

GUIDO OROZCO RUIZ

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E DA EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA EM
CULTURAS DE CÉLULAS OSTEoblÁSTICAS SOBRE MEMBRANAS DE
POLIPROPILENO**

CAMPINAS
2015

GUIDO OROZCO RUIZ

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E DA EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA EM
CULTURAS DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS SOBRE MEMBRANAS DE
POLIPROPILENO**

Dissertação apresentada ao Centro de
Pós-Graduação / CPO São Leopoldo
Mandic, para obtenção do título de
Mestre em Odontologia

Área de Concentração: Implantodontia.

Orientador: Daiane Cristina Peruzzo

CAMPINAS
2015

**Ficha Catalográfica elaborada pela biblioteca São Leopoldo Mandic
“Prof. Dr. Cid. Santos Gesteira**

Ruiz, O Guido.

Análise da citotoxicidade e da expressão de fibronectina em culturas de células osteoblásticas sobre membranas de polipropileno

Guido O Ruiz. 2015.

Orientador: Daiane C. Peruzzo

Dissertação (mestrado) - Faculdade São Leopoldo Mandic.

1.Regeneração Tecidual Guiada . 2. Formação óssea. 3. Membranas

C.P.O. SÃO LEOPOLDO MANDIC
Mestrado de Excelência em Implantodontia

Análise da citotoxicidade e da expressão de fibronectina em culturas de células osteoblásticas sobre membranas de polipropileno

Coordenador: Prof. Dr. Júlio Cesar Joly

Orientadora: Profa. Dra Daiane C. Peruzzo

Pesquisador: Guido Orozco Ruiz

CAMPINAS
2015

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Tania pela incondicional presença e abnegação, da qual atribuo toda minha formação pessoal e profissional.

Aos meus filhos David e Victor, pela razão e estímulo de alcançar e constituir objetivos maiores na vida.

À minha esposa Tathiana, pelo amor, companheirismo, caráter e compreensão, me apoiando e incentivando para que me torne uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do curso professor Julio Cesar Joly, que admiro ao ver sua excepcional maneira individualizada de passar ensinamentos e filosofias, bem como na convivência, mostrando-se além de um notável professor, um distinto ser humano.

A minha orientadora professora Daiane Cristina Peruzzo, por toda ajuda e acompanhamento durante a realização deste projeto.

À Professora Elizabeth Ferreira Martinez em especial, por estar sempre disposta a ajudar e explicar o estudo em todos os sentidos, desde o início até a conclusão, para que este trabalho chegasse a finalização.

À Vanessa de Araújo e Pollyana Montaldi pela ajuda nos experimentos laboratoriais realizados.

Ao grupo implante-perio, pelos ensinamentos.

Ao Dr. Munir Salomão e a empresa Bionnovation pelo suporte à pesquisa.

Aos colegas de curso, pela amizade construída.

Qualquer novo conhecimento
provoca dissoluções e novas
integrações

(Hugo Hofmannsthal)

RESUMO

Membranas têm sido frequentemente utilizadas em tratamentos de prevenção de perda óssea alveolar e correção de defeitos ósseos em rebordos alveolares visando instalação de implantes dentários. Este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a citotoxicidade e a expressão de fibronectina em cultura de células osteoblásticas sobre membranas de polipropileno. Células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 foram plaqueadas sobre membranas de polipropileno e de PTFE (grupo controle) e cultivadas por períodos de até 10 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) proliferação celular por contagem em hemocitômetro aos 3, 7 e 10 dias; 2) viabilidade celular por MTT aos 3, 7 e 10 dias; e 3) Imunolocalização da proteína matricelular fibronectina por epifluorescência em 1, 2, 4 e 24 h. Os resultados demonstraram que a proliferação e a viabilidade celulares foram semelhantes entre as culturas crescidas sobre ambas as membranas avaliadas (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Além disso, não foram observadas diferenças na expressão de fibronectina entre as células cultivadas sobre as membranas de polipropileno e PTFE. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a membrana de polipropileno não apresenta citotoxicidade e pode ser considerada uma alternativa à membrana de PTFE nos procedimentos de regeneração óssea guiada.

Palavras-chave: 1. Regeneração Tecidual Guiada; 2. Formação óssea; 3. Membranas

ABSTRACT

Membranes have been used frequently in alveolar bone loss prevention and correction of bone defects in alveolar ridges aiming dental implants treatments. The present study was undertaken to evaluate *in vitro* the cytotoxicity and fibronectin expression in cultured osteoblast cells on polypropylene membrane. Cells from an osteoblast-like line MC3T3-E1 were plated on polypropylene membranes and PTFE (control group) and cultured for up to 10 days. The following parameters were evaluated: 1) cell proliferation, by hemacytometer count at 3, 7 and 10 days; 2) Cell viability, by MTT analysis at 3, 7 and 10 days; and 3) protein fibronectin Immunolocalization matricelular, by epifluorescence at 1, 2, 4 and 24 hours. The results showed that the proliferation and cell viability was similar in cultures grown evaluated for both membranes. (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). In addition, there was no difference in fibronectin expression in cells cultures on the polypropilene and PTFE membranes. Based on these results, it was concluded that the polypropylene membrane showed no cytotoxicity and can be considered an alternative to PTFE membrane in guided bone regeneration procedures.

Keywords: 1. Guided Tissue Regeneration; 2. Bone Formation; 3. Membranes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Avaliação da proliferação celular pelo método de exclusão vital por azul de *Trypan* nos tempos 3, 7 e 10 dias para as membranas BoneHeal® e Surgitime®..... 37
- Figura 2** Testes de viabilidade celular (MTT) nos tempos 3, 7 e 10 dias para as membranas BoneHeal® e Surgitime®..... 38
- Figura 3** Imunomarcação para fibronectina (verde, AlexaFluor 488) em células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 plaqueadas sobre membranas BoneHeal® e Surgitime® após 1, 2, 4 e 24h. Aumento original: 400X..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
BMP-2	Proteína 2 óssea morfogenética
DFDBA	Osso alógeno congelado seco desmineralizado
d-PTFE	Politetrafluoroetileno denso
e-PTFE	Politetrafluoroetileno expandido
FDBA	Osso alógeno congelado seco
IGF1	Fator 1 de crescimento de insulina
MC3T3-E1	Células osteoblásticas
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MDA	Matriz dérmica acelular
PDLLCL	Poly(DL-lactide-e-caprolactone)
PTFE	Politetrafluoroetileno
PLA	Ácido Polilático
PLLA	Ácido Poli-L-lático
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Fator de crescimento plaquetário
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SAOS-2	Células de osteosarcoma
TGF β1	Fator de crescimento transformador β 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	06
3	PROPOSIÇÃO.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5	RESULTADOS.....	35
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	57

1. Introdução

Os implantes dentários têm sido utilizados com sucesso há anos na reabilitação oral. Atualmente a previsibilidade do tratamento mede não somente a taxa de sobrevivência dos implantes dentários como também o sucesso estético-funcional das próteses sobre implante. Este sucesso depende de um correto posicionamento do implante, que é influenciado por diversos fatores, entre eles está altura e dimensões da crista óssea da região a ser reabilitada (SCHANTZ et al 2000; BARBER et al 2007; LINDFORS et al 2010; MEZZOMO et al 2010; SALOMÃO et al 2010).

A perda de osso alveolar pós-extração dentária está bem documentada na literatura. A compreensão do processo de reparo, alterações de contorno alveolar causados pela reabsorção e remodelação óssea fisiológica são essenciais no planejamento reverso para assim poder obter uma reabilitação satisfatória em termos de estética e função. A manutenção e prevenção da perda óssea nessas regiões é de extrema importância para os planejamentos reabilitadores (SCHANTZ et al 2000; BARBER et al 2007; KIM et al 2008; LINDFORS et al 2010; MEZZOMO et al 2010; SALOMÃO et al 2010).

As duas grandes áreas de utilização das membranas em odontologia são a Regeneração Tecidual Guiada (RTG) e Regeneração Óssea Guiada (ROG). A ROG requer espaço adequado na região que servirá como sítio provedor, onde células mesenquimais com potencial de migração, proliferação e diferenciação produzirão matriz colágena extracelular que mineralizará. Para que a ROG possa acontecer, faz-se necessário o uso de uma membrana biocompatível que serve para separar o sítio provedor de células mesenquimais dos tecidos adjacentes de outras origens, promovendo, desta forma, espaço suficiente para a formação de coágulo e a diferenciação de células mesenquimais, mediada pelos fatores de crescimento ósseo, em tecido ósseo neoformado (FRIEDMANN et al 2007).

A primeira membrana não biodegradável disponível para uso odontológico era constituída de e-PTFE. PTFE é um polímero estável, quimicamente e biologicamente inerte, capaz de resistir a ação enzimática e microbiológica. Membranas expandidas têm sido amplamente utilizadas para regeneração tecidual e óssea guiada e tem respaldo de sucesso na documentação literária (CARBONELL et al. 2013).

No início dos anos 90, a Academia Americana de Periodontia, baseada nas evidências científicas de uma década de pesquisadores de todo o mundo estipularam 5 critérios recomendados para membranas em uso da técnica de RTG e ROG: 1) interação tecidual; 2) separação celular; 3) manipulação clínica; 4) manutenção de espaço e 5) biocompatibilidade. A evolução biológica ocorreu com estudos de regeneração tecidual com matriz óssea e e-PTFE inicialmente e, posteriormente, caminhou para exames dos fatores de crescimento nos defeitos periodontais e ósseos. Ainda hoje, a evolução das membranas biodegradáveis e não biodegradáveis carece de pesquisa de engenharia estrutural e clínica para serem amplamente utilizadas e garantirem o sucesso da técnica (SCANTLEBURY e AMBRUSTER 2012).

Vários tipos de membrana e sua efetividade como barreira têm sido testadas, como as de tetrafluoretileno (PTFE) densa, membranas de colágeno e membranas de ácido polilático. Muitos problemas têm sido associados às membranas não absorvíveis, especialmente a necessidade de um segundo estágio de cirurgia para remoção. Para evitar este problema, polímeros absorvíveis e membranas de colágenos tem sido uma alternativa. Além disso, exposições precoces ao meio bucal têm sido relatadas e subsequente colonização bacteriana são problemas comuns das membranas não absorvíveis (KASAJ et al 2008).

Além da PTFE densa, também está descrito na literatura, para abordagem de técnica de ROG, o uso de membrana de polipropileno. As membranas de polipropileno

são feitas de material impermeável, não reabsorvível que podem ser usadas nos procedimentos de ROG de alvéolos pós extração dentária. Uma das propriedades sugeridas à técnica da ROG com essas membranas é que essas barreiras não absorvíveis, expostas ao meio bucal, controlem ou evitem o infiltrado de células de tecidos moles, tecido conjuntivo e epitelial, favorecendo a proliferação de células ósseas no interior do alvéolo sem que se corra o risco de infecção bacteriana (SALOMÃO et al 2009;2010;2012).

A engenharia tecidual é uma área de pesquisa de grande foco ultimamente, nos quais tecidos funcionais e órgãos são restaurados sinteticamente ou de organismos nativos para reparar uma função ou defeito. As membranas de e-PTFE são largamente utilizadas para RTG e apesar de suas vantagens, apresentam resultados pobres pelos micromovimentos entre o tecido mole e a membrana, migração de fibroblastos pela membrana e infecção. Grandes reconstruções de defeitos ósseos estão contra-indicados também pelas suas propriedades inertes e também pelas características mecânicas. (BELOTI et al. 2006).

Existem poucas evidências na literatura quanto à porosidade e à superfície ideais das membranas não absorvíveis na prevenção de crescimento de tecido mole durante a RTG. O tamanho dos poros definitivamente interfere na qualidade do osso formado e da previsibilidade da técnica de ROG (GUTTA et al. 2009). Adicionalmente, são relatadas possíveis infecções iniciais na utilização de e-PTFE, afetando a regeneração, devido a sua macroporosidade, propriedade essa necessária para a estabilidade da membrana (CARBONELL et al. 2013).

Uma vez sabido que as membranas não biodegradáveis são quimicamente e biologicamente inertes, resistentes ao ataque enzimático e microbiológico, um dos pré-requisitos para o sucesso da técnica de ROG, é que o excesso de reação

inflamatória não interfira no reparo ósseo e exista o mínimo de infiltração celular inflamatória sobre a superfície da membrana, assim que, a superfície e a porosidade da membrana são fundamentais para o sucesso da técnica de ROG. (ZHAO et al. 2000).

Diante da carência de estudos relacionados às propriedades biológicas das membranas nacionais, o presente estudo se propõe a investigar a citotoxicidade da membrana de polipropileno bem como avaliar a proliferação, a viabilidade celular e a expressão de fibronectina em culturas de osteoblastos comparadas à membrana de PTFE.

2. Revisão da Literatura

Becker et al (1992) fizeram um estudo comparativo para avaliar o crescimento ósseo ao redor de implantes utilizando membranas de e-PTFE tradicionais, e-PTFE embebidas de fator 1 de crescimento plaquetário e fator de crescimento de insulina (PDGF/IGF1) e grupo com uso concomitante de enxerto alógeno desmineralizado congelado seco (DFDBA). Foi feita avaliação após 18 semanas de altura óssea clinicamente e histologicamente após sacrifício dos animais. Clinicamente, houve um ganho em ambos os grupos com uso simultâneo de membranas mas não com uso simultâneo de membrana e DFDBA. O uso de DFDBA não resultou em melhora na eficácia de regeneração óssea com uso das membranas, no entanto a formação óssea sem o uso de FDBA resultou similar para o grupo das membranas com e sem os fatores de crescimento. Histologicamente, o grupo das membranas com fator de crescimento demonstraram uma maior densidade óssea comparado ao grupo sem fator de crescimento e uso concomitante de DFDBA. Os autores questionam a indicação do uso de osso alógeno para técnica de implantes imediatos pós extração e suportam a utilização de ambas membranas para reparação de volume ósseo adequado porém sugerem uma antecipação de carga sobre implantes juntamente com fatores de crescimento como vantagem em seu uso.

Piatelli et al (1996) reforçaram a possibilidade de integração biológica das membranas de e-PTFE para obtenção de estabilização mecânica necessária para reparação e formação óssea em ROG. No estudo os autores observaram histologicamente a presença de células do tecido conjuntivo e fibras colágenas e presença óssea. A presença no interior da membrana de tecido conjuntivo e osso pode ajuda na integração e no selamento biológico e confirmando a biocompatibilidade das membranas. A porosidade das membranas permite a invasão de fibroblastos, pequenos capilares e finas fibras de colágeno e invasão de células

osteogênicas provenientes da medula óssea que permitem crescimento de tecido ósseo dentro da membrana estabelecendo excelente selamento e estabilização.

Zhao et al (2000) chamaram a atenção para os diferentes tipos de membranas absorvíveis disponíveis para utilização em regeneração óssea guiada. Quanto às membranas não biodegradáveis, a e-PTFE possui duas partes: uma porção externa de micro-estrutura (100-300 μm de porosidade) e uma porção interna ($\leq 8 \mu\text{m}$ de porosidade). A parte externa promove o espriamento de fibras de colágeno melhorando na estabilidade da membrana e difusão de nutrientes pelos poros. A parte interna, por outro lado, é impermeável a fluídos e bloqueia a perfusão e migração de tecido mole na região de formação óssea. Neste estudo se dispuseram a avaliar histologicamente 3 tipos diferentes de membrana Bio-Gide®, Resolut® e Vicryl®) e uma membrana não absorvível de politetrafluoroetileno (e-PTFE) implantadas subcutaneamente em ratos. Pode-se observar histologicamente que a membrana de e-PTFE foi bem tolerada e encapsulada por tecido conjuntivo fibroso. Houve cápsulas formadas ao redor das membranas biodegradáveis, no entanto notou-se grande zona inflamatória na fase inicial. Os autores chegaram a conclusão que a membrana de e-PTFE se manteve mais estável causando pouca reação e formação de cápsula enquanto que as membranas absorvíveis provocaram reações inflamatórias.

Salata et al (2001) afirmaram que o uso de uma variedade de membranas tem sido avaliadas para procedimento cirúrgico encorajado pela formação óssea em defeitos restringindo a infiltração de tecidos moles, ou regeneração óssea guiada. Neste estudo foi feito uma comparação *in vivo* e *in vitro* da biocompatibilidade da tradicional e-PTFE e alcalina-celulose. No estudo *in vitro*, ambas as membranas tiveram resultados positivos no que tange a viabilidade, crescimento, espriamento para 3 semanas. O estudo *in vivo* foi feito em defeito transcortical completo de

mandíbula em ratos (Sprague-Dawley) e análise patológica e histomorfométrica em 4 e 10 semanas após implantação das membranas. A regeneração óssea associada a membranas de Alcalina-celulose foi predominantemente endocondral diferente da formação óssea de e-PTFE que mostrou-se ossificação intramembranosa, ou seja, indução direta de osso. A quantidade de osso neoformado foi similar nos dois defeitos, porém a membrana de alcalina-celulose apresentou maior resposta inflamatória caracterizada por linfócitos macrófagos e células gigantes multinucleadas. A degradação e possível exposição podem ser atribuídas a membrana de alcalina-celulose no estudo *in vivo*. Os autores concluíram neste estudo *in vivo* e *in vitro* indica que quando da escolha de membranas não reabsorvíveis para regeneração óssea guiada, as membranas de e-PTFE se sobressaem em resultados.

Schantz et al (2002) salientaram a importância da engenharia tecidual na busca de previsibilidade e sucesso dentro da regeneração tecidual guiada. As propriedades das membranas e seu manejo influenciam significativamente no resultado, no entanto, as membranas puramente sintéticas ou de polímeros naturais sem componentes biológicos permitem somente uma regeneração tecidual passiva. O conceito de engenharia tecidual vai além da integração passiva, desejando componentes teciduais que participam ativamente de produção óssea. Em um estudo *in vitro* e *in vivo* fizeram uma análise de tecido modificado celular-membrana utilizando técnicas de imagem, imuno-histoquímica e histologia. Afirmaram que atualmente, as membranas biodegradáveis usadas para regeneração óssea guiada levam a reparação incompleta de tecido pelas suas precárias propriedades mecânicas, curto período de degradação e falta de componentes biológicos integráveis resultando na incapacidade de criar e manter um ambiente apropriado para reparação e remodelamento tecidual. Estudaram o potencial osteogênico de células periosteais de

calvária humana combinadas com membranas de policaprolactone ultrafina (PCL2) de degeneração lenta em um grupo e no segundo grupo as membranas foram tratadas com hidróxido de sódio. Os resultados *in vivo* demonstraram tecido mineralizado e vascularização. Os autores concluíram que as membranas de PCL suportam adesão, crescimento e diferenciação celular osteoblástica sendo que as membranas tratadas com hidróxido apresentaram melhores resultados devido a hidrofilia do material e possuem um potencial em desenvolvimento para membranas osteocondutoras.

Wang et al (2002) sugeriram que a composição e estrutura das diferentes barreiras podem afetar o resultado dentro da regeneração óssea guiada, fatores como morfologia, constituição de membrana, capacidade de adesão, substâncias soltas durante degradação, textura de superfície, tamanho de poros e duração da membrana quando absorvíveis. Os autores avaliaram *in vitro* a capacidade de adesão de células osteoblásticas (MC3T3-E1) nas membranas BioMend®, Resolut®, Guidor®, EpiGuide®, GoreTex® e Millipore filter®. Células foram plaqueadas para grupo controle. Os resultados foram triplicados. Os tempos de avaliação foram de 1,5 e 24 h depois de plaquear 2 ml (5×10^4 cel/ml). Todas as amostras foram lavadas e fixadas com 10% de solução formalina por 1 dia e coradas com hematoxilina. O número de células aderidas foi contado e a utilização de microscópio de luz para verificação de área de 0,25 mm². A morfologia celular aderida as membranas também foi avaliada por microscópio eletrônico de varredura. Os resultados do estudo concluíram que as membranas Milipore®, BioMend®, Resolut® e EpiGuide® melhoram a adesão precoce de osteoblastos. No entanto, o benefício real do estudo somente poderá ser verificado em ensaios clínicos.

Amano et al (2003) tiveram como propósito em seu trabalho esclarecer o benefício do uso de pinos ou dispositivos para fixação de membranas de ácido poli-L-

lático (PLLA) visando ROG em defeitos ósseos em cachorros. Lembraram para a indicação do uso do material quando da necessidade de melhores propriedades mecânicas. Quando comparadas a PTFE, muitas vezes deixam a desejar em estabilidade, ou colapso para o defeito ósseo. No entanto são materiais biocompatíveis e não interferem com a cicatrização. Foram criados defeitos ósseos em 8 beagles. No grupo I de teste o defeito foi coberto com membrana PLLA fixada com tachinhas e no grupo II de teste o defeito foi coberto com membrana sem fixação com dispositivos. O grupo controle não recebeu membrana. As observações foram feitas microscopicamente e houve a análise estatística dos resultados. A degradação das membranas não foi percebida no primeiro tempo mas notada no segundo tempo de 36 semanas. Após 24 e 36 semanas, a maior parte do defeito do grupo I estava totalmente com osso neoformado enquanto que no grupo controle observou-se pouco osso formado somente no fundo do defeito. Após 36 semanas observou-se 62.2% de osso neoformado no grupo I (membrana fixada) o qual era maior do que no grupo II (sem fixação de membrana), 53.2%, enquanto que no grupo controle era de 43.9%. Os resultados mostraram que as membranas de PLLA fixadas ou não com dispositivos permitiram regeneração óssea e obtiveram sucesso em separar tecido mole adjacente da área reparada.

David et al (2004) afirmaram que a interface de ligação química polímero-metal tem papel importante na adesão. A engenharia tem desenvolvido interessantes maneiras de modificar as superfícies de PTFE, assim, reações que alteram o polímero introduzindo átomo de metal, um único tipo de grupo funcional ou uma mistura deles pode tornar-se energeticamente favorável. Neste estudo os autores agregam uma fina camada de átomos de sódio a membrana de PTFE e tem como resultado um processo

químico formado de forte ligação polímero-metal que aumenta a adesão na superfície, o que é uma propriedade interessante.

Barber et al (2007) lembraram que as barreiras mais comuns utilizadas para ROG são de materiais absorvíveis, como colágeno e de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE), e ambas necessitam de fechamento primário de tecido mole para prevenir contaminação bacteriana, degradação precoce da membrana e exposição do enxerto, sendo muitas vezes necessária incisões de retalho e periósteo. Os autores realizaram um estudo comparativo que explora a utilização de membrana de politetrafluoroetileno denso (d-PTFE), seus significado clínicos, suas vantagens para reabilitações em tratamentos reabilitadores com implantes dentários. A membrana utilizada foi Cytoplast Regentex® GBR-200 ou TXT-200 com protocolo de remoção de 4 a 6 semanas. Pela sua estrutura densa, a membrana não apresenta crescimento fibroso sobre ela, é de fácil remoção deixando uma camada de osso osteóide e tecido derivado ósseo e epitelializado para cicatrização de 10 a 14 dias, onde recomenda-se implantes em 4 meses após osso neoformado e gengiva queratinizada. Por não haver necessidade do fechamento em primeira intenção, há possibilidade de tratamentos de defeitos mais amplos sem necessidade de grandes incisões, com preservação de papila e mucosa queratinizada. Ao contrário da e-PTFE que aumenta a colonização bacteriana quando exposta, a membrana densa previne devido sua estrutura densa. Uma das vantagens das membranas de colágeno que são de tipo I ou tipo I-III, é a não tem necessidade de remoção, porém quando expostas há degradação rápida e possível perda óssea. Os autores concluíram que as membranas densas são uma alternativa eficaz e previsível para tratamentos de defeitos ósseos maiores, de fácil remoção e preservação de tecido queratinizado,

mesmo expostas não comprometem a qualidade de regeneração e vascularização da região.

Friedmann et al (2007) fizeram um estudo *in vitro* em células osteoblásticas sobre a citobiocompatibilidade de membranas de colágeno e e-PTFE. Os autores sugerem que apesar da importante propriedade de barreira que separa células formadoras de osso de células de tecido conjuntivo, o papel da permissividade de difusão fluido não é conhecida. O objetivo do estudo foi avaliar o qual grau de difusão pode suportar propriedades funcionais de células osteoblásticas *in vitro* em uma membrana comumente utilizada em regeneração óssea guiada. Células (SAOS-2) foram cultivadas sobre as membranas com ligações cruzadas de colágeno, sem ligações cruzadas de colágeno e e-PTFE. Grupos controles foram realizados em poços. A avaliação foi realizada em 7 e 21 dias e analisadas com expressão de fosfatase alcalina, fator 1 de ligação de núcleo, sialoproteína óssea-2 e osteocalcina. As expressões foram determinadas por quantidade de tempo real de PCR. As membranas foram examinadas por microscopia de transmissão de luz. O perfil das expressões de cada dos 4 genes testados demonstraram pequenas variações de crescimento celular nas membranas. A microscopia observou células intactas aderidas nas duas membranas de colágeno e a morfologia celular indicou vitalidade. Difusão pelas 3 membranas avaliadas nesse estudos foram suficientes para suportar diferenciação osteoblástica. Os autores concluíram que as membranas não só devem permitir passagem de nutrientes para desenvolvimento de osso mas também permitir secreção de citocinas do tecido gengival para região estimulando migração de celular indiferenciadas, osteoprogenitoras e progenitoras endoteliais.

Kim et al (2008) tiveram como objetivo analisar os tecidos adjacentes e as condições de superfície da membrana exposta durante RTG. As membranas

utilizadas foram as de e-PTFE (politetrafluoroetileno expandido) TR-Goretex® (W.L. Gore & associates, CA, USA.) e as malhas de titânio (Dentsply Friadent®, Mannheim, Germany e Jeil Medical Co. Seoul, Korea). 9 casos tiveram exposição precoce e remoção entre 3-6 semanas. 8 casos não tiveram exposição e sua remoção foi realizada de 8-12 semanas. As membranas foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura. Os autores encontraram significativa diferença na superfície das membranas expostas ao meio bucal das que não foram expostas. Foram observados biofilme e tecido mole sob as membranas com exposição precoce. Debridamento ósseo foi observado em somente 1 caso e o grau de dano das membranas expostas era severo quando comparado às membranas não expostas. A conclusão dos autores foi de que os tecidos observados e a superfície das membranas foram sensivelmente afetados se a membrana é exposta, e neste caso o tecido mole e biofilme interfere diretamente na formação óssea afetando as condições de superfície de membrana e tecidos ósseos.

Ksaj et al (2008) avaliaram os efeitos biológicos de várias membranas absorvíveis e não absorvíveis para RTG.. em estudo *in vitro* de cultura celular fibroblástica de ligamento periodontal, células fibroblásticas e osteoblásticas. Foram utilizadas membranas de colágeno absorvíveis das marcas comerciais TutuDent®, Resodont® e Bio-Gide® e 3 membranas não absorvíveis das marcas comerciais ACE, Cytoplast® e TefGen-FD®. Os efeitos foram mensurados nos períodos de 1, 2.5, 4, 24 e 48 h e as propriedades morfológicas e estruturais avaliadas por microscópio eletrônico de varredura. Na observação de microscópio eletrônico, foi observada na estrutura das membranas biodegradáveis, uma superfície compacta de um lado e porosa de outro enquanto que nas membranas não biodegradáveis de PTFE foi observado estrutura homogênea. Os autores concluíram que os materiais tem grande

influência na técnica de regeneração tecidual guiada e podem interferir na proliferação celular e no processo de reparação tecidual e ósseo. Entre as 6 membranas estudadas, as membranas biodegradáveis demonstraram ser mais compatíveis para estimulação de proliferação celular quando comparado as membranas não biodegradáveis.

Gutta et al (2009) questionaram neste estudo o tamanho ideal dos poros nas membranas utilizadas em ROG usadas para aumento de rebordos. Afirmaram que poros muito pequenos são inadequados para penetração de capilares e poros muito grandes são preenchidos ao invés de tecido vascular de tecido conjuntivo e o tamanho ainda permanece indefinido variando idealmente entre 100 e 150 μm . Realizaram um estudo randomizado, controlado prospectivo com enxerto cortico-medular de tíbia em mandíbula de cachorros protegido com membrana. Dois tipos de barreira de titânio, uma com micro-poro (0.6mm) e outra com macro-poro (1.2mm) e uma malha biodegradável de ácido polilático com porosidade de 1.0mm foram comparadas ao lado contralateral da mandíbula com barreiras sem perfurações. Avaliações foram feitas em 1, 2 e 3 meses por histomorfometria para cálculo de volume, e também foi medido aposição mineral. Foram analisados 31 sítios. O volume ósseo no grupo experimental com macro-poros foi sensivelmente maior que nos outros grupos. A área de osso neoformado nas malhas de poros largo foi de 66.26 mm^2 , enquanto que na de menor poros foi de 52.82 mm^2 , na membrana biodegradável de 46.76 mm^2 e no grupo controle de 29.80 mm^2 . Observou-se pouco de crescimento de tecido conjuntivo (23.47 mm^2) no grupo de malha absorvível maior quando comparado aos outros grupos de perfurações largas (16.96 mm^2) e pequenas (22.29 mm^2), enquanto que no grupo controle o crescimento foi de 9,41 mm^2 . A taxa de aposição mineral foi maior no grupo de barreira biodegradável e menor no grupo de macro-poro. Os autores

concluíram que as membranas de macro-poros facilitam uma maior regeneração quando comparadas as de micro-poros e biodegradáveis e previnem entrada de tecido mole. A manutenção do enxerto é importante para o sucesso da técnica.

Hoogveen et al (2009) avaliaram a barreira Vivosorb® em defeitos ósseos em ratos visando ROG. A barreira é composta de poly(DL-lactide-e-caprolactone)(PDLLCL). Foram realizados defeitos de 5 mm em 192 mandíbulas de ratos e recobertos com a membrana PDLLCL, ePTFE e o grupo controle deixado sem recobrimento com membrana. As medidas de volume, mineralização de osso neoformado foram avaliadas por microradiografia transversal nos intervalos de 2,4 e 12 semanas. Os autores concluíram pelos resultados que a membrana PDLLCL não estava pronta para aplicação clínica devido ao baixo desempenho no que diz respeito a propriedade de manutenção de espaço insuficiente para reparação óssea quando comparada a membrana de e-PTFE.

Zheng et al (2009) realizaram estudo em que produziram 3 membranas para ROG. de quitosan/policato provenientes de misturas de compósitos diferentes, Poli-L-lisina, polietileneimina e poli-L-ornitina. Foram feitas análises topográficas de superfície, química e molhabilidade por microscopia de força atômica, espectroscopia fotoelétrica de raio-x e ensaio de ângulo de contato. Sua citobiocompatibilidade foi avaliada com células osteoblásticas MC3T3-E1, proteína e ensaios biológicos genéticos, western blot e análise RT-PCR. Sobre membrana de compósito quitosan/poli-L-lisina as células desenvolveram melhor organização de citoesqueleto e uma sensível melhor adesão, proliferação e diferenciação quando comparada às outras membranas. Esse mesmo compósito expressou melhor mRNA para fibronectina, Runx2, RhoA, integrin α 5 e integrin β 1 concluindo que possui melhor citocompatibilidade com osteoblastos devido superfície topográfica favorável matriz

extra-celular e química superfície favorável e molhabilidade, assim que possui melhor potencial para regeneração óssea guiada em um futuro promissor.

Lindfors et al (2010) tiveram como objetivo em um estudo avaliar o resultado do tratamento alcançado utilizando osso autógeno em ROG. particularmente sob efeito de fumo e exposição da membrana. Os processos de cicatrização e resultados do tratamento de 27 enxertos ósseos e cobertos por membrana de e-PTFE com reforço de titânio foi avaliado. 23 enxertos (85%) obtiveram sucesso e 4 (15%) não. Enxertos em pacientes não fumantes tiveram um sucesso de 95% enquanto que a taxa de sucesso em fumantes foi de 63%. Houve 4 casos (15%) de casos com exposição de membranas, sendo que nenhuma afetou o resultado. Sinais de inflamação tecidual foram observadas em 37% das áreas enxertadas, mais comum em pacientes fumantes (75%) do que pacientes não fumantes (21). Os autores concluíram que o fumo está ligado a resultados ruins no tratamento e a exposição de membranas não interferiram para o resultado satisfatório de regeneração óssea guiada.

Salomão et al (2009;2010;2012) escreveram sobre a importância de preservação alveolar após extração dentária, principalmente quando existem defeitos ósseos extensos que dificultem a reabilitação protética conveniente com implantes dentários seja do ponto de vista estético e/ou funcional. Ao longo dos anos, tem sido utilizado diferentes biomateriais para preenchimento do alvéolo pós extração. Falam da importância da manutenção do coágulo sanguíneo, rico em plaquetas e fatores de crescimento que propiciam a regeneração óssea alveolar, além disso a rede de fibrina formada que dá a resistência fundamental para reparação óssea. Os autores chamam a atenção para maior perda de altura óssea quando comparada em espessura observadas clinicamente e radiologicamente e a importância de prevenir as alterações

indesejáveis. Descrevem a utilização das barreiras de polipropileno como uma maneira menos invasiva para manutenção do coágulo dentro do alvéolo, principalmente durante a primeira semana de cicatrização, quando ele será substituído por tecido de granulação e simultaneamente impedir que o tecido conjuntivo invada a área a ser regenerada, que é o principal objetivo das barreiras, a osteopromoção. Os autores relatam 7 casos clínicos descrevendo a utilização da barreira de polipropileno intencionalmente exposta ao meio bucal na regeneração óssea após exodontia. Foram utilizados em todos os casos a barreira de polipropileno BoneHeal, protegendo o defeito ósseo após extração, exposta ao meio bucal, mantida em posição sem fixação e suturados retalhos vestibular e palatino sem tensão, e removida após uma semana após cirurgia. Nenhum tipo de biomaterial foi associado ao defeito. A BoneHeal é uma película não reabsorvível, 100% impermeável, não apresentando porosidade em sua superfície. Os autores chegaram a conclusão que a barreira de polipropileno contribui para preservação do rebordo alveolar viabilizando a indicação de instalação de implantes osteointegráveis.

Zwahlen et al (2009) tiveram como objetivo em seu trabalho comparar o desempenho da membrana biodegradável Inion® GTR e da membrana da Geistlich Bio-Gide® em regeneração óssea. Realizaram um estudo duplo-cego, randomizado, prospectivo multicentro de 15 pacientes tratados cada lado com uma membrana a ser avaliada após remoção de dente do siso. Tomografia computadorizada foi realizada após 3 meses de cirurgia e biópsia. 5 pacientes eram fumantes. Complicações como hematoma, infecção e inchaço ocorreu em 3 pacientes. Os autores discutiram sobre a normalidade da cicatrização e de que foi satisfatória e concluíram que ambas as membranas apresentaram capacidade semelhante no que tange a barreira funcional e foram associadas a osso neoformado. Puderam observar também que não houve

diferença significativa em evidências válidas sobre a superioridade de uma membrana sobre a outra e não houve maior densidade óssea quando comparadas, apresentada nos sítios de cada uma, sendo a única diferença a se constatar entre elas a sua origem: Inion® de origem sintética e Bio-Gide® de origem animal.

Nanami et al (2011) descreveram aplicação de membrana experimental de PTFE em defeito cirúrgico periodontal de ratos. O objetivo do estudo foi avaliar a influência do sua da membrana na RTG. Foram utilizados 20 ratos, machos, divididos em grupos controle e teste. Foi criado um defeito ósseo em mandibular no periodonto de suporte do incisivo inferior direito. O grupo teste recebeu membrana de PTFE e o grupo controle preenchido com coágulo. Os resultados foram avaliados através de microscopia de lua e eletrônica de varredura aos 7 e 21 dias. OS autores observaram neoformação óssea parcial em todos os casos analisados. No grupo teste ocorreu separação entre a membrana e os tecidos circundantes, e houve diferença no sentido tanto das fibras colágenas quanto da deposição óssea. Concluíram que a membrana experimental de Teflon foi eficaz como barreira física e separou o ambiente do defeito da mucosa e submucosa, no entanto, alterou a biologia do reparo mudando padrão de deposição de matriz óssea em relação à fisiologia normal.

Papaioannou et al (2011) realizaram um estudo comparativo *in vitro* sobre a adesão e proliferação de células osteoblásticas (MG63) de membranas biodegradáveis visando ROG. com a presença ou não de nicotina. A nicotina é um constituinte do cigarro que pode prejudicar a regeneração óssea guiada, é tóxico e vasoativo. Muitos dos efeitos adversos clínicos hemostáticos e de reparação óssea tem sido atribuída a nicotina. Amostras de membranas Resolut Adapt®, Biocollagen®, Bio-Gide®, OsseoGuard® e células de banco de tecido foram avaliadas em 24h e 5 dias onde foram contadas as células. Em 24h, Bio-Gide®

mostrou um maior número de células e OsseoGuard® o menor. Em 5 dias Bio-Gide® mostrou o maior número de células. Em baixas concentrações de nicotina (0.3 e 3 µg/ml) demonstraram maiores números de células e altas concentrações de nicotina (300 µg/ml) demonstraram baixas contagem de células. Os autores concluíram que os materiais influenciam na adesão e proliferação celular e todas as membranas tiveram êxito nesses quesitos. Concluíram também que apesar de as membranas de colágenos não demonstrarem sofrer alteração significativa em adesão e proliferação por conta da nicotina, há uma tendência devido ao efeito bifásico da nicotina em estimulação celular em baixas concentrações e inibitório em altas concentrações.

Ye et al (2011) fizeram uma análise *in vitro* dos efeitos de uma membrana antibacteriana sobre células osteoblásticas. Ressaltaram que infecções sobre membranas são frequentemente encontradas quando utilização de ROG. A excelente propriedade antibacteriana do Ag-nHA-nTiO₂/poliamido-66 (PA66) nano-composto de membranas tem sido demonstrado previamente. No grupo experimental foi utilizado somente a membrana com a propriedade antibacteriana e no grupo controle ambas membranas nHA/PA66 e e-PTFE. Células osteoblásticas MG64 foram cultivadas em 3 tipos de membranas e cultura de tecido poliestireno. A microestrutura foi analisada por microscopia de varredura eletrônica. Foram analisados proliferação celular, viabilidade, e concentração. O microscópio demonstrou que ambas membranas Ag-nHA-nTiO₂/PA66 e nHA/PA66 possuíam superfícies porosas de um lado e lisa de outro. A membrana de e-PTFE mostrou como estrutura uma superfície com várias pequenas linhas rachaduras. As células se aderiram e proliferaram nas 3 membranas, no entanto, a viabilidade celular na membrana com antibacteriano foi sensivelmente menor do que no grupo controle. Os autores assim concluíram que a membrana com antimicrobiano células osteoblásticas não teve efeitos negativos no crescimento de

celular e a porosidade estrutural ajudou na proliferação e adesão tornando a membrana, assim como as outras do estudo, biocompatível e podem ser usadas com segurança para técnica de ROG.

Cheng et al (2013) Ressaltaram que contaminação bacteriana em região de R.T.G. pode reduzir a eficácia da regeneração periodontal. Alguns fatores como controle de placa, infecção periodontal residual e fumo influenciam nos resultados da R.T.G.. Aplicação tópica de antibióticos tem sido empregada com sucesso para terapia de regeneração periodontal. Neste estudo, os autores compararam a adesão bacteriana em 3 membranas de RTG agregadas de antibióticos. As membranas utilizadas foram ePTFE (Gore-Tex®, W.L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ, USA), membrana de colágeno bovina (Biomend®, Sulzer Calcitek, Carlsbad, CA, USA) e membrana de fibra glicólica (Resolut XT® W.L. Gore & Associates) agregadas de tetraciclina e amoxicilina. A adesão de *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) sobre as membranas com e sem antibióticos foram avaliadas usando microscópio eletrônico de varredura (MEV). A análise do MEV mostrou nenhuma alteração na estrutura física das membranas alteradas com antibióticos. Ambos as bactérias estudadas aderiram melhor na membrana de colágeno seguida da de e-PTFE e então fibra glicólica sem antibióticos. A incorporação de ambos antibióticos diminuiu drasticamente a adesão bacteriana nas 3 membranas analisadas. Os autores concluíram que a incorporação de tetraciclina e amoxicilina reduz muito a adesão de *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nas membranas de RTG. analisadas.

Miron et al (2013) observaram que membranas de colágeno biodegradáveis são rotineiramente utilizadas em regeneração óssea guiada para separar o crescimento e a repovoamento de células ósseas em áreas de volume insuficiente.

Lembraram que a exata natureza de quais osteoblastos alveolares reagem as membranas bem como os efeitos seguintes da participação dos fatores de crescimento ainda necessitam de estudo. Propuseram neste estudo investigar os efeitos das membranas de colágeno absorvíveis embebidas em fatores de crescimento proteína 2 óssea morfogenética (BMP-2) ou fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) para adesão, proliferação e diferenciação osteoblástica. Foi utilizado a concentração de 10ng/ml por 5 min. Com a ajuda de microscópio eletrônico de varredura verificou-se adesão celular em todas as membranas analisadas. Fatores de crescimento BMP2 e TGF $\beta 1$ aumentaram a proliferação celular no 3 ou 5 dias após quando comparado ao grupo controle. A análise de tempo real de PCR revelou que a administração de BMP2 aumentou a diferenciação osteoblástica para os marcadores osterix, colágeno tipo 1 e osteocalcina. Alizarina mostrou que a BMP2 aumentou a mineralização dos osteoblastos primários. Os autores chegaram a conclusão que a combinação de membranas de colágeno com fatores de crescimento BMP2 e TGF $\beta 1$ influenciaram significativamente na adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas e o estudo em vitro dá respaldo biológico para aplicação clínica como estratégia de tratamento em procedimentos de ROG.

Rakhmatia et al (2013) ressaltaram as propriedades que uma membrana deve possuir para preencher os critérios de uma bem sucedida regeneração óssea, tais como biocompatibilidade, oclusividade, manutenção de espaço, manuseio clínico e apropriada interação biológica. Ressaltaram a grande desvantagem dentro das membranas biodegradáveis devido sua imprevisibilidade ao tempo de degradação comprometendo a quantidade de osso formado e que a membrana não biodegradável de e-PTFE não está mais disponível no mercado dando lugar a membrana de PTFE

de alta densidade (ex: Cytoplast Regentex® GBR-200 ou TXT-200, Osteogenics Biomedical Inc., Lubbock, Texas, USA). Possui porosidade de 0,2 μm eliminando infiltrado bacteriano. Mesmo se expostas ao meio bucal, age apropriadamente como membrana, porém pela pequena porosidade sua estabilidade é fraca. Classificam como barreira as malhas de titânio para reconstrução de largos defeitos ósseos e ressaltam a sua excelente propriedade mecânica para adaptação, estabilização óssea, elasticidade para compressão tecidual, manutenção de espaço, deslocamento de enxerto, e alta previsibilidade. Os autores chamam a atenção que é menos susceptível a contaminação que membranas biodegradáveis. No entanto, levam a desvantagem, pela espessura, no alto número de exposições. Os autores concluíram que membranas oferecem vantagens e desvantagens nas estratégias de reconstruções de defeitos ósseos, e devem ser escolhidas especificamente baseadas nos limites de cada uma e benefícios de cada caso. Concluíram também que as malhas de titânio oferecem uma excelente solução para regeneração óssea guiada frente as outras membranas, no entanto ajustes de tamanho de poros e espessura devem ser levados em consideração para melhorar sua eficácia.

Ronda et al (2013) descreveram as características de propriedade e acreditam no sucesso da utilização de membranas totalmente impermeáveis. As membranas de d-PTFE não possuem poros em sua estrutura, diminuindo sua estabilidade e facilitando sua remoção. A presença de porosidade é uma condição facilitadora de adesão de biofilme bacteriana, inevitável nos casos de exposição ao meio bucal, podendo indicar remoção precoce que geralmente ocorre em 4 semanas. Por outro lado, quando se utiliza as membranas de PTFE densa ($\leq 3 \mu\text{m}$), previne-se a adesão celular e bacteriana, e apesar de não ocorrer passagem de nutrientes e fluidos do

periósteo adjacente, há estudos clínicos e histológicos mais promissores em termos de ROG, dessas membranas expostas ao meio bucal sem sinais de infecção.

Yaghobee et al (2013) em estudo *in vitro* compararam a penetração e passagem de *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* através de membranas de PTFE e matriz dérmica acelular (MDA) carregadas com tetraciclina, amoxicilina e clorhexidina. A colonização e passagem dos microorganismos pela PTFE e MDA foram avaliadas usando recipientes com meio de cultura. As membranas com agente antimicrobiano reduziram significativamente a passagem bacteriana comparada com os grupos controles. PTFE teve melhor desempenho de barreira que MDA. Tetraciclina teve maior atividade antibacteriana em ambos os grupos quando comparada a amoxicilina mas similar resultado a clorhexidina. Aa teve maior penetração nas membranas comparado ao *S. mutans*. Os autores concluíram que a penetração de *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diminuem com as membranas carregadas de antimicrobianos e clorhexidina melhorando a efetividade no que tange o aspecto infeccioso quando presente durante procedimentos regenerativos.

Wallace (2013) chamaram atenção para preservação alveolar por ROG em alvéolos pós-extrações devido ao grau de reabsorção óssea, vertical e horizontal, observado principalmente nos primeiros 3 meses após extração. Inúmeros biomateriais e osso autógeno tem sido utilizados para preenchimento de alvéolos e a utilização de barreiras biodegradáveis e não absorvíveis para manutenção de espaço e sobre enxertos tem sido utilizadas para prevenção de invasão de tecidos moles na área de reparação onde estão células osteogênica e endoteliais. O autor relata 6 casos com utilização de osso mineralizado congelado e seco (FDBA), (OraGRAFT, LifeNet Health, Virginia Beach, Va, USA) e coberto com matriz dérmica acelular (MDA)

OrACELL, LifeNet Health, Virginia Beach, Va, USA). Foi realizada análise histomorfométrica após 12 semanas. Afirmaram que MDA pode promover uma espessa biótipo gengival, desejado ao redor dos implantes. Após 10 semanas, o ciclo reparador celular está completo, após análise histológica, sem indícios de inflamação e macrófagos. O autor lembrou que a presença de tecido queratinizado e biótipo mais espesso, há menor susceptibilidade de inflamação, acúmulo de biofilme bacteriano, adversidades estéticas ou recessões. O autor concluiu que MDA usado como barreira em alvéolos enxertados com FDBA para preservação podem produzir significativa porcentagem de novo osso regenerado após 12 semanas para instalação estável de implante em região de molar.

Moura et al (2014) salientaram os critérios para efetividade de membranas em ROG, são elas: biocompatibilidade, oclusão celular, incorporação tecidual, formação e manutenção de espaço reparador e bom manuseio clínico. Existe uma gama de membranas visando a ROG e a busca de melhorar suas propriedades bem como seu custo/benefício dos biomateriais disponíveis segue atualmente. Acompanharam neste estudo em ratos visando a ROG, o desempenho de membrana natural de látex extraída da *Hevea Brasiliensis* com 3 diferentes tipos de preparo: polimerizada imediatamente após coleta sem uso de amônia (L1), polimerizado e conservada em amônia (L2) e polimerizada após conserva em amônia. Foi utilizada membrana de PTFE como controle. Os tempo de avaliação foram feitos com 7, 20 e 60 dias e realizados por microscopia. Com 60 dias o grupo das membranas L1 mostraram sensivelmente maior formação óssea comparado aos outros grupos. Foi feito sensibilidade de tecido ósseo para membrana L1 e PTFE o que resultou em nenhuma diferença entre o grupo L1 e grupo controle. Os autores chegaram a conclusão após a análise dos resultados que as membranas de látex apresentaram resultados

comparáveis com as membranas de PTFE e que a membrana L1 induziu maior formação óssea.

Urban et al (2014) mostraram uma avaliação prospectiva de uma série de casos com o uso de membranas de alta densidade de PTFE reforçada de titânio associada a osso xenógeno misturado a autógeno para ganho vertical em reconstruções tridimensionais de rebordo alveolar. Medidas prévias foram feitas, complicações foram anotadas e biópsias foram coletadas para análises histológicas. 24 procedimentos foram executados em 19 pacientes. Todos os defeitos tiveram sucesso na formação óssea com média de 5.45 mm de osso ganho e não foram observadas nenhuma exposição de membrana. Histologicamente após 8.24 meses de enxerto, pode-se observar que osso autógeno ou remodelado representava 36.6%, sendo 19.6% osso neoformado e 17% de osso enxertado. Partículas de osso xenógeno correspondiam a 16.6% e osso medular 46.8 %. Concluíram que se trata de uma técnica de sucesso para utilização em ganho tridimensional de rebordos alveolares.

3. Proposição

Objetivo geral

- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade da membrana de polipropileno e compará-la com a membrana de PTFE.

Objetivos específicos

- Avaliar a proliferação e viabilidade celular de osteoblastos cultivados sobre as membranas de polipropileno e PTFE;

- Investigar a expressão de fibronectina em cultura de osteoblastos sobre membranas de polipropileno e PTFE.

4. Material e Métodos

Este estudo *in vitro* recebeu dispensa do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto e Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic (*Anexo A*).

Para a realização deste estudo foram analisadas duas membranas:

- a) Membrana de Polipropileno - Bone Heal[®] (Fabricante: Sistema de Implantes Nacionais e de Próteses Comércio Ltda. São Paulo-SP/Brasil. Registro ANVISA: 10272310018): descrita como uma película biocompatível, inerte, não absorvível e impermeável. Constituída de 100% de filme de polipropileno.

- b) Membrana de Politetrafluoretileno - Surgitime[®] (Fabricante: Bionnovation Produtos Biomédicos S/A, Bauru-SP/Brasil. Registro ANVISA 10392710009): descrita como uma membrana 100% biocompatível, inerte, maleável, sintética e sem origem animal, não citotóxica e esterilizável a vapor e óxido de etileno. Possui duas camadas distintas: uma lisa isolante, com porosidade menor que 0,1 μm , para prevenção de adesões de microrganismos; e outra rugosa hidrofílica com porosidade média de 22 μm de modo a permitir o crescimento tecidual sobre a membrana.

Para este estudo, a padronização de recorte das dimensões de ambas as membranas foi de 1,25 X 1,25 mm. A cultura celular da membrana de PTFE foi realizada na camada rugosa.

Procedimentos Laboratoriais

Cultura Celular

A linhagem de células de osteoblastos de camundongo (MC3T3-E1) foi obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC, VA, EUA).

As células osteoblásticas foram cultivadas em meio Essencial Mínimo, modificação alfa (α -MEM) suplementados com 10% de soro fetal Bovino (Cultilab®, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura, foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno.

1. Ensaio de proliferação celular

Para a avaliação da proliferação celular, foi utilizado o método de exclusão vital por azul de *Trypan*.

Para tal, as células foram plaqueadas na densidade de 110 células/mm² sobre as diferentes membranas e, após 3, 7 e 10 dias de cultura, foram enzimaticamente

removidas das placas e, o precipitado de células resultante da centrifugação foi suspenso em 1 mL de meio. Foram retirados 10 µL da suspensão de células e a ela juntou-se 10 µL de azul de Trypan, sendo que 1 µL desta solução foi colocada em um hemocítmetro (câmara de Neubauer-Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e levado ao microscópio invertido de fase (Nikon, Eclipse TS100) para a contagem e observação das células.

O número total de células presentes em cada membrana em diferentes tempos de análise foi obtido através da seguinte equação matemática:

$$\text{N}^\circ \text{ total de células} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas} \times \text{Vol. inicial} \times \text{Diluição} \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados usados para contagem}}$$

2. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

As culturas celulares foram testadas quanto à viabilidade celular utilizando o ensaio MTT.

Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem o MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) em cristais de formazan, de cor púrpura e, portanto, na capacidade que têm as células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan.

No ensaio de citotoxicidade, as células foram plaqueadas na densidade de 110 células/mm² sobre as membranas. Dez (10) µl da solução de MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA), foram diluídos em meio de cultura DMEM sem soro, e adicionados às culturas celulares, e estas incubadas por um período de 3 horas, a 37°C. Após este período, foram adicionados 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido, LGC, São Paulo, Brasil) e mantidos por 15 minutos em temperatura ambiente.

Após a solubilização dos cristais, a quantificação foi realizada em leitor de microplacas ELX800 (Biotek Instruments, Inc.) a 590 nm.

III) Imunolocalização de fibronectina por Epifluorescência

As células osteoblásticas foram plaqueadas sobre as diferentes membranas na densidade de 110 células/mm². Após 1, 2, 4 e 24h, as células foram fixadas em metanol a -20°C por 6 minutos, e lavados em PBS. Para o bloqueio da marcação inespecífica, as células foram incubadas em leite desnatado a 5% em PBS, por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi incubado o anticorpo primário anti-fibronectina (1:300, Dako, EUA) e mantido 1 h, em câmara úmida. O controle negativo para reação foi incubado com PBS, substituindo o anticorpo primário. Todos os procedimentos descritos foram precedidos de lavagens em PBS.

O anticorpo secundário utilizado foi anti-camundongo biotilado (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, EUA) em uma concentração de 1:50, por 30 min, e incubados com estreptavidina conjugada com fluoresceína em temperatura ambiente por 30 min e protegidos da luz.

As montagens das lamínulas sobre as membranas foram realizadas utilizando-se meio de montagem Vectashield (Vector®) conjugado ao DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride) para visualização dos núcleos.

As observações e fotomicrografias foram realizadas em epi-iluminação em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot (Zeiss®, Alemanha), usando objetivas Plan Neofluor de 20X e 63X e abertura numérica de 1,4.

Análise Estatística

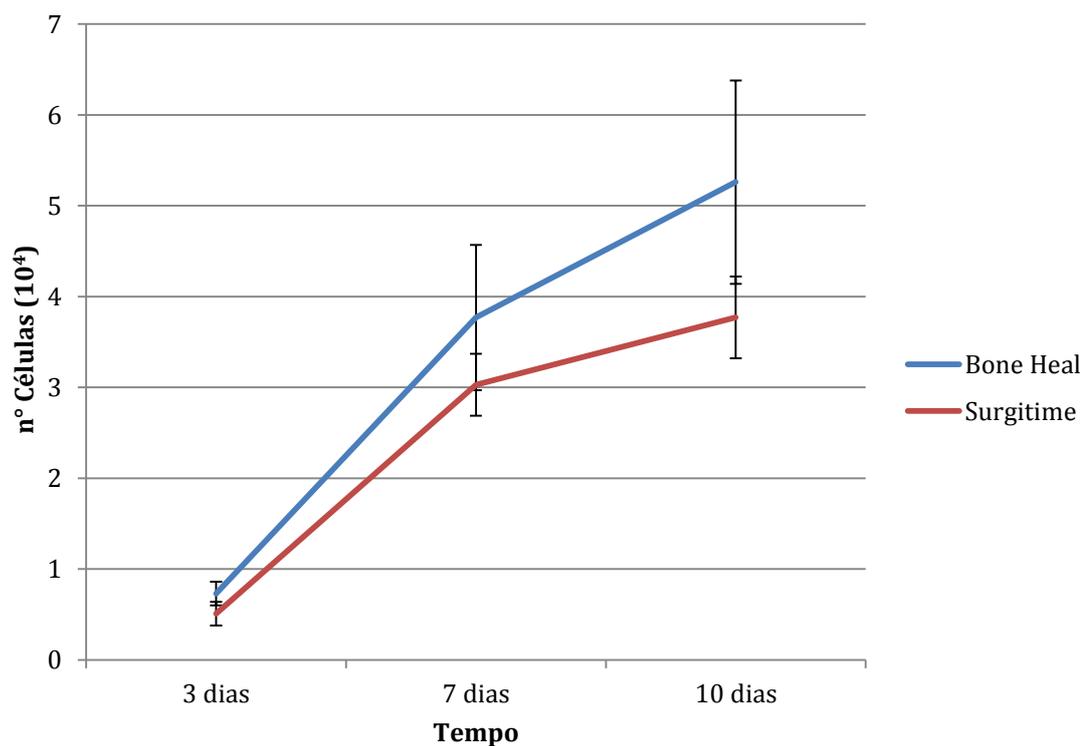
Em cada experimento foi realizado uma triplicata biológica e os experimentos foram repetidos para confirmação dos resultados.

Foi aplicada análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial e teste de Tukey. Os dados de número de células não atenderam às pressuposições de uma análise paramétrica e foram analisados pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn. O nível de significância considerado foi de 5%. As análises foram realizadas nos programas SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, Release 9.3, 2010.) e Bioestat (Bioestat 5.0 Statistical program; Mamirauá Maintainable Development Institute, Belém, Pará, Brazil, 2009).

5. Resultados

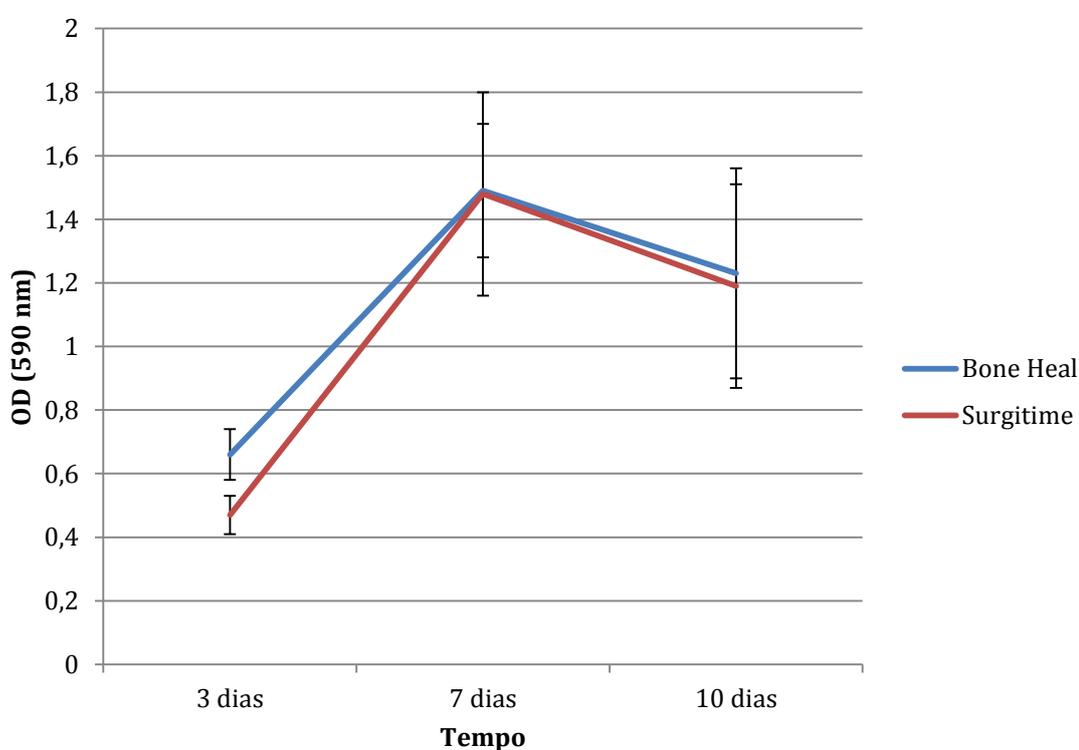
Para a avaliação do comportamento biológico das membranas BoneHeal® e Surgitime®, primeiramente foi utilizada a técnica de proliferação celular pelo método de exclusão vital por azul de *Trypan*. Como demonstrado na figura 1, no ensaio de proliferação celular, os resultados evidenciaram não haver diferença significativa entre as membranas BoneHeal® e Surgitime® nos três tempos avaliados (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$).

Figura1- Avaliação de proliferação celular pelo método de exclusão vital por azul de *Trypan* nos tempos 3, 7 e 10 dias para as membranas BoneHeal® e Surgitime®.



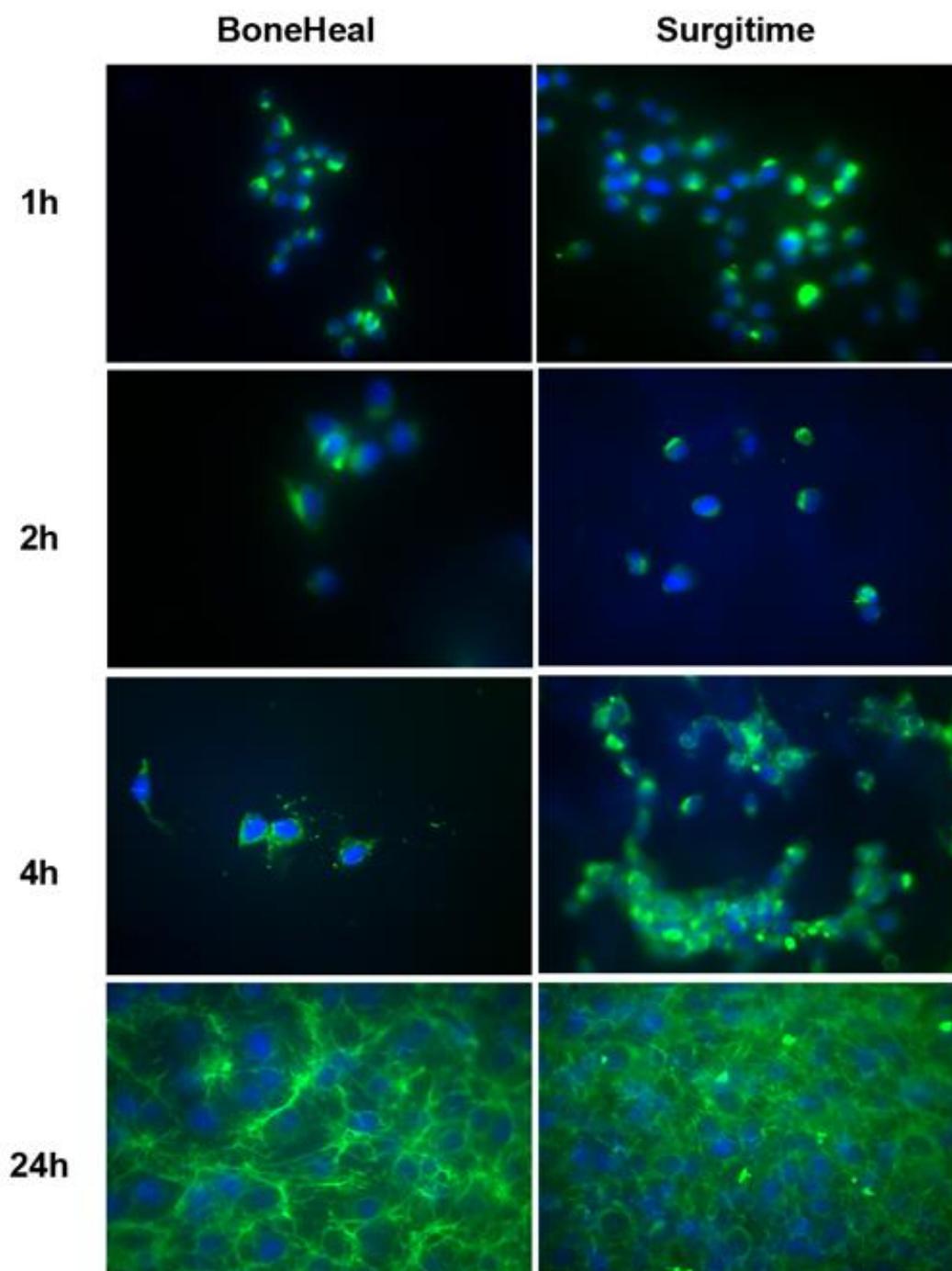
A viabilidade celular não foi afetada pela composição das membranas, sendo semelhante estatisticamente entre BoneHeal® e Sugitime® nos tempos estudados (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$, Figura 2).

Figura 2- Testes de viabilidade celular (MTT) nos tempos 3, 7 e 10 dias para as membranas BoneHeal® e Surgitime®.



A análise por Epifluorescência indicou que as células cultivadas sobre ambas membranas BoneHeal® e Surgitime® expressaram a proteína fibronectina em 1, 2, 4 e 24 h (Figura 3). Em 24 h, notou-se que as culturas estavam em confluência (Figura 3).

Figura 3- Imunomarcação para fibronectina (verde, AlexaFluor 488) em células osteoblásticas MC3T3-E1 plaqueadas nas membranas BoneHeal® e Surgitime® após 1, 2, 4 e 24 h. Aumento original: 400X.



6. Discussão

Um volume mínimo de espessura e altura óssea são necessários para o posicionamento bem sucedido dos implantes dentários. Condições locais desfavoráveis devido a reabsorções, traumas e doenças periodontais podem limitar o posicionamento tridimensional ideal dos implantes tendo em vista o planejamento protético reabilitador adequado em relação à oclusão e relação intermaxilares. Desta forma, metodologias para aumentos ósseos horizontais e verticais têm sido descritos na literatura com sucesso (GARBER&BELSER 1995; URBAN et al 2010; CLEMENTINI et al 2012).

A ROG é baseada no conceito da utilização de uma membrana biodegradável ou de uma não biodegradável para estabilização de coágulo sanguíneo e criação de espaço suficiente para que células provenientes do tecido ósseo possam crescer sem interferência do crescimento mais acelerado e proliferativo do tecido mole adjacente (CLEMENTINI et al 2012). A técnica de ROG é um dos tratamentos de escolha, com resultados previsíveis e confiáveis para ganhos ósseos tridimensionais. Proporciona osso viável para instalação de implantes dentários com taxas de sobrevida de 91,7 a 100% e relatos de baixas complicações. Dentre as complicações cirúrgicas podem-se citar as exposições de membranas, conseqüentemente com maior grau de deteriorização e maior susceptibilidade a infecções (SIMION et al 1998; URBAN et al 2009).

Neste contexto, o presente estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar a citotoxicidade da membrana de prolipropileno (BoneHeal®) quando da sua utilização em procedimentos de ROG utilizando a membrana de PTFE como grupo controle.

As membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) são polímeros quimicamente estáveis biologicamente inertes. Apresentam-se expandidos (e-PTFE) e densos ou de alta densidade (d-PTFE) com ou se reforço de titânio. As membranas de e-PTFE

apresentam estruturas de poros e flexibilidade descritas na literatura para ROG. Também demonstram resistência a degradação enzimática e microbiológica e não estimulam reações imunológicas (BECKER et al 1992; PIATELLI et al 1996; SIMION et al 1998; SALATA et al 2001; URBAN et al 2009; LINDFORS et al 2010). As membranas de e-PTFE são constituídas de 2 partes: porção microestrutural aberta (porosidade de 100-300 μm) e uma porção oclusiva (porosidade $<8 \mu\text{m}$). A porção aberta possibilita difusão de nutrientes e crescimento de fibras colágenas em sua superfície, garantindo maior estabilidade enquanto que a parte oclusiva impede migração de tecido mole na área de crescimento ósseo. No entanto as membranas de e-PTFE não estão mais disponíveis. Por outro lado, as membranas de d-PTFE e impermeáveis não possuem estrutura de porosidade em sua superfície resultando em interação fraca, mesmo com texturização em sua superfície realizada com finalidade de garantir maior estabilidade. Essa característica possibilita maior facilidade em remoção em segundo estágio cirúrgico, uma vez que as membranas não são biodegradáveis, no entanto, requerem maior atenção e cuidado durante posicionamento e estabilização (RONDA et al 2013). Entretanto, há uma maior pré-disposição de acúmulo de biofilme bacteriano em superfícies com porosidades a partir de 10-100 μm . As baixas porosidades nas superfícies das membranas previnem adesão celular e acúmulo bacteriano e conseqüentemente uma menor pré-disposição a infecções em casos de exposições das membranas (RONDA et al 2013).

As membranas de e-PTFE tem indicação clássica para serem cobertas pelo tecido mole ou por primeira intenção, prevenindo acúmulo bacteriano em sua superfície e conseqüentemente infecções, migração destas membranas, degradação precoce e exposição de enxerto ósseo quando utilizado. Membranas de alta densidade de PTFE, impermeáveis, densas e sem porosidade, oferecem uma

alternativa a esse problema. (SALATA et al 2000; CARBONELL et al. 2013). Contudo, a falta de adesão e o tamanho dos poros são dois fatores com necessidade de maiores investigações científicas para determinar sua real importância e influência na resposta osteogênica e no resultado final da regeneração óssea.

A membrana utilizada como controle para o presente estudo foi a Surgitime®, feita de politetrafluoroetileno densa (d-PTFE) sem reforço de titânio, sintética e de origem não-animal e possuem 2 camadas distintas: uma lisa isolante com porosidade < 0,1µm para prevenção de adesões e outra rugosa hidrofílica com porosidade de 22 µm e está indicada para tratamento de defeitos ósseos visando ROG.

A outra membrana do estudo é a BoneHeal®, constituída 100% de polipropileno, impermeável, não apresenta porosidade em sua superfície e tem sua utilização precisamente indicada para sítios alveolares após extrações dentárias visando preservação e/ou promoção óssea, permanecendo exposta ao meio bucal. Uma das vantagens é que, assim, não se faz necessário, incisões relaxantes e maiores descolamentos de retalho, o que melhora o reparo tecidual. A membrana tem indicação de remoção precoce (entre 7 e 10 dias). Por ser impermeável, possuem menor predisposição ao acúmulo bacteriano e infecção. Vale destacar que a membrana tem seu *design* para melhor adaptação em alvéolos, o que pode limitar sua manipulação para outras indicações de tratamentos de defeitos ósseos, diferente da membrana controle de PTFE (Surgitime®).

Quando se trata de tratamento para preservação alveolar, muitas técnicas tem sido desenvolvidas utilizando diferente tipos de biomateriais. A BoneHeal®, bem como sua indicação clínica, por suas características de oclusividade e rigidez para preservação de arcabouço, direciona seu papel como barreira física para formação

óssea, visando manutenção de coágulo sanguíneo permitindo regeneração óssea sem infiltrado de células de tecido mole prevenindo uma maior perda de osso alveolar pós-exodontia e com menor risco de processo infeccioso.

Os estudos *in vitro* de proliferação e viabilidade para todos os tempos estudados (3, 7 e 10 dias) com a membrana BoneHeal® foram semelhantes entre as membranas avaliadas.

Biocompatibilidade é uma das características importantes no que tange o sucesso das membranas visando ROG. Proliferação e adesão celular na membrana são críticos para os resultados clínicos da ROG (BELOTI et al 2006). Testes *in vivo* de sensibilização inicial e exposição a antígenos para mensuração de respostas locais celulares inflamatórias e de imunogenicidade, sendo elas pequenas ou não, devem ser realizados para uma melhor avaliação de citobiocompatibilidade (BELOTI et al 2016; MOURA et al 2013). Idealmente, as membranas devem facilitar adesão celular e promover migração de células progenitoras e necessária adesão ao substrato para que ocorra o processo cascata de cicatrização, proliferação, diferenciação, maturação tecidual (DAHLIN et al 2012).

O processo de adesão depende de uma série de interações complexas entre substrato-matriz-célula que envolve absorção de glicoproteína ao substrato da superfície, contato celular, adesão e espraiamento e que estão relacionados a diferentes aspectos a serem levados em consideração quanto a interação topográfica, química, molhabilidade e energia da superfície (DAHLIN et al 2012). Por outro lado, a falta de aderência celular pode ser explicada pela baixa molhabilidade, pelo tipo de rugosidade de superfície criada por fibras sobrepostas, ou pela falta de ligação proteica. Há ainda a possibilidade de liberação de produtos deletérios às células como

liberação gradativa de óxido de etileno ou ácidos presentes em muitos biomateriais (WANG et al 2002).

Pode-se sugerir também que, em processo laboratorial de cultivo celular *in vitro*, haja um favorecimento de quimiotaxia e íntima adesão entre conteúdo celular e PTFE. Com a quantidade de flúor contido na molécula de teflon ocorre uma interação intermolecular por pontes de hidrogênio entre a película de PTFE e o conteúdo celular conjuntivo osteoblástico formando ligações covalentes estáveis (NANAMI et al 2011).

É amplamente aceito que a adesão celular à superfície é dependente da absorção de proteína que ocorre em sua interação que por sua vez depende de vários fatores químicos, topográficos e hidrofílicos-hidrofóbicos (DAHLIN et al 2012).

Neste estudo, a análise por epifluorescência demonstrou que as células osteoblásticas MC3T3-E1 expressaram a proteína fibronectina em 1, 2, 4 e 24 h para ambas membranas BoneHeal® e Surgitime® e que somente após 24h as culturas estavam em confluência, bem como maior densidade celular.

Para o sucesso da barreira em ROG, adesão celular inicial ao biomaterial é essencial, uma vez que a resposta celular só começa após absorção de glicoproteína, contato, adesão e espraiamento de substrato. Para que isso ocorra, os biomateriais não devem possuir propriedades deletérias às células, além de estimular adesão e proliferação (WANG et al 2002).

Se por um lado sabe-se que um dos principais fatores para o sucesso da ROG é a capacidade das membranas de manter e criar espaço suficiente para permitir crescimento de novo osso, por outro lado a baixa adesão celular e sua influência na habilidade em preservar essa propriedade deve ser investigada. Outras membranas por sua vez, já apresentaram resultados de baixa adesão celular em estudos *in vitro*,

tais como Guidor®, porém os reais efeitos clínicos da mínima adesão e a capacidade de manter o arcabouço das membranas impermeáveis e sua influência no sucesso durante ROG permanecem para ser determinados (WANG et al 2002).

Além da biocompatibilidade e da manutenção de espaço, outro fator importante a ser considerado para a previsibilidade de formação óssea utilizando a técnica ROG é a interação tecidual, diretamente relacionada com os poros e a estabilização das membranas.

A estabilização da membrana durante aumento ósseo vertical e/ou horizontal utilizando a técnica de ROG permanece pré-requisito fundamental para previsibilidade e sucesso do tratamento e pode ser feita por dispositivos específicos de fixação de membranas, como parafusos (DAHLIN et al 1992).

A mínima interação tecidual pode ser uma das vantagens quando se trata da fácil remoção dessas membranas. Por outro lado, pode ser um problema para sua estabilização e formação inicial do coágulo podendo interferir significativamente para cicatrização e formação óssea (DAHLIN et al 1992).

Membranas não biodegradáveis utilizadas para ROG de proveniência nacional são de fácil acesso e tem um custo mais atrativo quando comparadas as membranas não biodegradáveis importadas utilizadas para o mesmo fim, no entanto carecem de maior evidência científica e de mais estudos biológicos comparativos, randomizados, controlados e prospectivos longitudinais para que possam ser consideradas materiais de características e comportamentos previsíveis e de confiança visando ROG.

Considerando que membranas tem resultados limitados em condições experimentais laboratoriais *in vitro* para verificar eficácia de formação óssea, os

resultados sugerem maiores investigações em estudos *in vivo*, que mimetizam mais fielmente os processos celulares complexos envolvidos na ROG.

7. Conclusões

Com base nos resultados do presente estudo, conclui-se que:

- A membrana de polipropileno apresenta citotoxicidade semelhante à membrana de PTFE.
- A proliferação e viabilidade celular, bem como a expressão de fibronectina em culturas de osteoblastos sobre ambas membranas foram semelhantes.

Referências Bibliográficas

1. Amano Y, Ota M, Sekiguchi K, Shibukawa Y, Yamada S. Evaluation of poly-l-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration on bone defects in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(2):155-63.
2. Barber HD, Lignell J, Smith BM, Bartee BK. Using a dense PTFE membrane without primary closure to achieve bone and tissue regeneration. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(4):748-52.
3. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K, Sanchez R. A Comparison of PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like growth factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implant. *J Periodontol.* 1992; 63(11):929-40.
4. Beloti MM, Oliveira PT, Gimenes R, Zaghete MA, Bertolini MJ, Rosa AL. In vitro biocompatibility of novel membrane of the composite poly (vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. *J Biomed Mater Res A.* 2006; 79(2):282-8.
5. Buser, D. Guided bone regeneration over the past 20 years. In: 20 Years of guided bone regeneration in implant dentistry. [on-line]. 2a ed. Hanover Park, US-IL: Quintessence Publishing Co.; 2009.p.1-10. [cited 2015 Abr 29]. Available from: http://www.quintpub.com/PDFs/book_preview/B4016.pdf
6. Carbonell JM, Martín IS, Santos A, Pujol A, Sanz-Moliner JD, Nart J. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 43(1):75-84.
7. Cheng CF, Wu KM, Chen YT, Hung SL. Bacterial adhesion to antibiotic-loaded guided tissue regeneration membranes – A scanning electron microscopy study. *J Formos Med Assoc.* 2015; 114(1):35-45.

8. Clementini M, Morlupi A, Canullo L, Agrestini C, Barlattani A. Success of dental implants inserted in horizontal and vertical guided bone regenerated areas: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 41(7):847-52.
9. Dahlin C, Johansson A, Hoffman M, Molenberg A. Early biocompatibility of poly(ethyleneglycol) hydrogel barrier materials for guided bone regeneration. An *in vitro* study using human gingival fibroblasts (HGF-1). *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(1):16-20.
10. David E, Lazar A, Armeanu A. Surface modification of polytetrafluoroethylene for adhesive bonding. *J Mater Process Technol.* 2004; 157-158:284-89.
11. Dupoirieux L, Pouquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 30(1):58-62.
12. Friedmann A, Dehnhardt J, Kleber BM, Bernimoulin JP. Cytobiocompatibility of collagen and PTFE membranes on osteoblast-like cells *in vitro*. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 86(4):935-41.
13. Garber & Belser. Compend. Contin. Educ. Dent. In: SIMPÓSIO DE EDUCAÇÃO CONTINUADA. 1995.
14. Gutta R, Baker RA, Bartolucci AA, Louis PJ. Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size? *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67(6):1218-25.
15. Hoogeveen EJ, Gielkens PF, Schortinghuis J, Ruben JL, Huysmans MC, Stegenga B. Vivosorb[®] as a barrier membrane in rat mandibular defects. An evaluation with transversal microradiography. *Int Oral Maxillofac Surg.* 2009; 38(8):870-5.

16. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med.* 2008; 4: 4-22.
17. Kim YK, Yun PY, Kim SG, Oh DS. In vitro scanning electron microscopic comparison of inner surface of exposed and unexposed nonresorbable membranes. *Oral. Surg. Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod.* 2009; 107(6):e5-e11.
18. Lindfors LT, Tervonen EA, Sándor GK, Ylikontiola LP. Guided bone regeneration using a titanium-reinforced ePTFE membrane and particulate autogenous bone: the effect of smoking and membrane exposure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod.* 2010; 109(6):825-30.
19. Malmquist PJ. Successful implant restoration with the use of barrier membranes. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 57:1114-6.
20. Marouf HA, El-Guindi HM. Efficacy of high-density versus semipermeable PTFE membranes in an elderly experimental model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod.* 2000; 89(2):164-70.
21. Mezzomo LA, Shinkai RS, Mardas N, Donos N. Alveolar ridge preservation after dental extraction and before implant placement: a literature review. *Revista Odonto Ciência.* 2011; 26(1):77-83.
22. Miron RJ, Saulacic N, Buser D, Iizuka T, Sculean A. Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP-2 and TGF β 1. *Clin Oral Invest.* 2013; 17(3):981-8.
23. Moura JM, Ferreira JF, Marques L, Holgado L, Graeff CF, Kinoshita A. Comparison of the performance of natural latex membranes prepared with

- different procedures and PTFE membrane in guided bone regeneration (GBR) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* 2014; 25(9):2111-20.
24. Nanami R, Leonardi DP, Deliberador TM, Ulbrich LM, Zielak JC, Giovanini AF. Aplicação de membrana experimental de PTFE em defeito cirúrgico periodontal de ratos. *J Health Sci Inst.* 2011; 29(4):239-42.
25. Nguyen C, Young S, Kretlow JD, Mikos AG, Wong M. Surface characteristics of biomaterials used for space maintenance in a mandibular defect: a pilot animal study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 69(1):11-8.
26. Papaioannou KA, Markopoulou CE, Gioni V, Mamalis AA, Vayouraki HN, Kletsas D, Vrotsos IA. Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells on guided bone regeneration (GBR) membranes in the absence or presence of nicotine: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26(3):509-19.
27. Silva Pereira SL, Sallum AW, Casati MZ, Caffesse RG, Weng D, Nociti Junior FH, Sallum EA. Comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in the treatment of dehiscence-type defects. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol.* 2000; 71(8):1306-14.
28. Piatelli A, Scarano P, Russo S, Matarasso S. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. *Biomaterials.* 1996; 17(8):791-6.
29. Piatelli A, Scarano A, Paolantonio M. Bone formation inside the material interstices of e-PTFE membranes: a light microscopical and histochemical study in man. *Biomaterials.* 1996; 17(17):1725-31.
30. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res.* 2013; 57(1):3-14.

31. Ronda, M, Rebaudi A, Torelli L, Stacchi C. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(7):p.859-66.
32. Salata LA, Hatton PV, Devlin AJ, Craig GT, Brook IM. In vitro and *in vivo* evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2001; 12(1):62-8.
33. Salomão M, Siqueira JTT. Regeneração óssea guiada através de barreira exposta ao meio bucal após exodontias. Relato de caso. *Rev Bras Implant.*[periódico online]. 2010[citado 27 Abr 2015]; Jul/Set.:5-7.Disponível em: <http://boneheal.inpbiomedical.com/wp-content/uploads/2012/05/06-ROG-atrav%C3%A9s-de-barreira-exposta-ao-meio-bucal-ap%C3%B3s-exodontias.-Relato-de-caso-IBI-2010.pdf>
34. Salomão M, Alvarez KF, Siqueira JTT. Regeneração óssea guiada em defeitos extensos pós-exodontias utilizando membrana exposta ao meio bucal. *Rev Implantnews.* 2010; 7(6):753-9.
35. Salomão M, Siqueira JTT. Uso de barreira de polipropileno pós exodontia. Relato de três casos clínicos. *Rev Bras Implant.* 2009; p.12-5.
36. Cunha J, Jórias Morales R, Siqueira JTT. Regeneração óssea guiada com barreira de polipropileno intencionalmente exposta ao meio bucal. *Revista Catarinense de Implantodontia.* 2012; 12(14):65-8.
37. Salomão, M. Uso de barreira exposta ao meio bucal para regeneração óssea guiada após exodontia. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2010; 63(3): 184-8.

38. Scantlebury T, Ambruster J. The development of guided regeneration: making the impossible possible and the unpredictable predictable. *J Evid Based Dent Pract.* 2012; 12(3 Suppl): 101-17.
39. Schantz JT, Hutmacher DW, Ng KW, Khor HL, Lim MT, Teoh SH. Evaluation of a tissue-engineered membrane-cell construct for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofacil Implants.* 2002; 17(2):161-74.
40. Simion, M, Jovanovic SA, Trisi P, Scarano A, Piattelli A. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allograft in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1998;18(1):8-23.
41. Scantlebury T, Ambruster J. The development of guided regeneration: making the impossible possible and the unpredictable predictable. *J Evid Based Dent Pract.* 2012; 12(3 Suppl):101-17.
42. Trejo MP, Weltman R, Cafesse RG. Effects of expanded polytetrafluoroethylene and polylactic acid barriers on healthy sites. *J Periodontol.* 1998; 69(1):14-8.
43. Urban AI, Jovanovic AS, Lozada LJ. Vertical Ridge augmentation using guided bone regeneration (GBR) in three clinical scenarios prior to implant placement: a retrospective study of 35 patients 12 to 72 months after loading. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009; 24:502-10.
44. Urban AI, Lozada JL, Jovanovic SA, Nagy K. Vertical ridge augmentation with titanium-reinforced, dense-PTFE membranes and a combination of particulated autogenous bone and anorganic bovine bone-derived mineral: a prospective case series in 19 patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014; 29(1):185-93.
45. Yaghobee S, Samadi N, Khorsand A, Ghahroudi AA, Kadkhodazadeh M. Comparison of penetration and passage os streptococcus mutans and

- aggregatibacter actinomycetemcomitans through membranes loaded with tetracycline, amoxicillin, and chlorhexidine: an in vitro study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2013; 25(1):87-97.
46. Ye J, Yao Q, Mo A, Nie J, Liu W, Ye C, Chen X. Effects of an antibacterial membrane on osteoblast-like cells in vitro. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:1853-61.
47. Wang HL, Miyauchi MTT, Takata T. Initial attachment of osteoblast to various guided bone regeneration membranes: an *in vitro* study. *J Periodontal Res*. 2002; 37(5):340-4.
48. Wallace CS. Guided bone regeneration for socket preservation in molar extraction sites: histomorphometric and 3D computerized tomography analysis. *J Oral Implantol*. 2013; 39:503-9.
49. Zheng Z, Wei Y, Wang G, Gong Y, Zhang X. Surface characterization and cytocompatibility of three chitosan/polycation composite membranes for guided bone regeneration. *J Biomater Appl*. 2009; 24(3):209-29.
50. Zhao S, Pinholt EM, Madsen JE, Donath K. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2000; 28(2):116-22.
51. Zwahlen RA, Cheung LK, Zheng LW, Chow RL, Li T, Schuknecht B, Grätz KW, Weber FE. Comparison of two resorbable membrane systems in bone regeneration after removal of wisdom teeth: a randomized-controlled clinical pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(10):1084-91.

Anexo

Anexo A- Folha de Aprovação do Comitê de Ética



**SÃO
LEOPOLDO
MANDIC**

Faculdade São Leopoldo Mandic
Certificado de Cumprimento de Princípios Éticos

Campinas, 26 de maio de 2014

Pesquisador principal: **Guido Alejandro Orozco Ruiz**

Orientador: **Daiane Peruzzo**

Data Avaliação: **26/05/2014** Nº Protocolo: **2014/0225**

CERTIFICO que, após analisar o projeto de pesquisa
**Análise in vitro do comportamento biológico das membranas de
polipropileno e politetrafluoroetileno**
a Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA SLMANDIC considerou que o projeto
está de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação
Animal - CONCEA e da Lei nº 11.749, de 2008.

Prof. Dra. Mara Celia Dambros
Coordenadora do CEUA