, o que significa um aumento da viabilidade celular neste período. O que não ocorre para os fibroblastos, onde não há diferença estatística comparando os dois tempos. (Tabelas 2 e 3).

A membrana PLA no grupo dos osteoblastos apresentou melhores resultados estatísticos, no tempo de 24 horas (PLA vs. COL2 $p < 0,001$ / PLA vs. Controle $p = 0,005$ / PLA vs. COL1 $p = 0,021$). Já para os fibroblastos, PLA e COL1 apresentaram resultados semelhantes, sendo estatisticamente diferentes do controle e COL2, estes resultados foram encontrados nos dois tempos analisados (04 e 24 horas) (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Valores de absorbância apresentados pelo teste MTT na cultura de osteoblastos, onde letras maiúsculas mostram diferença nas linhas, e letras minúsculas nas colunas.

TEMPO	CONTROLE	PLA	COL1	COL2
4 H	0,2418 (0,034)Ab	0,2522 (0,014)Ab	0,2426 (0,010)Ab	0,2678 (0,046)Ab
24 H	0,4118 (0,047)Ba	0,5718 (0,112)Aa	0,4366 (0,044) Ba	0,3814 (0,047) Ba

Tabela 3: Valores de absorbância apresentados pelo teste MTT na cultura de fibroblastos, onde letras maiúsculas mostram diferença nas linhas, e letras minúsculas nas colunas.

TEMPO	CONTROLE	PLA	COL1	COL2
4 H	0,247 (0,028)Ba	0,354 (0,034) Aa	0,312 (0,030)ABa	0,266 (0,043)Ba
24 H	0,305 (0,060) Ba	0,389 (0,053) Aa	0,347 (0,031) ABa	0,276 (0,047) Ba

5.2 TGF β 1

As tabelas 4 e 5 apresentam os resultados (média e desvio padrão) da comparação das membranas entre si e em função do tempo.

Na cultura de osteoblastos, os níveis de TGF β 1 liberado em 4 horas foi similar entre os grupos. Já em 24 horas, houve um aumento significativo na quantidade desse fator de crescimento celular nos grupos em contato com as membranas PLA e COL1. Estas mesmas membranas, PLA e COL1, em 24h apresentaram diferença estatística significativa, quando comparadas com controle e COL2. ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Na cultura de fibroblastos, em 24h, houve um aumento significativo na quantidade de TGF β 1 somente para as células cultivadas em contato com a membrana PLA, que apresentou diferença estatística significativa quando comparada com os outros grupos ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela4: Resultado do teste de Elisa, para os osteoblastos, onde letras maiúsculas mostram diferença nas linhas, e letras minúsculas nas colunas.

TEMPO	CONTROLE	PLA	COL1	COL2
4 H	147,6 (0,50)Ba	147,9 (0,12)Bb	147,7 (0,10)Bb	147,7 (0,09)Ba
24 H	147,8 (0,3)Ba	4347,5 (723,5)Aa	5715,0 (1391,7)Aa	147,7 (0,8)Ba

Tabela 5. Resultado do teste de Elisa, para os fibroblastos, onde letras maiúsculas mostram diferença nas linhas, e letras minúsculas nas colunas.

TEMPO	CONTROL	PLA	COL1	COL2
4 H	148,0 (1,10)Aa	148,0 (0,36)Ab	147,8 (0,12)Aa	147,7 (0,34)Aa
24 H	148,0 (0,63)Ba	2972,9 (777,61)Aa	148,9 (0,29)Ba	148,0 (0,74)Ba

5.3. Microscopia eletrônica de varredura

As eletromicrografias apontam diferenças na trama das três membranas avaliadas. A membrana de ácido polilático apresentou uma menor quantidade de fibras, sendo estas mais espessas e distantes uma das outras, formando uma rede. Já as membranas colágenas apresentaram diferenças estruturais, apesar da mesma composição. Observamos em COL1, uma membrana com uma topografia de superfície mais plana, com algumas porosidades e relevo, já na membrana COL2, observamos uma membrana mais espessa, com camadas de fibras finas embaraçadas (Figura 8).

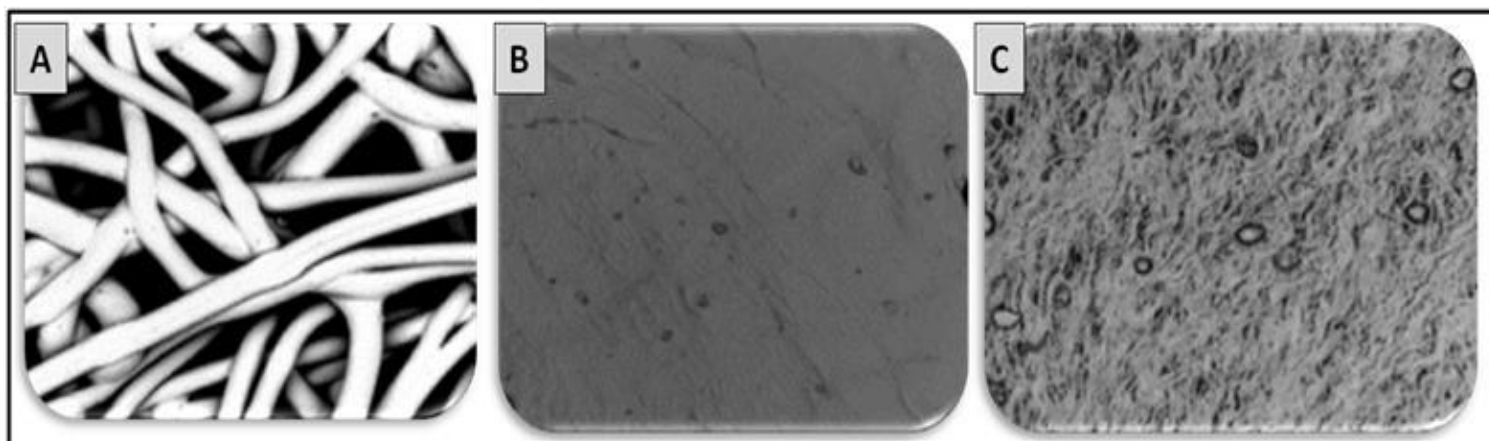


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura, da trama da membrana, com aumento de 2500 x, mostrando em A, membrana de ácido polilático, B, membrana COL1, e C, membrana COL2.

A despeito das diferenças na trama das membranas, foi observado um padrão similar de morfologia celular em 24 horas de cultura. Em ambas as culturas a maior parte das células apresentou morfologia esférica, com algumas células elípticas. Esporadicamente ao longo da trama foi encontrada a emissão de alguns prolongamentos citoplasmáticos e lamelopodia. Em alguns campos, na membrana COL1, foi observado um comportamento diferente, onde a célula se apresentava de forma mais espalhada, se acomodando em poros, buscando o formato estrelado (Figura 9 e 10).

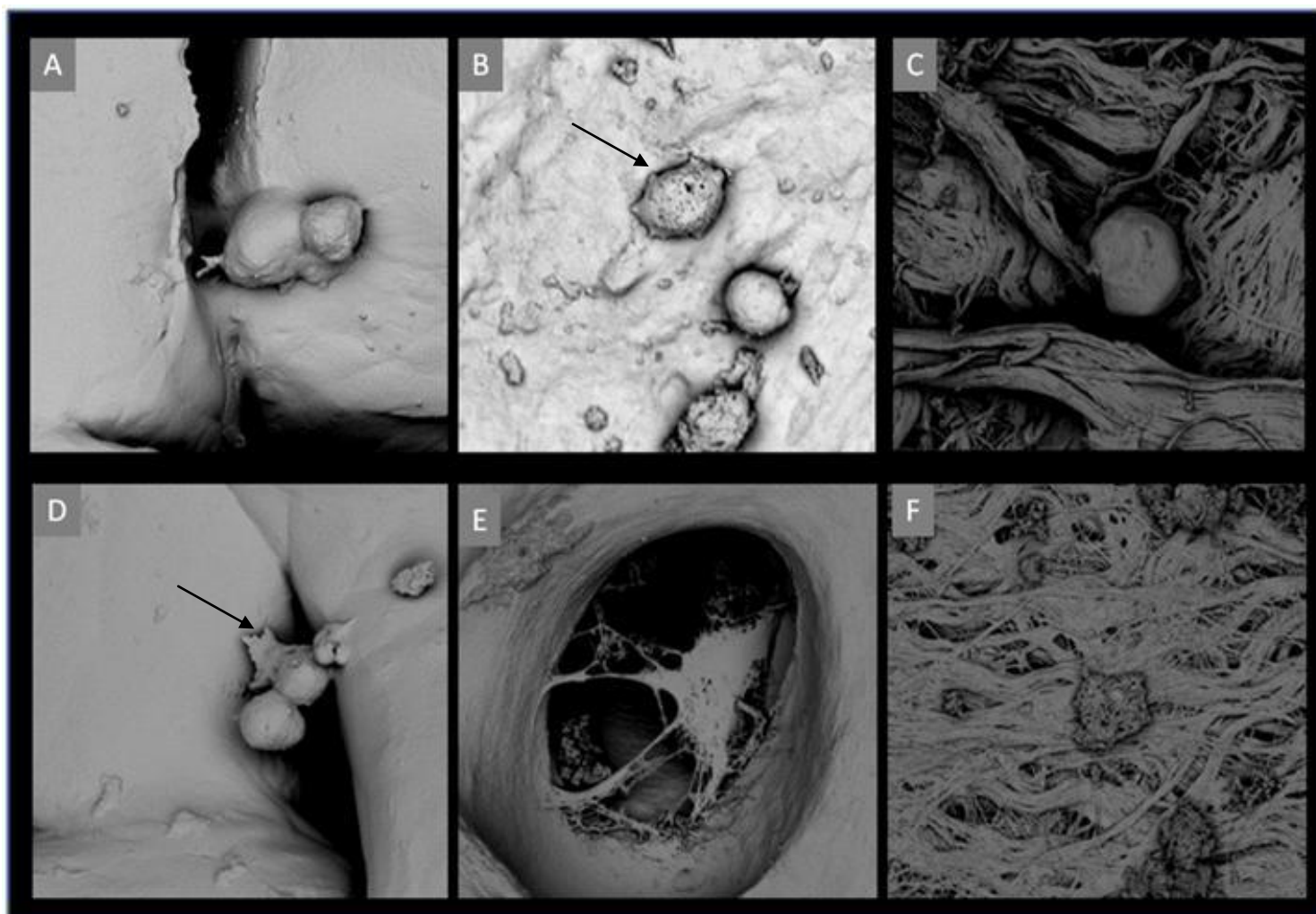


Figura 9. As imagens ilustram o comportamento dos osteoblastos sobre as membranas em um aumento de 5000x, após 24 h de cultura. A e D, temos a membrana de ácido polilático, onde observamos células mais arredondadas, em D, com a proximidade das duas fibras, há uma tentativa de alongamento da estrutura com a expansão citoplasmática, representada pela seta. B e E, observamos os osteoblastos sobre a membrana COL1, temos uma célula arredondada que esta emitindo lamelopodias sobre a superfície da membrana, em E, um comportamento mais estrelado, reticular, aproveitando o poro da estrutura. C e F, a membrana COL2, com células mais arredondadas e algumas mais achatadas, espreiadas.

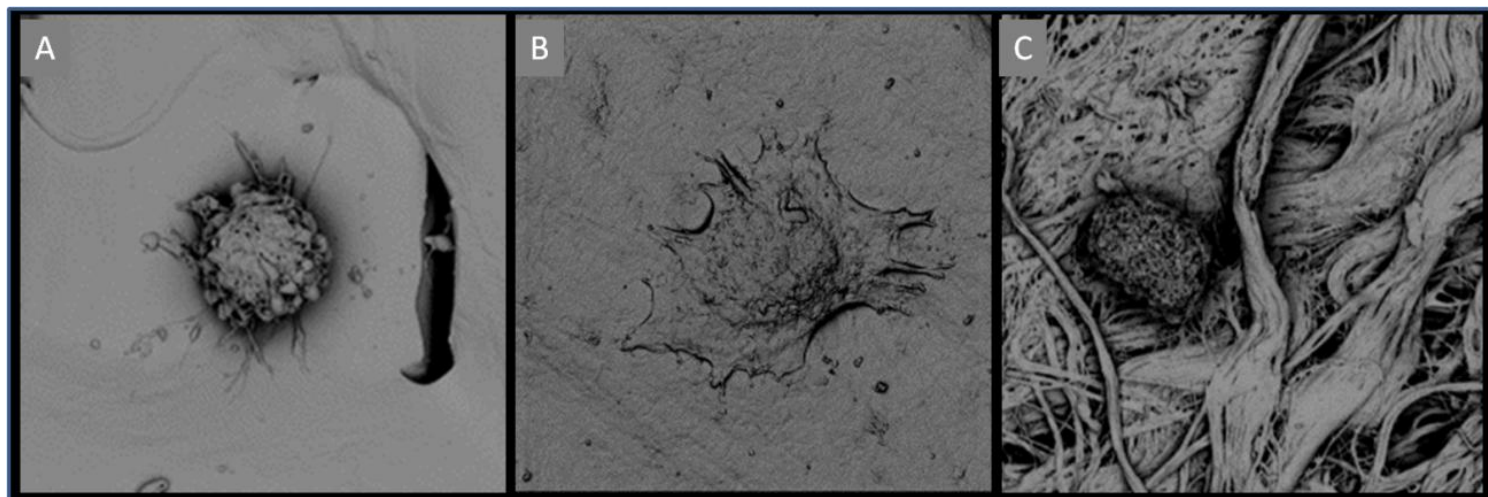


Figura 10: Imagem do comportamento dos fibroblastos sobre as membranas, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 5000x. Em A, a membrana de ácido polilático com um fibroblasto centralizado, mostrando a adesão sobre a superfície da membrana e alguns prolongamentos. Em B, observamos uma célula espreiada, aproveitando a superfície da membrana COL1, E em C uma célula mais arredondada, sobre a trama da membrana COL2.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A periodontia depara-se com um número cada vez maior de materiais de preenchimento (osso orgânico, inorgânico, esponjas de colágeno) e membranas, o que muitas vezes dificulta a escolha do profissional quanto ao melhor material e técnica a serem utilizados. No entanto, o sucesso do tratamento periodontal independe da escolha de materiais considerados de última geração, estando vinculado ao respeito dos princípios biológicos empregados durante o tratamento. Entre tantas membranas bioabsorvíveis, os biomateriais de ácido polilático e colágeno tem sido muito utilizado, porém alguns dos materiais disponíveis no mercado podem favorecer a regeneração tecidual mais do que outros.

Uma técnica cirúrgica adequada depende primeiramente de um correto diagnóstico e plano de tratamento, permitindo assim que os materiais utilizados como barreira, membranas absorvíveis ou não, promovam uma exclusão dos tecidos competidores e permita uma adequada regeneração tecidual guiada. Contudo, as membranas ou barreiras absorvíveis precisam apresentar algumas características essenciais, como poros de tamanho adequado, fácil manipulação, degradação enzimática em tempo adequado, e biocompatibilidade.

O uso da regeneração tecidual guiada provou ser uma técnica adequada para regenerar tecido conjuntivo do ligamento peridontal, cemento e novo osso (Simain-Sato et al., 1999). Assim, uma membrana é colocada sobre a superfície radicular raspada e entre o retalho mucogengival reposicionado, proporcionando um espaço isolado em que fibroblastos e células osteogênicas saudáveis originadas da porção apical do periodonto podem migrar.(Alpar et al., 2000). A membrana tem como objetivo excluir células epiteliais da área a ser regenerada, pois estas células tem a capacidade de migrarem aproximadamente 10 vezes mais rápido do que os outros tipos de células periodontais (Bashutski & Wang, 2009).

Vários estudos têm utilizado as membranas, a fim de regenerar as estruturas perdidas, seja em cirurgias de implantes (Oh et al., 2003), cirurgias

periodontais (Pretzl et al., 2008; Santana et al., 2009), cirurgias endodônticas (Tsesis et al., 2011) e mucogengival (Kelsey et al., 2009), mostrando resultados favoráveis ao uso. Alguns autores afirmam que o uso de membranas mostram aumento de osso no sentido vertical, e que foram mantidas até 10 anos após a cirurgia na maioria dos casos (Pretzl et al., 2008). E outros autores demonstraram reduções significativas na profundidade de sondagem periodontal e aumento do nível de inserção clínica (Kasaj et al., 2008).

Diversos biomateriais, naturais ou sintéticos, têm sido investigados em sua biocompatibilidade, capacidade de biodegradação, propriedades mecânicas e interação celular. Membranas absorvíveis, tem sido amplamente utilizadas, pela ausência de uma segunda cirurgia para remoção do biomaterial, além de reduzir tempo e custos ao clínico, e morbidade do paciente (Darby, 2011).

O objetivo deste estudo foi determinar, *in vitro*, a biocompatibilidade de três tipos de membranas bioabsorvíveis, em culturas de células humanas, fibroblastos e osteoblastos, pois estas células tem capacidade de regenerar as estruturas do periodonto, formando novo osso, cemento e ligamento periodontal.

Avaliando os resultados dos testes obtidos neste experimento, no teste de viabilidade celular para o grupo dos osteoblastos foi identificado um aumento significativo de 4 para 24 horas, o que não observamos no grupo dos fibroblastos, onde todos os grupos em 24h mantiveram seus valores similares ao de 4 h. Isso mostra que, os osteoblastos, apresentam uma cinética de crescimento diferente dos fibroblastos, o que pode ser justificado por Behring, et al, 2008, onde comprovou que diferentes tipos celulares podem se comportar de forma diferente sobre o mesmo biomaterial.

Comparando os grupos, foi observado que a membrana PLA, apresentou significativamente os melhores resultados no teste de MTT, em 24 horas, tanto para osteoblastos e fibroblastos. Isso mostra que, a membrana pode favorecer a proliferação celular. No entanto, a membrana COL1, apresentou semelhança a PLA no grupo dos fibroblastos, além disso, COL2, em todos os tempos, e nos dois tipos de células, apresentou resultados semelhantes ao grupo controle. Logo, as membranas colágenas em estudo,

não prejudicam a proliferação celular, pois não apresentaram resultados menores do que o grupo controle, no qual, não sofria interferência de nenhum fator, pois era cultivado no fundo do poço da placa inerte.

No teste de TGF β 1, foi encontrado o fator de crescimento nos dois tipos de células, este fator em estudo, é essencial no processo de regeneração ou reparo tecidual. No entanto, confirmando os resultados obtidos no teste de viabilidade, a membrana PLA, na cultura com fibroblastos, foi estatisticamente significativa em 24hs, e também, para os osteoblastos, onde COL1, foi igual a PLA. Isso mostra que este biomaterial pode estimular o crescimento celular, pois provavelmente as células conseguiram atingir a fase log, onde ocorre maior proliferação e atividade metabólica.

Os resultados de todos os experimentos indicaram que a membrana PLA apresentou melhor comportamento, podendo induzir a proliferação, em contradição com outros autores em estudos *in vitro* utilizando membranas de colágeno (Kasaj et al., 2008; Gebhardt et al., 2009; Thangakumaran et al., 2009).

No presente estudo os resultados mostraram que uma das membranas de colágeno apresentou valores inferiores quando comparadas com PLA. Estes resultados foram semelhantes aos Chandrasekhar, et al, 2011, Parrish et al, 2007. Billir et al (2007) avaliou a biocompatibilidade *in vitro* da membrana de ácido polilático e colágeno, utilizando osteoblastos-like. Os resultados mostraram capacidade de proliferação em dois tipos de biomateriais, porém a membrana de ácido polilático apresentou os melhores resultados.

Na análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, observou-se um comportamento morfológico de células com aparência arredondada, e as vezes espalhadas. Nas membranas de colágeno, foi observado um melhor aproveitamento da superfície da membrana, pois as células conseguiam crescer horizontalmente sobre o biomaterial. No entanto, este padrão não foi observado em PLA, pois sua estrutura apresentou uma distância entre as fibras, o que favorece melhor contato com uma única fibra, permitindo que as células se comportassem de forma mais arredondada.

Morfologia celular semelhante a deste estudo foi encontrada por Berahim, et al., 2011.

Os resultados mostraram que as células emitiam expansões citoplasmáticas e lamelopodias e que os dois tipos de células conseguiram aderir sobre as membranas em estudo. A topografia da superfície da membrana, desempenha um papel importante na adesão de células, superfícies com textura ásperas ou porosas têm sido consideradas favoráveis em promover a adesão celular, e a morfologia da célula pode ser considerada um indicador de afinidade por um substrato. (Rothamel et al., 2004)

A adesão celular sobre as membranas é dependente do tipo e da natureza da estrutura utilizada e pode influenciar positivamente na regeneração tecidual. Adesão inicial a um substrato é um pré-requisito para as células proliferarem e diferenciarem (Bornstein et al., 2009). Estas membranas não inibem a capacidade de proliferação e diferenciação celular, pois os resultados deste estudo indicam que são semelhantes ou melhores que o grupo controle.

Em uma revisão sistemática, observou-se que o uso de membrana de ácido polilático apresentou melhores resultados quando comparado com debridamento periodontal cirúrgico associado ao enxerto. (Parrish et al., 2009) Em um estudo utilizando células do ligamento periodontal humano e osteoblastos-like, foram comparados três tipos de membranas: ácido polilático, colágeno, e politetrafluoretileno, e os resultados mostraram que a membrana de colágeno é mais biocompatível do que as outras do estudo (ePTFE e ácido polilático). (Alpar et al., 2000) Berahim, et al (2011), comparou *in vitro* membranas de colágeno e de ácido poliglicólico, e concluiu que apesar da semelhança de proliferação, as membranas de colágeno apresentaram maiores valores.

Membranas de colágeno têm demonstrado resultados favoráveis na regeneração tecidual guiada, devido à sua biocompatibilidade e afinidade celular. No entanto, as membranas de colágeno mostram estabilidade mecânica e dimensional relativamente pobre, devido à sua rápida degradação. (Bornstein et al., 2009)

O uso de membranas bioabsorvíveis tem se tornado comum na regeneração tecidual. O seu sucesso é possível devido à exclusão celular e a manutenção do espaço pelo tempo necessário da regeneração. Este tempo pode variar de 03 a 12 meses, dependendo do defeito ósseo. No entanto, a degradação precoce destes biomateriais pode ocorrer, quando a membrana de ácido polilático é inserida em um ambiente aquoso, como o sistema biológico, os polímeros biodegradáveis são submetidos a estágios de degradação, nomeados: hidratação, perda de força, perda da integridade de massa e solubilização através de fagocitose. No entanto, durante a hidrólise, esses materiais perdem a integridade mecânica e desintegram-se em fragmentos. Os fragmentos podem afetar a natureza física da membrana e desencadear uma resposta local do tecido e, posteriormente, pode levar a uma reabsorção óssea.(El Helow & El Askary Ael, 2008) O tempo necessário para ocorrer a biodegradação é dependente da natureza do polímero, do pH, da temperatura, do tipo de membrana e do grau de cristalização.(Retzepi & Donos, 2010)

Em condições metabólicas, *in vivo*, o colágeno é reabsorvido através da degradação da membrana pela ação da collagenase endógenas e proteinases.(Berahim et al., 2011) O colágeno é uma das principais macromoléculas estruturais do corpo humano, o colágeno nativo é degradado dentro de poucos dias. As membranas de colágeno são tratadas para manter a estabilidade e a manutenção do espaço onde perdeu suporte ósseo, em busca da regeneração. Para superar esses problemas de degradação precoce, técnicas de ligações cruzadas têm sido desenvolvidas. Ligações cruzadas envolvem a multiplicação natural de ligações entre moléculas de colágeno. Isto induz as membranas de colágeno a retardarem o tempo de degradação enzimática.(Behring et al., 2008) Além disso, a maneira em que o colágeno é processado tem um efeito considerável sobre a estrutura, tempo de degradação, propriedades mecânicas e potencial antigênico do biomaterial. Além disso, dependendo da origem das proteínas do colágeno, ele pode apresentar potencial para desencadear reações imunológicas. Estes riscos, podem ser diminuídos pelo uso do ligações cruzadas ou reduzindo a quantidade de resíduos liberados na degradação.(El Helow & El Askary Ael,

2008) Portanto, muitos estudos utilizaram o ligações cruzadas para aumentar o tempo de biodegradação ou mesmo a aplicação de produtos para favorecer regeneração.(Rothamel et al., 2005; Bottino et al., 2011)

Realizar estudo *in vitro* utilizando cultura de células permanente, é importante pois permite conhecer as características específicas dos biomateriais, além da capacidade de avaliar uma única variável, com precisão, sem interferência externa. Ambas as linhagens das células do estudo são classificadas como células de cultura permanente, que se multiplicam indefinidamente, apresentam características específicas e não sofrem interferência de sexo, hormônio, idade e metabolismo individual, como ocorre com células que originam de cultura primária. A diferença nos resultados observados pode ser explicada pelo uso de diferentes tipos celulares e metodologias na realização do estudo, além disso, outro fator que pode estar associado, é que apesar de ter a mesma composição, os biomateriais podem ter tratamentos diferentes na confecção de suas estruturas, como observamos nas duas membranas de colágeno bovino tipo 1. (Figura 8). No entanto, é preciso ter cuidado na interpretação dos resultados obtidos em testes *in vitro*, pois são testes sensíveis e que qualquer interferência pode alterar o comportamento celular.

Por outro lado, é importante lembrar que os resultados obtidos em teste *in vitro*, não podem criar as complexas interações das células *in vivo*. Sendo assim, novos estudos *in vivo*, utilizando os biomateriais do experimento, são necessários, a fim de confirmar os resultados presentes. A regeneração óssea guiada tem diferentes graus de sucesso, é dependente de varios fatores, como o tipo de membrana selecionada, da associação com outro biomaterial subjacente, facilidade de manipulação, tipo de defeito a ser regenerado, estabilidade da membrana. Logo, tão importante como as limitações clínicas, é necessário que as membranas tenham características físicas, química e biológicas favoráveis, sendo biocompatíveis, capazes de manter o arcabouço para regeneração e não desencadear respostas imunes e inflamatórias, ou seja, permanecer na região pelo tempo necessário, sem que seus resíduos prejudique o processo da RTG.

Avaliar, uma membrana importada, amplamente pesquisada e duas novas membranas nacionais é uma tentativa de levar ao clínico um material de qualidade mais acessível e com menor custo, sendo que estudo *in vitro* é a primeira etapa dos estudos com biomaterias.

Conclusão

6.CONCLUSÃO

A composição das membranas para a RTG apresenta efeito significativo na produção de fator TGF β 1, na viabilidade celular, morfologia e adesão das células, o comportamento expresso em 24 horas apresenta-se mais significativo quando PLA é aplicada, e alguns resultados mostram também em 24 horas, que COL1, apresentou comportamento igual ou semelhante a PLA. Porém, não houve efeitos negativos com qualquer dos materiais empregados, fato que sinaliza uma boa oportunidade de emprego clínico dos mesmos.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Alpar B, Leyhausen G, Gunay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. **Clin Oral Investig.** 2000;4(4):219-25.
2. Bashutski JD, Wang HL. Periodontal and endodontic regeneration. **J Endod.** 2009;35(3):321-8.
3. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. **Odontology.** 2008;96(1):1-11.
4. Berahim Z, Moharamzadeh K, Rawlinson A, Jowett AK. Biologic interaction of three-dimensional periodontal fibroblast spheroids with collagen-based and synthetic membranes. **J Periodontol.** 2011;82(5):790-7.
5. Bilir A, Aybar B, Tanrikulu SH, Issever H, Tuna S. Biocompatibility of different barrier membranes in cultures of human CRL 11372 osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. **Clin Oral Implants Res.** 2007;18(1):46-52.
6. Bornstein MM, Heynen G, Bosshardt DD, Buser D. Effect of two bioabsorbable barrier membranes on bone regeneration of standardized defects in calvarial bone: a comparative histomorphometric study in pigs. **J Periodontol.** 2009;80(8):1289-99.
7. Bottino MC, Thomas V, Janowski GM. A novel spatially designed and functionally graded electrospun membrane for periodontal regeneration. **Acta Biomater.** 2011;7(1):216-24.
8. Carpio L, Loza J, Lynch S, Genco R. Guided bone regeneration around endosseous implants with anorganic bovine bone mineral. A randomized controlled trial comparing bioabsorbable versus non-resorbable barriers. **J Periodontol.** 2000;71(11):1743-9.
9. Chandrhasa S, Murray PE, Namerow KN. Proliferation of mature ex vivo human dental pulp using tissue engineering scaffolds. **J Endod.** 2011;37(9):1236-9.
10. Cruz M. Regeneração Guiada Tecidual. Santos (Grupo GEN) 2006.
11. Darby I. Periodontal materials. **Aust Dent J.** 2011;56 Suppl 1(107-18.
12. El Helow K, El Askary Ael S. Regenerative barriers in immediate implant placement: a literature review. **Implant Dent.** 2008;17(3):360-71.
13. Gebhardt M, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Cell survival within pulp and periodontal constructs. **J Endod.** 2009;35(1):63-6.
14. Gupta D, Venugopal J, Mitra S, Giri Dev VR, Ramakrishna S. Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts. **Biomaterials.** 2009;30(11):2085-94.
15. Hefti AF. Periodontal probing. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1997;8(3):336-56.
16. Inanc B, Arslan YE, Seker S, Elcin AE, Elcin YM. Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. **J Biomed Mater Res A.** 2009;90(1):186-95.
17. Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. **J Periodontol.** 2001;72(3):314-23.
18. Jung RE, Kokovic V, Jurisic M, Yaman D, Subramani K, Weber FE. Guided bone regeneration with a synthetic biodegradable membrane: a comparative study in dogs. **Clin Oral Implants Res.** 2011;22(8):802-7.
19. Kasaj A, Reichert C, Gotz H, Rohrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. **Head Face Med.** 2008;4(22.

20. Kelsey WPT, Kalmar JR, Tatakis DN. Gingival cyst of the adult: regenerative therapy of associated root exposure. A case report and literature review. **J Periodontol.** 2009;80(12):2073-81.
21. Klinger A, Asad R, Shapira L, Zubery Y. *In vivo* degradation of collagen barrier membranes exposed to the oral cavity. **Clin Oral Implants Res.** 2010;21(8):873-6.
22. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Kenney EB, Vasilic N. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. **J Periodontol.** 2001;72(5):583-9.
23. Milella E, Barra G, Ramires PA, Leo G, Aversa P, Romito A. Poly(L-lactide)acid/alginate composite membranes for guided tissue regeneration. **J Biomed Mater Res.** 2001;57(2):248-57.
24. Minozzi S, Fornaciari G, Musco S, Catalano P. A gold dental prosthesis of Roman imperial age. **Am J Med.** 2007;120(5):e1-2.
25. Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, et al. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. **J Periodontol.** 2008;79(5):905-11.
26. Needleman I, Tucker R, Giedrys-Leeper E, Worthington H. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal infrabony defects. **J Periodontal Res.** 2002;37(5):380-8.
27. Oh SL, Fouad AF, Park SH. Treatment strategy for guided tissue regeneration in combined endodontic-periodontal lesions: case report and review. **J Endod.** 2009;35(10):1331-6.
28. Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. **Clin Oral Implants Res.** 2003;14(1):80-90.
29. Pagliaro U, Nieri M, Rotundo R, Cairo F, Carnevale G, Esposito M, et al. Clinical guidelines of the Italian Society of Periodontology for the reconstructive surgical treatment of angular bony defects in periodontal patients. **J Periodontol.** 2008;79(12):2219-32.
30. Parrish LC, Miyamoto T, Fong N, Mattson JS, Cerutis DR. Non-bioabsorbable vs. bioabsorbable membrane: assessment of their clinical efficacy in guided tissue regeneration technique. A systematic review. **J Oral Sci.** 2009;51(3):383-400.
31. Poiate IA, de Vasconcellos AB, de Santana RB, Poiate E. Three-dimensional stress distribution in the human periodontal ligament in masticatory, parafunctional, and trauma loads: finite element analysis. **J Periodontol.** 2009;80(11):1859-67.
32. Pretzl B, Kim TS, Holle R, Eickholz P. Long-term results of guided tissue regeneration therapy with non-resorbable and bioabsorbable barriers. IV. A case series of infrabony defects after 10 years. **J Periodontol.** 2008;79(8):1491-9.
33. Ranney RR. Diagnosis of periodontal diseases. **Adv Dent Res.** 1991;5(21-36).
34. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. **Clin Oral Implants Res.** 2010;21(6):567-76.
35. Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently ligated collagen membranes: an experimental study in the rat. **Clin Oral Implants Res.** 2005;16(3):369-78.
36. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. **Clin Oral Implants Res.** 2004;15(4):443-9.
37. Santana RB, de Mattos CM, Van Dyke T. Efficacy of combined regenerative treatments in human mandibular class II furcation defects. **J Periodontol.** 2009;80(11):1756-64.
38. Sanz M, Tonetti MS, Zabalegui I, Sicilia A, Blanco J, Rebelo H, et al. Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or barrier membranes: results from a multicenter practice-based clinical trial. **J Periodontol.** 2004;75(5):726-33.

39. Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). **Biomaterials**. 1997;18(7):535-8.
40. Sculean A, Donos N, Miliauskaitė A, Arweiler N, Brex M. Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or bioabsorbable membranes. A 4-year follow-up split-mouth study. **J Periodontol**. 2001;72(12):1695-701.
41. Simain-Sato F, Lahmouzi J, Kalykakis GK, Heinen E, Defresne MP, De Pauw MC, et al. Culture of gingival fibroblasts on bioabsorbable regenerative materials in vitro. **J Periodontol**. 1999;70(10):1234-9.
42. Thangakumaran S, Sudarsan S, Arun KV, Talwar A, James JR. Osteoblast response (initial adhesion and alkaline phosphatase activity) following exposure to a barrier membrane/enamel matrix derivative combination. **Indian J Dent Res**. 2009;20(1):7-12.
43. Trejo PM, Weltman R, Caffesse R. Treatment of intraosseous defects with bioabsorbable barriers alone or in combination with decalcified freeze-dried bone allograft: a randomized clinical trial. **J Periodontol**. 2000;71(12):1852-61.
44. Tsesis I, Rosen E, Tamse A, Taschieri S, Del Fabbro M. Effect of guided tissue regeneration on the outcome of surgical endodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. **J Endod**. 2011;37(8):1039-45.

Anexos

ANEXOS

Análise estatística – teste de MTT – Osteoblastos

Two Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

Balanced Design

Dependent Variable: Variável

Normality Test: Passed ($P = 0,069$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0,131$)

Source of Variation DF SS MS F P

Grupo 3 0,109 0,0363 7,230 <0,001

Tempo 2 0,402 0,201 40,000 <0,001

Grupo x Tempo 6 0,0672 0,0112 2,231 0,056

Residual 48 0,241 0,00502

Total 59 0,819 0,0139

The difference in the mean values among the different levels of Grupo is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Tempo. There is a statistically significant difference ($P = <0,001$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Tempo is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Grupo. There is a statistically significant difference ($P = <0,001$). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of Grupo does not depend on what level of Tempo is present. There is not a

statistically significant interaction between Grupo and Tempo. ($P = 0,056$)

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Grupo : 0,959

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Tempo : 1,000

Power of performed test with $\alpha = 0,0500$: for Grupo x Tempo : 0,431

Least square means for Grupo :

Group Mean

Controle 0,324

M1 0,427

M2 0,356

M3 0,321

Std Err of LS Mean = 0,0183

Least square means for Tempo :

Group Mean

4 horas 0,251

12 horas 0,369

24 horas 0,450

Std Err of LS Mean = 0,0158

Least square means for Grupo x Tempo :

Group Mean

Controle x 4 horas 0,242

Controle x 12 horas 0,319

Controle x 24 horas 0,412

M1 x 4 horas 0,252

M1 x 12 horas 0,457

M1 x 24 horas 0,572

M2 x 4 horas 0,243

M2 x 12 horas 0,388

M2 x 24 horas 0,437

M3 x 4 horas 0,268

M3 x 12 horas 0,314

M3 x 24 horas 0,381

Std Err of LS Mean = 0,0317

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Grupo**

Comparison Diff of Means p q P P<0,050

M1 vs. M3 0,106 4 5,785 0,001 Yes

M1 vs. Controle 0,103 4 5,618 0,001 Yes

M1 vs. M2 0,0711 4 3,887 0,041 Yes

M2 vs. M3 0,0347 4 1,898 0,541 No

M2 vs. Controle 0,0317 4 1,730 0,615 Do Not Test
Controle vs. M3 0,00307 4 0,168 0,999 Do Not Test

Comparisons for factor: **Tempo**

Comparison Diff of Means p q P P<0,050

24 horas vs. 4 horas 0,199 3 12,576 <0,001 Yes
24 horas vs. 12 horas 0,0809 3 5,108 0,002 Yes
12 horas vs. 4 horas 0,118 3 7,468 <0,001 Yes

Comparisons for factor: **Tempo within Controle**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 4 horas 0,170 3 5,363 0,001 Yes
24 horas vs. 12 horas 0,0930 3 2,934 0,106 No
12 horas vs. 4 horas 0,0770 3 2,429 0,209 No

Comparisons for factor: **Tempo within M1**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 4 horas 0,320 3 10,083 <0,001 Yes
24 horas vs. 12 horas 0,115 3 3,628 0,035 Yes
12 horas vs. 4 horas 0,205 3 6,455 <0,001 Yes

Comparisons for factor: **Tempo within M2**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 4 horas 0,194 3 6,121 <0,001 Yes
24 horas vs. 12 horas 0,0484 3 1,527 0,531 No
12 horas vs. 4 horas 0,146 3 4,594 0,006 Yes

Comparisons for factor: **Tempo within M3**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 4 horas 0,114 3 3,584 0,038 Yes
24 horas vs. 12 horas 0,0674 3 2,126 0,298 No
12 horas vs. 4 horas 0,0462 3 1,458 0,561 No

Comparisons for factor: **Grupo within 4 horas**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

M3 vs. Controle 0,0260 4 0,820 0,938 No
M3 vs. M2 0,0252 4 0,795 0,943 Do Not Test
M3 vs. M1 0,0156 4 0,492 0,985 Do Not Test

M1 vs. Controle 0,0104 4 0,328 0,996 Do Not Test
 M1 vs. M2 0,00960 4 0,303 0,997 Do Not Test
 M2 vs. Controle 0,000800 4 0,0252 1,000 Do Not Test

Comparisons for factor: **Grupo within 12 horas**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

M1 vs. M3 0,143 4 4,505 0,013 Yes
 M1 vs. Controle 0,138 4 4,354 0,018 Yes
 M1 vs. M2 0,0686 4 2,164 0,428 No
 M2 vs. M3 0,0742 4 2,341 0,358 No
 M2 vs. Controle 0,0694 4 2,190 0,418 Do Not Test
 Controle vs. M3 0,00480 4 0,151 1,000 Do Not Test

Comparisons for factor: **Grupo within 24 horas**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

M1 vs. M3 0,190 4 6,007 <0,001 Yes
 M1 vs. Controle 0,160 4 5,048 0,005 Yes
 M1 vs. M2 0,135 4 4,265 0,021 Yes
 M2 vs. M3 0,0552 4 1,742 0,610 No
 M2 vs. Controle 0,0248 4 0,782 0,945 Do Not Test
 Controle vs. M3 0,0304 4 0,959 0,905 Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two

means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no

difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a

procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Análise estatística – teste de MTT - Fibroblastos

Two Way Analysis of Variance

Data source: Data 2 in Notebook1

Balanced Design

Dependent Variable: Variável

Normality Test: Passed (P = 0,291)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,995)

Source of Variation DF SS MS F P

Grupo 3 0,0957 0,0319 19,838 <0,001

Tempo 2 0,0830 0,0415 25,815 <0,001

Grupo x Tempo 6 0,0120 0,00199 1,240 0,303

Residual 48 0,0772 0,00161

Total 59 0,268 0,00454

The difference in the mean values among the different levels of Grupo is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Tempo. There is a statistically significant difference (P = which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The difference in the mean values among the different levels of Tempo is greater than would be expected by chance after allowing for effects of differences in Grupo. There is a statistically significant difference (P = <0,001). To isolate which group(s) differ from the others use a multiple comparison procedure.

The effect of different levels of Grupo does not depend on what level of Tempo is present. There is not a statistically significant interaction between Grupo and Tempo. (P = 0,303)

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Grupo : 1,000

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Tempo : 1,000

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Grupo x Tempo : 0,106

Least square means for Grupo :

Group Mean

Controle 0,244

M1 0,348

M2 0,299

M3 0,261

Std Err of LS Mean = 0,0104

Least square means for Tempo :

Group Mean

4 horas 0,295

12 horas 0,239

24 horas 0,329

Std Err of LS Mean = 0,00897

Least square means for Grupo x Tempo :

Group Mean

Controle x 4 horas 0,247

Controle x 12 horas 0,179

Controle x 24 horas 0,305

M1 x 4 horas 0,354

M1 x 12 horas 0,300

M1 x 24 horas 0,389

M2 x 4 horas 0,313

M2 x 12 horas 0,237

M2 x 24 horas 0,347

M3 x 4 horas 0,266

M3 x 12 horas 0,240

M3 x 24 horas 0,276

Std Err of LS Mean = 0,0179

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Grupo**

Comparison Diff of Means p q P P<0,050

M1 vs. Controle 0,104 4 10,031 <0,001 Yes

M1 vs. M3 0,0871 4 8,415 <0,001 Yes

M1 vs. M2 0,0490 4 4,732 0,009 Yes

M2 vs. Controle 0,0549 4 5,299 0,003 Yes

M2 vs. M3 0,0381 4 3,683 0,057 No

M3 vs. Controle 0,0167 4 1,616 0,665 No

Comparisons for factor: **Tempo**

Comparison Diff of Means p q P P<0,050

24 horas vs. 12 horas 0,0903 3 10,064 <0,001 Yes

24 horas vs. 4 horas 0,0342 3 3,814 0,026 Yes

4 horas vs. 12 horas 0,0560 3 6,250 <0,001 Yes

Comparisons for factor: **Tempo within Controle**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 12 horas 0,126 3 7,036 <0,001 Yes

24 horas vs. 4 horas 0,0580 3 3,234 0,067 No

4 horas vs. 12 horas 0,0682 3 3,803 0,026 Yes

Comparisons for factor: **Tempo within M1**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 12 horas 0,0888 3 4,951 0,003 Yes

24 horas vs. 4 horas 0,0352 3 1,963 0,355 No

4 horas vs. 12 horas 0,0536 3 2,989 0,098 No

Comparisons for factor: **Tempo within M2**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 12 horas 0,110 3 6,122 <0,001 Yes

24 horas vs. 4 horas 0,0340 3 1,896 0,380 No

4 horas vs. 12 horas 0,0758 3 4,226 0,012 Yes

Comparisons for factor: **Tempo within M3**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

24 horas vs. 12 horas 0,0362 3 2,018 0,335 No

24 horas vs. 4 horas 0,00960 3 0,535 0,924 Do Not Test

4 horas vs. 12 horas 0,0266 3 1,483 0,550 Do Not Test

Comparisons for factor: **Grupo within 4 horas**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

M1 vs. Controle 0,107 4 5,944 <0,001 Yes

M1 vs. M3 0,0876 4 4,884 0,006 Yes

M1 vs. M2 0,0412 4 2,297 0,375 No

M2 vs. Controle 0,0654 4 3,646 0,061 No

M2 vs. M3 0,0464 4 2,587 0,273 Do Not Test

M3 vs. Controle 0,0190 4 1,059 0,877 Do Not Test

Comparisons for factor: **Grupo within 12 horas**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

M1 vs. Controle 0,121 4 6,758 <0,001 Yes

M1 vs. M2 0,0634 4 3,535 0,073 No

M1 vs. M3 0,0606 4 3,379 0,093 Do Not Test

M3 vs. Controle 0,0606 4 3,379 0,093 No

M3 vs. M2 0,00280 4 0,156 1,000 Do Not Test

M2 vs. Controle 0,0578 4 3,223 0,117 Do Not Test

Comparisons for factor: **Grupo within 24 horas**

Comparison Diff of Means p q P P<0,05

M1 vs. M3 0,113 4 6,312 <0,001 Yes

M1 vs. Controle 0,0838 4 4,672 0,010 Yes

M1 vs. M2 0,0424 4 2,364 0,350 No

M2 vs. M3 0,0708 4 3,948 0,037 Yes

M2 vs. Controle 0,0414 4 2,308 0,371 No

Controle vs. M3 0,0294 4 1,639 0,655 No

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two

means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no

difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a

procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Análise estatística – teste de ELISA - Osteoblastos**Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks**

Data source: Data 3 in Notebook1

Dependent Variable: Viabilidade

Group N Missing Median 25% 75%

C 4 horas 5 0 147,619 147,586 147,744

M1 4 horas 5 0 147,880 147,820 148,288

M2 4 horas 5 0 147,713 147,658 147,771

M3 4 horas 5 0 147,676 147,633 147,773

H = 8,066 with 3 degrees of freedom. (P = 0,045)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by

chance; there is a statistically significant difference (P = 0,045)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison Diff of Ranks q P<0,05

M2 4 horas vs M3 4 horas 58,000 4,384 Yes

M2 4 horas vs C 4 horas 51,000 3,855 Yes

M2 4 horas vs M1 4 horas 9,000 0,680 No

M1 4 horas vs M3 4 horas 49,000 3,704 Yes

M1 4 horas vs C 4 horas 42,000 3,175 Yes

C 4 horas vs M3 4 horas 7,000 0,529 No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 3 in Notebook1

Dependent Variable: Col 5

Group N Missing Median 25% 75%

C 24 horas 5 0 147,796 147,721 148,134

M1 24 horas 5 0 4347,530 3701,797 4570,797

M2 24 horas 5 0 5715,000 3751,250 6064,000

M3 24 horas 5 0 147,667 147,588 148,238

H = 14,657 with 3 degrees of freedom. (P = 0,002)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by

chance; there is a statistically significant difference (P = 0,002)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison Diff of Ranks q $P < 0,05$

M1 24 horas vs C 24 horas 49,500 3,742 No

M1 24 horas vs M3 24 horas 39,500 2,986 No

M1 24 horas vs M2 24 horas 37,000 2,797 Do Not Test

M2 24 horas vs C 24 horas 12,500 0,945 No

M2 24 horas vs M3 24 horas 2,500 0,189 Do Not Test

M3 24 horas vs C 24 horas 10,000 0,756 Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

Mann-Whitney Rank Sum Test segunda-feira, janeiro 09, 2012, 16:33:04

Data source: Data 3 in Notebook1

Equal Variance Test: Passed ($P = 0,151$)

Group N Missing Median 25% 75%

Controle 4 horas 5 0 147,619 147,586 147,744

Controle 24 horas 5 0 147,796 147,721 148,134

Mann-Whitney U Statistic= 3,500

$T = 36,500$ $n(\text{small}) = 5$ $n(\text{big}) = 5$ $P(\text{est.}) = 0,075$ $P(\text{exact}) = 0,056$

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility

that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0,056$)

Mann-Whitney Rank Sum Test

Data source: Data 3 in Notebook1

Equal Variance Test: Failed ($P < 0,050$)

Group N Missing Median 25% 75%

M1 4 horas 5 0 147,880 147,820 148,288

M1 24 horas 5 0 4347,530 3701,797 4570,797

Mann-Whitney U Statistic= 0,000

T = 40,000 n(small)= 5 n(big)= 5 P(est.)= 0,012 P(exact)= 0,008

The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance;

there is a statistically significant difference (P = 0,008)

Mann-Whitney Rank Sum Test segunda-feira, janeiro 09, 2012, 16:33:56

Data source: Data 3 in Notebook1

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group N Missing Median 25% 75%

M2 4 horas 5 0 147,713 147,658 147,771

M2 24 horas 5 0 5715,000 3751,250 6064,000

Mann-Whitney U Statistic= 0,000

T = 40,000 n(small)= 5 n(big)= 5 P(est.)= 0,012 P(exact)= 0,008

The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance;

there is a statistically significant difference (P = 0,008)

Mann-Whitney Rank Sum Test

Data source: Data 3 in Notebook1

Group N Missing Median 25% 75%

M3 4 horas 5 0 147,676 147,633 147,773

M3 24 horas 5 0 147,667 147,588 148,238

Mann-Whitney U Statistic= 12,000

T = 28,000 n(small)= 5 n(big)= 5 P(est.)= 1,000 P(exact)= 1,000

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility

that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P= 1,000)

Análise estatística – teste de ELISA - Fibroblastos

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Copy of Data 3 in Notebook1

Equal Variance Test: Failed ($P < 0,050$)

Group N Missing Median 25% 75%

Controle 4 horas 5 0 148,037 147,627 149,682

M1 4 horas 5 0 147,958 147,724 148,340

M2 4 horas 5 0 147,764 147,639 147,843

M3 4 horas 5 0 147,722 147,617 147,945

$H = 2,178$ with 3 degrees of freedom. ($P = 0,536$)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0,536$)

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks segunda-feira, janeiro 09, 2012, 16:46:26

Data source: Copy of Data 3 in Notebook1

Group N Missing Median 25% 75%

Controle 24 horas 5 0 148,030 147,967 148,385

M1 24 horas 5 0 2972,884 2741,273 3762,443

M2 24 horas 5 0 148,949 148,618 149,133

M3 24 horas 5 0 148,007 147,780 149,093

$H = 11,994$ with 3 degrees of freedom. ($P = 0,007$)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = 0,007$)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method)

:

Comparison Diff of Ranks q $P < 0,05$

M1 24 horas vs M3 24 horas 58,000 4,384 Yes

M1 24 horas vs Controle 24 h 54,000 5,400 Yes

M1 24 horas vs M2 24 horas 38,000 5,613 Yes

M2 24 horas vs M3 24 horas 20,000 2,000 No

M2 24 horas vs Controle 24 h 16,000 2,363 Do Not Test

Controle 24 h vs M3 24 horas 4,000 0,591 Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1).

Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

Mann-Whitney Rank Sum Test

Data source: Copy of Data 3 in Notebook1

Group N Missing Median 25% 75%

Controle 4 horas 5 0 148,037 147,627 149,682

Controle 24 horas 5 0 148,030 147,967 148,385

Mann-Whitney U Statistic= 12,000

T = 28,000 n(small)= 5 n(big)= 5 P(est.)= 1,000 P(exact)= 1,000

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility

that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P= 1,000)

Mann-Whitney Rank Sum Test

Data source: Copy of Data 3 in Notebook1

Equal Variance Test: Passed (P = 0,060)

Group N Missing Median 25% 75%

M1 4 horas 5 0 147,958 147,724 148,340

M1 24 horas 5 0 2972,884 2741,273 3762,443

Mann-Whitney U Statistic= 0,000

$T = 15,000$ $n(\text{small}) = 5$ $n(\text{big}) = 5$ $P(\text{est.}) = 0,012$ $P(\text{exact}) = 0,008$

The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance;

there is a statistically significant difference ($P = 0,008$)

Mann-Whitney Rank Sum Test segunda-feira, janeiro 09, 2012, 16:49:17

Data source: Copy of Data 3 in Notebook1

Equal Variance Test: Passed ($P = 0,055$)

Group N Missing Median 25% 75%

M2 4 horas 5 0 147,764 147,639 147,843

M2 24 horas 5 0 148,949 148,618 149,133

Mann-Whitney U Statistic= 0,000

$T = 15,000$ $n(\text{small}) = 5$ $n(\text{big}) = 5$ $P(\text{est.}) = 0,268$ $P(\text{exact}) = 0,234$

The difference in the median values between the two groups is greater than would be expected by chance;

there is a statistically significant difference ($P = 0,234$)

Mann-Whitney Rank Sum Test

Data source: Copy of Data 3 in Notebook1

Equal Variance Test: Passed ($P = 0,179$)

Group N Missing Median 25% 75%

M3 4 horas 5 0 147,722 147,617 147,945

M3 24 horas 5 0 148,007 147,780 149,093

Mann-Whitney U Statistic= 5,000

$T = 20,000$ $n(\text{small}) = 5$ $n(\text{big}) = 5$ $P(\text{est.}) = 0,144$ $P(\text{exact}) = 0,151$

The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility

that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0,151$)