

DANIELLA CRISTINA BORGES

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA *IN VITRO* DA
DISPERSÃO DE DOXICICLINA IMPREGNADA EM
MEMBRANAS ABSORVÍVEIS UTILIZADAS NOS
PROCEDIMENTOS REGENERATIVOS
PERIODONTAIS E IMPLANTARES

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de concentração em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Batistas Melo

Uberlândia-MG

2008

Daniella Cristina Borges

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA *IN VITRO* DA
DISPERSÃO DE DOXICICLINA IMPREGNADA A
MEMBRANAS ABSORVÍVEIS UTILIZADAS NOS
PROCEDIMENTOS REGENERATIVOS
PERIODONTAIS E IMPLANTARES

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em
Odontologia, Área de concentração em
Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Batistas Melo

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Denildo de Magalhães
Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi
Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga

Uberlândia, 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B732a Borges, Daniella Cristina, 1978-

Análise microbiológica *in vitro* da dispersão de doxiciclina impregnada a membranas absorvíveis utilizadas nos procedimentos regenerativos periodontais e implantares / Daniella Cristina Borges. - 2008.

75 f. : il.

Orientador: Denildo de Magalhães.

Co-orientador: Geraldo Batistas Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Periodontia - Teses. 2. Periodontite - Teses. 3. Tetraciclina - Teses. I. Magalhães, Denildo de. II. Melo, Geraldo Batistas. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU:

616.314.17-008.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AV. Pará, 1720, bloco 2u – sala 2U09 – Campus Umuarama - UBERLÂNDIA –MG – 38400-902
(0XX) 034 –3218-2550

RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA PROVA DEFESA DE MESTRADO DA CD DANIELLA CRISTINA BORGES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.

Às nove horas do dia **vinte e nove de fevereiro** do ano de **dois mil e oito**, reuniu-se a Comissão Julgadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação desta Faculdade, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata, DANIELLA CRISTINA BORGES com o título: *Análise Microbiológica in vitro da dispersão de doxiciclina incorporada a membranas absorvíveis utilizadas nos procedimentos regenerativos periodontais e implantares*. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador expressou o seu julgamento em sessão secreta e 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.

Uberlândia 29 de fevereiro de 2008

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

Aprovado/Reprovado/Conceito

Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado/Conceito

Prof. Dr. Eulázio Mikio Taga
Titulação: Doutor
Universidade de São Paulo – USP-Bauru

Aprovado/Reprovado/Conceito

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Baltazar e Maria Helena, que com o seu carinho e apoio incondicionais permitiram a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

Para Leonardo que com seu amor e paciência, sempre esteve ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

Aos meus irmãos que mesmo distantes nunca deixaram de torcer por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Denildo de Magalhães, Titular da Disciplina de Periodontia da Universidade Federal de Uberlândia, o qual me transmitiu não apenas seu grande conhecimento e experiência, mas também os maiores valores referentes a respeito, honestidade e caráter que devemos adotar durante nosso convívio profissional e social. Obrigado pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao amigo e professor Ms. Helder Henrique Machado de Menezes, que juntamente com Prof. Dr. Denildo tem me apoiado desde o início de minha carreira, oferecendo-me além de sua amizade, grandes oportunidades de crescimento pessoal e profissional através de sua experiência e garra para enfrentar as dificuldades.

Ao Professor Dr. Geraldo Batista Melo pela sua ajuda e co-orientação durante a confecção deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia, Ricardo de Oliveira França, por toda paciência e ajuda durante a parte experimental do trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, representado pelo Prof. Dr. Carlos José Soares Coordenador de Pesquisa e Pós-Graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
3. PROPOSIÇÃO	28
4. MATERIAL E MÉTODO	30
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	74

RESUMO

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar comparativamente por meio de análises microbiológicas *in vitro* a capacidade e o tempo de inibição do crescimento bacteriano das membranas absorvíveis de osso bovino impregnadas com doxiciclina e compará-las com as impregnadas com cloridrato de tetraciclina. Três variações da membrana absorvível derivada de osso bovino, provenientes do laboratório de Bioquímica da USP- Bauru foram testadas, a convencional (C), impregnada com cloridrato de tetraciclina (T) e impregnada com doxiciclina (D). Análises microbiológicas baseadas nos testes de sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos foram feitas. Em placas com os meios de cultura apropriados foram semeadas bactérias aeróbias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), e um “pool” de bactérias anaeróbias” proveniente de material coletado em bolsas periodontais. Cada placa foi dividida em quatro regiões e 3 amostras padronizadas das membranas depositadas, mantendo uma área sem amostra para confirmar o crescimento bacteriano. Utilizou-se a membrana convencional (C) para verificar se esta apresentava propriedades antimicrobianas e nas outras duas regiões foram colocadas as amostras de (D) e (T). Foram feitas três placas (1,2 e 3) para cada grupo bacteriano, sendo os fragmentos de membrana convencional, doxiciclina e cloridrato de tetraciclina denominados (C1/D1/T1; C2/D2/T2; C3/D3/T3) respectivamente. As placas de aeróbios foram incubadas em estufa a 35 °C e as de anaeróbios em jarra de anaerobiose. Análises semanais com a troca das amostras para novas placas foram feitas e a capacidade das membranas em inibir o crescimento bacteriano avaliada a partir da formação nas placas de halos de inibição ao redor de cada amostra, as quais tiveram seus diâmetros aferidos com paquímetro digital. A presença dos halos e a integridade das amostras determinaram o tempo do experimento. Os resultados mostraram que em todas as placas dos três grupos bacterianos, onde as amostras de (C) estavam presentes não ocorreu nenhum tipo de inibição de crescimento bacteriano, não sendo formado nenhum halo. Quanto às áreas onde foram aplicadas amostras de (D), tanto para a cultura de *E.coli* quanto para de *S.aureus*, foram observados halos de inibição por até 35 dias. Para a membrana (T) foram observados halos de inibição em até 28 dias, exceto para *E.coli* (14 dias). Em relação ao “pool anaeróbio”, ambas as membranas (D) e (T), apresentaram o período máximo de inibiçãp por 21 dias, exceto a amostra de (D) presente na placa 2, onde aos 28 dias o halo estava presente.

Palavras-chave: membrana absorvível, regeneração tecidual guiada, tetraciclina e doxiciclina.

ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, by means of microbiological *in vitro* analyses, the capacity and the inhibition period of bacterial growth of the resorbable membranes of bovine bone doxycycline loaded and to compare them with the tetracycline hydrochloride loaded ones. Three variations of the resorbable membrane of bovine bone from the Biochemist laboratory of USP-Bauru were tested: conventional (C), tetracycline loaded (T) and doxycycline loaded (D). Microbiological analyses based in tests of *in vitro* sensibility to antimicrobials were made. Aerobic bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and a pool of nonaerobic bacteria were sown in plates with appropriate media cultures proceeding from the material collected into periodontal pockets. Each plate was divided in four regions and 3 standardized samples of the membranes were deposited, keeping an area without sample to confirm the bacterial growth. It was used a conventional membrane (C) to verify if it presented antimicrobial properties and in the other two regions it was placed (D) and (T) samples. Three plates (1, 2 and 3) were made for each bacterial group, being the doxycycline and tetracycline hydrochloride fragments called (C1/D1/T1; C2/D2/T2; C3/D3/T3) respectively. The aerobic plates were kept into a greenhouse at 35 °C and the nonaerobic ones were kept into a specific anaerobic storage jar. Weekly analyses exchanging the fragments for new plates were made and the capacity of the membranes in inhibiting the evaluated bacterial growth from the formation of inhibition halos around of each sample, which had its diameters surveyed with a digital caliper. The halos presence and the integrity of the samples determined the time of the experiment. The results showed that in all plates of the three bacterial groups, where the samples of (C) were present, did not occur an inhibition of the bacterial growth, thus presenting no halo. In the areas where the membrane was placed (D), as for the *E.coli* and *S.aureus* culture, it was observed inhibition halos up to 35 days. It was observed inhibition halos in the membrane (T) areas up to 28 days, except for *E.coli* (14 days). For both membranes (D) and (T), the maximum inhibition period for the anaerobic pool was 21 days, except for sample (D) present in plate 2, where the halo was present at the 28th day.

Keywords: resorbable membrane, guided tissue regeneration, tetracycline and doxycycline.

1 - INTRODUÇÃO

A terapia periodontal apresenta dois objetivos principais: redução ou eliminação da inflamação tecidual induzida pelo biofilme dental com seus subprodutos e correção dos defeitos anatômicos causados pelo processo da doença, restabelecendo a integridade da inserção dental (Wang *et al.*, 1998). Em estágios avançados da doença, cirurgias ressectivas tradicionais mostram-se eficazes em interromper a progressão da mesma, por facilitarem a remoção dos depósitos subgengivais e devolver a morfologia dos tecidos periodontais de sustentação e revestimento (Lindhe, 2005). Todavia são limitadas no sentido de promover uma regeneração significativa do periodonto (Karring *et al.*, 1993).

Na presença destas limitações, técnicas regenerativas foram recomendadas para inibir o crescimento dos tecidos indesejáveis, principalmente o epitelial que apresenta velocidade de crescimento maior que os tecidos conjuntivo e ósseo (Caton *et al.*, 1976). Fundamentados nos mecanismos de manipulação celular por meio de barreiras físicas, os procedimentos regenerativos buscam a colonização do defeito a ser reconstruído por células viáveis, capazes de promover a regeneração periodontal. Essas barreiras foram desenvolvidas e testadas, sendo classificadas em membranas não absorvíveis e absorvíveis (Black *et al.*, 1994; Christgau *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2000; Bunyaratavej & Wang 2001; Kim *et al.*, 2002).

Embora ambos os tipos de membrana, atendam aos objetivos biológicos e mecânicos dos eventos regenerativos, existe a possibilidade da exposição destas após sua utilização cirúrgica, com conseqüente contaminação da área (Slots *et al.*, 1999; Sbordone *et al.*, 1999). A exposição é a principal complicação do tratamento, com prevalência variando de 50 a 100% (Trombelli *et al.*, 1997). Infecções nos locais tratados com RTG estão comumente associadas a contaminações das membranas expostas precocemente (Ling *et al.* 2003), influenciando de forma negativa o ganho de inserção e a regeneração dos tecidos, podendo ainda acelerar o processo de degradação da membrana (Cristina *et al.*, 1987; Selvig *et al.*, 1990; Wakabayashi *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997).

Este fato chamou a atenção dos pesquisadores quanto à necessidade de desenvolver uma barreira que possua não só de uma correta capacidade oclusiva para o isolamento da área, mas também que garanta uma maior proteção inclusive quanto a possíveis contaminações bacterianas (Sbordone *et al.*, 2000). Para tal, as membranas absorvíveis apresentam um significativo destaque, devido à sua capacidade de permitir a incorporação a elas de agentes antimicrobianos. Dentre os mais comumente empregados temos a tetraciclina e seus derivados.

Pesquisas relatam o uso da tetraciclina em associação à biomateriais para o tratamento de defeitos ósseos, afirmando ser uma técnica muito efetiva em conjunto com a RTG (Chung *et al.*, 1997; Sbordone *et al.*, 2000; Harris 2002) e a associação desses agentes utilizados localmente, no tratamento de exposições de membrana também já foi relatada (Zucchelli *et al.*, 1999) por promover a descontaminação da área e auxiliar na regeneração dos tecidos perdidos (Alger *et al.*, 1990; Drury *et al.*, 1991; Rosenberg & Rose 1998; Delaissé *et al.*, 2000; Houser *et al.*, 2001, Bettany *et al.*, 2000). Membranas absorvíveis de ácido polilático tratadas com tetraciclina também foram desenvolvidas e testadas mostrando melhores resultados do que as sem antimicrobiano (Park *et al.*, 2000).

Recentemente foi lançada no mercado brasileiro uma membrana derivada da matriz orgânica bovina desmineralizada, a qual vem sendo largamente utilizada na clínica odontológica, por apresentar custo acessível e qualidade clínica comprovada (Taga *et al.*, 1997; Herculani, 2000) Esta membrana foi patenteada com o nome de Gen-derm (Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil).

Estudos com esta membrana vêm sendo desenvolvidos, e a presença do agente antimicrobiano na mesma também avaliada. Silva, (2003) avaliou através de testes *in vitro* a membrana de osso bovino impregnada com cloridrato de tetraciclina comparando-a com a membrana convencional e também com outra que apresentava metronidazol. O nível e o tempo de dispersão dos agentes antimicrobianos nas membranas foram analisados e os resultados mostraram que a membrana com o cloridrato de tetraciclina

apresentou os melhores resultados *in vitro*, com uma capacidade máxima de inibição das cepas aeróbias e anaeróbias testadas em até 21 dias.

Motão (2004), avaliou através de seu estudo *in vivo* a eficácia desta membrana utilizando-a como um dispositivo de liberação local, em terapia adjunta ao tratamento periodontal não cirúrgico concluindo que a utilização da membrana como dispositivo de liberação controlada associada à terapia mecânica, foi mais eficiente na melhora dos parâmetros clínicos, do que somente raspagem e alisamento radicular.

Oliveira (2003), também avaliou as membranas derivadas de matriz orgânica bovina desmineralizada impregnadas ou não com o cloridrato de tetraciclina implantando-as em subcutâneo de ratos. A resposta celular frente à presença destas membranas e o tempo de absorção das mesmas foram analisados através de testes histológicos e bioquímicos. Os resultados mostraram que a membrana é bem tolerada pelos tecidos sendo totalmente absorvida no período de 30-60 dias.

Dentre os vários outros agentes bacterianos empregados na terapia periodontal, um destaque tem sido dado aos derivados da tetraciclina, principalmente a doxiciclina. Estudos recentes têm destacado as vantagens deste antimicrobiano frente as demais tetraciclinas, quando do seu uso em conjunto com a terapia periodontal, principalmente com relação a sua atuação na microbiota periodontopatogênica (Lakahssassi *et al.*, 2005). Seu emprego em baixas dosagens (Xajigerorgiou *et al.*, 2006; Preshaw *et al.*, 2004; Golub *et al.*, 2001), ou associado a dispositivos de liberação local (Polson *et al.*, 1997; Garret *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2004; Machion *et al.*, 2004; Tomasi *et al.*, 2004; Machion., 2006), apresenta propriedades não só antimicrobianas, como também atividade anticolagenase e antimetaloproteinases, contribuindo com a inibição da reabsorção óssea (Bezerra *et al.*, 2002).

Considerando-se os bons resultados apresentados pelos procedimentos regenerativos quando da presença local de antimicrobianos e os estudos que demonstram resultados satisfatórios com relação à capacidade das membranas absorvíveis de osso bovino em proporcionar a absorção e dispersão de agentes antimicrobianos, passa a ser viável inferirmos sobre a

possibilidade de utilização destas não somente como recurso de seleção celular, mas também como proteção da ferida cirúrgica.

Baseando-se nestes aspectos e tendo em vista a eficácia comprovada da utilização local de doxiciclina associada ao tratamento periodontal, nosso estudo tem como objetivo avaliar microbiologicamente através de testes *in vitro* as membranas absorvíveis derivadas de osso bovino, convencional, impregnadas com tetraciclina e com doxiciclina.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Etiologia da doença periodontal

As periodontopatias na sua grande maioria têm sua etiologia relacionada ao biofilme dental, resultando como consequência da sua evolução e uma progressiva perda de inserção dental. Armitage *et al.* (1994); Socransky & Haffajee (1993), em seus estudos demonstraram que a presença do biofilme dental bacteriano é a causa primária para o estabelecimento e progressão da doença.

Loe *et al.* (1965), comprovaram a íntima relação existente entre a presença da placa bacteriana e o desenvolvimento da gengivite. Em um estudo clínico os autores acompanharam o acúmulo de placa bacteriana presente ao longo da margem gengival de 12 indivíduos. Passados 21 dias do início da experiência constatou-se que em todos os pacientes a gengivite havia se instalado e a microbiota passou de uma composição relativamente simples para uma composição mais complexa. Na medida em que o retorno dos procedimentos de higiene bucal eram iniciados e mantidos, o tecido gengival tornava-se novamente saudável e sem nenhuma seqüela. Assim, o acúmulo do biofilme sobre as superfícies dentárias induz uma resposta inflamatória nos tecidos gengivais adjacentes e em contrapartida a sua completa remoção resulta no desaparecimento dos sinais clínicos da inflamação (Theilade *et al.*, 1966).

Por sua vez Socransky em 1970 sugere a possibilidade da doença periodontal ser fruto da habilidade de vários tipos de microrganismos em se acumular na placa, sendo isto um pré-requisito para o início da destruição do periodonto. As bactérias presentes na placa supra e subgengival eram o principal fator etiológico da doença e o seu caráter destrutivo e sua progressão relacionados com a presença de menor ou maior quantidade desta, o que garantirá a presença dos microrganismos periodontopatogênicos. Dentre os principais destacam-se *porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Actinibacillus actinomycetecomitans*, *Bacterioides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, espécies de *Selenomonas*, *Campylobacter*, *Capnocytopaga* e *Eikenella corrodens* (Slots, 2002).

O efeito deletério do biofilme bacteriano também foi confirmado por Socransky & Haffajee (2002), onde os mesmos relatam a presença de propriedades metabólicas no biofilme que garantem proteção aos microorganismos colonizadores, contra as defesas naturais do organismo, aumentando assim a resistência das mesmas.

Inicialmente a relação direta entre a presença de um maior número de bactérias e o seu efeito periodontopatogênico foi aceita, contudo as diferenças biológicas do biofilme ainda não eram relevantes (hipótese da placa inespecífica) (Theilade, 1966). Posteriormente outros estudos longitudinais Slots, (1977) e Newman *et al.* (1977), mostraram riscos maiores de destruição periodontal nos sítios colonizados por algumas espécies de bactérias potencialmente patogênicas, destacando assim a especificidade do biofilme bacteriano (hipótese da placa específica) (Löesche, 1979). Além da especificidade bacteriana, constata-se novamente a presença dos fatores adicionais que garantem a evolução das periodontopatias, como influência genética, a resposta imune do hospedeiro e a presença dos fatores ambientais, já que estes podem contribuir para o maior acúmulo e retenção da placa bacteriana (Walker *et al.*, 2004).

2.2 - Tratamento da doença periodontal

2.2.1 - Controle mecânico do biofilme dental

A medida primária para prevenir e reduzir a evolução da doença periodontal é a remoção mecânica regular do biofilme das superfícies dentárias (Haffajee, 2006). O tratamento mecânico consiste na eliminação do biofilme dental, cálculo, cemento contaminado, tecido de granulação e porção coronal do epitélio juncional (Kaldhahl *et al.*, 1988). Em geral, a doença periodontal pode ser tratada com sucesso e os resultados da terapia podem ser mantidos por um período prolongado de tempo com métodos de higiene meticulosos e regulares (Cobb, 1996). O objetivo dos tratamentos convencionais baseia-se em bloquear ou ao menos retardar a progressão da doença, impedindo a

destruição dos tecidos. Os efeitos clínicos indicariam uma diminuição da profundidade de sondagem e melhora dos níveis de inserção clínica (Kaldhahl *et al.*, 1988). Estudos longitudinais têm mostrado que certos indivíduos que passaram por tratamento periodontal não-cirúrgico (raspagem e alisamento radicular) e se encontravam sob tratamento periodontal de suporte apresentavam doença recorrente ou refratária em alguns sítios (Lang *et al.*, 1996, Serino *et al.*, 2001). Os motivos que explicam a recorrência da doença em alguns sítios não são claros, porém podem-se sugerir a inclusão de alguns fatores como controle de placa não-adequado, neoformação de placa subgengival e incompleta remoção da microbiota subgengival durante a fase inicial de tratamento (Rosling *et al.*, 2001). De acordo com Magnusson *et al.* (1984), a recolonização da microbiota subgengival após a raspagem e alisamento radicular poderia ocorrer de forma lenta após vários meses, sendo que alguns espécimes bacterianos recolonizam bolsas periodontais profundas de 140 a 224 dias, mesmo após múltiplas sessões de instrumentação subgengival e um meticuloso controle de placa. Para Haffajje *et al.* (2006), a terapia mecânica e os cuidados de higiene oral ainda são a base do tratamento periodontal, apresentando resultados satisfatórios. Porém a remoção física do biofilme subgengival promove pequena redução dos patógenos periodontais e este se restabelece em sete dias. O tratamento mecânico é considerado fundamental para a terapia periodontal. Entretanto algumas formas de doença, ou sítios, podem não responder adequadamente ao mesmo, devido à incompleta descontaminação da bolsa e subsequente invasão bacteriana do tecido conjuntivo, ou às deficiências nos sistemas imunológicos (Magnusson, 1998). A raspagem e o alisamento radicular mostram-se eficazes no tratamento da doença, no entanto, observa-se a dificuldade de instrumentação em bolsas maiores que 5 mm de profundidade (Caffesse, 1986) e a eventual necessidade de aplicação ou associação a outras técnicas, como o uso de antimicrobianos (Xajigerorgiou 2006).

2.2.2 – Tratamento cirúrgico periodontal

Segundo Wang *et al.* (1998), a terapia periodontal apresenta dois objetivos principais: redução ou eliminação da inflamação tecidual induzida pelo biofilme dental com seus subprodutos e correção dos defeitos anatômicos causados pelo processo da doença. Assim, os tratamentos cirúrgicos podem ser considerados como coadjuvantes, devendo ser avaliados considerando-se o fato destes poderem facilitar a remoção dos depósitos subgengivais e devolver a morfologia dos tecidos periodontais de sustentação e revestimento, favorecendo o controle do biofilme pelo paciente. A opção pelo tratamento cirúrgico é feita após a avaliação da resposta à fase inicial, ou seja, à persistência dos sinais de inflamação mesmo após serem efetuados todas as etapas da terapia mecânica (Wennström, 2005b).

Ao longo dos anos uma variedade de técnicas cirúrgicas tem sido descrita e empregada e o conceito de que não só o tecido mole inflamado, mas também “o osso necrótico e infectado” deveriam ser eliminados, levou ao desenvolvimento dos procedimentos à retalho para exposição do osso alveolar. O tratamento dos defeitos ósseos varia dependendo da extensão, sendo fundamental a criação de uma forma fisiológica que possibilite uma relação contígua com os tecidos gengivais adjacentes (Nyman *et al.*, 1982). Entretanto, vários fatores devem ser considerados durante a escolha da técnica cirúrgica, tais como estética, dente/região envolvida, morfologia do defeito ósseo e extensão do periodonto remanescente. As técnicas cirúrgicas tradicionais de eliminação da bolsa periodontal e tratamento dos defeitos de uma forma ressectiva, têm se mostrado eficazes em interromper a progressão da doença, a partir da eliminação e controle efetivo de seus fatores etiológicos. Todavia são limitadas no sentido de promover uma regeneração significativa do periodonto. Segundo Karring *et al.* (1993), o que se observa é uma formação de epitélio juncional longo e que apesar do tratamento dos defeitos ósseos e formação de algumas extensões de cimento e fibras periodontais, este epitélio estende-se, por vezes, apicalmente à crista óssea, não se caracterizando, portanto, um processo ideal de regeneração dos tecidos e sim de um reparo

tecidual apenas. Na presença destas limitações, técnicas cirúrgicas foram recomendadas para inibir o crescimento dos tecidos indesejáveis, principalmente o epitelial que apresenta velocidade de crescimento maior que os tecidos conjuntivo e ósseo (Caton *et al.*, 1976).

Misch & Dietsh (1993), em seus estudos a respeito dos vários aspectos envolvidos na regeneração do tecido ósseo, relatam que apesar de seu grande poder de reparo, a resposta do organismo é insuficiente para que ocorra a regeneração do tecido em diversas situações como defeitos extensos e infecções.

2.3 - Utilização de procedimentos regenerativos

O termo regeneração é definido como uma reprodução ou reconstituição de uma parte perdida ou lesada, de tal forma que a arquitetura e a função dos tecidos sejam completamente recuperadas. Partindo-se destes conceitos, novas perspectivas de regeneração quando da reconstrução periodontal, têm dado à Odontologia um novo enfoque terapêutico, buscando a evolução de resultados clínicos e histológicos que viabilizem o emprego, cada vez maior de métodos regenerativos em detrimento dos ressectivos.

Um conceito clássico na literatura é o da necessidade de uma barreira mecânica que impeça a infiltração de células do tecido conjuntivo ou do epitélio no defeito ósseo, protegendo o coágulo sanguíneo nos estágios iniciais do reparo (Melcher, 1976). Este princípio do selamento físico de uma região anatômica para melhorar o reparo de certo tipo de tecido e direcionar a regeneração tecidual, é descrito desde meados de 1950 (Hurley *et al.*, 1959). Segundo, Amler (1969), o tecido epitelial regenera-se após 21 dias da intervenção cirúrgica. Durante este período, o tecido ósseo apresenta-se imaturo, estando ainda nos seus estágios iniciais de mineralização. Tendo em vista estas limitações, os conceitos de selamento anatômico da área para proteger o coágulo e barreira para impedir a invasão dos tecidos moles adjacentes, passaram a ser empregados. Na Periodontia, com o intuito de permitir a regeneração de defeitos criados como consequência da periodontite,

este procedimento foi denominado por Nyman, *et al.*, 1982, de Regeneração Tecidual Guiada (RTG). Os mesmos princípios da RTG também foram aplicados na regeneração de defeitos envolvendo reconstruções ósseas, sendo chamado de Regeneração Óssea Guiada (ROG). As barreiras são colocadas sobre o defeito ósseo, com o intuito de proteger o coágulo sanguíneo e impedir a migração dos tecidos conjuntivo e epitelial, os quais apresentam o processo de regeneração mais acelerado do que o tecido ósseo, para dentro do defeito (Pittaru, 1987).

2.3.1 - As barreiras biológicas

Frente às necessidades do procedimento regenerativo de selamento da área, proteção do coágulo e exclusão celular seletiva, barreiras foram desenvolvidas e testadas, sendo classificadas em membranas não absorvíveis e absorvíveis.

Para as membranas não absorvíveis foi utilizado inicialmente o acetato de celulose (Parodie *et al.*, 1997), mas a membrana não absorvível mais conhecida e utilizada é a de politetrafluoretileno expandido (PTFEe), patenteada com o nome de “Gore- Tex” (Gore –Tex - WL Gore and Associates, Inc., Flagstone, USA). As mesmas não se degradam quimicamente em condições fisiológicas e são biocompatíveis pela ausência de reação tecidual adversa. Sua eficiência foi demonstrada em inúmeros trabalhos (Becker *et al.*, 1987; Piette *et al.*, 1995; Yukna & Yukna, 1996; Zhao *et al.*, 2000).

Entretanto, algumas desvantagens são apontadas na literatura, como a necessidade de remoção através de um segundo tempo cirúrgico (Windisch *et al.*, 1999), causando possíveis intervenções deletérias aos tecidos em cicatrização Cortellini (1990, 1995) e principalmente a exposição prematura com subsequente contaminação por bactérias (Grevstad *et al.*, 1993).

Galgut *et al.* (1991), testaram vários tipos de membranas, de diferentes compostos (Gore-tex, Milipore filter, membranas de ácido polilático e uma membrana de um polímero chamado de hidroxibutirato/ hidroxivalerato), em transcutâneo de ratos. A resposta celular aos materiais foi variada, com

predominância de monócitos em todos os materiais. A membrana não absorvível Gore-tex, foi associada com uma tendência maior de infiltrado e formação de cápsula fibrosa precoce, além de uma inflamação aguda persistente. Zhao *et al* (2000), examinou a resposta celular destes materiais, implantando-os em subcutâneo de ratos e comparando-os com a membrana de e-PTEFE que foi o controle. O autor relatou que somente o controle foi bem tolerado e encapsulado por tecido fibroso. Os outros 3 tipos de membranas biodegradáveis (Vycril, Resolut e Bio-Guide) induziram um significativo edema, encapsulamento e extensa inflamação.

Essas questões levaram ao estudo e desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis e biodegradáveis, podendo ser estas sintéticas ou naturais. No mercado nacional encontramos membranas biodegradáveis de poligalactina (Vycril, Johnson & Johnson, Skillman, NJ, USA), polímero de ácido láctico e ácido glicólico (Resolut - Gore –Tex - WL Gore and Associates, Inc., Flagstone, USA) e bicamada de peritônio de porcos (Bio-Guide, Osteohealth Co., New York, USA).

Outros estudos clínicos avaliando comparativamente membranas absorvíveis e não absorvíveis relatam que as absorvíveis são tão eficazes em procedimentos regenerativos (RTG/RGO), quanto as não absorvíveis compostas de PTFEe (Black *et al.*, 1994; Yukna & Yukna, 1996). Por sua vez Blumenthal *et al.*, 1993, relata superioridade das absorvíveis.

Os materiais absorvíveis mais comumente utilizados na fabricação das membranas são: colágeno, ácido polilático e copolímeros do ácido polilático e poliglicólico. De todos os materiais o colágeno é o mais estudado (Al-Arrayed *et al.*, 1995; Bunyaratavej & Wang, 2001) e apresenta características importantes como, biocompatibilidade tecidual e a propriedade de ser absorvido pelos tecidos do hospedeiro, tanto em animais como em humanos (Pitaru *et al.*, 1989; Black *et al.*, 1994; Taga *et al.*, 1997a; Rocha *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Há alguns anos o FDA aprovou o uso de colágeno xenogênico (obtido principalmente de bovinos) como o material para uso clínico. Frequentemente o colágeno é obtido do couro animal ou do tendão. Contudo, a confecção de barreiras a partir desse tipo de colágeno com vistas à RTG exige vários tipos

de tratamentos químicos (Rocha *et al.*, 2002). A utilização do osso bovino desmineralizado, cuja parte orgânica é constituída principalmente por colágeno tipo I densamente organizado, foi proposta para a confecção de membranas absorvíveis (Taga *et al.*, 1997 a ; Taga *et al.*, 1997 b). Segundo alguns autores, este material apresenta baixo potencial imune quando implantado em animais e humanos (Delaisse *et al.*, 2000). Cerca de 90% do colágeno humano é do tipo I, sendo encontrado principalmente em ossos e pele. O osso é um tecido denso, uma forma especializada de tecido conjuntivo que consiste de uma matriz orgânica, na qual 90% dela é composta por colágeno tipo I e uma matriz inorgânica, composta basicamente por hidroxiapatita (Seal *et al.*, 2001). As principais enzimas envolvidas na degradação do colágeno são as collagenases. Estas pertencem a família das chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs), que são responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo. Essas collagenases são produzidas por diversos tipos celulares, incluindo células epiteliais, fibroblastos e osteoclastos (Wang & Mcneil 1998). Os vários tipos de colágeno mostraram ser quimiotáticos para fibroblastos humanos, são absorvíveis fisiologicamente pelos tecidos, possuem propriedades hemostáticas, servem de suporte (material carreador) para crescimento celular na engenharia tecidual devido sua disponibilidade e abundância na natureza e são de fácil manuseio, podendo ser modelados em diversas formas (Wang & Mcneil 1998). Apresentam afinidade por outros polímeros sintéticos e também por fatores de crescimento como as proteínas osseoindutoras (BMPs) (Matsumoto *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002).

Rocha *et al* (2002), avaliaram as propriedades do colágeno bovino utilizando-o para preenchimento de defeitos intra-ósseos criados em tíbia de ratos. Os autores preencheram os defeitos com matriz de colágeno tipo I no grupo teste sendo que no grupo controle os defeitos foram preenchidos apenas com o coágulo sanguíneo do animal. Os resultados mostraram a biocompatibilidade da matriz de colágeno em tecido ósseo e capacidade osteocondutora, quando comparados ao grupo controle.

Recentemente foi lançada no mercado brasileiro uma membrana derivada da matriz orgânica bovina desmineralizada, a qual vem sendo

largamente utilizada na clínica odontológica, pois apresenta custo acessível e qualidade clínica comprovada (Sanches *et al.*, 2000; Herculani, 2000). Esta membrana derivada do osso bovino cortical é um biomaterial existente no Brasil e teve sua biocompatibilidade e eficiência clínica comprovada (Taga, *et al.*, 1997a). Esta membrana foi patenteada com o nome de Gen-derm (Baumer-AS, Mogi-Mirim SP, Brasil).

2.3.2 – Propriedades ideais das membranas

A aceitação do auxílio das membranas no processo de regeneração, fez com que novos componentes para a fabricação destas, tanto não absorvíveis como absorvíveis, fossem desenvolvidos e testados. Mas independente da sua composição as membranas devem apresentar propriedades importantes, que irão garantir sua eficiência. Além da biocompatibilidade as barreiras devem possuir características físico-estruturais que garantem a oclusão celular seletiva e a transferência de nutrientes, contribuindo de forma passiva para a integração dos tecidos (Pitaru, *et al.*, 1987; Warrer, 1992). A integração tecidual da membrana é uma propriedade importante, já que isso garante o crescimento do tecido através do material, mas sem atravessá-lo. O objetivo desta integração é prevenir a migração precoce do epitélio na superfície externa do material ou o seu encapsulamento, além de proporcionar uma boa estabilidade do retalho subjacente. (Warrer *et al.*, 1992). As características químicas, da superfície e microestruturais da membrana, interferem diretamente no desenvolvimento e adesão superficial dos tecidos e devem permitir uma junção estável epitélio - tecido conjuntivo – membrana durante a cicatrização, alcançando assim os requisitos funcionais gerais do processo de regeneração (Shenk RK *et al.*, 1994).

2.3.3 – Contaminação das membranas

No contexto da regeneração óssea alveolar, as realidades anatômicas, mecânicas e as técnicas utilizadas no tratamento clínico podem gerar exposição da membrana ao meio bucal no curso do tratamento (Selvig *et al.*, 1990). Qualquer membrana utilizada em procedimentos regenerativos corre o risco de exposição, seja devido à proximidade desta aos dentes adjacentes, pela presença de uma incisão subjacente ou deiscência tecidual, ou mesmo pela quantidade insuficiente de tecido mole na região não permitindo uma cicatrização primária. A exposição da membrana é a principal complicação, com prevalência variando de 50 a 100% (Trombelli *et al.*, 1997). Isso conduz a uma possibilidade de invasão bacteriana, resultando em inflamação e até necrose do tecido gengival que a recobre, devido à redução do suprimento sanguíneo, prejudicando assim a osteogênese e podendo inclusive ocasionar a falha do procedimento regenerativo (Warrer *et al.*, 1992). Segundo Ling (1993), infecções nos locais tratados com RTG tem sido associadas à contaminações bacterianas das membranas de e-PTFE que são expostas precocemente ao meio bucal, influenciando de forma negativa o ganho de inserção e a regeneração dos tecidos, podendo ainda acelerar o processo de degradação da membrana (Selvig *et al.*, 1990; Wakabayashi *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997).. Por outro lado, a presença de microorganismos nas membranas não deve ser considerada uma surpresa, visto que as membranas foram desenvolvidas para retardar a migração de células e não a colonização e invasão bacteriana (Yoshinari *et al.*, 1998).

Vários estudos têm mostrado que essas membranas, se expostas, podem ser facilmente colonizadas por bactérias e ressaltam a importância dos métodos de controle de placa e higiene oral, durante o período de cicatrização (De Sanctis *et al.*, 1996a; Nowzari *et al.*, 1996). Selvig *et al.* (1990), a partir da análise de membranas não-absorvíveis de e-PTFE em microscopia eletrônica de varredura, encontrou colonizações bacterianas não somente na parte que se expôs ao meio bucal, mas também nas porções mais apicais abaixo da margem gengival, confirmando a invasão bacteriana sob o tecido. Yoshinari, (1998), encontrou microorganismos não apenas na superfície da membrana,

como também no seu interior. Mombelli *et al.*, 1993, avaliaram também membranas de PTFE que foram expostas ao meio bucal em função de uma deiscência de tecido gengival. Os autores relatam que há a criação de um ambiente muito favorável à colonização e proliferação de microorganismos anaeróbios. Quando dispostas em camadas na superfície da membrana, essas bactérias são resistentes à antibioticoterapia (Cristina *et al.*, 1987).

O tratamento para os casos de exposição da membrana deve ser composto por um acompanhamento periódico da área, através de métodos para controle de placa e caso seja necessário, uma intervenção cirúrgica para fechamento da área deve ser considerada (De Sanctis *et al.*, 1996 a; Nowzari *et al.*, 1996).

De Sanctis *et al.* (1996 b), estudaram membranas absorvíveis de ácido polilático em procedimentos regenerativos. A antibioticoterapia foi utilizada em todos os pacientes, sendo que para os casos em que ocorreu exposição os pacientes foram submetidos a outra intervenção cirúrgica para remoção do fragmento exposto e reposicionamento do retalho. Após o período de 6 meses avaliações foram feitas com relação ao ganho de inserção dos tecidos e os autores concluíram que nos casos que não houve exposição, os resultados foram melhores e que quanto mais apical a contaminação da membrana piores eram os resultados.

2. 4 - Tetraciclina e seus derivados

As tetraciclinas fazem parte dos antibióticos de amplo espectro introduzidos a partir dos anos de 1940 na Periodontia (Duggar, 1948). Este antimicrobiano e seus análogos têm sido muito investigados nos últimos anos, por características que envolvem a inibição da ação das metaloproteinases MMPs (Delaisse *et al.*, 2000). Sua eficácia pode ser comprovada não somente devido às ações antibacterianas, mas também por estes apresentarem propriedades adicionais como a atividade antiinflamatória. Esta característica deve ser destacada, já que estas atuam na supressão da atividade dos neutrófilos, inibição da atividade da fosfolipase A2, prevenção da ativação de

colagenases latentes no espaço extracelular (procolagenases), produzidas por polimorfonucleares e outras células como os fibroblastos e osteoblastos, e também inibição das próprias colagenases já ativas e outras enzimas. Tem sido sugerido que a inibição de colagenases pelas tetraciclinas está relacionada à habilidade destas em se ligar a íons cálcio e íons zinco (Golub *et al.*, 1991). As propriedades anti-proteolíticas deste fármaco associadas à atividade anti-colagenase têm resultado em sua aplicação na inibição da reabsorção óssea, já que esta é mediada pelos osteoclastos e facilitada pela colagenases secretadas pelos osteoblastos. As tetraciclinas também inibem as colagenases dos osteoblastos *in vivo* (Golub *et al.*, 1991).

Em uso sistêmico a tetraciclina é encontrada no fluido crevicular em concentrações bacteriostáticas, ao passo que no seu uso local ela atinge concentrações bactericidas (Greenstein & Polson, 1998). A tetraciclina foi incorporada numa variedade de sistemas de liberação, que garantiam a sua inserção dentro de bolsas periodontais. Alguns desses sistemas incluíam fibras ocas, fibras de copolímeros de etileno vinil acetato (Goodson *et al.*, 1983), fibras de etil celulose, tiras acrílicas.

2.4.1 - Doxíciclina

Apesar de ter seu processamento e composição relatados no final dos anos 50, a doxíciclina foi introduzida no mercado para uso clínico em humanos apenas em 1966 (Fabre *et al.*, 1966), sendo utilizada inicialmente para tratamento respiratório, doenças venéreas e posteriormente como auxiliar na eliminação dos patógenos periodontais em pacientes portadores de periodontopatias (Slots & Rams, 1990; Akalin *et al.*, 2004). A doxíciclina é um isômero estrutural da tetraciclina sendo um derivado sintético e diferindo apenas quanto à posição do grupo hidroxila 1: situado no carbono 6 na tetraciclina e no carbono 5 na doxíciclina, característica essa que lhe confere maior estabilidade que as outras tetraciclinas. Ao contrário das demais tetraciclinas, pouco absorvidas pelo organismo (25 – 80 %), quando utilizada sistemicamente a doxíciclina é quase completamente absorvida na porção

superior do trato gastrointestinal (93%). Apresenta alto grau de lipossolubilidade (5 a 10 vezes mais lipossolúvel que as tetraciclina), alta capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas, sendo altamente estável no soro humano (Franklin & Snow, 1975). A meia vida de absorção da droga é de aproximadamente 50 minutos, sendo possível detectá-la no soro 30 minutos após sua administração oral. É um antibiótico com amplo espectro de ação, atuando contra microorganismos aeróbios e anaeróbios, gram – positivos e negativos.

Outro fato importante é que possui uma menor concentração inibitória mínima (MIC) para alguns patógenos periodontais como a *Prevotella intermédia* e *Fusobacterium nucleatum* (Lakhssassi et al., 2005; Takahashi et al., 2006). Em função de seu amplo espectro de ação, a doxiciclina tem se mostrado tão ou mais eficaz que outros antimicrobianos no combate aos patógenos periodontais como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Tannarella forsythia*, *fusobacterium nycleatum* e *Peptostreptococcus micros*, apresentando ainda pouca variação de atividade entre os patógenos (Lakhssassi et al., 2005; Takahashi et al., 2006). Os patógenos periodontais apresentam susceptibilidade a concentrações de 0,1 a 2.0 µg/ml de doxiciclina (Riond & Riviere 1988). O uso local da doxiciclina reduz significativamente os níveis de bactérias subgengivais anaeróbias (Walker et al., 2000; Johnson et al., 2002; Jorgensen et al., 2004; Machion et al., 2004; 2006). Stoller et al. (1998), estudaram as concentrações encontradas no fluido crevicular, após aplicação local de doxiciclina a 8,5%. Os autores encontraram uma concentração de 1493µg/ml (700 vezes maior que a concentração inibitória mínima) no fluido crevicular em 2 horas. Esta concentração permanecia alta (acima de 1000µg/ml) após 18 horas, e caía para 309µg/ml ao sétimo dia, sendo esta última concentração ainda 150 vezes maior que a concentração inibitória mínima.

Golub et al. (1994), demonstraram que a doxiciclina, mesmo aplicada por via sistêmica e em baixas concentrações são bacteriostáticas, apresentando propriedades não-antibacterianas, porém têm a capacidade de inibir metaloproteinases em tecido gengival humano inflamado. Apesar de

todos os benefícios apresentados pela doxiciclina, Garrett, *et al.* (2000), relata que apesar de todas as excelentes propriedades apresentadas pela doxiciclina, o seu uso através da sua administração sistêmica ou local, deve atuar como adjunto à terapia mecânica de remoção de biofilme bacteriano e não como monoterapia no tratamento das periodontopatias.

2.5 - Associação de antimicrobianos nos procedimentos regenerativos.

Agentes antimicrobianos como a tetraciclina e doxiciclina têm sido preconizados como terapia adjunta ao tratamento da doença periodontal (Ramberg *et al.*, 2001; Haffajee *et al.*, 2004; Haffajee, 2006; Xajigeorgiou *et al.*, 2006). O uso destes antimicrobianos sob a forma dos dispositivos de liberação local (DLLs), principalmente com relação ao derivado doxiciclina vêm sendo muito estudado, (Greenstein & Polson 1998; Salvi *et al.*, 2002; Aimetti *et al.*, 2004) apresentando concentrações subgengivais até 100 vezes maiores do que a via sistêmica (Stoller *et al.*, 1998).

Outras pesquisas também relatam o uso da tetraciclina em associação à biomateriais para o tratamento de defeitos ósseos, afirmando ser uma técnica muito efetiva em conjunto com a RTG (Sbordone *et al.*, 2000; Harris 2002) e a associação desses agentes utilizados localmente, no tratamento de exposições de membrana também já foi relatada por promover a descontaminação da área e auxiliar na regeneração dos tecidos perdidos (Alger *et al.*, 1990; Drury *et al.*, 1991; Rosenberg & Rose 1998; Delaissé *et al.*, 2000; Houser *et al.*, 2001, Bettany *et al.*, 2000). Zucchelli *et al.* (1999), em seu estudo utilizando membranas de e-PTFE com intuito de avaliar a contaminação bacteriana e o ganho de inserção quando utilizado antibióticos sistêmicos e locais, concluiu que não houve diferenças nos resultados relativos ao ganho de inserção, mas quando avaliada a contaminação da membrana a aplicação de antibiótico local mostrou-se mais efetiva para combater a contaminação das mesmas.

Membranas absorvíveis de ácido polilático tratadas com tetraciclina também foram desenvolvidas e testadas mostrando melhores resultados do que as sem antimicrobiano (Park *et al.*, 2000).

Lesões infectadas ou contaminadas, particularmente as lesões periodontais, representam um desafio adicional à terapia de lesões ósseas. Algumas bactérias como a *Phorphyromonas gingivalis* são capazes de colonizar e acelerar o processo de degradação das membranas absorvíveis, pelo fato de produzirem colagenases (Sbordone *et al.*, 1999). Como o uso da tetraciclina e seus derivados tem sido muito difundido em procedimentos periodontais para descontaminação da área e auxiliar na regeneração dos tecidos perdidos (Alger *et al.*, 1990; Rosenberg & Rose, 1998; Delaisse *et al.*, 2000; Houser *et al.*, 2001), parece bastante lógico utilizá-la associada a membranas absorvíveis (Oliveira, 2003). Outros trabalhos como o de Harris (2002), preconizaram a tetraciclina associada a biomateriais para o tratamento de defeitos periodontais, sendo aceita como uma técnica muito efetiva em conjunto com a RTG. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm relatado o potencial da tetraciclina e seus análogos na indução da promoção de matriz óssea por osteoblastos (incluindo síntese de novo colágeno) e inibição dos osteoclastos (Bettany *et al.*, 2000). Park *et al.*, (2000), desenvolveram membranas de ácido polilático incorporadas com tetraciclina e avaliaram o potencial de regeneração óssea destas. Os autores utilizaram testes de cinética de liberação *in vitro* e *in vivo*, testes de biodegradação e testes de inserção celular. Os resultados mostraram que estas membranas mantiveram sua integridade por 4 semanas, sendo que as que apresentavam tetraciclina induziram um aumento no nível de inserção quando comparado com as outras. Os resultados sugeriram que a incorporação da tetraciclina nessas membranas favoreceu melhores resultados no procedimento regenerativo.

Atualmente encontra-se no mercado nacional a membrana derivada de matriz orgânica bovina desmineralizada (Gen-derm/Baumer, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil) na sua versão original e também esta mesma membrana incorporada com cloridrato tetraciclina. (Oliveira, 2003) em seu estudo, avaliou estas membranas na utilizando como modelo experimental a implantação no

tecido subcutâneo de ratos. O autor avaliou a resposta celular frente à presença destas membranas (com e sem tetraciclina), e o tempo de absorção das mesmas. Biópsias foram coletadas após diferentes períodos experimentais e análises microscópicas e bioquímicas foram efetuadas. Os resultados mostraram que a membrana Gen-derm é bem tolerada pelos tecidos sendo totalmente absorvida no período de 30-60 dias. O tratamento da membrana Gen-derm com cloridrato de tetraciclina provoca uma pequena mudança aparente nos achados microscópicos, mas modifica significativamente a atividade das enzimas analisadas nos períodos iniciais de implantação em conjuntivo subcutâneo de ratos, em particular as enzimas lisossomais. Segundo o autor, ambas as membranas testadas, apresentam-se como possível opção para pesquisas futuras em técnicas de regeneração guiada, tanto com relação à sua biocompatibilidade como tempo de absorção.

Esta mesma membrana foi analisada por (Silva, 2003). O autor avaliou através de testes *in vitro* a membrana de osso bovino impregnada com cloridrato de tetraciclina comparando-a com a membrana convencional e também com uma incorporada com outro antimicrobiano, o metronidazol. O nível e o tempo de dispersão dos agentes antimicrobianos nas membranas foram analisados. Os resultados mostraram que a membrana com o cloridrato de tetraciclina apresentou os melhores resultados *in vitro*, apresentando uma capacidade máxima de inibição das cepas aeróbias e anaeróbias testadas em até 21 dias. Além disso, foi possível observar a presença de halo de inibição na membrana absorvível xenógena de origem bovina contendo tetraciclina em até 30 dias.

Motão (2004), avaliou através de seu estudo *in vivo* a eficácia desta membrana utilizando-a com um dispositivo de liberação local, como terapia adjunta ao tratamento periodontal não cirúrgico. Em estudo experimental clínico o autor utilizou fragmentos da membrana de colágeno bovino incorporada com cloridrato de tetraciclina, inserindo porções padronizadas da mesma no interior de bolsas periodontais maiores ou iguais a 5 mm de profundidade, de pacientes que não responderam de forma adequada ao tratamento convencional (raspagem e alisamento radicular). Após 45 dias foi possível

concluir que a utilização da membrana como dispositivo de liberação controlada do antibiótico associada à terapia mecânica, foi mais eficiente na melhora dos parâmetros clínicos de índice gengival, de sangramento, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica, do que somente raspagem e alisamento radicular.

3 – PROPOSIÇÃO

Avaliar comparativamente por meio de análises microbiológicas *in vitro* a capacidade de dispersão e o tempo de inibição do crescimento bacteriano das membranas absorvíveis de osso bovino, convencional, impregnadas com cloridrato de tetraciclina e doxiciclina.

4 - MATERIAL E MÉTODO

Por utilizar, em partes do estudo, amostras microbiológicas coletadas de pacientes com envolvimento periodontal, o projeto foi enviado ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo de registro 240/7) e aprovado de acordo com o parecer 518/07. As triagens para escolha do paciente foram efetuadas no Hospital Odontológico da UFU. Toda a parte experimental foi executada no Laboratório de Microbiologia da instituição seguindo-se as normas estabelecidas, para testes de antibiograma, pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” – CLSI (previamente referido como “National Committee for Clinical Laboratory Standards” - NCCLS) (2003).

4.1 - Critérios de seleção e inclusão dos pacientes

A seleção dos pacientes e a coleta das amostras para o estudo foram realizadas durante o atendimento dos mesmos no hospital odontológico da Universidade Federal de Uberlândia. Os critérios de seleção e inclusão estavam relacionados com a presença de doença periodontal confirmada após os exames clínico e radiográfico. Foram selecionados cinco pacientes que apresentavam durante o exame clínico periodontal, bolsas periodontais maiores ou iguais a 5 mm presentes em mais de três sítios localizados em ambos os arcos dentários. A aceitação ou não por parte dos pacientes na pesquisa, não influenciou no plano de tratamento e atendimento dos mesmos na clínica do hospital odontológico. Selecionamos o paciente que além dos sinais clínicos descritos acima também apresentava várias regiões com secreção purulenta nas bolsas periodontais. Todas as informações da pesquisa foram passadas e após a autorização o paciente recebeu uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 - Coleta das amostras bacterianas e estocagem

A coleta de material do “pool anaeróbio” foi realizada, semanalmente, a partir do biofilme dental e cálculo subgingival removidos durante os

procedimentos de raspagem, efetuados para adequação e regressão do quadro inflamatório.

As amostras foram processadas em câmara de fluxo laminar, como descrito abaixo:

A) amostra padrão de bactérias aeróbias:

Staphylococcus aureus (ATCC/25923) e *Escherichia coli* (ATCC/29922) (American Type Culture Collection, USA). Após a coleta, os aeróbios foram transferidos para tubos contendo caldo TSB - Tryptic Soy Broth (fabricante: Biobrás S/A - Brasil)

B) amostra constituída por um “pool anaeróbio”, provenientes de material de bolsa periodontal. Os anaeróbios foram semeados em tubos contendo tioglicolato de sódio (fabricante: Biobrás S/A Brasil)

As três amostras foram incubadas em estufa a 35°C, por 24 horas. A turvação dos tubos de TSB contendo *E. coli* e *S.aureus*, foram padronizadas conforme a escala de Mac Farland com a turvação 0.5 da escala (10^8 organismos/ml). Caso essa turvação estivesse acima do desejado uma diluição era feita e conferida de acordo com mesma (FIGURA 1). Com relação aos anaeróbios, repetiu-se o mesmo procedimento.

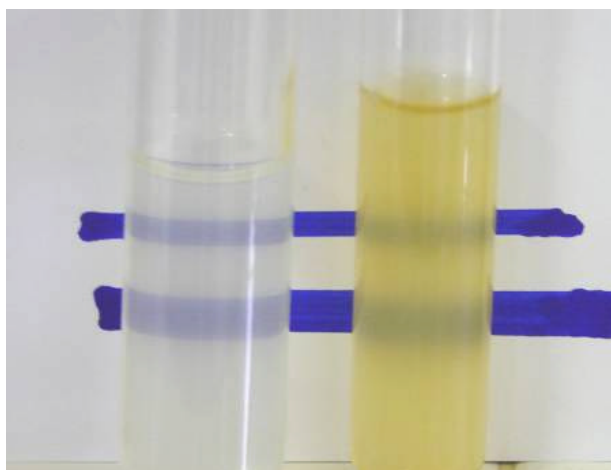


Figura 1: Escala de Mac Farland (esquerda) e meio TSB (direita) com turvação acima do desejado.

4.3 - Preparo dos meios de cultura

Placas contendo os meios de cultura apropriados para cada grupo bacteriano foram preparadas da seguinte maneira:

- Aeróbios: ágar Müeler - Hinton (fabricante: Biobrás S/A do Brasil) (figura 2A).

- Anaeróbios: ágar Müeler - Hinton com adição de 5 % de sangue de carneiro desfibrinado (fabricante: Newprov – Pinhais/ Brasil) (figura 2B).

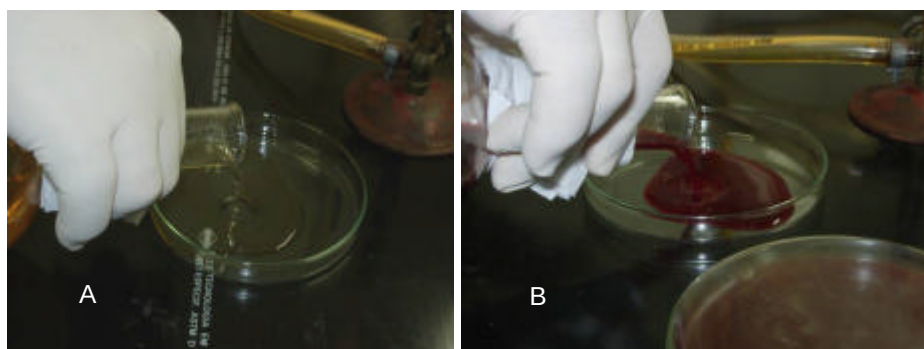


Figura 2: preparo do ágar Müeler – Hinton em (A) e ágar sangue em (B).

4.4 - Semeadura das amostras

Antes da semeadura, todas as placas foram previamente identificadas e em cada uma feita as divisões dos quadrantes que receberam as membranas. O experimento foi realizado em triplicata para cada tipo de microorganismo (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e “pool anaeróbio”), perfazendo inicialmente um total de nove placas (FIGURA 3).

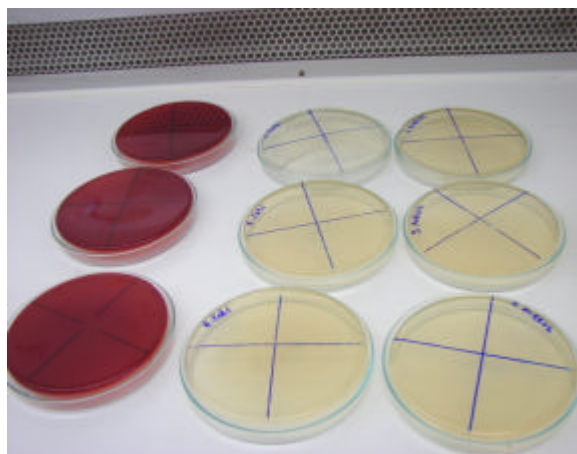


Figura 3: placas preparadas

Realizou-se todo o processo de semeadura dentro da câmara de fluxo laminar. A semeadura dos aeróbios ocorreu após 24 horas de incubação, em meio de cultura ágar Müeller-Hinton conforme proposto em testes de Bauer-Kirby para prova de sensibilidade por difusão de discos de antibióticos (Barry AI, Thornsberry C, 1980).

Em relação aos anaeróbios a semeadura foi efetuada a partir de 24h, quando foi observada a turvação padronizada. Além disso, cuidados adicionais foram executados, objetivando-se uma menor exposição do “pool” ao oxigênio, sendo a abertura do tubo feita uma única vez e a coleta de material o suficiente para ser semeado nas três placas iniciais do ágar modificado com o sangue (FIGURAS 4A e 4B).

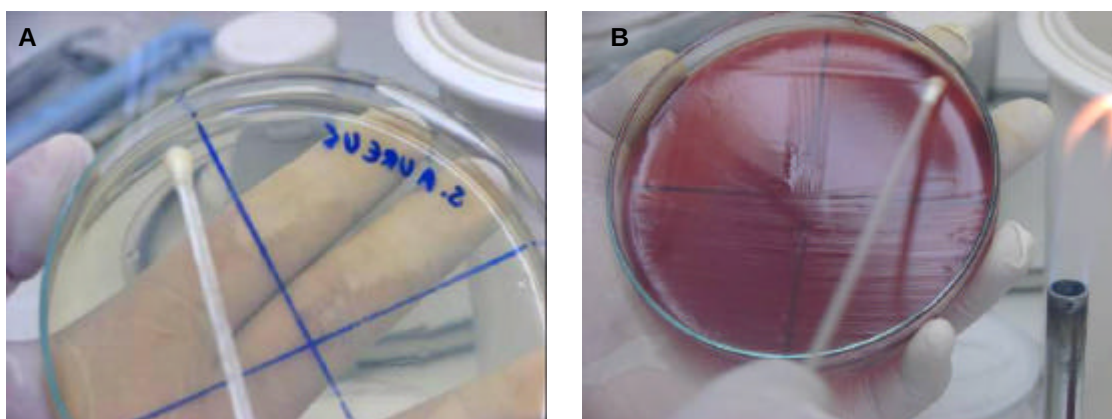


FIGURA 4: Em (A) semeadura aeróbio. (B) semeadura anaeróbio

4.5 - Preparo das barreiras

Todas as membranas são provenientes do Departamento de Bioquímica da USP – Bauru (figura 5).

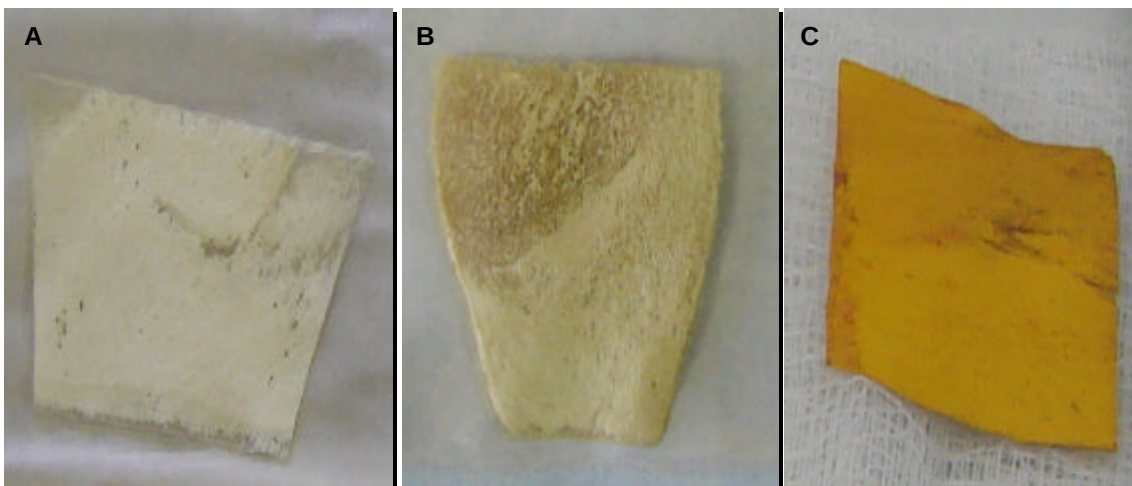


FIGURA 5: membranas absorvíveis derivadas de osso bovino convencional (A), impregnadas com doxiciclina (B) e cloridrato de tetraciclina (C).

Para o corte das membranas, manipulação e adaptação dos fragmentos nas placas, foram preparados quites com campo cirúrgico, gaze, luva, pinça, placa de vidro e recipiente estéreis. Durante a manipulação o instrumental utilizado para um tipo de membrana não foi usado para outra com o objetivo de evitar a mistura de antimicrobianos nos fragmentos, durante a manipulação. Cada membrana foi aberta e recortada fornecendo um disco com um centímetro de diâmetro. Os cortes padronizados foram feitos com um bisturi circular confeccionado em aço cirúrgico (FIGURA 6). Os três tipos de membranas foram separados dentro da câmara de fluxo laminar e posteriormente denominados da seguinte forma:

Grupo D: membranas xenógenas de origem bovina, impregnadas com doxiciclina.

Grupo T: membranas xenógenas de origem bovina, impregnadas com cloridrato de tetraciclina.

Grupo C: membranas xenógenas de origem bovina, sem antimicrobiano.

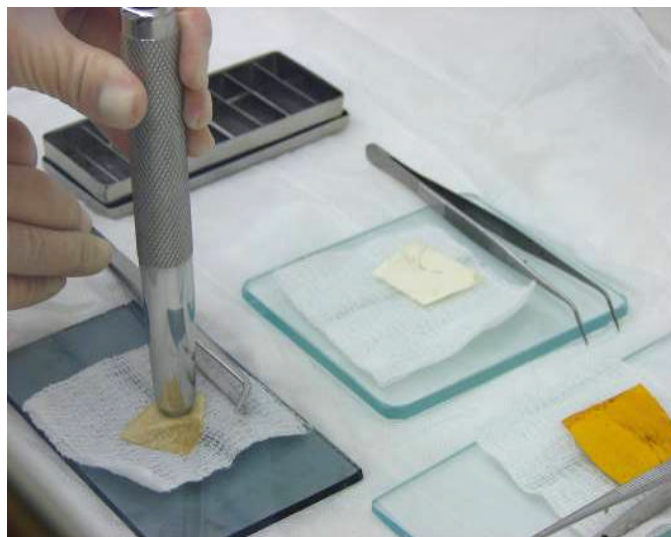


FIGURA 6: Corte das membranas com bisturi circular.

4.6- Período experimental

Para cada grupo bacteriano foram preparadas 3 placas denominadas (placa 1, placa 2 e placa 3). Cada placa foi subdividida em quatro quadrantes, sendo que três quadrantes receberam amostras e um quadrante permaneceu vazio para demonstrar o crescimento bacteriano. Foi utilizada uma amostra de membrana convencional, para avaliar se esta apresentava propriedades antimicrobianas e os outros dois quadrantes receberam as amostra impregnadas respectivamente com doxiciclina (D) e com o cloridrato de tetraciclina (T) (FIGURAS 7A, 7B e 7C).

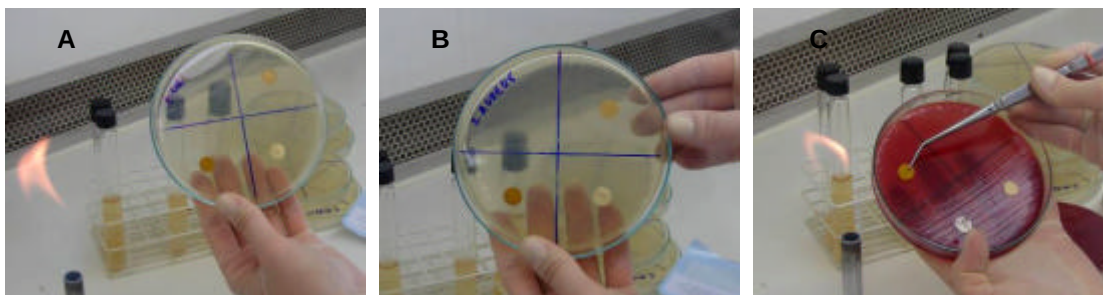
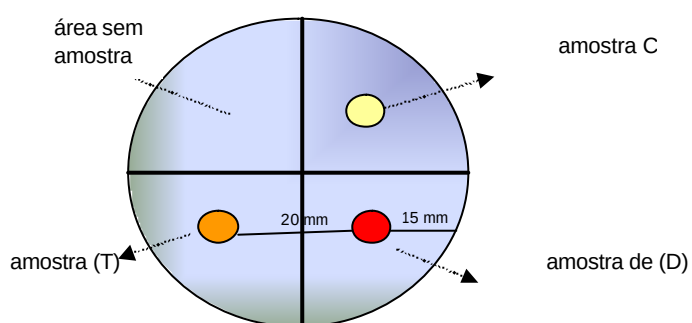


FIGURA 7: amostras das membranas nas placas de *E.coli* (A), *S.aureus* (B) e “pool” (C).

Assim cada grupo bacteriano apresentavam placas com (C)1 / (D)1 / (T)1; (C)2 / (D)2 / (T)2 e (C)3 / (D)3 / (T)3 respectivamente. A disposição dos “discos” sobre o meio de cultura foi feita de forma a manter uma distância mínima de 20 mm entre elas e 15 mm delas à parede da placa. O objetivo foi evitar que as zonas de inibição de crescimento se sobrepusessem ou se estendessem até a margem do ágar (ESQUEMA 1).



Esquema 1: distribuição dos fragmentos na placa 1

4.7- Incubação

Para os aeróbios ocorreu em estufa a 35° C por sete dias. Para os anaeróbios as placas foram colocadas em uma jarra de anaerobiose, (FIGURA 8A) sendo o ambiente de anaerobiose garantido pelo uso de um gerador de anaerobiose (Anaerobac- Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos-São

Paulo/Brasil). (FIGURA 8B). A jarra também é incubada em estufa a 35° C por sete dias.

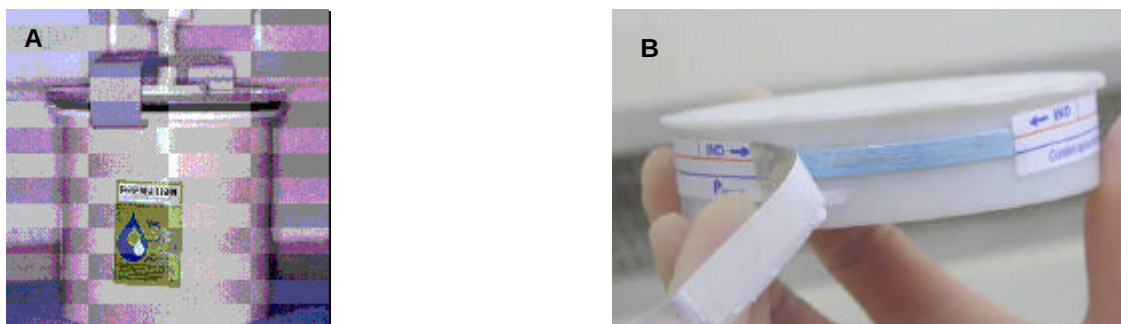


FIGURA 8: (A) jarra de anaerobiose. (B) Anaerobac

4.8 - Avaliação dos halos de inibição e transferência das amostras

A capacidade das membranas impregnadas com os antimicrobianos, em atuar como inibidor de crescimento bacteriano foi avaliada a partir da formação nas placas, de halos de inibição medidos com paquímetro digital. Realizou-se a primeira avaliação após sete dias e durante está foi efetuada a primeira transferência das amostras correspondentes aos três tipos de membranas para novas placas preparadas como escrito anteriormente (FIGURA 9). Avaliações semanais foram seguidas com transferência das mesmas para outras placas, obedecendo aos intervalos de 14, 21, 28 dias e 35 dias. Essas transferências ocorreram enquanto houve a presença de halos de inibição e também enquanto persistiu a integridade das membranas.

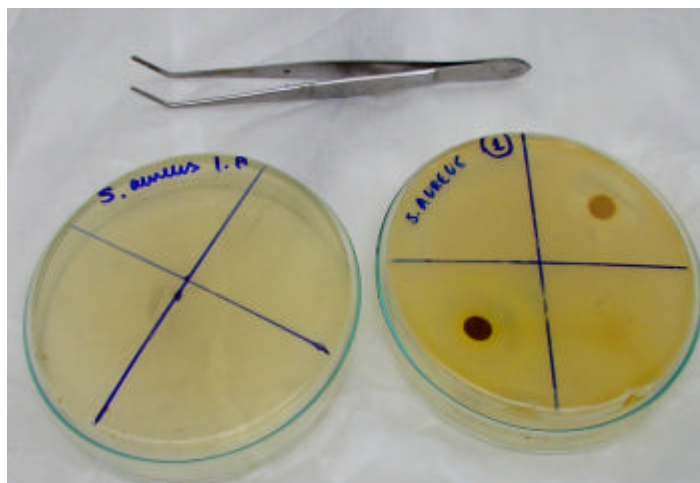


FIGURA 9: nova placa de *S.aureus* preparada (esquerda) para transferência das amostras.

Para “pool anaeróbio”, após a abertura da jarra, os halos eram aferidos com o paquímetro dentro da câmara de fluxo laminar. Antes de se efetuar as trocas das amostras, novas placas eram previamente preparadas. A coleta do novo pool era feita no dia anterior à troca sempre do mesmo paciente, armazenada em tioglicolato de sódio e incubada em estufa a 35°C por 24 horas. Após este período as placas eram semeadas e os fragmentos de membrana transferidos rapidamente. Logo em seguida eram colocadas novamente na jarra e um novo gerador de anaerobiose era preparado e adicionado. A jarra era fechada e mantida novamente na estufa por mais sete dias.

5 - RESULTADOS

5.2 – Avaliação dos halos de inibição

Ao avaliarmos as placas, de todos os três grupos, observou-se que as áreas onde não foram colocadas amostras, ocorreu crescimento bacteriano preenchendo toda a região (FIGURAS 12, 13 e 14). O mesmo ocorreu nas amostras de (C)1, (C)2, e (C)3, as quais não apresentavam halos de inibição, com conseqüente crescimento de colônias bacterianas por sobre as amostras (FIGURA 10).

A capacidade de inibição do crescimento bacteriano foi confirmada pela presença dos halos de inibição ao redor das amostras, indicando que ocorreu a liberação do antimicrobiano no meio (cloridrato de tetraciclina ou doxiciclina) durante o processo de degradação das membranas. O critério de avaliação dos halos foi baseado na presença de áreas circulares nítidas, com seus diâmetros bem definidos e a ausência de colônias bacterianas dentro da área circunferencial do halo. Em relação às amostras de (D) e (T) presentes em todos os três grupos, as medidas correspondentes aos halos de inibição formados, foram aferidas com o paquímetro digital (FIGURA 11) e estão descritas nas tabelas 1, 2 e 3. Os resultados obtidos em cada grupo bacteriano foram descritos separadamente.



FIGURA 10: amostra de membranas convencional (C), em placa “pool” evidenciando ausência de halo de inibição.

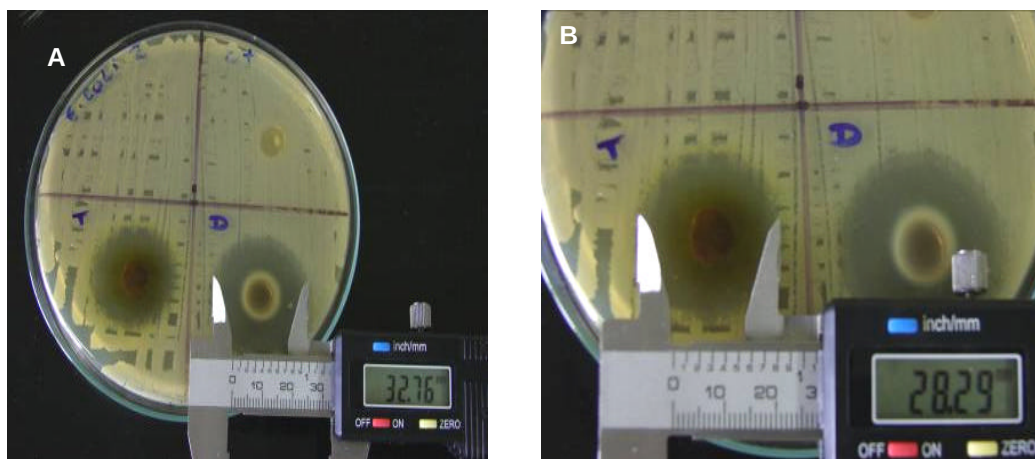


FIGURA 11: aferição com paquímetro dos halos de doxiciclina (A) e cloridrato de tetraciclina (B).

5.2.1- Placas correspondentes ao grupo *E.coli*:

Para o grupo *E. coli*, nas áreas das placas correspondentes às amostras de membrana com doxiciclina (D) e membrana com cloridrato de tetraciclina (T) ocorreram a formação de halos de inibição de crescimento bacteriano (FIGURA 12). Estes halos apresentaram tamanhos que variaram de acordo com o tipo de membrana e também conforme o tempo do experimento, não estando presentes em algumas amostras após um período maior de avaliação (tabela 1). Aos sete dias foram observados halos de inibição para as duas amostras (D) e (T), estando os halos de (D)1, (D)2 e (D)3 sempre maiores que os de (T)1, (T)2 e (T)3. Aos quatorze dias os halos de (D) continuavam maiores que os de (T), em todas as placas, embora menores que os encontrados aos sete dias. Aos vinte e um dias para as amostras de (D), formaram-se halos de inibição em todas as placas, mas menores que os apresentados aos quatorze dias. A partir desse período, para as amostras de (T), não ocorreu formação de halos de inibição em todas as placas, já que (T)1 não apresentou halo e apesar de existirem halos em (T)2 e (T)3, estes eram menores que os de (D)2 e (D)3. Passados 28 dias, observou-se ainda halos de inibição em todas as amostras de (D), no entanto somente (T)2 apresentava halo de inibição. Aos 35 dias observou-se ainda a existência de halos de inibição somente para as amostras de (D).



FIGURA 12: Placa de *E.coli* evidenciando os halos de inibição para (D) acima à direita e para (T) abaixo à esquerda.

Tabela 1: Medidas correspondentes ao diâmetro dos halos de inibição dos fragmentos de membrana para placas de *E. coli* nos diferentes tempos.

dias / antimicrobiano	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
(D) 1	26.56	21.80	17.03	14.95	27.33
(T) 1	23.16	19.51	-	-	-
(D) 2	32.76	22.06	17.14	20.38	13.49
(T) 2	28.20	17.51	16.33	12.76	-
(D) 3	29.34	22.06	19.40	19.76	18.60
(T) 3	28.10	17.51	11.26	-	-

Valores expressos em milímetros (mm). (D): Doxiciclina. (T): cloridrato de tetraciclina. Os números (1, 2 e 3) representam as placas.

5.2.2 - Placas correspondentes ao *S.aureus*:

Em todas as placas do grupo *S.aureus*, ocorreu formação de halos de inibição nas amostras de (D) e (T) e assim como o grupo *E.coli*, a presença e tamanho dos halos também foram dependentes do tipo de membrana e dos tempos analisados (FIGURA 13). Aos sete dias foram observados halos de inibição para as amostras de (D) e (T) estando os halos de (D) maiores que os de (T) nas três placas (tabela 2). Aos quatorze dias, os halos de (D)

continuavam maiores que os de (T), nas três placas, mas o halo de (D)1 apresentava-se maior aos 14 dias, do que aos 7 dias. Já os halos de (T) aos 14 dias foram menores do que aos 7 dias nas três placas. Aos 21 dias os halos das 3 amostras de (D) foram menores do que os apresentados em 14 dias. Quando comparado aos halos de (T), os halos de (D)2 e (D)3 foram maiores que os de (T)2 e (T)3 e (D)1 apresentou-se menor que (T)1. Os halos de (T)2 e (T)3 foram menores aos 21 dias do que aos 14 dias, sendo que o halo de (T)1 foi maior. Aos 28 dias nas três amostras de (D), os halos de inibição estavam presentes, sendo os halos de (D)1 e (D)2 aos 28 dias maiores do que aos 21 dias e o halo de (D)3 menor. Quando comparado com os halos de (T), (T)2 e (T)3 foram menores que (D)2 e (D)3. Para os halos das amostras de (T), em (T)1 o halo não estava presente e observou-se que em (T)2 o halo aos 28 dias foi maior do que o aos 21 dias e em (T)3 foi menor. Passados 35 dias do experimento, observou-se a presença de halo de inibição nas três amostras de (D), sendo que os halos de (D)1 e (D)3 foram maiores aos 35 dias do aos 28 dias. Em (T)2 e (T)3, os halos foram menores que (D)2 e (D)3 e em (T)1 o halo continuou ausente. O halo de (T)2 aos 35 dias foi menor que aos 28 dias, já (T)3 apresentou-se maior.



FIGURA 13: placa de *S.aureus* evidenciando os halos de inibição para (D) acima à direita e para (T) abaixo à esquerda.

Tabela 2: Medidas correspondentes ao diâmetro dos halos de inibição dos fragmentos de membrana para placas de *S. aureus* nos diferentes tempos.

dias / antimicrobiano	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
(D) 1	26.89	28.55	13.15	20.03	25.30
(T) 1	25.00	19.51	19.55	-	-
(D) 2	35.52	26.63	23.15	26.27	22.35
(T) 2	30.78	21.59	17.90	21.25	17.14
(D) 3	35.67	28.92	18.92	13.30	20.71
(T) 3	32.20	22.78	11.80	9.42	11.07

Valores expressos em milímetros (mm). (D): Doxiciclina. (T): cloridrato de tetraciclina. Os números (1, 2 e 3) representam as placas.

5.2.3 - Placas correspondentes ao "pool anaeróbio":

Em todas as três placas correspondentes ao "pool anaeróbio" foram observados halos de inibição bacteriana, que também tinham sua presença e tamanho relacionados com o tipo de membrana presente na região da placa em que estava presente a amostra (FIGURA 14).

Aos sete e aos quatorze dias em todas as placas do "pool", ocorreu a formação de halos de inibição tanto para as amostras de (D) quanto para as de (T), sendo que as três amostras de (D) apresentaram halos de inibição maiores do que os halos das amostras de (T) nestes tempos (tabela 3). Além disso, os halos das três amostras de (D) e de (T) aos quatorze dias foram menores do que os halos apresentados em sete dias. Aos vinte e um dias ocorreu uma diminuição dos halos de (D) e de (T) em relação à quatorze dias. Ao compararmos os halos de (D) e (T), observou-se um que em (T)1 e (T)3 o halo foi maior que em (D)1 e (D)3. Contudo, apenas em (D) 2 ocorreu a formação de halo de inibição aos 28 dias.

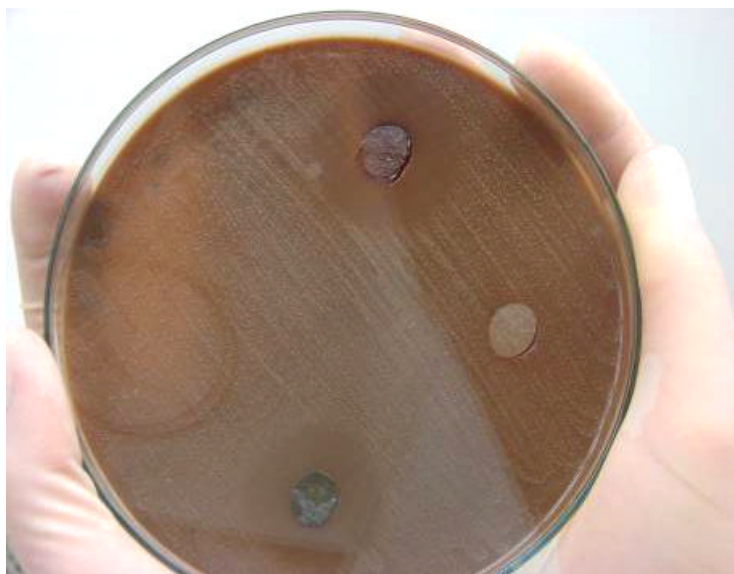


FIGURA 14: placa “pool anaeróbio”, apresentando halos de inibição para (D) acima e (T) abaixo.

Tabela 3: Medidas correspondentes ao diâmetro dos halos de inibição dos fragmentos de membrana para placas do pool anaeróbio nos diferentes tempos.

dias / antimicrobiano	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
(D) 1	31.20	21.05	10.90	-
(T) 1	27.39	17.85	12.17	-
(D) 2	29.91	19.76	10.78	12.67
(T) 2	22.92	19.72	10.55	-
(D) 3	30.15	27.15	11.08	-
(T) 3	28.00	19.02	11.46	-

Valores expressos em milímetros (mm). (D): Doxíciclina. (T): cloridrato de tetraciclina. Os números (1, 2 e 3) representam as placas

5.3 - Término das avaliações.

Para os três grupos bacterianos, a presença do halo de inibição, o tempo de permanência do mesmo e a integridade das membranas determinaram o tempo do experimento (FIGURA 15 A e 15B)

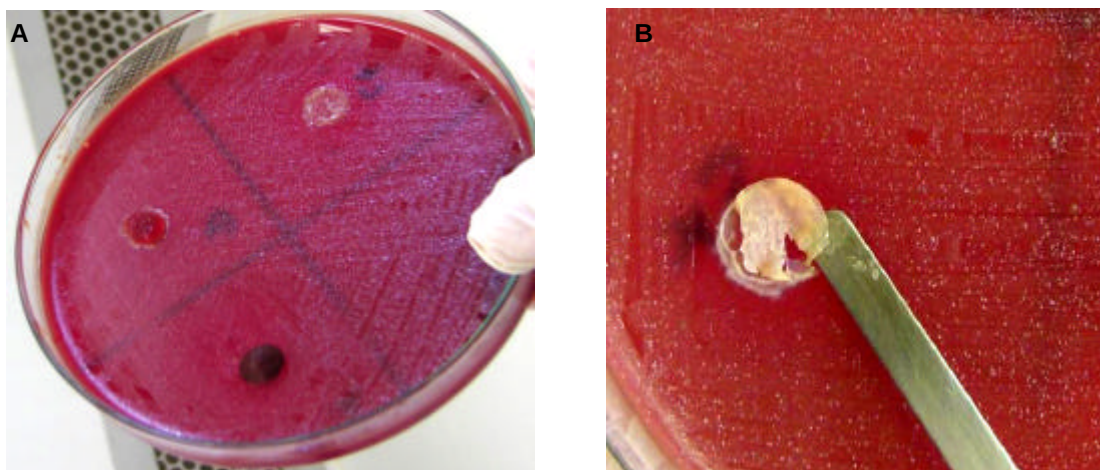


FIGURA 15: Em (A) placa “pool” mostrando ausência de halos de inibição para (D) e (T). Em (B) degradação da membrana

5.4 - Análise estatística dos resultados

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significantes, entre os resultados obtidos com a doxiciclina (D) e com o cloridrato de tetraciclina (T), nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias, foi aplicado o teste de U de Mann-Whitney (Siegel, 1975), com relação ao *E. coli*, ao *S. aureus* e ao “pool anaeróbio” separadamente. O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral e os resultados estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney aos resultados obtidos com (D) e com (T), nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias, com relação ao *E. Coli*, ao *S. aureus* e ao “pool anaeróbio”.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
<i>E. coli</i> – 7 dias	0,275
<i>E. coli</i> – 14 dias	0,043*
<i>E. coli</i> – 21 dias	0,050
<i>E. coli</i> – 28 dias	0,046*
<i>E. coli</i> – 35 dias	0,037*
<i>S. aureus</i> – 7 dias	0,275

<i>S. aureus</i> – 14 dias	0,050
<i>S. aureus</i> – 21 dias	0,513
<i>S. aureus</i> – 28 dias	0,275
<i>S. aureus</i> – 35 dias	0,050
pool – 7 dias	0,050
pool – 14 dias	0,050
pool – 21 dias	0,513

(*) $P < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 4, foram encontradas diferenças, estatisticamente significantes, entre os valores obtidos com (D) e com a (T), com relação ao *E. coli*, quando comparados os dados obtidos aos 14, aos 28 e aos 35 dias, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos com (D), nos três casos.

Avaliando-se os resultados obtidos com (D) e (T) nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias, para todas as placas de todos os três grupos e considerando-se todos os valores encontrados, o teste U de Mann-Whitney (Siegel, 1975) foi novamente aplicado. Os resultados estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney, aos resultados obtidos com a Doxiciclina e com a Tetraciclina, nos tempos de 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias e 35 dias, considerando-se todos os valores encontrados.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
7 dias	0,058
14 dias	0,003*
21 dias	0,354
28 dias	0,036*
35 dias	0,006*

(*) $P < 0,05$

De acordo com os resultados da tabela 5, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos no 14º dia, no 28º e no 35º, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos com (D), nos três casos.

6 – DISCUSSÃO

Os procedimentos de regeneração periodontal representam uma importante modalidade de tratamento, visto que os procedimentos resectivos utilizados para correção dos defeitos ósseos durante a terapia cirúrgica convencional são limitados no sentido de promover uma regeneração significativa dos tecidos (Karring *et al.*, 1993).

A partir dos estudos de Nyman *et al.* (1982) sobre os princípios da regeneração tecidual guiada, observa-se uma busca constante de aperfeiçoamento das técnicas, assim como o desenvolvimento e fabricação de biomateriais com características que garantam o sucesso dos tratamentos (Black *et al.*, 1994; Wang & Mcneill., 1998).

Dos materiais utilizados para a fabricação das membranas tem-se dado preferência aos absorvíveis (Blumenthal *et al.*, 1993). Com isso elimina-se uma segunda cirurgia para a remoção da membrana, proporcionando um melhor pós-operatório e aceitação por parte do paciente Windisch *et al.* (1999), além do que diminuem-se os riscos de exposição prematura com subsequente contaminação por bactérias (Grevstad *et al.*, 1993).

A possibilidade de associar fatores de crescimento e agentes antimicrobianos às membranas absorvíveis (Chen *et al.*, 1997) objetivam uma maior “proteção” e potencialização da resposta orgânica favorecendo os resultados clínicos (Wang & Macneil, 1998; Bunyaratavej & Wang 2001).

O interesse pelo estudo da associação de antimicrobianos às membranas absorvíveis vem de encontro aos objetivos dos procedimentos regenerativos de uma forma geral, já que a condição primária para o sucesso dos mesmos, diz respeito à ausência de contaminação do sítio cirúrgico, que pode ocorrer com a exposição da membrana (Mayfield *et al.*, 1998). Essa exposição ao meio bucal, representa um importante desafio na Periodontia, pois facilita a colonização bacteriana e prejudica a regeneração adequada dos tecidos periodontais (Oliveira, 2003), podendo ainda acelerar o processo de degradação das membranas presentes no local tratado (Chen *et al.*, 1997; Sbordone *et al.*, 1999; Ling *et al.*, 2003). O uso local de antimicrobianos nos tratamentos regenerativos já foi relatado, apresentando eficácia clínica comprovada (Chung *et al.*, 1997; Sbordone *et al.*, 2000). O uso da tetraciclina

em conjunto com os outros biomateriais, já foi descrito por Harris, 2002 e a associação deste agente em membranas absorvíveis de ácido polilático, também já foi relatada (Park et al., 2000).

A tetraciclina e seus derivados são muito difundidos na terapia periodontal, não apenas pelos bons resultados atingidos com seu uso sistêmico (Ramberg *et al.*, 2001), mas principalmente no que se refere a sua utilização local (Haffajee *et al.*, 2004; Aimetti *et al.*, 2004), para descontaminação da área e regeneração dos tecidos periodontais perdidos (Delaisse *et al.*, 2000; Houser *et al.*, 2001). Seus benefícios incluem não somente sua ação bactericida e bacteriostática, mas também pelas características de substantividade, capacidade de adsorção a superfície dentária e promoção da inserção de fibroblastos na superfície radicular.

Baseando-se nos resultados positivos dos tratamentos regenerativos, quando da utilização local de tetraciclina e na possibilidade de associá-la em membranas absorvíveis, foi desenvolvida pelo laboratório de Bioquímica - USP (Bauru), a membrana absorvível derivada de osso bovino impregnada com o cloridrato de tetraciclina. Estudos posteriores usando esse material foram realizados avaliando a biocompatibilidade e tempo de absorção (Oliveira, 2003), à inibição de crescimento bacteriano (Silva, 2003) e na utilização desta como dispositivo de liberação local (DLL) durante o tratamento da doença periodontal (Motão, 2004), apresentando bons resultados. Também encontramos na literatura, muitos estudos demonstrando os bons resultados do derivado sintético da tetraciclina, a doxiciclina. Este agente teve sua utilização na Periodontia a partir dos anos 90 (Slots & Rams 1990; Garret *et al.* 2000), sendo usado como um auxiliar na eliminação dos patógenos periodontais quando associado à terapia mecânica (Akalin *et al.* 2004). Apresenta propriedades que o colocam em destaque frente aos demais antimicrobianos como a ação efetiva contra anaeróbios (Lakhssassi *et al.*, 2005) e o seu uso local viabiliza concentrações que a tornam bactericidas (Stoller *et al.*, 1998), além de possuir atividade anticolagenase e antimetaloproteínases (Walker, *et al.*, 2000; Bezerra *et al.*, 2002). Quando comparada às demais tetraciclinas, a doxiciclina pode ser prescrita em baixas doses e com menor frequência

(Bezerra *et al.*, 2002; Preshaw *et al.*, 2004), apresentando meia vida prolongada, excreção mais lenta, menor afinidade ao cálcio, maior lipossolubilidade e capacidade de se ligar às proteínas plasmáticas, sendo mais estáveis em soro humano (Cunha *et al.*, 1982).

Objetivando-se uma maior previsibilidade dos tratamentos regenerativos quando do uso da membrana absorvível impregnada com antimicrobiano e tendo em vista os excelentes resultados que a doxiciclina vem apresentando, a hipótese de associá-la à membrana absorvível derivada de osso bovino, assim como proposto com o cloridrato de tetraciclina, representa mais um recurso que poderá ser empregado, com a finalidade de eliminar ou reduzir os riscos de contaminação dos sítios tratados através da liberação local de agentes antimicrobianos, enquanto a membrana é absorvida.

Nosso estudo baseou-se nos testes por difusão em ágar, para análise da sensibilidade *in vitro* à antimicrobianos. A capacidade de inibição do crescimento bacteriano através das membranas impregnadas com doxiciclina (D) e com cloridrato de tetraciclina (T) foi avaliada e os resultados das mesmas comparados.

A escolha dos grupos bacterianos para os testes foi baseada na necessidade de se avaliar estes biomateriais frente aos microorganismos aeróbios e anaeróbios, já que ambos fazem parte da microbiota presente na cavidade bucal. Sabemos também que a microbiota envolvida na doença periodontal é bastante complexa (Theilade *et al.*, 1966; Socransky, 1970;) havendo na sua maioria anaeróbios (Socransky & Haffajee 2002).

Optou-se por utilizar culturas de *E. coli* e *S. Aureus*, provenientes de amostras laboratoriais padrão (American Type Culture Collection, USA) e um “pool anaeróbio” coletado de bolsas periodontais de um paciente previamente selecionado que apresentava doença periodontal em estágio avançado. Nas condições experimentais de nosso estudo, foi possível observar a presença de halos de inibição de crescimento bacterianos em todas as culturas, tanto para a (T) quanto para (D) (FIGURAS 12, 13 e 14).

Nossos achados são similares aos de Silva (2003), todavia a autor avaliou somente o cloridrato de tetraciclina e em nosso experimento, ao

compararmos os resultados obtidos com os dois tipos de membrana, o uso da doxiciclina demonstrou valores superiores conforme observado nas tabelas 1, 2 e 3.

A fim de avaliar a significância desses dados, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney (Siegel, 1975) e conforme observado na tabela 4, com $P < 0.05$, comparando-se as dimensões dos halos de inibição, na maioria dos resultados não foram obtidas diferenças estatisticamente significantes para os dados experimentais. Essa diferença somente ocorreu para o grupo E. coli aos 14 dias (0.043), aos 28 dias (0.046) e aos 35 dias (0.037).

Embora nas tabelas 1, 2 e 3, sejam expressados valores superiores para (D), comparando-os aos de (T), a inexistência de diferenças significativas com relação ao tamanho dos halos, demonstra a efetividade dos dois agentes antimicrobianos. Todavia, temos que considerar a diferença observada nas placas do grupo E.coli (14, 28 e 35 dias). A princípio essas diferenças possam ser justificadas em razão de uma maior ação de (D) sobre esses microrganismos. Partindo do fato que ocorreu uma degradação das membranas, associada à uma liberação do agente antimicrobiano nos meios de cultura, concluímos que pode ter ocorrido uma maior atuação de (D) nesses microorganismos durante o período de avaliação.

Em relação ao tempo de inibição de crescimento bacteriano apresentado pelo “pool anaeróbio”, constatamos que os halos de inibição das amostras de (D) e (T) com 21 dias mostravam-se ainda evidentes, todavia as amostras de membrana apresentavam-se com sinais de degradação acentuados, impossibilitando a toca das mesmas para as outras placas. Este fato pode estar relacionado à capacidade de algumas bactérias anaeróbias como a *Porphyromonas gingivales* (Chen, *et al.*, 1999; Wakabayashi *et al.*, 1996) produzirem enzimas, acelerando assim o processo de degradação das membranas (Sbordone *et al.*, 1999).

Conforme abordado na revisão de literatura, a técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) passou a contribuir significativamente para a reconstrução periodontal, todavia, trata-se de uma técnica onde tanto os princípios cirúrgicos da área tratada, quanto os biológicos devem ser

respeitados. Caso contrário aumentam-se as chances de insucessos ou de resultados insatisfatórios. O correto fechamento da ferida cirúrgica pela adaptação de seus bordos é um dos princípios fundamentais da técnica, sendo que a exposição do leito cirúrgico acarretará uma possível contaminação e consequentemente perda do procedimento (Warrer *et al.*, 1992). Apesar desse fato não ser uma ocorrência favorável, é necessário admitir que esta condição vá requerer cuidados adicionais, tais como proteção física da área, o uso de substâncias antisépticas ou aplicação tópica de agentes antibacterianos (Nowzari *et al.*, 1996), até que ocorra a epitelização da ferida cirúrgica que ocorrerá em aproximadamente 21 dias (Amler, 1969).

A associação dos aspectos acima descritos tem levado os pesquisadores a buscarem uma integração dos procedimentos, com a intenção de proteger a ferida cirúrgica até sua completa epitelização. Sabe-se que as membranas exercem uma função mecânica no processo de seleção celular, garantindo uma proteção física à área cirúrgica, que poderá ser estendida à uma proteção tópica medicamentosa, caso a membrana apresente propriedades que permitam a liberação de certos princípios ativos durante seu processo de absorção. Foi possível confirmar a liberação de antimicrobianos por períodos semelhantes ou até superiores (28 e 35 dias), nos transmitindo a idéia de que o uso das membranas impregnadas com estes agentes é uma boa alternativa nos tratamentos regenerativos já que garante uma proteção adicional, caso haja exposição da membrana ao meio bucal.

A capacidade de inibição do crescimento bacteriano por antibióticos tem sido constantemente avaliada pelas pesquisas. Tradicionalmente estudos *in vitro* caracterizam a atividade destes agentes através da formação de halos de inibição em placas contendo meios de cultura apropriados para os grupos bacterianos selecionados. Assim, a formação desses halos associado ao período de tempo em que são mantidos, caracterizam essa inibição (Silva, 2003).

A membrana absorvível convencional (C), sem a impregnação de antimicrobiano foi avaliada, com a intenção de identificar se esta apresentava capacidade de inibição de crescimento bacteriano, o que poderia interferir em

nossos resultados. Durante a análise de todas as placas, não foi observado em nenhuma delas a formação de halos de inibição ao redor das amostras de (C), demonstrando que as membranas convencionais não apresentam essa propriedade. Em algumas placas foi observado inclusive o crescimento de colônias bacterianas por sobre as amostras de (C) (FIGURA 10).

Os resultados obtidos com as amostras impregnadas (T) e (D), indicaram a ação do agente antimicrobiano. A partir do período de 7 dias observou-se que para ambas as amostras (tabela 1,2 e 3) os halos estavam presentes, caracterizando a capacidade inibitória dos dispositivos avaliados, mantida por no mínimo 21 dias. Este período coincide com o tempo necessário para a epitelização de uma ferida cirúrgica, sendo possível inferir sobre a aplicabilidade do uso dessas membranas nos procedimentos regenerativos, já que haverá liberação nos sítios tratados, de antimicrobianos nas fases iniciais do processo de cicatrização.

Oliveira (2003) avaliou a biocompatibilidade e o tempo de absorção das membranas convencional e impregnada com (T), demonstrando que ambas são biocompatíveis, apresentando um tempo de absorção de 30 a 60 dias. Acreditamos que nossos resultados tornam-se mais expressivos se associados aos desse autor, já que além da biocompatibilidade, poderemos incluir a capacidade de inibição bacteriana apresentada por (T).

Embora confirmada a capacidade de inibição das amostras de (T) e (D) por no mínimo 21 dias, com exceção da placa 1 de *E.coli* (tabelas 1, 2 e 3), observamos que em algumas placas houve uma manutenção dessa inibição por até 28 e 35 dias, sendo que nesses dois últimos períodos um maior destaque pode ser dado às amostras de (D), que apresentavam halos maiores que os de (T) ou ainda persistia sua ocorrência em placas nas quais (T) já não mais apresentava capacidade inibitória.

Motão em 2003 realizou uma avaliação *in vivo* das membranas derivadas de osso bovino impregnadas com tetraciclina (T), aplicando-as como dispositivo de liberação medicamentosa local (DLL) em bolsas periodontais durante o tratamento periodontal não-cirúrgico. Os resultados demonstrados neste associados ao nosso estudo, leva-nos a propor a aplicação deste recurso

não somente à RTG, mas também como terapia complementar à raspagem. Baseando-se em nossos resultados, com relação à excelente capacidade inibitória apresentada pela membrana impregnada com doxiciclina, sugerimos que também sejam feitos estudos *in vivo* com a mesma, pois acreditamos que assim como a membrana (T), a membrana de doxiciclina também apresentará bons resultados quando do seu uso como DLL na terapia periodontal não-cirúrgica.

Embora nossos resultados expressem a possibilidade de ser utilizada uma barreira absorvível com capacidade de dispersão medicamentosa, sabemos, no entanto, que outros tipos de avaliações deverão ser realizadas, a fim de se determinar, de forma mais conclusiva, a influência desse recurso nos tratamentos regenerativos, tornando assim viável sua aplicação clínica.

7 - CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado o estudo e baseado na metodologia empregada pode-se concluir que:

As membranas absorvíveis derivadas de osso bovino convencionais não apresentam nenhuma capacidade de inibição do crescimento bacteriano, não ocorrendo formação de nenhum tipo de halo de inibição ao redor dos fragmentos.

As membranas impregnadas com o cloridrato de tetraciclina apresentaram capacidade de inibição por tempos que variavam de 14 a 28 dias para o grupo de *E. coli* e de 21 a 35 dias para o grupo *S. aureus*. Já para o grupo pertencente ao “pool anaeróbio” houve inibição de crescimento bacteriano por 21 dias.

As membranas impregnadas com doxiciclina quando comparada às impregnadas com cloridrato de tetraciclina apresentou resultados mais efetivos *in vitro*, com uma capacidade máxima de inibição das cepas aeróbias em até 35 dias e das anaeróbias por 21 dias.

REFERÊNCIAS

1. Armitage GC, Jeffcoat MK, Chadwick DE, Taggart EJ Jr, Numabe Y, Landis JR, Weaver SL, Sharp TJ. Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of periodontitis. **J Periodontol.**1994;65(2):120-8
2. AL-ARRAYED, F.; MORAN, A.S.; DOWELL, P. Clinical trial of cross-linked human type I collagen as a barrier material in surgical periodontal treatment. **J. Clin. Periodontol.**1995;22(5): 371-379.
3. Aimetti M, Romano F, Torta I, Cirillo D, Caposio P, Romagnoli R. Debridement and local application of tetracycline-loaded fibres in the management of persistent periodontitis: results after 12 months. **J Clin Periodontol.**2004;31(3):166-72.
4. Akalin FA, Baltacioglu E, Sengün D, Hekimoglu S, Taskin M, Etikan I, Fisenk I. A comparative evaluation of the clinical effects of systemic and local doxycycline in the treatment of chronic periodontitis. **J Oral Sci.**2004;46(1):25-35.
5. Alger FA, Solt CW, Vuddhakanok S, Miles K. The histologic evaluation of new attachment in periodontally diseased human roots treated with tetracycline-hydrochloride and fibronectin. **J. Periodontol.** 1990; 61 (7): 447-455.
6. Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction Wounds. **Oral Surgery** 1969;(27):309-318.
7. Barry AL, Thornsberry C. Susceptibility testing: Diffusion test procedure. In: **Manual of clinical Microbiology**. 3 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1980.
8. Becker W. New attachment after treatment with root isolation procedures: report of treated class III and class II furcations and vertical osseous defects. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**1988;8(3):8-23.
9. Bettany JT, Peet NM, Wolowacz RG, Skerry T.M, Grabowski, PS. Tetracycline induce apoptosis in osteoblasts. **Bone.**2000;27(1):75-80.

10. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res.**2002;35(5):613-6.

11. Black BS, Gher ME, Sandifer JB, Fucini SE, Richardson AC. Comparative study of collagen and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of human class II furcation defects. **J. Periodontol.**1994;65(6):598-604.

12. Blumenthal, N.M. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE membranes in the treatment of human mandibular buccal class II furcation defects. **J. Periodontol.**1993;64(10): 925-933.

13. Bunyaratavej P, Wang HI. Collagen membranes: A review. **J. Periodontol.** 2001;72(2):215-229.

14. Caffesse RG, Sweeney PL, Smith BA. Scaling and root planing with and without periodontal flap surgery. **J Clin Periodontol.** 1986;13(3):205-10.

15. Caton J, Zander HA. Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. **J Clin Periodontol.**1976;3(1):54-8.

16. Caton JG, Ciancio Sg, Blinden TM, Bradshaw M, Crout RJ, Hefti AF, Massaro JM, Polson AM, Thomas J, Walter C. Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planning: post-treatment effects. **J. Clinical Periodontol.**2001;(28):782-789.

17. Chen CC, Wang HL, Lopatin De, O'neal RB, MacNEIL, RL. Bacterial adherence to guided tissue regeneration barrier membranes exposed to the oral environment. **J Periodontol.**1997;68(2):172-79.

18. Christgau M, Schmalz G, Wenzel A, Hiller Ka. Periodontal regeneration of intrabony defects with resorbable and non-resorbable membranes: 30-month results. **J. Clin. Periodontol.**1997;24(1):17-27.

19. Choi SH, Kim CK, Cho KS; Huh JS, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjo, UME. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-Wall intrabony defects in dogs. **J. Periodontol.**2002;73:63-72.

20. Chung CP, Kim DK, Park YJ, Nam KH, Lee SJ. Biological effects of drug-loaded biodegradable membranes for guided bone regeneration. **J Periodontal Res.**1997;32(1 Pt 2):172-5.

21. Cobb CM. Non-surgical pocket therapy: mechanical. **Ann Periodontol.**1996;1(1):443-90. Review.

22. Cortellini P, Pini Prato G, Baldi C, Clauser C. Guided tissue regeneration with different materials. **Int J Periodontics Restorative Dent.**1990;10(2):136-51.

23. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS.Interproximal free gingival grafts after membrane removal in guided tissue regeneration treatment of intrabony defects. A randomized controlled clinical trial. **J Periodontol.** 1995;66(6):488-93

24. Cristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. **Biomaterials** .1987;8(6):423-26.

25. Cunha BA, Sibley CM, Ristuccia AM. Doxycycline. **Ther Drug Monit.**1982;(2):115-35.

26. De Sanctis M, Zucchelli G, Clauser C. Bacterial colonization of bioabsorbable barrier material and periodontal regeneration. **J Periodontol.**1996a;67(11):1193-200.

27. De Sanctis M, Zucchelli G, Clauser C. Bacterial colonization of barrier material and periodontal regeneration. **J Clin Periodontol.**1996b;23(11):1039-46.

28. Delaissé JM, Engsig MT, Everts V, Ovejero, MC et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. **Clinica Chimica Acta.**2000;291:223-234.

29. Drury GI & Yukna RA. Histologic evaluation of combining tetracycline and allogeneic freeze-dried bone on bone regeneration in experimental defects in baboons. **J. Periodontol.**1991;62(11):652-58.

30. DUGGAR BM. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. **Ann N Y Acad Sci.**1948; 30(51(Art. 2)):177-81.

31. Fabre J, Pitton JS, Kunz JP. Distribution and excretion of doxycycline in man. **Chemotherapy.**1966;11(2):73-85.

32. Franklin TJ, Snow GA. **Biochemistry of antimicrobial action**, ed.2.London: Chapman & Hall.1975:123-126.

33. Garrett S, Johnson L, Drisko CH, Adams DF, Bandt C, Beiswanger B, Bogle G, Donly K, Hallmon WW, Hancock EB, Hanes P, Hawley CE, Kiger R, Killoy W, Mellonig JT, Polson A, Raab FJ, Ryder M, Stoller NH, Wang HL, Wolinsky LE, Evans GH, Harrold CQ, Arnold RM, Southard GL, et al.Two multi-center studies evaluating locally delivered doxycycline hyclate, placebo control, oral hygiene, and scaling and root planing in the treatment of periodontitis. **J Periodontol.**1999;70(5):490-503.

34. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. **Crit Rev Oral Biol Med.** 1991;2(3):297-321. Review.

35. Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blinden T, Payonk G, Sipos T, Baron HJ. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and loss in adult periodontitis. **J. Clinical Periodontol.**2001;(28):146-156.

36. Galgut P, Pitrola R, Waite I, Doyle C, Smith R. Histologica Evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats. **J. Clin. Periodontol.** 1991;18(8):581-586.

37. Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. **J Periodontol.**1998;69(5):507-20.

38. Goodson JM, Holborow D, Dunn RL, Hogan P, Dunham S. Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. **J Periodontol.**1983 Oct;54(10):575-9.

39. Golub LM, Wolff M, Roberts S, Lee HM, Leung M, Payonk GS. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. **J Am Dent Assoc.**1994 Feb;125(2):163-69.

40. Grevstad HJ, Leknes KN. Ultrastructure of plaque associated with polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes used for guided tissue regeneration. **J Clin Periodontol.**1993;20(3):193-8.

41. Haffajee AD, Uzel NG, Arguello EI, Torresyap G, Guerrero DM, Socransky SS. Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat "refractory" periodontitis. **J Clin Periodontol.**2004;31(10):869-77.

42. Haffajee AD. Systemic antibiotics: to use or not to use in the treatment of periodontal infections. That is the question. **J Clin Periodontol.**2006;33(5):359-61.

43. Harris RJ. Treatment of furcation defects with an allograft -alloplast-tetracycline composite bone graft combined with GTR: Human histologic evaluation of a case Report. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**2002;22(4):381-387.

44. Herculiani PP, Cestari TM, Taga EM, Taga R. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Rev. Bras. Implant.**2000;7(2):7-14.

45. Houser BE, Melloning JM, Brunsvold MA, Cochran DL, Meffert RM, Alder ME. Clinical evaluation of anorganic bovine bone xenograft with a bioabsorbable collagen barrier in the treatment of molar furcation defects. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**2001;21(2):161-169.

46. Hurley La, Stinchfield Fe, Bassett Al, Lyon Wh. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. **J Bone Joint Surg Am.** 1959;41-A:1243-54.

47. Johnson LR, Stoller NH, Polson A, Harrold CQ, Ryder M, Garrett S. The effects of subgingival calculus on the clinical outcomes of locally-delivered controlled-release doxycycline compared to scaling and root planing. **J. Clin Periodontol.**2002;29(2):87-91.

48. Jorgensen MG, Safarian A, Daneshmand N, Keim RJ, Slots J. Initial antimicrobial effect of controlled-release doxycycline in subgingival sites. **J Periodontal Res.** 2004;39(5):315-19.

49. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Dyer JK, Bates RE Jr. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. **J Periodontol.** 1988;59(12):783-93.

50. Karring T, Nyman S, Gottlow J & Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration animal and human studies. **Periodotology 2000.** 1993; (1): 26-35.

51. Kim TS, Holle R, Haustmann E, Eickholz, P. Long-term results of guided tissue regeneration therapy with non-resorbable and bioabsorbable barriers. II. A case series of infrabony defects. **J. Periodontol.**2002;73(4):450-459.

52. Lang NP, Joss A, Tonetti MS. Monitoring disease during supportive periodontal treatment by bleeding on probing. **Periodontol 2000.** 1996;12:44-8.

53. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. **Oral Microbiol Immunol.**2005;20(4):244-52.

54. Ling LJ, Hung SI, Lee, CF, Chen YT, Wu KM. The influence of membrane exposure on the outcomes of guided tissue regeneration: clinical and microbiological aspects. **J. Periodont. Res.**2003;(38):57-63.

55. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**.1965;36:177-87.

56. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. **J Dent Res**.1979;58(12):2404-12.

57. Machion L, Andia DC, Lecio G, Nociti FH Jr, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA. Locally delivered doxycycline as an adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of smokers: a 2-year follow-up. **J Periodontol**.2006;77(4):606-13.

58. Machion L, Andia DC, Saito D, Klein MI, Gonçalves RB, Casati MZ, Nociti FH Jr, Sallum EA. Microbiological changes with the use of locally delivered doxycycline in the periodontal treatment of smokers. **J Periodontol**.2004;75(12):1600-4.

59. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. **J Clin Periodontol**.1984 Mar;11(3):193-207.

60. Magnusson I. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontitis. **Compend Contin Educ Dent**. 1998;19(10):953-6.

61. Matsumoto A; Yamaji K; Kawanami M Kato H. Effect of aging on bone formation induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 combined with fibrous collagen membranes at subperiosteal sites. **J. Period.Res**.2001;36:175-182.

62. Mombelli A, Lang N, Nyman S. Isolation of periodontal species after guided tissue regeneration. **Journal of Periodontology**. 1993;64:1171-75.

63. Misch, Ce; Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dentistry**.1993;2(3):158-67.
64. Melcher AH.On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol**. 1976 May;47(5):256-60. Review.
65. Motão LC. **Avaliação de dispositivo de liberação controlada aplicado à terapia periodontal não cirúrgica (experimental)**. [dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia/UFU, 2004.
66. Nowzari H, MacDonald ES, Flynn J, London RM, Morrison JL, Slots J. The dynamics of microbial colonization of barrier membranes for guided tissue regeneration. **J Periodontol**. 1996;67(7):694-702.
67. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol**.1982;9(3):290-296.
68. Newman MG, Socransky SS.Predominant cultivable microbiota in periodontosis. **J Periodontal Res**. 1977 Mar;12(2):120-8.
69. Oliveira RC. **Avaliação microscópica e bioquímica comparativa da membrana de osso cortical bovino desmineralizado, tratada ou não com tetraciclina, implantada em subcutâneo de ratos**. [dissertação] Bauru: Universidade de São Paulo/USP;2003.
70. Park YJ, Lee YM, Park SN, Lee JY, Ku Y, Chung CP, Lee SJ. Enhanced guided bone regeneration by controlled tetracycline release from poly(L-lactide) barrier membranes. **J Biomed Mater Res**.2000;51(3):391-7.
71. Parodi R, Carusi G; Santarelli G; Nanni F; Pingitore R, Brunel G. Guided tissue regeneration employing a collagen membrane in a human periodontal bone defect: A histologic evaluation. **Int. J. Periodont. Rest. Dent**.1997;17(3):283-291.
72. Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. **J Clin Periodontol**.2004;31(9):697-707.

73. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Azar-Avidan O, Noff M. Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. **J. Periodont. Res.**1987;22(4): 331-333.

74. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Noff M Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. **J. Periodont. Res.** 1989;24(4):247-253.

75. Piette E; Alberius P; Samman N; Linde A. Experience with e-PTFE membrane application to bone grafting of cleft maxilla. **Int J Oral Maxillofac Surg.**1995;24(5):327-332.

76. Ramberg P, Rosling B, Serino G, Hellström MK, Socransky SS, Lindhe J. The long-term effect of systemic tetracycline used as an adjunct to non-surgical treatment of advanced periodontitis. **J Clin Periodontol.**2001;28(5):446-52.

77. Riond JL, Riviere JE. Pharmacology and toxicology of doxycycline. **Vet Hum Toxicol.** 1988 Oct;30(5):431-43.

78. Rocha LB, Goissis G, Rossi M.A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials.**2002;23(2): 449-456.

79. Rosenberg E, Rose L. Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. **Dental Clinics of North America.**1998;42(3):467-90.

80. Rosling B, Hellström MK, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. The use of PVP-iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.** 2001 Nov;28(11):1023-31.

81. Salvi GE, Mombelli A, Mayfield L, Rutar A, Suvan J, Garrett S, Lang NP. Local antimicrobial therapy after initial periodontal treatment. **J Clin Periodontol.**2002;29(6):540-50.

82. Sanchez MPR; Marzola C; Taga R. Avaliação microscópica em ratos (Wistar albinus) de implantes de matriz de osso bovino liofilizado "Biograft" + proteína morfogenética + membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado Dentoflex". **Rev. Brasileira Cirurgia e Implantodontia**.2000;7(27):30-39.

83. Sbordone L, Barone A, Di Genio A, Ramaglia, LS. Bacterial colonisation during GTR treatment. A longitudinal analysis. **Minerva Stomatol**.1999;48(11):501-08.

84. Sbordone L, Barone A, Di Genio M, Ramaglia L. Tetracycline fibres used to control bacterial infection during guided tissue regeneration (GTR). **Minerva Stomatol**.2000;49(1-2):27-34.

85. Seal B.L; Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering R**.2001;34:147-230.

86. Selvig KA, Nilveus RE, Fitzmorris L, Kersten B, Khorsandi SS. Scanning electron microscopic observations of cell populations and bacterial contamination of membranes used for guided periodontal tissue regeneration in humans. **J Periodontol**. 1990;61(8):515-20.

87. Serino G, Rosling B, Ramberg P, Socransky SS, Lindhe J. Initial outcome and long-term effect of surgical and non-surgical treatment of advanced periodontal disease. **J Clin Periodontol**. 2001 Oct;28(10):910-6.

88. Siegel, S. **Estatística não paramétrica, para as ciências do comportamento**. Trad. Alfredo Alves de Farias. São Paulo, Ed. McGraw-Hill do Brasil,1975.

89. Silva JP. **Avaliação "in vitro" dos níveis da dispersão de agentes antimicrobianos em membranas absorvíveis aplicadas nos procedimentos regenerativos periodontais**. [dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia de Uberlândia/UFU; 2003.

90. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. **Int J Oral Maxillofac Implants**.1994;9(1):13-29.

91. Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. **Scand J Dent Res.** 1977 Jan-Feb;85(2):114-21.

92. Slots J, MacDonald ES, Nowzari H. Infectious aspects of periodontal regeneration. **Periodontol 2000.**1999;(19):164-72.

93. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. **J Clin Periodontol.**1990;17(7 (Pt 2)):479-93.

94. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. **J Periodontal Res.** 2002 Oct;37(5):389-98.

95. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000.** 2002;28:12-55.

96. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **J Dent Res.** 1970;49(2):203-22.

97. Socransky SS, Haffajee AD. Effect of therapy on periodontal infections. **J Periodontol.** 1993 Aug;64(8 Suppl):754-9.

98. Stoller NH, Johnson LR, Trapnell s, Harrold CQ. The pharmacokinetic profile a biodegradable controlled-release delivery system containing doxycycline in gingival 47 crevicular fluid, saliva and serum. **Journal of Periodontology.**1998;69(10):1085-91.

99. Taga R, Cestari TM, Taga EM, Assis GF, Marine MG. Avaliação histológica, radiográfica e morfométrica da reparação de defeito ósseo perene em crânio de cobaia tratado com mistura de osseobond e membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperiostica na calvária de cobaia. **Rev. Bras. Implant.**1997a:24-29.

100. Taga R, Hassunuma CY, Cestari TM, Ferreira PM. Destino de membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperióstica na calvária de cobaia. **Rev. Bras. Implant.** 1997b:24-29.

101. Takahashi N, Ishihara K, Kimizuka R, Okuda K, Kato T. The effects of tetracycline, minocycline, doxycycline and ofloxacin on *Prevotella intermedia* biofilm. **Oral Microbiol Immunol.**2006;21(6):366-71.

102. Theilade E. The non-specif theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. **Journal of Periodont.**1966;13(10):905-11.

103. Trombelli L, Kim CK, Zimmerman GJ, Wikesjö UM. Retrospective analysis of factors related to clinical outcome of guided tissue regeneration procedures in intrabony defects. **J Clin Periodontol.**1997;24(6):366-71.

104. Wakabayashi RC, Wong F, Richards DW, Johnson PW. Protease repertoires of cells adherent to membranes recovered after guided tissue regeneration. **J Periodontal Res.**1996;31(3):171-80.

105. Walker C, Thomas J, Nangó S, Lennon J, Wetzel J, Powala C. Long-term treatment with subantimicrobial dose doxycycline exerts no antibacterial effect on the subgingival microflora associated with adult periodontitis. **J Periodontol.**2000;71(9):1465-71.

106. Walker CB, Karpinia K, Baehni P. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. **Periodontol 2000.** 2004;36:146-65.

107. Wang HL, Macneil RL. Guided tissue regeneration. Absorbable barriers. **Dental Clinics of North America.**1998; 42 (3): 505-22.

108. Wang HL, Kimble K, Eber R. Use of bone grafts for the enhancement of a GTR-based root coverage procedure: a pilot case study. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**2002;22(2):118-27.

109. Warrer K, Karring T, Nyman S, Gogolewski, S. Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane. **J. Clin. Periodontol.**1992;19(9):633-640.

110. Wennström JL, Newman HN, MacNeill SR, Killoy WJ, Griffiths GS, Gillam DG, Krok L, Needleman IG, Weiss G, Garrett S. Utilisation of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis. A comparative multi-centre trial of 2 treatment approaches. **J Clin Periodontol**.2001;28(8):753-61.
111. Wennström JL, Heijl L, Lindhe J. Cirurgia Periodontal: acesso cirúrgico. In: **Tratado de Periodontia clínica e Impantodontia Oral**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2005. p: 502-541.
112. Windisch P; Sculean A; Gera, I. GTR with three different types of membranes in the treatment of intrabony periodontal defects: three-year results in sixty consecutive cases. **J Long Term Eff Med Implants**1999;9(3):235-246.
113. Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T, Baka A, Konstantinidis A. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol**.2006;33(4):254-64.
114. Yoshinari N, Tohya T, Mori A, Koide M, Kawase H, Takada T, Inagaki K, Noguchi T. Inflammatory cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regenerative procedures. **J Periodontol**.1998;69(4):460-9.
115. Yukna CN, Yukna RA. Multi-Center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human class II furcations. **J. Periodontol**.1996;67(7):650-657.
116. Zhao S, Pinholt Em Madsen J.E, Donath K. Histological evaluation of diferent biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**. 2000;2000 (28):116-122.
117. Zucchelli G, Sforza NM, Clauser C, Cesari C, De Sanctis M. Topical and systemic antimicrobial therapy in guided tissue regeneration. **J Periodontol**.1999;70(3):239-47.

Anexo - I


Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531

ANÁLISE FINAL Nº 518 /07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 240/07

Projeto Pesquisa: "Análise microbiológica *in vitro* da dispersão de doxiciclina incorporada a membranas absorvíveis utilizadas nos procedimentos regenerativos periodontais e implantares".

Pesquisador Responsável: Denildo de Magalhães

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

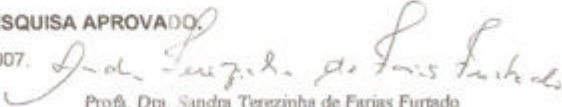
O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do Relatório Final: Março /2008

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

Uberlândia, 14 de Dezembro de 2007.


Prof.ª Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise dos riscos da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requerem ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme a norma da Res. 196/96 CNS.

Anexo – II



PROBAC DO BRASIL

CERTIFICADO DE QUALIDADE

PRODUTO: ANAEROBAC

LOTE: ANA 091007	DATA PRODUÇÃO	VALIDADE:	DATA-ANÁLISE FINAL
Sub lotes: A, B, C, D	10/09/07	1 Ano	12/09/07

TESTE	BACTÉRIAS TESTADAS	
<i>MICROBIOLÓGICO</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124
Crescimento	+	+

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	ASPECTO	COR
	H	N

OBSERVAÇÕES/COMENTÁRIOS:

H = Homogêneo
N = Normal

Biomédico analista:


 Rosana P. C. Fernandes
 CRBM 4618

Data: Setembro/2007