

ARMANDO RODRIGUES LOPES PEREIRA NETO

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE FIBROBLASTOS
GENGIVAIS CULTIVADOS SOBRE DIFERENTES
TIPOS DE MEMBRANAS REABSORVÍVEIS**

**Florianópolis
2010**

ARMANDO RODRIGUES LOPES PEREIRA NETO

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE FIBROBLASTOS
GENGIVAIS CULTIVADOS SOBRE DIFERENTES
TIPOS DE MEMBRANAS REABSORVÍVEIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de MESTRE em ODONTOLOGIA, área de concentração Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

**Florianópolis
2010**

Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de “Mestre em Odontologia”, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Florianópolis, 09 de abril de 2010

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
- Coordenador do Programa-

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
-Orientador-

Prof. Dr. Adriano Maia Corrêa
-Membro-

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
-Membro-

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima.”

Luis Pasteur

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, Célio e Célia, por todo o apoio e confiança depositados em mim sempre. Saibam que tudo o que procuro realizar na minha vida é para que se orgulhem de mim, sei que a estrada é longa, mas com vocês do meu lado tenho certeza que tudo será mais fácil. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À *Deus* pai, porque tudo, absolutamente tudo que conquisei durante a minha vida foi porque Ele permitiu. Continue sempre do meu lado meu Senhor.

Ao *Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini*, meu orientador e amigo, por todo conhecimento a mim transmitido durante o mestrado, pelas oportunidades, pela paciência durante todos os dias do nosso convívio e pelas orientações completamente indispensáveis para a conclusão do mestrado, que contribuíram para minha formação na Implantodontia e Periodontia e fizeram com que definitivamente me apaixonasse pela carreira acadêmica.

Ao *Prof. Dr. Antonio Carlos Cardoso*, pela sabedoria repassada e por ter aberto minha cabeça para a constante busca de conhecimento dentro da Implantodontia, por me ensinar a confiar em mim e por mostrar que apenas com muito trabalho e dedicação chegarei em algum lugar.

Ao *Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini*, pela atenção e confiança e por estar disponível para qualquer tipo de questionamento sempre que necessário, se tornando indispensável para a conclusão desta etapa de minha vida.

A *Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões*, pela oportunidade de adquirir conhecimento dentro da cultura celular animal e, principalmente, por ter possibilitado que esta pesquisa se realizasse dentro do LVA. Espero que este seja apenas o primeiro de muitos trabalhos que realizaremos juntos. O meu muito obrigado!

A amiga *Ariadne*, porque simplesmente sem você este trabalho não teria acontecido. Obrigado por todo o conhecimento passado a mim, pelo voto de confiança depositado. Tenha certeza que serei grato pelo resto de minha vida pela ajuda. Um agradecimento também ao seu marido *Neto*, que participou ativamente de todo o desenrolar desse trabalho.

Ao amigo e *Prof. Dr. Cesar Augusto Magalhães Benfatti*, por sempre estar disposto a ajudar quem precisasse e por todos os conselhos e oportunidades que me

ajudaram a concluir esse curso de pós-graduação. Nossa amizade é verdadeira e ainda perdurará por anos.

Aos colegas do curso de Mestrado, **Gustavo, Ernesto, João, Newton, Pamela e Daniel**, nossa convivência não foi fácil, rimos, brigamos, nos estressamos, mas construímos uma amizade sincera de qual me orgulho muito e sou bastante feliz por tê-la conquistado.

Aos professores **Gláucia, Diego, Wilson (Titi), Zendron**, por todos os ensinamentos transmitidos e pelos momentos de descontração que fizeram com que me sentisse em casa dentro do UFSC.

Aos colegas do curso de Doutorado **Boff, Elisa, Moira, Rodrigo e André (Alemão)**, pelas dicas e experiências transmitidas que fizeram com que eu conseguisse crescer dentro da nossa profissão.

Aos residentes do CEPID **José, Monique, Rosana e Letícia**, vocês são o combustível do CEPID. Obrigado por toda ajuda dispensada nesse período.

As funcionárias **Gisella, Mirian e Dolores**, vocês representam muito bem o nosso ambiente de trabalho e são diretamente responsáveis por este ser tão prazeroso.

A **Baumer**, em nome do **Aguedo**, por ter cedido os materiais para a realização desta dissertação.

As amigas do Laboratório LVA **Isa, Franci, Jéssi, Naira e Mari**, somente graças a ajuda de vocês consegui desenvolver toda parte experimental desse trabalho e considero que nos tornamos além de colegas, bons amigos.

Ao amigo **Daniel Romeu Benchimol de Resende**, você foi responsável por eu cursar este mestrado. Seus ensinamentos me tornaram apto a concluir esta etapa. Considero-o como um irmão.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	8
<i>Resumo.....</i>	<i>9</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>10</i>
CAPÍTULO II	11
<i>1 - Introdução.....</i>	<i>12</i>
CAPÍTULO III	15
<i>1 - Artigo versão em Português.....</i>	<i>16</i>
<i>2 - Artigo versão em Inglês.....</i>	<i>36</i>
CAPÍTULO IV	56
<i>1 - Bibliografia Consultada.....</i>	<i>57</i>
CAPÍTULO V	58
<i>1 – Apêndices.....</i>	<i>59</i>
<i>2 - Produção Científica durante o Mestrado.....</i>	<i>68</i>

CAPÍTULO I

PEREIRA-NETO, Armando Rodrigues Lopes. **Análise do comportamento de fibroblastos gengivais cultivados sobre diferentes tipos de membranas reabsorvíveis**. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia) – Curso de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Cirurgias para reconstrução de tecido mole que utilizam material autógeno aumentam a morbidade e o riscos de complicações com a segunda área cirúrgica. Como alternativa para eliminar esses inconvenientes, a engenharia tecidual busca encontrar um arcabouço ideal para carrear células e fatores de crescimento responsáveis pela criação de tecidos em ambiente *in vitro*. Dessa forma o objetivo deste estudo é analisar quatro membranas absorvíveis como potencial arcabouço para a engenharia de tecidos. Foram utilizados fibroblastos humanos gengivais provenientes de cultura primária. Quatro membranas foram utilizadas: Osseoguard[®], Genderm[®], ácido poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e ácido poli(ácido lático-co-glicólico) associado com hidroxiapatita (PLGA+HA). Testes de proliferação, análise da degradação através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), teste de viabilidade celular (MTT) e análise do pH do meio de cultura foram os métodos utilizados para avaliar as membranas. Os índices de proliferação não foram estatisticamente significativos entre grupos, contudo todas as membranas possibilitaram a proliferação celular. A análise do MEV mostrou que as membranas com base polimérica (PLGA e PLGA + HA) apresentam características mais apropriadas a arcabouços para engenharia tecidual. Os níveis de viabilidade celular diminuíram e os níveis de pH foram similares para todos os grupos exceto o PLGA que se apresentou ácido. A membrana de PLGA + HA é a que apresenta melhores características biológicas e estruturais para funcionar como arcabouço para a engenharia de tecidos.

PEREIRA-NETO, Armando Rodrigues Lopes. **Course Analysis of gingival fibroblasts cultured on different types of biodegradable membranes.** 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração Implantodontia) – Curso de Pós Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Soft tissue reconstruction using autogenous material increases morbidity and risk of complications with the second surgical area, the donor site. As an alternative to eliminate these drawbacks, tissue engineering seeks to find an ideal scaffolds to wash cells and growth factors that are responsible for a tissue environment fabrication *in vitro*. Thus the aim of this study is to analyze four absorbable membranes as a potential scaffold for tissue engineering. Human gingival fibroblasts (HGF) from primary cell culture were used. Four types of bioabsorbable membranes were used as cell carrier: OsseoGuard[®], Genderm[®], poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and poly (lactic-co-glycolic) acid associated with hydroxyapatite (PLGA+HA). Proliferation assays, degradation analysis by scanning electron microscopy (SEM) cell viability assay (MTT) and pH analysis of the culture mediums were used to evaluate the membranes. The proliferation index was not statistically significant between groups, yet all the membranes allowed cell proliferation. The SEM analysis showed that the membranes based on polymers (PLGA and PLGA HA) have more appropriate scaffolds characteristics for tissue engineering. The level of cell viability decreased and the pH levels were similar for all groups except that PLGA. The PLGA+HA membrane has the best biological and structural functions as a scaffold for tissue engineering.

CAPÍTULO II

1 - INTRODUÇÃO

A perda de elementos dentais traz prejuízos funcionais, estéticos e, inclusive, de autoestima ao indivíduo. Com essa perda, o tecido ósseo sofre uma remodelação, que muitas vezes dificulta ou até impossibilita a reabilitação com implantes ósseo-integráveis (DAMIEN; PARSON, 1991; EVIAN; HARRIS 2001). A fim de compensar essa limitação, pode-se lançar mão de técnicas de reconstruções do tecido ósseo e do tecido mole. O material “padrão-ouro” utilizado como substituto ósseo é o autógeno, porque tal material é o único que desempenha as três funções essenciais para a formação óssea: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Esse tecido é obtido de áreas intraorais, como corpo e ramo mandibular e mento, ou de áreas extraorais, como a crista ilíaca e a calota craniana (CLAVERO; LUNDGREN, 2003).

Outra situação corriqueira na clínica odontológica são a presença de recessões e de depressões vestibulares, e a ausência de mucosa ceratinizada, que trazem problemas estéticos funcionais e dificultam a manutenção da higiene por parte do paciente. Nessas situações, enxertos de tecido mole autógeno (conjuntivo subepitelial, epitélio conjuntivo) são também o padrão-ouro de escolha e podem ser obtidos do palato, de áreas edêntulas e da região retromolar (CLAVERO; LUNDGREN, 2003).

Os benefícios do material autógeno estão bem fundamentados para essas técnicas de enxertia, porém com um grande prejuízo, a necessidade de uma segunda área doadora. Conseqüentemente, há maior morbidade, associada a riscos inerentes a áreas submetidas a intervenções cirúrgicas, como deiscências de sutura e hemorragias (CLAVERO; LUNDGREN, 2003; GRIFFIN et al., 2006).

Com o propósito de eliminar a segunda área cirúrgica, a literatura apresenta substitutos ósseos e de tecido mole como osso alógeno, matriz derivada do esmalte, osso bovino liofilizado e matriz dérmica acelular. Todos estes materiais possuem resultados fundamentados na literatura pertinente, porém com custo normalmente elevado, dificuldade de obtenção e resultados difíceis de serem previstos (EL-ASKARY; PIPCO, 2000; IMBERMAN, 2007; PRATA; LACERDA; BRENTGANI, 2007).

Dentro do processo de evolução dos tratamentos reconstrutivos, sejam eles de tecido duro ou de tecido mole, encontra-se a engenharia tecidual (ASSAEL, 2003). Tal técnica consiste na produção de um tecido no meio extracorpóreo e em sua implantação no indivíduo. A utilização da engenharia tecidual está diretamente

relacionada a três bases de uma tríade: a) o cultivo de células capazes de produzir o tecido que desejamos reconstruir, ou células capazes de se diferenciar em tipos específicos (células-tronco), células essas que, no caso dos tecidos orais periodontais e peri-implantares, são, principalmente, os fibroblastos e os osteoblastos; b) fatores de crescimento que irão guiar a diferenciação/proliferação dos vários tipos celulares, além de permitir a vascularização do material implantado; e c) um arcabouço de material absorvível capaz de armazenar tanto a cultura de células quanto esses fatores de crescimento (MUSCHLER; NAKAMOTO; GRIFFITH, 2004).

As técnicas que envolvem cultura celular são eficientes e indispensáveis para a avaliação da efetividade bases deste tríade. Esse tipo de estudo tem como principal vantagem a facilidade de padronização da amostra, pois o pH, a temperatura, a tensão de CO₂ e de O₂ e a pressão de CO₂ podem ser controlados de maneira facilitada e eficiente. Além dessa vantagem, o modelo de estudo de cultura de células possibilita a obtenção de culturas idênticas e tem um custo baixo quando comparado com estudos *in vivo* (FRESHNEY, 1990).

Ainda não se chegou a um consenso sobre qual biomaterial tem melhor desempenho no processo de engenharia de tecidos. Entre os tipos de arcabouços disponíveis, a literatura mostra uma enorme gama desses materiais, como hidroxiapatita (HA), fosfato de cálcio, fosfato tricalcio, colágeno do tipo I, ácido polilático (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), dentre outros (MIYAMOTO et al., 1992). Estes biomateriais têm papel importante na construção de arcabouço para a engenharia de tecido ósseo e tecido mole em decorrência de suas propriedades físico-químicas e biológicas, biocompatibilidade, taxas diferentes de degradação, fácil absorção, controle de sua macro e microestrutura (tamanho de poros) e incorporação e liberação de proteínas com certo grau de substantividade (IGNATIUS; CLAES, 1996; LANSMAN et al., 2006; GÓMEZ et al., 2006).

Em virtude destas propriedades, desenvolveram-se alguns estudos clínicos a fim de testar a capacidade de arcabouços variados no cultivo *in vitro* de tecido gengival sadio, com células cultivadas do próprio indivíduo. Para isso, utilizaram-se estruturas formadas de colágeno do tipo I bovino e de ácido hialurônico, associado ou não ao colágeno gel (McGUIRE et al., 2008; PINI PRATO et al., 2003; MURATA et al., 2008). Os resultados obtidos através desses estudos mostra excelente aplicação da engenharia tecidual para casos de enxertia de tecido mole, tanto para enxertos

conjuntivos para recobrimento radicular quanto para enxertos gengivais livres para aumento/ganho de faixa de gengiva ceratinizada.

Para esse tipo de procedimento, o tipo celular utilizado é uma linhagem de fibroblastos, algumas vezes associados a queratinócitos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento de fibroblastos humanos obtidos através de cultura primária de tecido gengival, cultivados sobre membranas de colágeno comercialmente disponíveis e sobre membranas de PLGA e PLGA + HA e assim elencar quais dessas membranas podem ser usadas em futuras aplicações clínicas para a engenharia de tecido mole, tanto para reconstruções ao redor de dentes, quanto ao redor de implantes.

CAPÍTULO III

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE
FIBROBLASTOS GENGIVAIS
CULTIVADOS SOBRE DIFERENTES
TIPOS DE MEMBRANAS
REABSORVÍVEIS.**

Análise do comportamento de fibroblastos gengivais humanos cultivados sobre diferentes tipos de membranas reabsorvíveis.

*Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto**

Ariadne Cristiane Cabral Cruz†

Águedo Aragonéz§

Cláudia Maria Oliveira Simões‡

Ricardo de Souza Magini||

* Programa de Pós-graduação em Implantodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

† Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

§ Programa de Pós-graduação em Implantodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

‡ Professora do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

|| Coordenador do Programa de Pós-graduação em Implantodontia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Endereço de Correspondência

*Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto

Rodovia Amaro Antonio Vieira 2463, apto 405C

88034-101 – Itacorubi, Florianópolis – SC - Brasil

Tel: (48) 3209-9172 – (48) 9944-9909

e-mail: armandopn@gmail.com

RESUMO

Introdução: Cirurgias para reconstrução de tecido mole que utilizam material autógeno aumentam a morbidade e o riscos de complicações com a segunda área cirúrgica. Como alternativa para eliminar esses inconvenientes, a engenharia tecidual busca encontrar um arcabouço ideal para carrear células e fatores de crescimento responsáveis pela criação de tecidos em ambiente *in vitro*. Dessa forma o objetivo deste estudo é analisar quatro membranas absorvíveis como potencial arcabouço para a engenharia de tecidos.

Material e Métodos: Foram utilizados fibroblastos humanos gengivais provenientes de cultura primária. Quatro membranas foram utilizadas: Osseoguard[®], Genderm[®], ácido poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) e ácido poli(ácido lactico-co-glicólico) associado com hidroxiapatita (PLGA+HA). Testes de proliferação, análise da degradação através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), teste de viabilidade celular (MTT) e análise do pH do meio de cultura foram os métodos utilizados para avaliar as membranas.

Resultados: Os índices de proliferação não foram estatisticamente significativos entre grupos, contudo todas as membranas possibilitaram a proliferação celular. A análise do MEV mostrou que as membranas com base polimérica (PLGA e PLGA + HA) apresentam características mais apropriadas a arcabouços para engenharia tecidual. Os níveis de viabilidade celular diminuíram e os níveis de pH foram similares para todos os grupos exceto o PLGA que se apresentou ácido.

Conclusão: A membrana de PLGA + HA é a que apresenta melhores características biológicas e estruturais para funcionar como arcabouço para a engenharia de tecidos.

1 - INTRODUÇÃO

A perda de elementos dentais traz prejuízos funcionais, estéticos e, inclusive, de autoestima ao indivíduo. Com essa perda, o tecido ósseo sofre uma remodelação, que muitas vezes dificulta ou até impossibilita a reabilitação com implantes ósseo-integráveis¹⁻³. A fim de compensar essa limitação, pode-se lançar mão de técnicas de reconstruções do tecido ósseo e do tecido mole. O material autógeno é o “padrão-ouro” utilizado para tais procedimentos.

Uma situação corriqueira na clínica odontológica é a presença de recessões e de depressões vestibulares e a ausência de mucosa ceratinizada, que trazem problemas estéticos funcionais e dificultam a manutenção da higiene por parte do paciente. Nessas situações, enxertos de tecido mole (conjuntivo subepitelial, epitélio conjuntivo) podem ser realizados com material obtido do palato, de áreas edêntulas e da região retromolar⁴.

Os benefícios do material autógeno estão bem fundamentados para essas técnicas de enxertia, porém com a necessidade de uma segunda área doadora, que representa grande prejuízo. Conseqüentemente, há maior morbidade, associada a riscos inerentes a áreas submetidas a intervenções cirúrgicas, como deiscências de sutura e hemorragias^{4,5}.

Alternativas para evitar esse aumento de morbidade estão sendo pesquisadas. Um substituto para tecido mole autógeno é a matriz dérmica acelular. Porém, com grau de contração imprevisível e alto custo⁶. Grande atenção tem sido dispensada à engenharia de tecidos, por meio da qual um arcabouço de material absorvível serve como carreador para células associadas a fatores de crescimento.

Ainda não se chegou a um consenso sobre qual biomaterial tem melhor desempenho no processo de engenharia de tecidos. Entre os tipos de arcabouços disponíveis, a literatura mostra uma enorme gama desses materiais, como hidroxiapatita (HA), fosfato de cálcio, fosfato tricálcio, colágeno do tipo I, ácido polilático (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), dentre outros⁷. Estes biomateriais têm papel importante na construção de arcabouço para a engenharia de tecido ósseo e tecido mole em decorrência de suas propriedades físico-químicas e biológicas, biocompatibilidade, taxas diferentes de degradação, fácil absorção, controle de sua macro e microestrutura (tamanho de poros), e incorporação e liberação de proteínas com certo grau de substantividade⁸⁻¹¹. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar

o comportamento de fibroblastos humanos obtidos através de cultura primária de tecido gengival, cultivados sobre duas membranas de colágeno comercialmente disponíveis e sobre duas membranas de PLGA e PLGA + HA. A partir dos resultados obtidos, poder-se-á elencar quais dessas membranas podem ser usadas em futuras aplicações clínicas para a engenharia de tecido mole, tanto para reconstruções ao redor de dentes, quanto ao redor de implantes.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Membranas absorvíveis

Foram utilizados quatro tipos de membranas absorvíveis, duas já disponíveis no mercado – Genderm[®] (Baumer, Mogi Mirim, SP, Brasil) e Osseoguard[®] (Biomet 3i, Palm Beach, Florida, EUA) – e duas membranas-testes, uma produzida de copolímero de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) e outra de PLGA associado a hidroxiapatita (PLGA + HA).

2.2 - Preparação das membranas de PLGA + HA e PLGA

Os arcabouços foram obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero de poli(ácido lático-co-glicólico) – PLGA (Boehringer Ingelheim), na proporção 82:18 (m:m), foi dissolvido em clorofórmio (Merck) (10% m/v) a temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, partículas de sacarose (Synth) (30% m/v) com tamanho inferior a 1.000 µm foram adicionados, bem como as partículas de hidroxiapatita (20% m/v) (Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brasil). Essa solução foi vertida em moldes de 6cm². Após a evaporação de solvente à temperatura ambiente, a sacarose foi removida usando-se álcool poli-vinílico (PVA). As membranas de PLGA foram fabricadas da mesma maneira, com exceção da adição de partículas de HA.

2.3 – Caracterização das membranas

As membranas foram metalizadas em um suporte (Shimadzu – 50TM) e a presença de poros e formato da superfície foram examinadas usando microscopia eletrônica de varredura (JSM-6390LV, JEOL, Tóquio, Japão). As micrografias foram obtidas nos aumentos 1000, 1500, 2000 e 2500x. O tamanho dos poros foi

determinado usando um programa de análise de imagem (Digimizer[®] versão 3.7.0 Medical Software Brolkstraat, Bélgica). Cada micrografia obtida foi dividida em nove quadrantes e em cada um desses foram medidos o diâmetro de dois poros escolhidos aleatoriamente por um único examinador calibrado.

Para analisar a degradação das membranas, colocou-se as mesmas em cavidades de placas de 96 cavidades juntamente com 300µl de meio DMEM e incubou-se a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente a 48 e 72h removeu-se o meio de cultura, lavou-se as membranas com PBS e desidratou-se com banho de álcool (50 – 100%). As membranas desidratadas foram processadas conforme o descrito acima para microscopia eletrônica de varredura.

2.4 - Cultura Primária

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC sob o número 021/09. O tecido gengival saudável foi obtido de um paciente submetido a cirurgia de cunha distal no Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID) da UFSC. A amostra de 20mm² foi acondicionada para transporte em PSA 4% em solução salina de fosfato tamponada (PBS). Em condições assépticas a amostra foi lavada por 2 vezes com PBS e, posteriormente, em condições assépticas o tecido epitelial foi removido com o auxílio de cabo de bisturi nº 3 e lâmina cirúrgica nº 15, em placas de Petri de 60mm de diâmetro, que continham 5ml do meio de cultura. Após a desepitelização, a amostra foi fragmentada em 15 partes (explantes) de aproximadamente 1mm². Os explantes foram colocados garrafas de cultura de 25cm² com meio Dulbecco (DMEM; Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com 1% de antibiótico e antifúngico (PSA - 10000U penicilina, 10000µg estreptomicina e 25µg anfotericina B) e 10% soro fetal bovino (SFB; Gibco, São Paulo, Brasil) e foram mantidos a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado 2 vezes por semana e o crescimento celular foi avaliado diariamente por meio de microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão).- Quando as células atingiram 70% confluência os explantes foram removidos e lavou-se duas vezes com PBS. As células foram tratadas com uma solução de tripsina EDTA (solução de tripsina 0,25% e 0,1% de glicose dissolvida em 1mM de EDTA-salino; Sigma-Aldrich Co.). A enzima foi inativada com a adição de DMEM/SFB. Realizou-se as subculturas na proporção de 1:1.-Fibroblastos humanos gengival da 6^a passagem foram utilizados em todos os

experimentos deste estudo.

2.5 Teste de Proliferação

Para determinar o efeito da presença das membranas na proliferação celular, os fibroblastos foram semeados a uma densidade de 5×10^4 células por cavidades, em placas de 12 cavidades. Em 1, 2, 4, 6 e 7 dias, as células foram tripsinizadas, e a contagem de células foi realizada no contador de células automatizado (Countess™, Invitrogen, Carlstad, EUA) usando o corante azul de Tripano.

2.6 Teste de Viabilidade Celular

A viabilidade dos fibroblastos na presença das membranas foi avaliada por meio do teste do ensaio colorimétrico do MTT^{12,13} [3 - (4,5-dimethylthiazolyl-2) -2,5-difenil tetrazolium bromide] (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) com pequenas modificações. Resumidamente, os fibroblastos foram semeados a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células por cavidade em placas de 96 cavidades preenchidas com 300µl de meio de cultura. As placas foram incubadas por 24h a 37 °C e 5% de CO₂. Após, os discos de 5mm de diâmetro de cada uma das membranas testadas foram colocados nas cavidades. Após os tempos experimentais (19h, 72h e 8 dias), as percentagens de células viáveis foram determinadas. Para tanto, o meio foi removido, e 50µl de solução de MTT (1 mg/ml) foram adicionados. As placas foram reincubadas por 4h. Depois disso, a solução de MTT foi removida, 100µl de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazana, e as placas foram gentilmente agitadas, de modo para que os cristais ficassem completamente dissolvidos. As absorbâncias foram medidas por meio do espectrofotômetro (Infinite M200, TECAN, Áustria GmbH, Grödig, Áustria), a 540nm, e as percentagens de células viáveis foram calculadas em relação aos controle (células cultivadas sem a presença das membrans durante o mesmo tempo experimental), não tratados. Duas repetições foram feitas para as amostras e duplicatas foram realizadas para o experimento.

O pH foi determinado no sobrenadante de todas as amostras destinadas ao teste de viabilidade celular, com tiras de indicador de pH (Merck, Whitehouse Station, NJ, E.U.A.)

2.7 - Análise Estatística

A reprodutibilidade intraexaminador do tamanho de poro foi testada com coeficiente de correlação intraclasse (ICC). Comparações entre os grupos foram submetidas a uma análise de variância não paramétrica (ANOVA), com as diferenças avaliadas pelo teste de Student Newman-Keuls *post-hoc*. Intervalo de confiança de 95% foi aprovado ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad InStat 3, versão 3.10 para Windows[©] (Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

3 - RESULTADOS

3.1 – Caracterização das membranas

A análise visual das imagens obtidas por meio do MEV mostram um padrão de entrelaçados característicos das membranas de colágeno (Genderm[®] e Osseoguard[®]). As imagens das membranas-testes (PLGA e PLGA+HA) apresentam características diferentes, com um grau de porosidade que se manteve padrão durante o período de degradação testado (Fig. 1). O ICC foi de 90%. As membranas de PLGA apresentaram uma área média de $4,10\mu\text{m}^2 \pm 1,14$ (controle). Após os períodos de 48 e 72h os valores foram da ordem de $6,50\mu\text{m}^2 \pm 2,04$ e $3,19\mu\text{m}^2 \pm 0,69$, respectivamente. Os valores das áreas das membranas de PLGA+HA para controle (0h) e após 48 e 72h foram $6,61\mu\text{m}^2 \pm 1,76$, $6,73\mu\text{m}^2 \pm 1,58$ e $9,95\mu\text{m}^2 \pm 2,24$, respectivamente. Não observou-se diferenças ($p > 0,05$) nos tamanhos dos poros entre os grupos de PLGA e PLGA + HA, em nenhum período avaliado. Para o grupo PLGA, observou-se diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) entre 48h e 72h, bem como 0h e 48h. Para o grupo PLGA + HA houve diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) entre 0h e 72h, bem como 48h e 72h (Gráfico 1)

3.2 - Teste de Proliferação Celular

Os resultados obtidos através da quantificação celular automatizada com o corante azul de Tripano foram de $112\% \pm 86,47$, $85\% \pm 20,20$, $142\% \pm 36,88$, $167\% \pm 0,43$ e $60\% \pm 37,57$, para os tempos experimentais de 1, 2, 4, 6, 7 dias, respectivamente em relação ao número de células semeadas inicialmente ($t = 0$) (Gráfico 2). Os valores de proliferação, nos períodos de 1, 2, 4, 6 e 7d, foram de 216, 100, 157, 100 e 28% para Genderm[®]; Para Osseoguard[®], foram de 150, 85, 71, 442 e

85%; Para PLGA, de 50, 57, 185, 28 e 28%; e para a membrana de PLGA+HA, os valores foram 33, 100, 128, 100 e 100%. A análise de variância realizada por meio do ANOVA mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos durante os tempos experimentais (Gráficos 3).

3.3 - Teste de Viabilidade Celular

Os resultados de citotoxicidade celular foram de 31, 40, 64, e 26%, para as membranas Genderm[®], Osseoguard[®], PLGA e PLGA+HA, respectivamente (Gráfico 4). A diferença entre a citotoxicidade dos diferentes grupos não foi significativa ($p>0,05$). Os resultados, quando comparados os grupos experimentais nos tempos de 19h, 72h e 8 dias foram 0, 18 e 75% no grupo Genderm[®]. Para Osseoguard[®], foram 36, 0 e 85%. Para a membrana PLGA foram 0, 97 e 94%; enquanto que para as membranas de PLGA+HA foram 0, 10 e 66%. As diferenças foram significativas ($p<0,05$) entre os períodos experimentais de 72h e 8 dias, bem como entre 19h e 8 dias (Gráficos 5).

A membrana de PLGA apresentou pH 4 em 24 e 72h, e pH 5 em 96 e 120h. A membrana Genderm[®] apresentou pH 8, 9, 9 e 9 em 24, 72, 96 e 120h, respectivamente. A membrana Osseoguard[®] apresentou pH 9 em todos os tempos experimentais. A membrana de PLGA+HA apresentou pH 8, 8, 9 e 9 em 24, 72, 96 e 120h, respectivamente (Gráfico 6).

4 - DISCUSSÃO

O processo de cultura celular está bem fundamentado na literatura. Suas vantagens sobre outros tipos de modelos de estudo com a finalidade de testar produtos, especialmente em animais, vão além das questões éticas. Passa pela praticidade, baixo custo e facilidade de controlar variáveis, o que é, muitas vezes, difícil de ser realizado em outros modelos experimentais^{14,15}. Dessa forma, foi escolhido esse tipo de pesquisa, com a finalidade de avaliar o comportamento de células presentes no tecido gengival sobre tipos de membranas que podem servir de arcabouços para a engenharia de tecidos moles orais.

A engenharia tecidual está baseada na tríade células, arcabouço e fatores de crescimento¹⁶. O arcabouço escolhido deve ser capaz de agregar os outros fatores, de

forma que possibilite a formação tecidual sem que haja alteração nas funções normais do tecido¹⁷. Assim, este trabalho busca associar células presentes nos tecidos gengivais a um arcabouço, para observar a influência desse material na viabilidade e na proliferação celular.

Para a realização deste estudo, com finalidade de se desenvolver um carreador para engenharia de tecidos gengival, foi eleita a utilização de fibroblastos gengivais humanos originados de cultura primária. Foram escolhidos fibroblastos da sexta passagem, por apresentarem alta viabilidade e não apresentarem danos no DNA¹⁸. No futuro, ao reconstruírem-se tecidos específicos para cada paciente doador de células, evitar-se-á qualquer tipo de contaminação cruzada e aumentar-se-á a taxa de sucesso em virtude de o material ter origens autógenas.

Essas células possuem com principais vantagens a facilidade de manuseio em ambiente de cultura celular, grande capacidade de proliferação e fácil obtenção. Nesta pesquisa, a escolha do cultivo de fibroblastos gengivais, eliminando os queratinócitos, reside no fato demonstrado por Løe et al. (1971)¹⁹ de que a ceratinização do epitélio bucal é controlada por estímulos morfogenéticos do tecido conjuntivo subepitelial ricos nesse tipo celular. Dessa forma, a cultura de fibroblastos existentes no tecido conjuntivo da mucosa ceratinizada foi a primeira opção de cultivo.

A disposição estrutural do arcabouço para engenharia tecidual deve possuir características específicas. Os arcabouços devem apresentar resistência mecânica, para possibilitar adesão celular; precisam ser biocompatíveis e ser reabsorvidos pelo organismo sem provocar qualquer tipo de alteração, seja ela funcional ou estrutural, nas áreas adjacentes; devem possuir porosidade capaz de permitir migração e povoamento celular; e devem possibilitar adesão e proliferação celular, além de ser capazes de carrear fatores de crescimento^{17,20,21}. Os resultados obtidos por meio da análise do MEV, mostraram que as membranas comercialmente disponíveis (Osseoguard[®] e Genderm[®]) apresentam estruturas semelhantes à das fibras têxteis, com fibras entrelaçadas e ausência de porosidades, fatores indispensáveis para criação *in vitro* de tecido gengival. Por outro lado, essa estrutura apresenta adjetivos essenciais para a formação de barreiras responsáveis por impedir a migração de células indesejáveis para procedimentos regenerativos (regeneração tecidual guiada e regeneração óssea guiada)^{22,23}.

As medições dos poros das membranas PLGA e PLGA+HA mostraram que a porosidade de ambas as membranas aumentou em 48h. Esse aumento também foi

observado no período de 72h nas membranas de PLGA+HA, porém em leve escala. Já a membrana de PLGA apresentou uma redução drástica do tamanho dos poros. Este dado pode estar relacionado a um possível preenchimento dos poros por partículas liberadas do polímero durante o processo de degradação. A adição de HA não alterou o tamanho dos poros ($p>0,05$). Contudo, os resultados estatísticos para comparações entre os tempos experimentais mostrou diferenças estatisticamente significativas no grupo da membrana PLGA e na PLGA+HA.

A proliferação celular foi avaliada por meio da coloração com azul de tripano e contagem de células em contador automatizado. Os dados foram contabilizados em porcentagens com relação ao controle celular. Entre os grupos testados, os dados não apresentaram diferenças significativas, o que mostra que as membranas de polímero possibilitam uma proliferação celular semelhante à das duas comercialmente disponíveis. Esses achados corroboram outros trabalhos em que polímeros possibilitam a proliferação celular, tanto para fibroblastos quanto para células do tecido ósseo²⁴⁻²⁶. A adição de HA ao polímero, nesse momento, não alterou os resultados quando comparado com a membrana que não apresentava essa estrutura, o que difere do trabalho realizado por Sui et. al (2007)²⁷ no qual a adição de HA ao polímero PLLA possibilitou maior crescimento de osteoblastos quando comparado ao grupo sem HA. Essa diferença parece estar relacionada ao tipo celular, já que a HA está é um componente do tecido ósseo e por isso teria maior afinidade a osteoblastos. Por fim, vale ressaltar que, mesmo não apresentando resultados estatisticamente significativos, a membrana polimérica acrescida de HA mostrou valores absolutos melhores que a sua similar sem a presença de HA.

Vários trabalhos utilizaram membranas de colágeno como as utilizadas neste estudo e comumente os resultados para proliferação de fibroblastos foi melhor nesse tipo de material²⁸⁻³¹. Tais dados fizeram com que estas membranas fossem escolhidas como controles. Os resultados para o teste de proliferação corroboram com os obtidos por outros autores³² que utilizaram fibroblastos de pele e não houve diferenças entre membranas de colágeno, quitosana e celulose. Outros autores²⁴ avaliaram a biocompatibilidade de membranas reabsorvíveis e não-reabsorvíveis em fibroblastos humanos do ligamento periodontal e células semelhantes a osteoblastos em culturas de células. Seus resultados mostraram que as membranas de colágeno apresentaram alta biocompatibilidade, enquanto que as de PTFE (poli-tetra-fluoretileno) e de ácido polilático induziram reações citotóxicas de leve a moderada.

A proliferação celular obteve resultados inferiores em 7 dias nos grupos Genderm[®], Osseguard[®] e PLGA se comparados com as taxas de proliferação das primeiras 24h (Gráfico 3). Possivelmente isto ocorreu em virtude da inibição de proliferação por contato celular. Quando se aproximaram de 7d, um alto grau de confluência foi alcançado o que pode ter ocasionado a diminuição das taxas de proliferação nesses grupos. O grupo de PLGA+HA, manteve os níveis de proliferação em 6 dias e 7 dias, possivelmente ocasionado pelo mesmo motivo.

Os níveis de proliferação celular devem ser associados a resultados da viabilidade dessas células. Nesse estudo foi realizado um teste que se baseia na atividade mitocondrial celular (MTT). Os resultados mostraram que não houve diferenças entre os grupos avaliados. Porém os menores valores para viabilidade foram os apresentados pela membrana de PLGA. Os resultados para as membranas de colágeno e a membrana de PLGA + HA foram bem semelhantes. Esta semelhança também foi observada nos resultados dos teste de variação do pH. A membrana de PLGA apresentou valores mais baixos para o pH. O que parece explicar o resultados obtidos na avaliação da viabilidade celular. A presença da HA funciona como “solução tampão” graças a suas propriedades de manter o meio, como descrito em outros trabalhos^{33,34}. O que também foi observado é alcalinização de todos os meios de todos os grupos, inclusive do controle. Isto ocorre pela liberação e degradação de proteínas presente no meio.

Avaliando-se os resultados de viabilidade celular obtidos comparando-se os tempos experimentais notou-se grande queda nos valores com o passar do tempo. A diferença entre 72h e 8d foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O mesmo foi observado quando comparados os resultados de 19h e 8d ($p < 0,05$). Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Alpar et. al (2000)²⁴ que também estudaram membranas de colágeno e membranas de polímeros.

Pode-se concluir que a membrana de PLGA + HA apresenta características mais consistentes para servir de arcabouço para a engenharia tecidual. As membranas de colágeno comercialmente disponíveis apresentaram condições similares a membrana de PLGA + HA, contudo suas características físicas impossibilitam a utilização destas como arcabouço.

REFERÊNCIAS

1. Damien JC, Parson JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Journal of Applied Biomaterials*, 1991; 2:187–208.
2. Harris RJ. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. *J Periodontol*, 2001; 72(7): 932-938.
3. Evian CI, al-Maseeh J, Symeonides E. Soft tissue augmentation for implant dentistry. *Compend Contin Educ Dent*, 2003; 24(3): 195-198.
4. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2003; 5 (3):154-160.
5. Griffin TJ, Cheung WS, Zavras AI, Damoulis PD. Postoperative complications following gingival augmentation procedures. *J Periodontol*, 2006; 77: 2070-2079.
Harris RJ. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. *J Periodontol*, 2001; 72(7): 932-938.
6. Park J-B. Increasing the width of keratinized mucosa around endosseous implant using acellular dermal matrix allograft. *Implant Dent*, 2006; 15(3) :275–281.
7. Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hasimoto J, Suzuki S, Ono K. Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 1992; 278: 274-285.
8. Ignatius AA, Claes LX. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL, lactide) and poly(L-lactide-coglycolide). *Biomaterials*, 1996; 17(8): 831-839.
9. Lansman S, Paakko P, Ryhanen J, Kellomaki M, Waris E, Tormala P, Waris T, Ashmmakhi N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcuts of experimental design. *J Craniofacial Surg*, 2006;17(6): 1121-1128.
10. Gómez, G, Korhikoski S, González, MM, Lansman S, Ella V, Salo T, Kellomaki M, Ashammakhi N, Arnaud E. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. *J Craniofacial Surg*, 2006; 17(5): 935-942.
11. Huang Y X, Miao X. Novel poros hydroxyapatite prepared by combing H2O2 foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass. *J. Biomater. Appl.*2007; 21:351-374.
12. Mosmann, T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolog. Methods*, 1983; 65: 55-63.

13. Sieuwerts AM, Klijn, JG, Peters, HA, Foekens, JA. et al. 1995 The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995 Nov; 33(11):813-23.
14. Freshney, RI. *Culture of animal cells. A multimedia guide.(CD-ROM).* New York: Wiley-Liss, 1999.
15. Freshney, RI. *Biology of the cultured cell: a manual of basic technique.* 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1990. p.347.
16. George F, Muschler CN, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86 :1541-1558.
17. Hollister SJ, Lin CY, Saito E, Lin CY, Schek RD, Taboas JM, Williams JM, Partee B, Flanagan CL, Diggs A, Wilke EN, Van Lenthe GH, Müller R, Wirtz T, Das S, Feinberg SE, Krebsbach PH. Engineering craniofacial scaffolds *Orthod Craniofac Res* 2005; 8, : 162–173.
18. COURA GS. Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA. 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
19. Løe H, Karring T. The three-dimensional morphology of the epithelium-connective tissue interface of the gingiva as related to age and sex. *Scand J Dent Res.* 1971; 79(5):315-26.
20. Messias AD, Aragonés A, Duek EAR. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. *Key Engineering Materials.* 2009; 396-398: 461-464.
21. Eberli D, Freitas Filho L, Atala A, Yoo JJ. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. *Methods* 2009; 47: 109–115.
22. Cortellini P, Pini Prato G, Baldi C. Guide tissue regeneration with different materials. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1990; 10 :137-151.
23. Simain-Sato F, Lahmouzi J, Kalykakis GK, Heinen E, Defresne MP, De Pauw MC, Grisar T, Legros JJ, Legrand R.. Culture of gingival fibroblasts bioabsorbable regenerative materials in vitro. *J Periodontol,* 1999; 70 :1234-1239.
24. Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Invest.* 2000; 4 :219–225.
25. Zhao L, Chenguang H, Yongjuan G, Lian C, Lei C, Yilin C. Preparation and cytocompatibility of PLGA scaffolds with controllable fiber morphology and diameter using electrospinning method. *J Biomed Mater Res. Part B, Appl Biomater.*

2008; 87B : 26–34.

26. Pan H, Jiang H, Chen W. The Biodegradability of electrospun dextran/PLGA scaffold in a fibroblast/macrophage co-culture. *Biomaterials*. 2008 April ; 29 (11): 1583–1592.

27. Sui G, Yang X, Mei F, Hu X, Chen G, Deng X, Ryu S. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*. 2007; 82A : 445–454.

28. Kumar TR, Shanmugasundaramand N, Babu M. Biocompatible collagen scaffolds from a human amniotic membrane: physicochemical and *in vitro* culture characteristics. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*. 2003; 14, (7) : 689–706.

29. Marinucci L, Lilli C, Guerra M, Belcastro S, Becchetti E, Stabellini G, Calvi EM, Locci P. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: an *in vitro* study. *J Biomed Mater Res*. 2003; 67A: 504–509.

30. Takata T, Wang H-L, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodont Res*. 2001; 36: 322-327.

31. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertel M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin. Oral Impl. Res*. 2004; 15 : 443–449.

32. Johnen C, Steffen I, Beichelt D, Brautigam K, Witascheck T, Toman N, Moser V, Ottomann C, Hartmann B, Gerlach JC. Culture of subconfluent human fibroblasts and keratinocytes using biodegradable transfer membranes. *b u rns*. 2008; 34 : 6 5 5 – 6 6 3.

33. Gomes IC, Chevitarese O, Alemida NS, Salles MR, Gomes GC. Diffusion of calcium through dentin. *J Endod*. 1996; 22 :590-595.

34. Staehle HJ, Spien V, Heinecke A, Muller HP. The effect of root canal filling materials containing calcium hydroxide on the alkalinity of root dentin. *Endod Dent Traumatol* 11:163-168, 1995.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig 1 – Imagens obtidas por meio do MEV mostra o padrão de degradação das membranas em meio de cultura durante os tempos avaliados (Controle, 48 e 72h)

Gráfico 1 – Efeito da degradação na área dos poros das membranas de PLGA, PLGA+HA. Valores expressos em percentuais. Os dados são reportados como média \pm DP (n = 3). A diferença entre a porosidade das duas membranas não foi significativa ($p > 0,05$). ANOVA e Student-Newman-Keuls post hoc. Média do controle 48h e 72h.

Gráfico 2 – A proliferação celular, expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao número de células semeadas em cada período experimental. Os dados são reportados como média \pm DP (n = 4). A diferença entre a proliferação celular na membrana de diferentes grupos não foi significativa ($p > 0,05$). ANOVA e Student-Newman-Keuls post hoc

Gráfico 3 – Porcentagem de proliferação celular de cada uma das membranas em relação ao grupo controle durante os tempos experimentais 1, 2, 4, 6, e 7d. Não houve diferença significativa estatisticamente ($p > 0,05$).

Gráfico 4 - Viabilidade da cultura de células com Genderm[®], OsseoGuard[®], PLGA, PLGA membranas HA. Valores expressos em percentuais. Os dados são reportados como média \pm DP (n = 3). A diferença entre a citotoxicidade de diferentes grupos de membranas não foi significativa ($p > 0,05$). ANOVA e Student-Newman-Keuls post hoc. Média de 19h, 72h, e 8 dias.

Gráfico 5 - Viabilidade de células de cultura com Genderm[®], OsseoGuard[®], PLGA, PLGA membranas HA. Valores expressos em percentuais. Os dados são reportados como média \pm DP (n = 3). (*) A diferença entre a citotoxicidade em 8 dias e 19h foi significativa ($p < 0,05$). (*) A diferença entre a citotoxicidade em 8 dias e 72h foi significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre 72h e 19h ($p > 0,05$). ANOVA e Student-Newman-Keuls post hoc.

Gráfico 6 – Variação do pH do meio de cultura com a presença das membranas e do grupo controle.

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

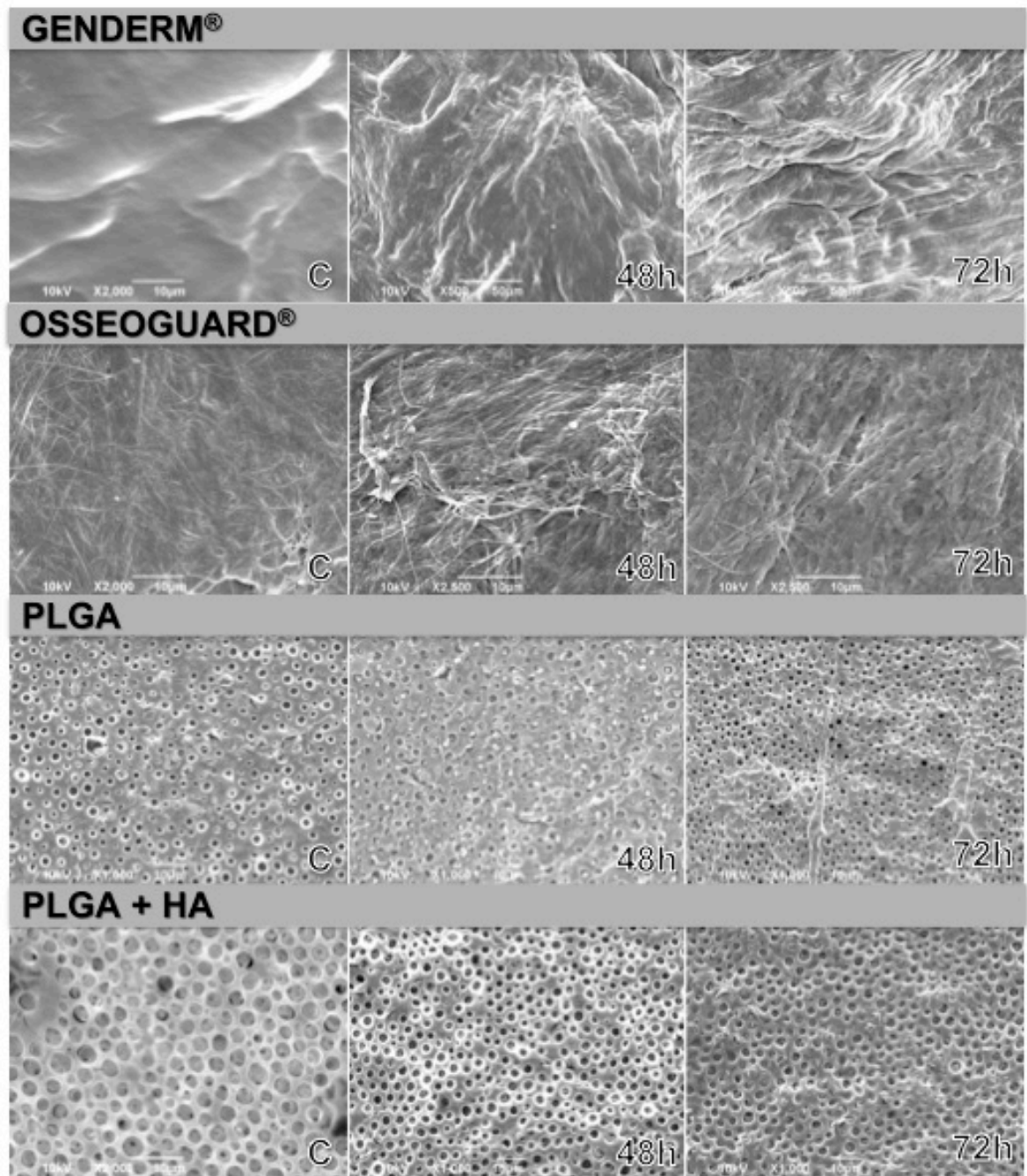


Fig. 1

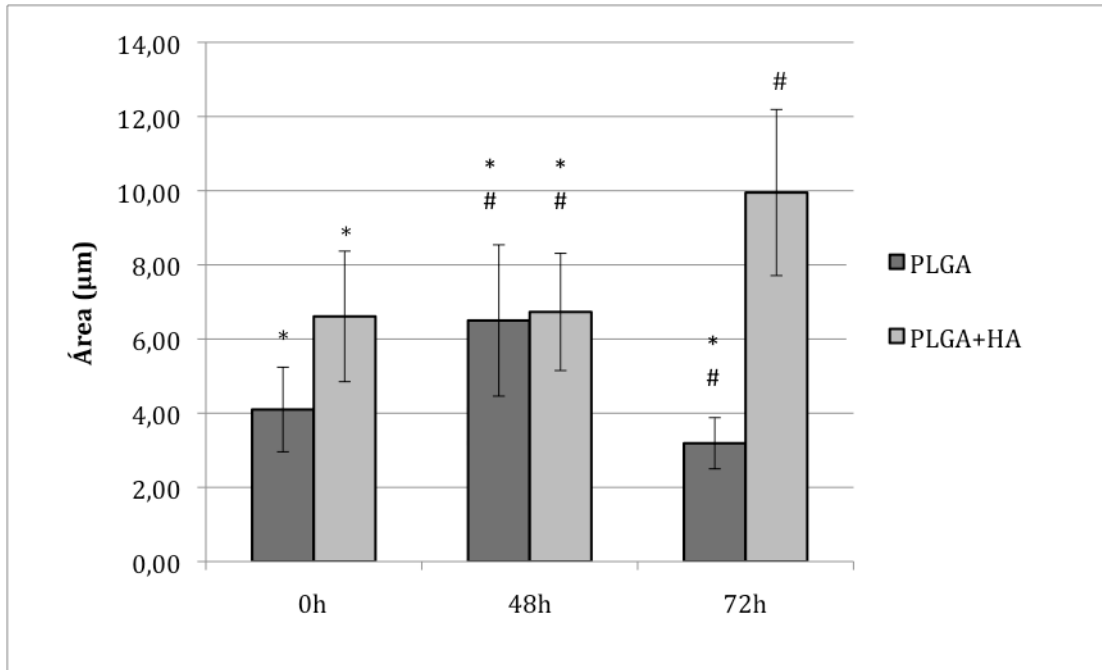


Gráfico 1

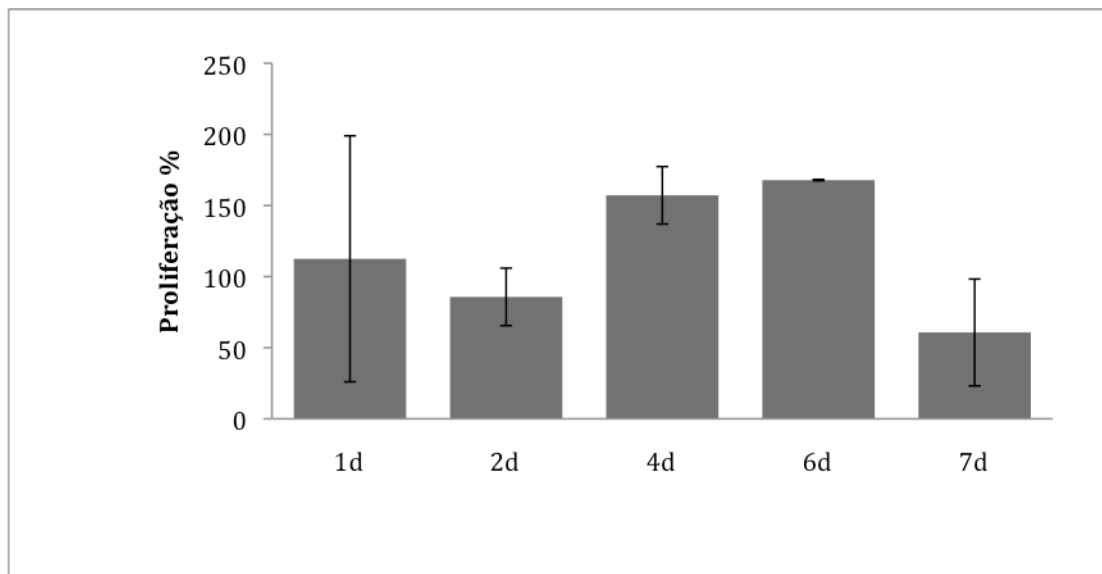


Gráfico 2

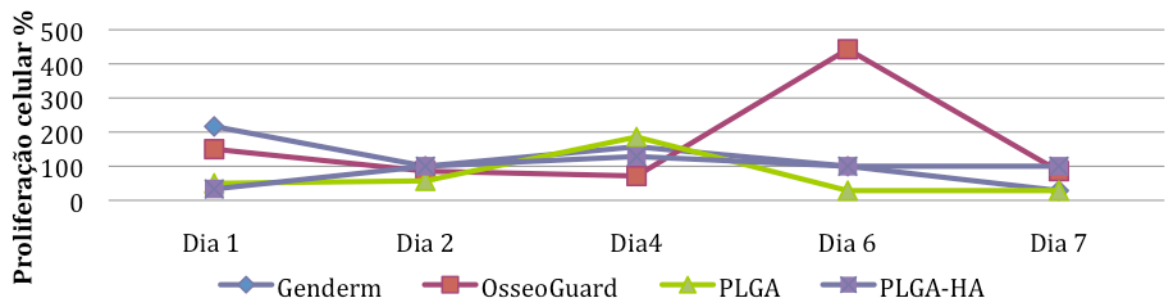


Gráfico 3

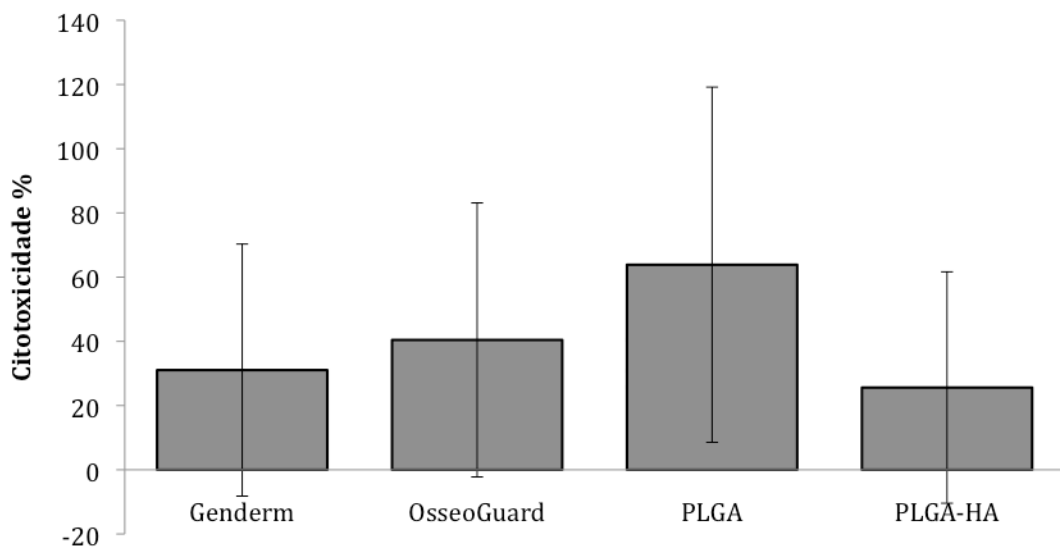


Gráfico 4

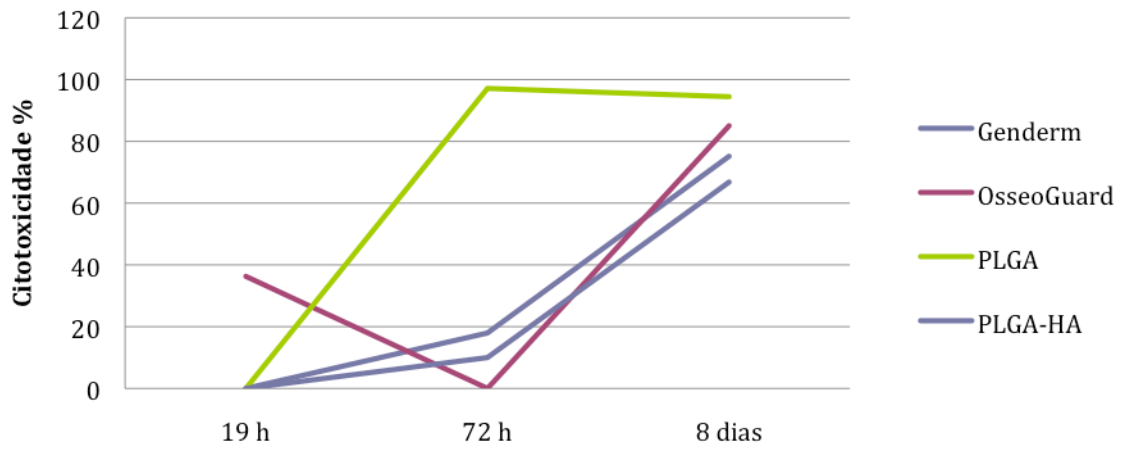


Gráfico 5

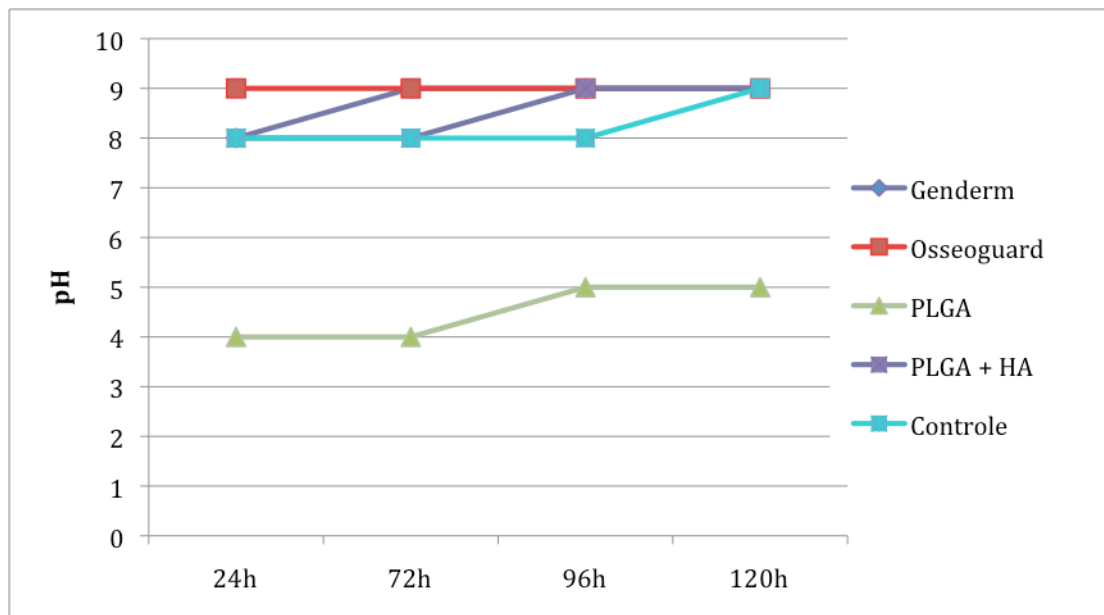


Gráfico 6

**COURSE ANALYSIS OF GINGIVAL
FIBROBLASTS CULTURED ON
DIFFERENT TYPES OF
BIODEGRADABLE MEMBRANES.**

This manuscript is formatted according with the author's guidelines of the *Journal of Periodontology*.

Course analysis of human gingival fibroblasts cultured on different types of biodegradable membranes.

*Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto**

Ariadne Cristiane Cabral Cruz†

Águedo Aragonéz§

Cláudia Maria Oliveira Simões‡

Ricardo de Souza Magini||

* DDS, Graduate Student, Department of Dental Implantology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

† MSc, PhD Student, Biotechnology Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

§ PhD, Post-doctorate Student, Department of Dental Implantology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

‡ PhD, Head Professor, Biotechnology Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

|| PhD, Head Professor, Department of Dental Implantology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Responsible for Correspondence

*Armando Rodrigues Lopes Pereira Neto

Amaro Antonio Vieira Street 2463, apartment 405C

ZIP CODE 88034-101 – Itacorubi, Florianópolis – SC - Brazil

Tel: + 55 48 3209-9172 – + 55 48 9944-9909

e-mail: armandopn@gmail.com

ABSTRACT

Background: Soft tissue reconstruction using autogenous material increases morbidity and risk of complications with the second surgical area, the donor site. As an alternative to eliminate these drawbacks, tissue engineering seeks to find an ideal scaffolds to wash cells and growth factors that are responsible for a tissue environment fabrication *in vitro*. Thus the aim of this study is to analyze four absorbable membranes as a potential scaffold for tissue engineering.

Material and Methods: Human gingival fibroblasts (HGF) from primary cell culture were used. Four types of bioabsorbable membranes were used as cell carrier: OsseoGuard[®], Genderm[®], poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and poly (lactic-co-glycolic) acid associated with hydroxyapatite (PLGA+HA). Proliferation assays, degradation analysis by scanning electron microscopy (SEM) cell viability assay (MTT) and pH analysis of the culture mediums were used to evaluate the membranes.

Results: The proliferation index was not statistically significant between groups, yet all the membranes allowed cell proliferation. The SEM analysis showed that the membranes based on polymers (PLGA and PLGA HA) have more appropriate scaffolds characteristics for tissue engineering. The level of cell viability decreased and the pH levels were similar for all groups except that PLGA.

Conclusion: The PLGA+HA membrane has the best biological and structural functions as a scaffold for tissue engineering.

1 - INTRODUCTION

Tooth loss harms functional, aesthetic, and even self-esteem problems. With this loss, the bone undergoes remodeling process can difficulty or even impossibility the patient rehabilitation with osseointegrated dental implant¹⁻³. To solve this limitation, hard and soft tissue reconstructions techniques have been chosen. The "gold standard" graft material used for these procedures is autogenous tissue.

A common scenario in dental practice is the presence of gingival recessions, buccal depressions, and the absence of keratinized mucosa. These clinical situations bring us functional and aesthetic problems, and make it difficult to maintain oral hygiene by the patient. In such situations, soft tissue grafts (subepithelial, epithelial tissue) can be performed from the palate, edentulous areas and retromolar region donor site⁴. The benefits of autogenous material is well-founded in grafting techniques, however, there is greater morbidity associated with the second surgery site, as suture dehiscence and bleeding^{4,5}.

Alternatives to avoid the second surgery site are being researched. A replacement for autogenous soft tissue graft is an acellular dermal matrix. However, the contraction degree is unpredictable and the material is expensive⁶. Great attention has been devoted to tissue engineering, whereby an absorbable scaffold is use as a cell carrier associated with growth factors. There are no consensus on which biomaterial has better performance in the process of tissue engineering. There are many types of scaffolds available, as hydroxyapatite (HA), calcium phosphate, tricalcium phosphate, type I collagen, poly-lactic acid (PLA), poly-glycolic acid (PGA), and others⁷. Some properties of these biomaterials play an important role in the development of bone and soft tissue engineering, as physico-chemical properties, biological characteristics, biocompatibility, degradation, absorption, pore size, and incorporation and release of proteins⁸⁻¹¹.

Therefore, the aim of this study was to analyze the human fibroblasts behavior obtained from primary culture of gingival tissue, seeded on commercially available collagen membranes and on PLGA and PLGA+HA membranes. And also to list which of these membranes can be used in future clinical applications for soft tissue engineering, for reconstructions, both around teeth and implants.

2 - MATERIALS AND METHODS

2.1 - Biodegradable membranes

Four types of absorbable membranes were used as cells carrier. Two are commercially available: Genderm[®] (Baumer, Mogi Mirim, SP, Brazil) and OsseoGuard[®] (Biomet 3i, Palm Beach, Florida, USA) and two tests membranes produced of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and other poly (lactic-co-glycolic) acid associated with hydroxyapatite (PLGA+HA).

2.2 - Fabrication of PLGA+HA and PLGA membranes

Biodegradable membranes were obtaining by a solvent casting technique. Poly(lactic-co-glycolic acid) PLGA (Böehringer Ingelheim) in proportions 82/18 (m/m) was dissolved in chloroform (Merck) (10% w/v). After complete dissolution sucrose (Synth) (30% w/v) particles size less than 1000 µm and hydroxyapatite particles (Genius-Baumer) (20% w/v) were added. After solvent casting at room temperature, the sucrose was removed using poly(vinyl alcohol) (PVA). Similar supports without hydroxyapatite were also investigated.

2.3 - Scanning Electron Microscopy (SEM)

The membranes were gold coated in an ion sputter (Shimadzu C-50TM) and the microstructure (shape and surface) was examined using SEM (JSM T330TM JEOL, Tokyo, Japan) with three replicates. Electron micrographs were obtained at 50x, 200x, 1000x and 10000x magnification to measure the pore size, to determine the internal pore morphology and the surface scaffold. The porous size was measured using image analysis software (Digimizer[®] version 3.7.0, MedCal software Broekstraat, Belgium). The X-ray diffraction (XRD) (Bruker-AXS D5000, Madison, WI, USA) spectrum was measured by the powder diffraction method using CuK_α radiation with a wavelength of 1.54056 Å and scanning range 2θ = 1- 40°, step time of 2 sec and 0.02° of step size (Laboratory of X-Ray Diffraction, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

2.4 - Cell Culture

The Ethics Research Committee of Federal University of Santa Catarina – UFSC, under a protocol number of 021/09, approved this study. Healthy gingival tissue was obtained from a patient undergoing distal wedge surgery, at the Center for Teaching and Research in Dental Implants (CEPID) of UFSC. A sample of 20mm² was packed for transport in PSA 4% supplemented with phosphate-buffered saline solution (PBS). Under aseptic conditions, the sample was washed 2 times with PBS and then epithelial tissue was removed with the aid of cable knife 3 and surgical blade n°. 15, in a 60mm diameter Petri dishes, containing 5ml of culture medium. After scarification, the sample was fragmented in 15 pieces (explants) of approximately 1mm². The explants were suspended in 25cm² culture bottles with Dulbecco medium (DMEM; Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with 1% antibiotic and antifungal (PSA) and 10% fetal calf serum (FCS, Gibco, São Paulo, Brazil) and were maintained at 37°C and 5% CO². The culture medium was changed 2 times a week and cell growth was evaluated by inverted phase microscope every day (40x to 200x, Olympus, Japan). When the cells reached 70% confluence, the explants were removed and washed twice with PBS solution. Cells were treated with a trypsin EDTA solution (trypsin 0.25% and 0.1% glucose dissolved in 1 mM EDTA-saline, Sigma-Aldrich Co.). The enzyme was inactivated by adding DMEM / FCS. Subculture was carried out at a ratio of 1:1. Human gingival fibroblasts from the 6th passage were used in all experiments of this study.

2.5 - Cell proliferation assay

To determine cell proliferation, gingival fibroblasts at passage 6 were seeded at a density of 5 x 10⁴ cells per well in a 12-well tissue culture plates. Cells were trypsinized at days 1, 2, 4, 5, 6, 7, and cell counting was performed at the same automated cell counter (Countess™, Invitrogen, Carlstad, USA).

2.6 - Determination of citotoxicity of biodegradable membranes by MTT assay

Experimental times used were 19h, 72h e 8d. Gingival fibroblasts were used to assess the cytotoxicity and cell viability of all the biodegradable membranes by MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) colorimetric assay^{12,13} with minor modifications. Briefly, human

gingival fibroblasts were seeded at a density of $1,5 \times 10^5$ cell per well in 96-well plates filled with 300 μ L of cell culture medium. The plates were incubated for 24h at 37°C and 5% CO₂. The 5mm discs of biodegradable membranes were placed in the wells. The percentages of viable cells were determined after 1, 3 and 7 days of incubation. The medium was removed and 50 μ L of MTT solution (1mg/mL) was added. The plates were reincubated for 4h. After that, the MTT solution was removed, 100 μ L of DMSO was added to dissolve formazan crystals and the plates were gently shaken, whereby crystals were completely dissolved. The absorbances were measured (Infinite M200, TECAN Austria GmbH, Grödig, Austria) at a wavelength of 540nm, and the percentages of viable cells were calculated when compared to untreated controls. Two replicates were done for samples and negative controls.

The pH was determinate in supernatants of all tested samples (with and without cylindrical discs of membranes) with pH indicator strips (*Merck*, Whitehouse Station, NJ, USA).

2.7 - Statistical Analysis

Comparisons among groups were tested with Non-parametric one-way analysis of variance (ANOVA) with differences assessed using the Student Newman-Keuls post hoc test and a confidence interval of 95% was adopted ($p < 0.05$). All analyses were performed using a software program (GraphPad InStat 3, version 3.10, Windows version, Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

3 - RESULTS

3.1 - Scanning Electron Microscopy (SEM)

The visual analysis through SEM observations shows an interwoven pattern of collagen membranes (Genderm[®] OsseoGuard[®]). The images of test membranes (PLGA and PLGA+HA) had different characteristics. A degree of porosity that remained standard during the degradation test (Fig. 1). The ICC was 90%. The membranes of PLGA showed an average area of $4.10\mu\text{m}^2 + 1.14$. After periods of 48 and 72h values were around $6.50\mu\text{m}^2 + 2.04$ and $3.19\mu\text{m}^2 + 0.69$, respectively. The values for membranes PLGA + HA to control sample, 48 and 72 hours were $6.61\mu\text{m}^2 + 1.76$, $6.73 \text{ microm}^2 + 1.58$ and $9.95 \text{ microm}^2 + 2.24$. No difference was

observed in pore sizes between the group of PLGA and PLGA + HA, in any study period ($p > 0.05$). For the PLGA group, there was significant difference ($p < 0.001$) between 72 and 48, and 0 and 48h. For the PLGA + HA group was significant difference ($p < 0.001$) between 0 and 72 and 48 and 72h (Fig. 2)

3.2 - Cell proliferation assay

Cell proliferation expressed as percentage of viable cells in relation with the number of cells plated in each experimental period 1, 2, 4, 6, 7d. Data are reported as mean \pm SD (n=4). Values of 112% \pm 86.47, 20.20% \pm 85, 142% \pm 36.88, 167% \pm 0, 43 and 60% \pm 37.57, respectively. The values from proliferation at 1, 2, 4, 6 and 7d, were 216, 100, 157, 100 and 28% for Genderm[®]; For Osseoguard[®], were 150, 85, 71, 442 and 85%. For PLGA, 50, 57, 185, 28 and 28%, and the membrane of PLGA + HA, the values were 33, 100, 128, 100 and 100%. The variance analysis performed using the ANOVA showed no significant difference between the groups during the experimental period (Fig. 3 and 4).

3.3 - Determination of cytotoxicity of biodegradable membranes by MTT assay

The results from cytotoxicity assay expressed as percentage were 31, 40, 64, and 26% for the membranes Genderm[®], OsseoGuard[®], PLGA and PLGA + HA, respectively. The difference between the cytotoxicity of different membranes groups was not significant ($p > 0.05$). The results, when compared membranes groups from 19h, 72h and 8 days were 0, 18 and 75% in group Genderm[®]. From OsseoGuard[®] were 36, 0 and 85%. For the PLGA membrane were 0, 97 and 94%, while for the membranes of PLGA + HA were 0, 10 and 66%. The differences were significant ($p < 0.05$) between the experimental periods of 72 hours and 8 days, and between 19h and 8 days (Figures 5 and 6).

The PLGA membrane showed pH value 4 in 24 and 72, and 5 at 96 and 120h. Genderm[®] membrane showed pH value 8, 9, 9 and 9 in 24, 72, 96 and 120h, respectively. OsseoGuard[®] membrane showed pH value 9 in all experimental times. The membrane of PLGA + HA showed pH value of 8, 8, 9 and 9 in 24, 72, 96 and 120h, respectively (Fig. 7)

DISCUSSION

The process of cell culture is well documented in the literature and has advantages over other types of study design in order to test products, especially in animals, go beyond the ethical aspects. Replaced by practicality, low cost and ease control of variables, which is often difficult to be realized in other experimental models^{14,15}. It was chosen this study design, in order to evaluate the performance of gingival cells on different types of biodegradable membranes, that can be used as scaffolds for oral soft tissue engineering.

Tissue engineering is based on the triad of cells, scaffolds and growth factors¹⁶. The scaffold chosen should enable tissue formation without altering the normal functions of tissue¹⁷. This paper aims to seed cells present in the gingival tissues into a scaffold and observe the material influence on cells viability and proliferation. It was used gingival fibroblasts originated from primary culture. Fibroblasts seeded were from sixth passage. This choice was made because the high viability and absence of DNA damage at this passage¹⁸. The resources are trying to make possible, in the future, rebuild tissues using specific patient's donor cells, in order to prevent any cross-contamination and increase the success rate.

These fibroblasts have major advantages, as easy handling in an environment of cell culture, great proliferation capacity, and accessibility. This study worked with gingival fibroblasts, eliminating keratinocytes, because the keratinization of oral epithelium is controlled by morphogenetic subepithelial connective tissue stimuli¹⁹. Thus, the existing culture of fibroblasts in the connective tissue of keratinized mucosa was the first choice of seeding.

The structural layout of the scaffold for tissue engineering must have specific characteristics, and the scaffold should provide mechanical strength to enable cell adhesion; must be biocompatible; be reabsorbed by the body without causing any changes, whether structural or functional, in adjacent areas; must have porous to allow cellular migration and settlement, and must allow cell adhesion and proliferation as well as being able to adduce and release growth factors^{17,20,21}. The results obtained by analyzing the SEM images were that the membranes commercially available (OsseoGuard[®] and Genderm[®]) have a microstructure similar to a textile fiber with woven fibers and the absence of porosity. The presence of porous is an essential aspect for in vitro tissue engineering. On the other hand, this structure has

essential adjectives for guide tissue barriers. These structures are responsible for preventing the undesirable migration of cells in regenerative tissue procedures (guided tissue regeneration and guided bone regeneration)^{22,23}.

The pores were measured only in the membranes PLGA and PLGA+HA. The results showed that porosity of both membranes increased at 48h. This was also observed at the 72 hours period of PLGA membranes with HA, but in a mild scale. Since then the PLGA membrane showed a drastic reduction in the size of pores. This finding may be related to a possible pores filling by polymer particles released during the degradation process. The addition of HA did not alter the pore size ($p > 0.05$). But the statistical results for comparisons between experimental times showed statistically significant differences in the membrane group in PLGA microspheres and HA.

Cell proliferation was assessed by trypan blue staining assay and counting were performed in automated counter. The data were recorded as percentages relative to control cells. Among the groups tested, the data showed no significant differences, indicating that the polymer membranes enable a cellular proliferation values similar to the two commercially available ones. These findings corroborate with other studies that investigated which polymers cell proliferation, both fibroblasts and osteoblasts-like cells²⁴⁻²⁶. The addition of HA particles to the polymer scaffold at that time did not alter the results compared with the membrane that did not have this structure, which differs from the research of Sui et. al (2007)²⁷. Their results showed that the addition of HA to PLLA polymer increased the osteoblasts growth when compared to those without HA. This difference seems to be related to cell type, since the HA is a component of bone tissue and therefore this cells must have greater affinity to it. Finally, it is noteworthy that, while it was not observed statistically significant results, polymer membrane plus HA showed greater values than their similar without the presence of HA.

Several studies used collagen membranes as this one. The results from fibroblasts proliferation showed better values when seeded on this type of material²⁸⁻³¹. This is the reason that these membranes were chosen for a control group. Results for the proliferation test corroborate with those obtained by other authors³² using skin fibroblasts. There was no difference between collagen, chitosan membranes and cellulose. Other authors²⁴ evaluated biocompatibility of resorbable and non-absorbable membranes in human fibroblasts, periodontal ligament cells and osteoblasts-like cells cultures. Their findings reported that the collagen membranes

showed high biocompatibility, while those of PTFE (poly-tetra-fluoroethylene) and polylactic acid induced cytotoxicity reactions of mild to moderate scale.

Cell proliferation results obtained at 7 days in groups Genderm ®, Osseguard ® and PLGA were lower rates than that obtained from cell proliferation at the first 24 hours. Possibly, this was due to the inhibition of proliferation by cell contact. When approached 7d, a high degree of confluence has been reached which may have caused the lower rates of proliferation in these groups. The group of PLGA+HA, maintained the levels of proliferation in 6 days and 7 days, possibly caused by the same reason. The level of cell proliferation must be associated with results of viability assays of these cells. In this study we performed a test based on the cell mitochondrial activity (MTT). The results show that there were no differences between the groups. On the other hand, the lower values for viability were presented by the PLGA membrane. The results from HA membranes and collagen microspheres membranes were quite similar. This similarity was also observed in the pH supernatants determination. PLGA membrane showed lower values for pH. It seems to explain the results from cell viability assay. The presence of the HA acts as a "buffer solution" because of its properties to maintain the environment, as described elsewhere^{33,34}. It was also observed alkalinization of the culture medium of all tested groups, including the control group. This occurred because of the release and degradation of proteins present in the culture medium.

Evaluating the results from cell viability obtained by comparing the experimental periods showed a great decline in values over time. The difference between 72h and 8d was statistically significant ($p < 0.05$). The same was observed when comparing the results of 19h and 8d ($p < 0.05$). These results are consistent with those presented by Alpar et. al (2000)²⁴, who also studied collagen membranes and polymer membranes.

It can be concluded that the PLGA+HA membrane has more consistent characteristics to be used as a scaffold for tissue engineering. Commercially available collagen membranes showed similar conditions to PLGA+HA membrane, however its physical microstructure makes it impossible to use these membranes as a tissue-engineering scaffold.

REFERENCES

1. Damien JC, Parson JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *Journal of Applied Biomaterials*, 1991; 2:187–208.
2. Harris RJ. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. *J Periodontol*, 2001; 72(7): 932-938.
3. Evian CI, al-Maseeh J, Symeonides E. Soft tissue augmentation for implant dentistry. *Compend Contin Educ Dent*, 2003; 24(3): 195-198.
4. Clavero J, Lundgren S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2003; 5 (3):154-160.
5. Griffin TJ, Cheung WS, Zavras AI, Damoulis PD. Postoperative complications following gingival augmentation procedures. *J Periodontol*, 2006; 77: 2070-2079.
Harris RJ. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. *J Periodontol*, 2001; 72(7): 932-938.
6. Park J-B. Increasing the width of keratinized mucosa around endosseous implant using acellular dermal matrix allograft. *Implant Dent*, 2006; 15(3) :275–281.
7. Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hasimoto J, Suzuki S, Ono K. Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*, 1992; 278: 274-285.
8. Ignatius AA, Claes LX. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL, lactide) and poly(L-lactide-coglycolide). *Biomaterials*, 1996; 17(8): 831-839.
9. Lansman S, Paakko P, Ryhanen J, Kellomaki M, Waris E, Tormala P, Waris T, Ashmmakhi N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcuts of experimental design. *J Craniofacial Surg*, 2006;17(6): 1121-1128.
10. Gómez, G, Korhikoski S, González, MM, Lansman S, Ella V, Salo T, Kellomaki M, Ashammakhi N, Arnaud E. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. *J Craniofacial Surg*, 2006; 17(5): 935-942.
11. Huang Y X, Miao X. Novel poros hydroxyapatite prepared by combing H2O2 foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass. *J. Biomater. Appl.*2007; 21:351-374.
12. Mosmann, T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolog. Methods*, 1983; 65: 55-63.

13. Sieuwerts AM, Klijn, JG, Peters, HA, Foekens, JA. et al. 1995 The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995 Nov; 33(11):813-23.
14. Freshney, RI. *Culture of animal cells. A multimedia guide.(CD-ROM).* New York: Wiley-Liss, 1999.
15. Freshney, RI. *Biology of the cultured cell: a manual of basic technique.* 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1990. p.347.
16. George F, Muschler CN, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86 :1541-1558.
17. Hollister SJ, Lin CY, Saito E, Lin CY, Schek RD, Taboas JM, Williams JM, Partee B, Flanagan CL, Diggs A, Wilke EN, Van Lenthe GH, Müller R, Wirtz T, Das S, Feinberg SE, Krebsbach PH. Engineering craniofacial scaffolds *Orthod Craniofacial Res* 2005; 8, : 162–173.
18. COURA GS. Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA. 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
19. Løe H, Karring T. The three-dimensional morphology of the epithelium-connective tissue interface of the gingiva as related to age and sex. *Scand J Dent Res.* 1971; 79(5):315-26.
20. Messias AD, Aragonés A, Duek EAR. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. *Key Engineering Materials.* 2009; 396-398: 461-464.
21. Eberli D, Freitas Filho L, Atala A, Yoo JJ. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. *Methods* 2009; 47: 109–115.
22. Cortellini P, Pini Prato G, Baldi C. Guide tissue regeneration with different materials. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1990; 10 :137-151.
23. Simain-Sato F, Lahmouzi J, Kalykakis GK, Heinen E, Defresne MP, De Pauw MC, Grisar T, Legros JJ, Legrand R.. Culture of gingival fibroblasts bioabsorbable regenerative materials in vitro. *J Periodontol,* 1999; 70 :1234-1239.
24. Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Invest.* 2000; 4 :219–225.
25. Zhao L, Chenguang H, Yongjuan G, Lian C, Lei C, Yilin C. Preparation and cytocompatibility of PLGA scaffolds with controllable fiber morphology and diameter using electrospinning method. *J Biomed Mater Res. Part B, Appl Biomater.*

2008; 87B : 26–34.

26. Pan H, Jiang H, Chen W. The Biodegradability of electrospun dextran/PLGA scaffold in a fibroblast/macrophage co-culture. *Biomaterials*. 2008 April ; 29 (11): 1583–1592.

27. Sui G, Yang X, Mei F, Hu X, Chen G, Deng X, Ryu S. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*. 2007; 82A : 445–454.

28. Kumar TR, Shanmugasundaramand N, Babu M. Biocompatible collagen scaffolds from a human amniotic membrane: physicochemical and *in vitro* culture characteristics. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*. 2003; 14, (7) : 689–706.

29. Marinucci L, Lilli C, Guerra M, Belcastro S, Becchetti E, Stabellini G, Calvi EM, Locci P. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide: an *in vitro* study. *J Biomed Mater Res*. 2003; 67A: 504–509.

30. Takata T, Wang H-L, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodont Res*. 2001; 36: 322-327.

31. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin. Oral Impl. Res*. 2004; 15 : 443–449.

32. Johnen C, Steffen I, Beichelt D, Brautigam K, Witascheck T, Toman N, Moser V, Ottomann C, Hartmann B, Gerlach JC. Culture of subconfluent human fibroblasts and keratinocytes using biodegradable transfer membranes. *b u rns*. 2008; 34 : 6 5 5 – 6 6 3.

33. Gomes IC, Chevitarese O, Alemida NS, Salles MR, Gomes GC. Diffusion of calcium through dentin. *J Endod*. 1996; 22 :590-595.

34. Staehle HJ, Spien V, Heinecke A, Muller HP. The effect of root canal filling materials containing calcium hydroxide on the alkalinity of root dentin. *Endod Dent Traumatol* 11:163-168, 1995.

FIGURE LEGENDS

Fig 1 – SEM images of the degradation pattern of membranes in culture during the experimental times periods (control, 48 and 72h).

Fig 2 – Effect of degradation of the membranes pores areas of PLGA, PLGA+HA. Values expressed as percentages. Data are reported as mean \pm SD (n = 3). The difference between the two membranes porous was not significant ($p > 0.05$). ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc. Average of experimental (control, 48 and 72h).

Fig. 3 – Cell proliferation expressed as percentage of viable cells in relation with the number of cells plated in each experimental period. Data are reported as mean \pm SD (n=4). The difference between cell proliferations at different membrane groups was not significant ($p > 0.05$). ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test.

Fig. 4 – Cell proliferation expressed as percentage of viable cells of each membrane group in relation with the number of cells plated in each experimental period. Data are reported as mean \pm SD (n=4). The difference between cell proliferations at different membrane groups was not significant ($p > 0.05$). ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test.

Fig. 5 - Cytotoxicity of cells culture with Genderm, OsseoGuard, PLGA, PLGA-HA membranes. Values expressed as percentage. Data are reported as mean \pm SD (n=3). The difference between cytotoxicity at different membrane groups was not significant ($p > 0.05$). ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test. Average of 19h, 72h, and 8 days.

Fig. 6 - Cytotoxicity cells of culture with Genderm, OsseoGuard, PLGA, PLGA-HA membranes. Values expressed as percentage. Data are reported as mean \pm SD (n=3). (*) The difference between cytotoxicity at 8 day and 19h was significant ($p < 0.05$). The difference between cytotoxicity at 8 day and 72h was significant ($p < 0.05$). There was no significant difference between 72h and 19h ($p > 0.05$). ANOVA and Student-Newman-Keuls post hoc test.

Fig. 7 – Changes in pH of culture medium in the presence of membranes and the control group.

FIGURES AND TABLES LIST

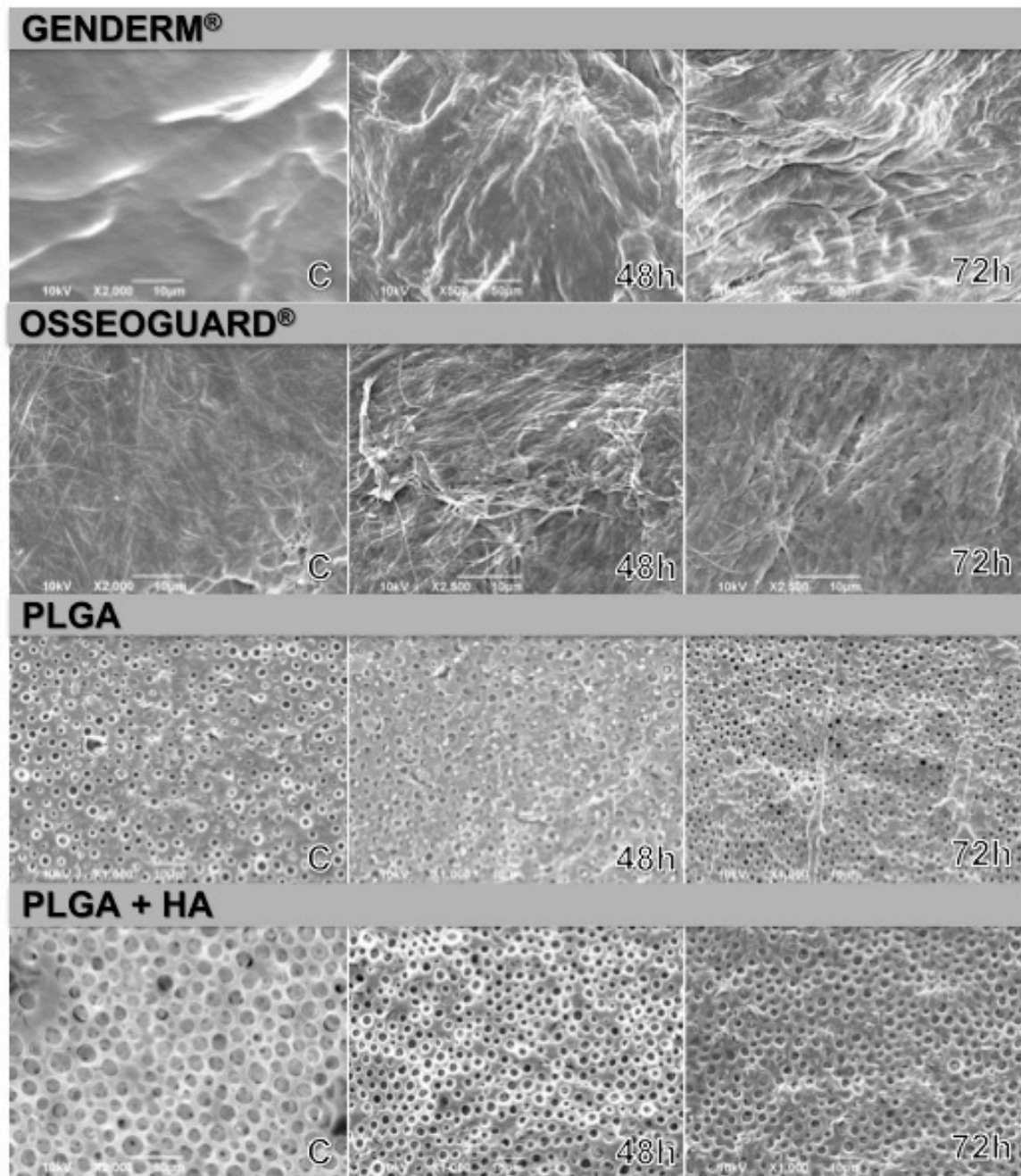


Fig. 1

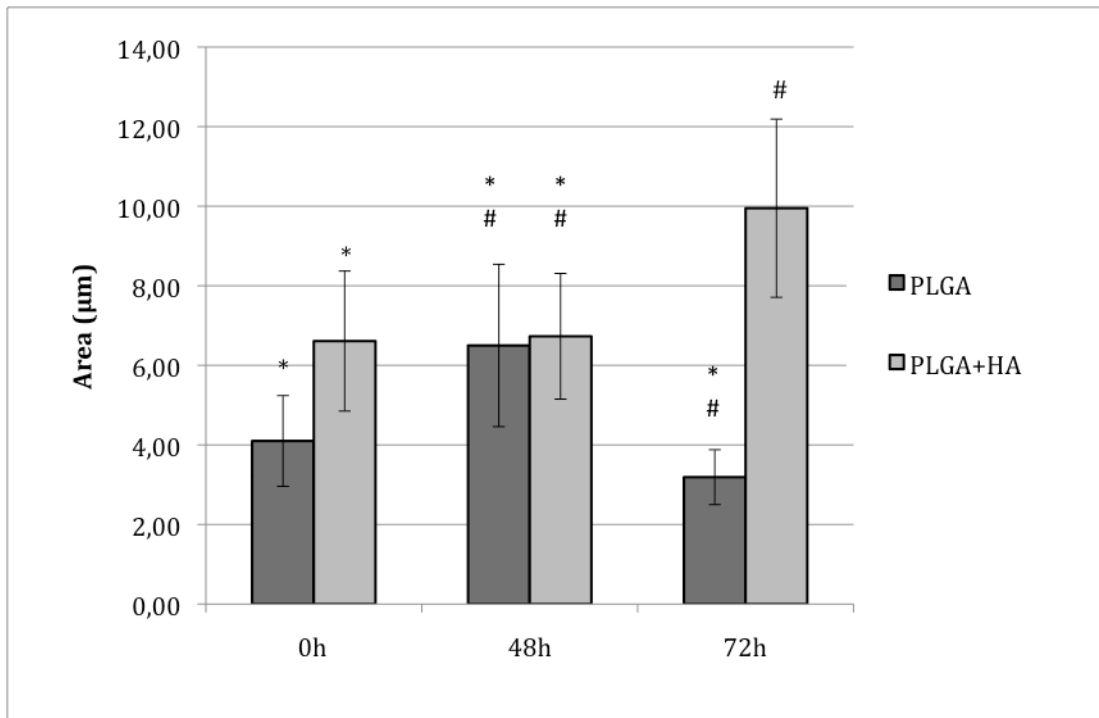


Fig. 2

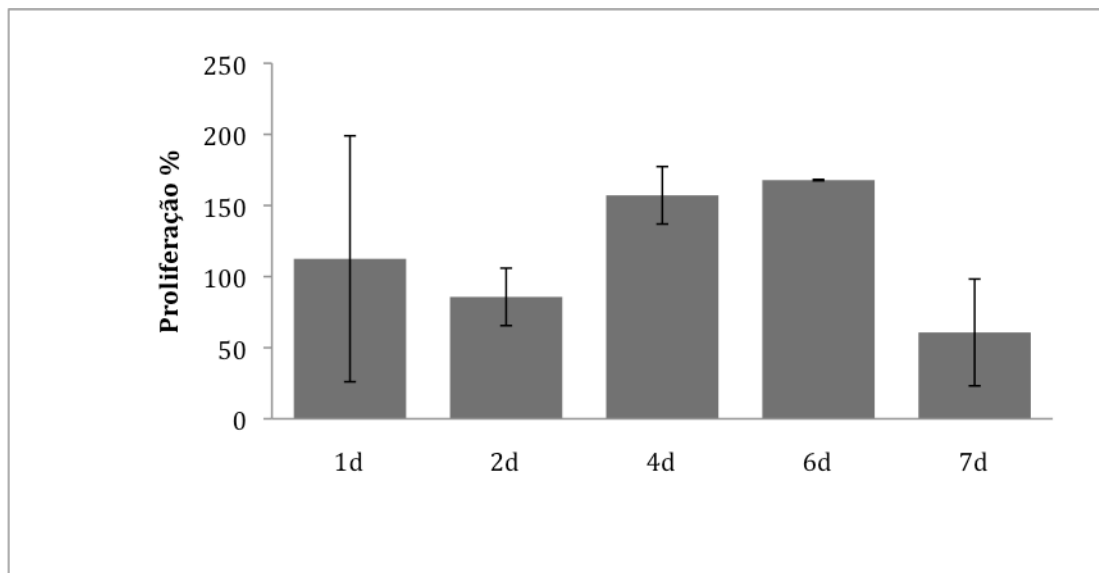


Fig. 3

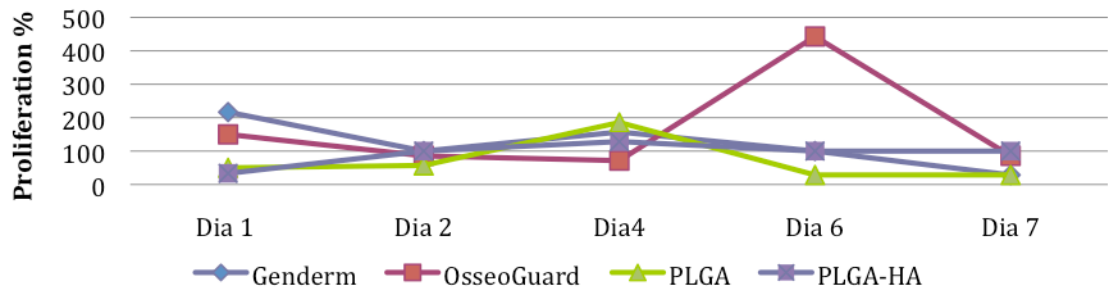


Fig. 4

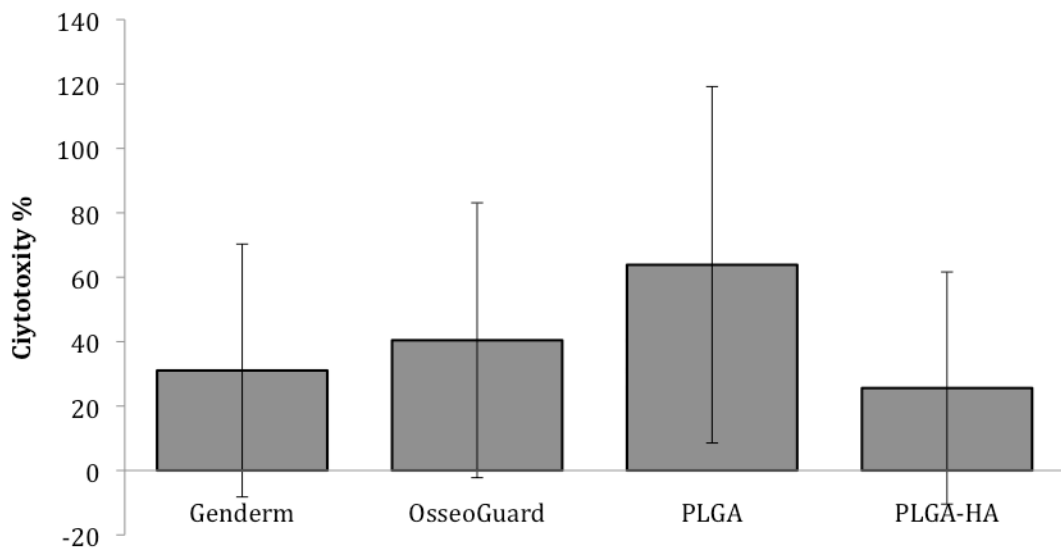


Fig. 5

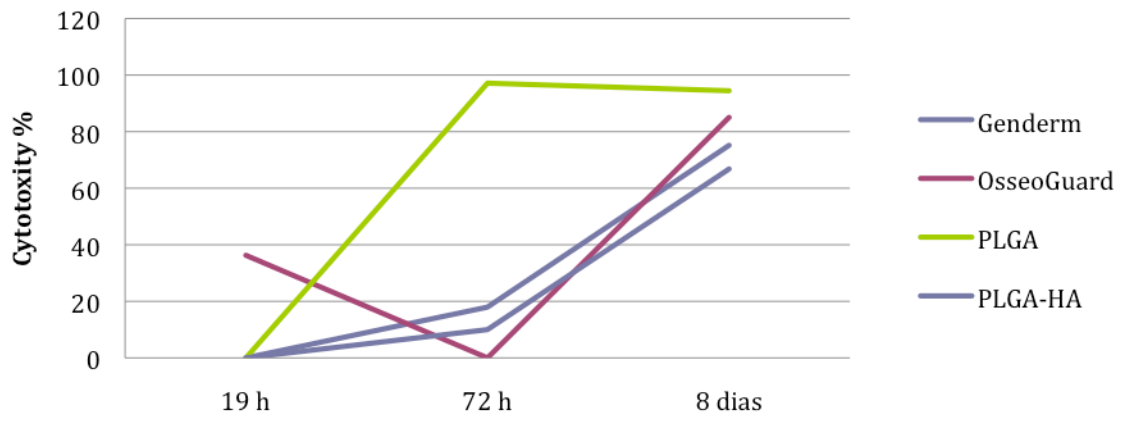


Fig. 6

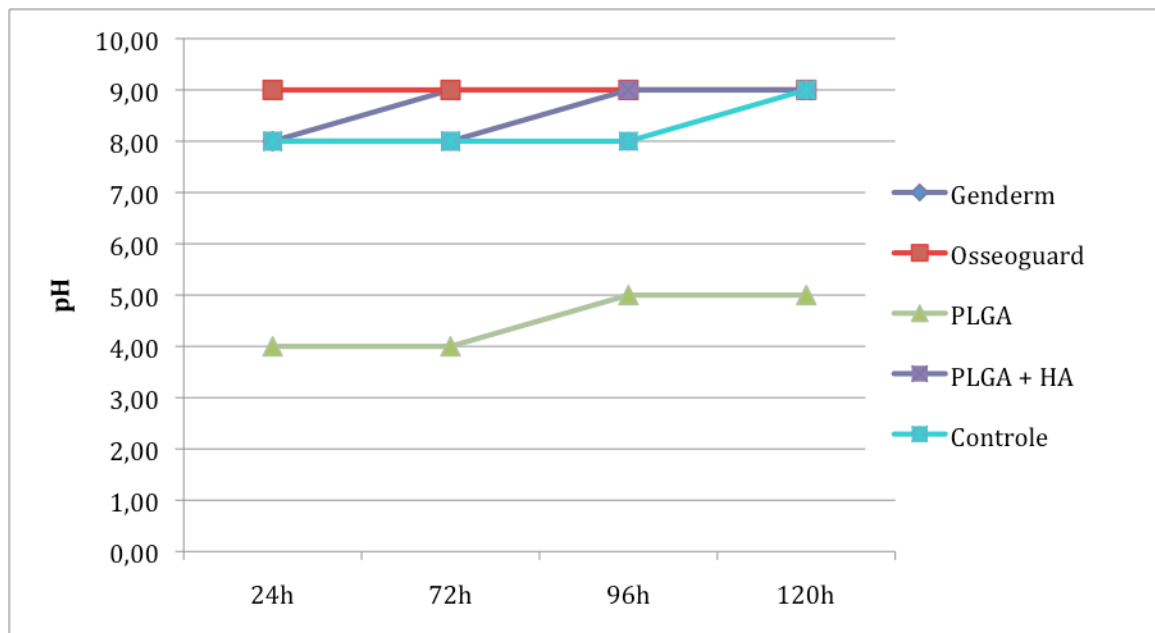


Fig. 7

CAPÍTULO IV

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ASSAEL, L.A. The promise of tissue engineering. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 61:155-156, 2003

EL-ASKARY, A.S.; PIPCO, D.J. Autogenous and allogeneous bone grafting techniques to maximize esthetics: a clinical report. *J Prosthet Dent*, 83 (2): 153-157, 2000.

IMBERMAN, H. Gingival augmentation with an acellular dermal matrix revisited: surgical technique for gingival grafting. *Pract Proced Aesthet Dent*, 19 (2):123-128, 2007.

MCGUIRE, M. K.; SCHEYER, E.T. ; NUNN, M.E. ; LAVIN, P.T. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *Periodontol*. 79:1847-1856, 2008.

MURATA, M.; OKUDA, K.; MOMOSE, M.; KUBO, K.; KUROYANAGI, Y.; WOLFF, L.F.; YOSHIE, H. Root coverage with cultured gingival dermal substitute composed of gingival fibroblasts and matrix: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 28 :461-467, 2008.

PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C.; MUZZI, L.; CAIRO, F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation: a case series. *J Periodontol*. 74 :262-267, 2003.

PRATA, C.A.; LACERDA, S.A.; BRENTAGANI, L.G. Autogenous bone graft associated with enamel matrix proteins in bone repair. *Implant Dent*, 16(4): 413-420, 2007.

CAPÍTULO V

1 – APÊNDICES

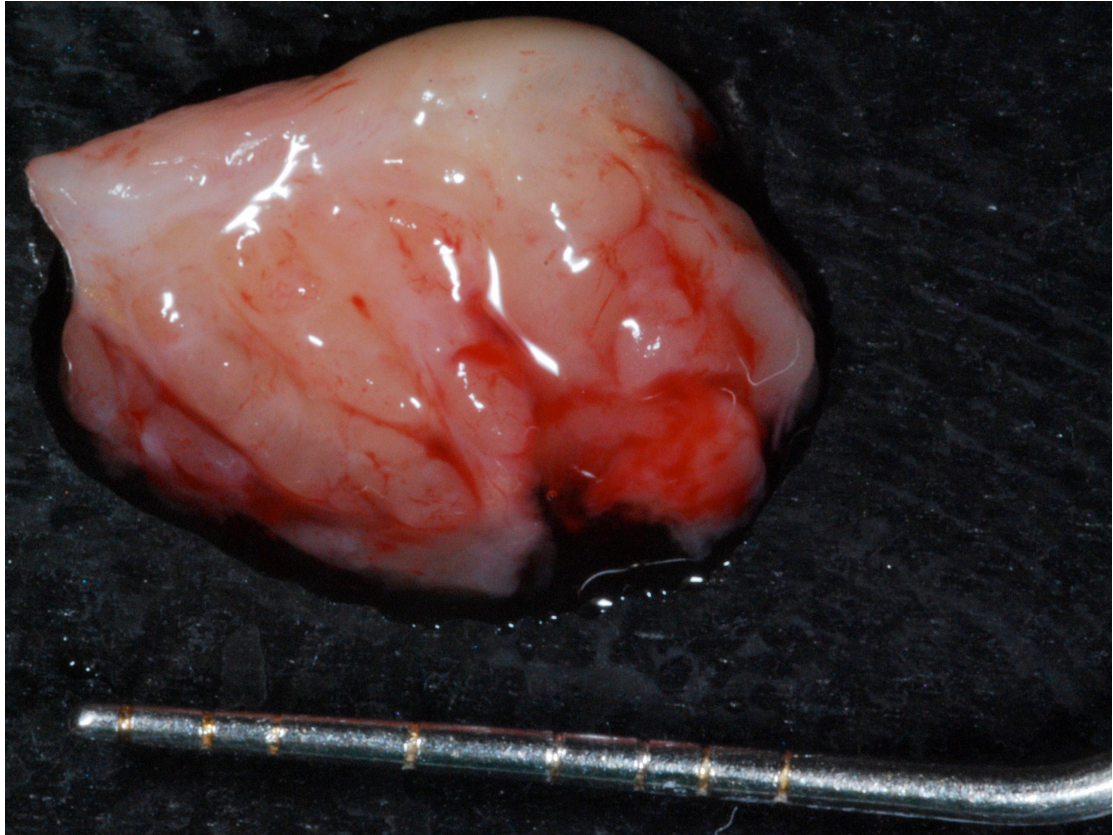


Fig. 1 – Tecidos conjuntivo e epitelial colhidos por meio de cirurgia de cunha distal.

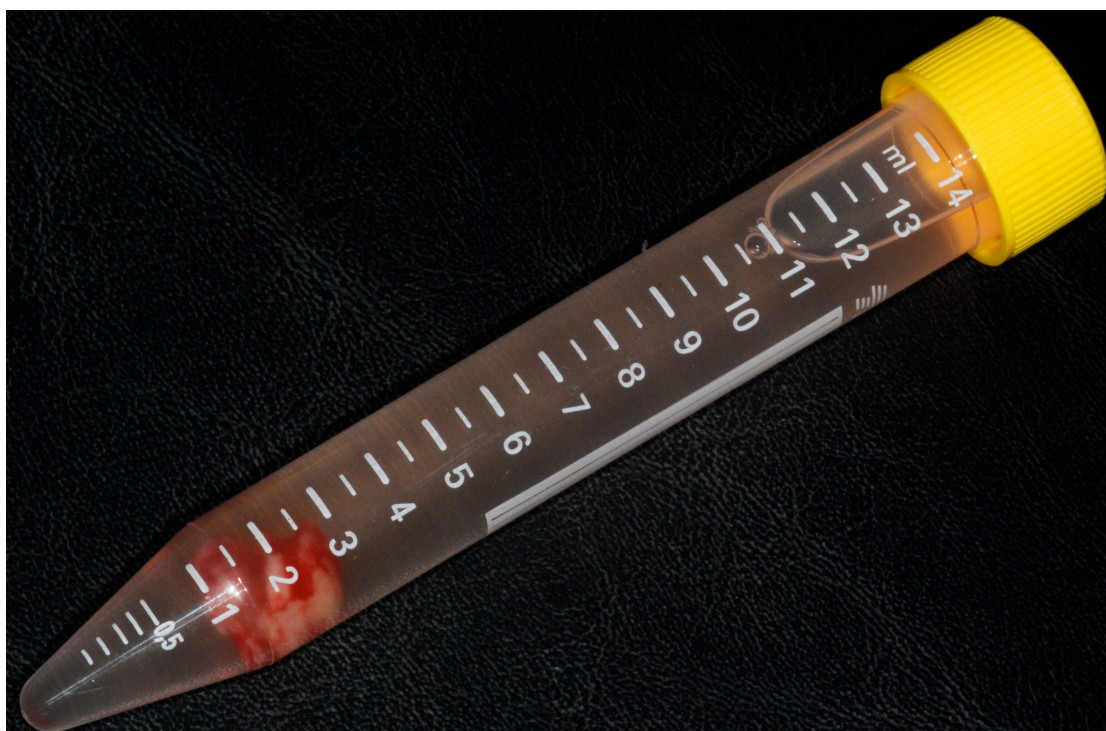


Fig. 2 – Amostra dentro do tubo de 15ml acondicionada para transporte em PSA 4% em solução salina de fosfato tamponada (PBS).

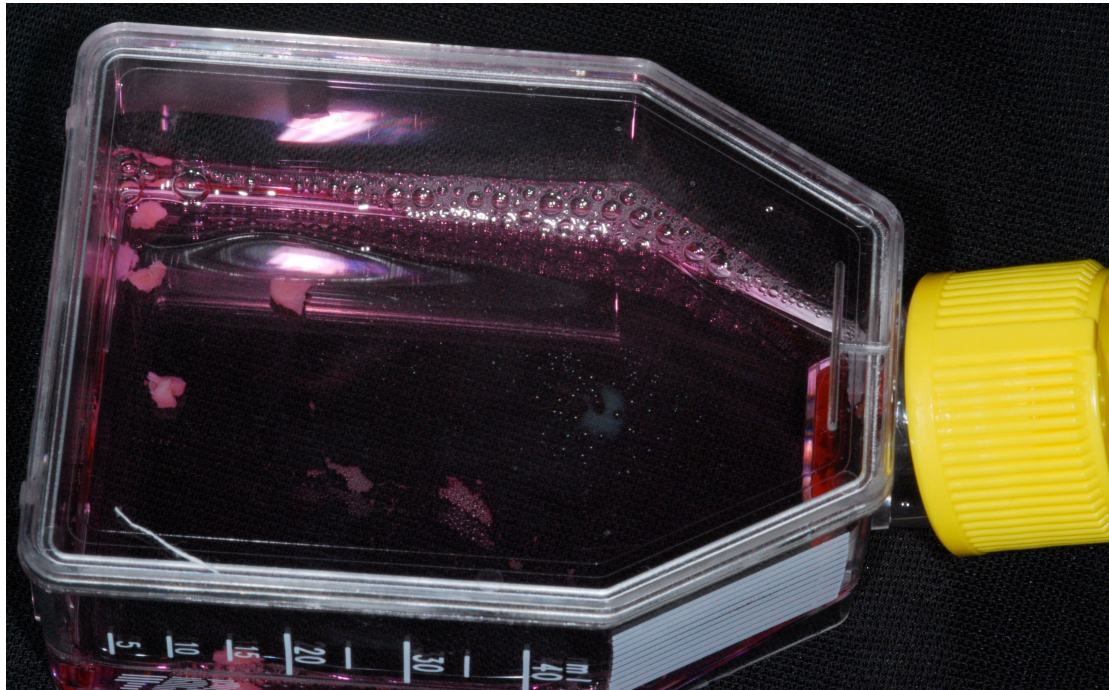


Fig. 3 - Os explantes de aproximadamente 1mm^2 colocados garrafas de cultura de 25cm^2 com meio DMEMsuplementado com 1% de antibiótico e antifúngico (PSA) e 10% soro fetal bovino e foram mantidos a 37°C e 5% de CO_2

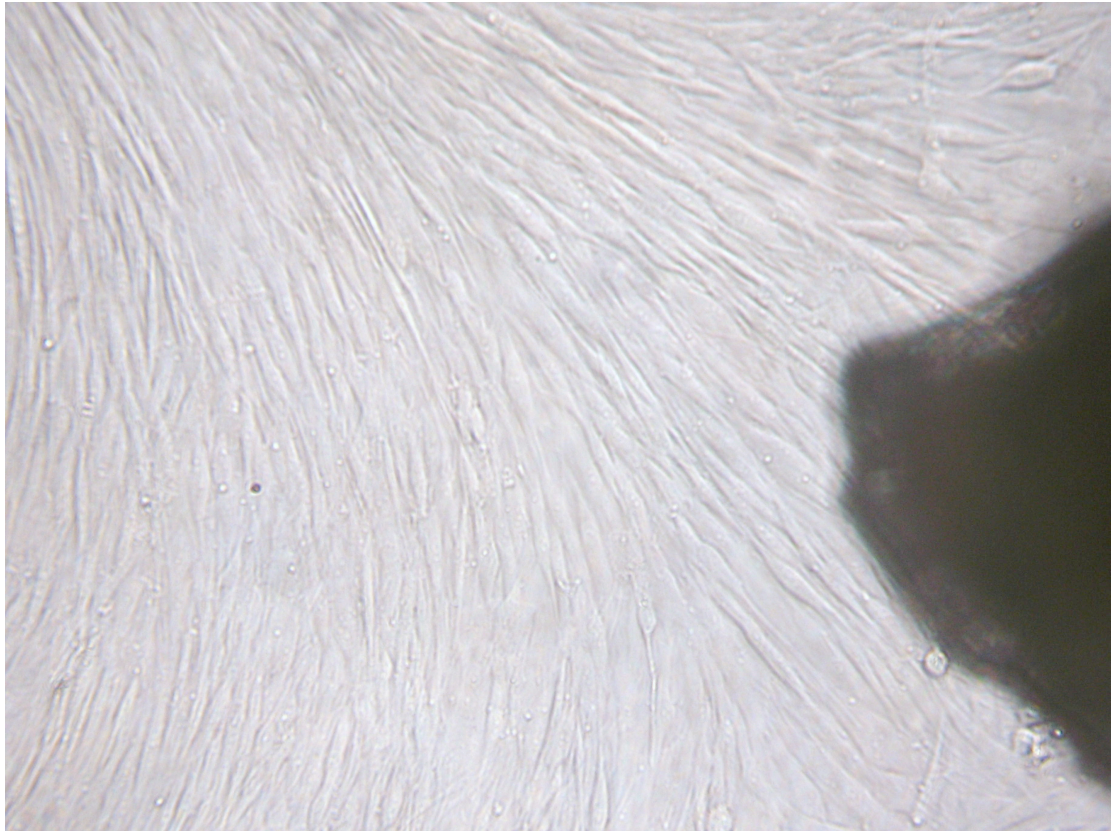


Fig. 4 – Fibroblastos após treze dias da cultura primária.

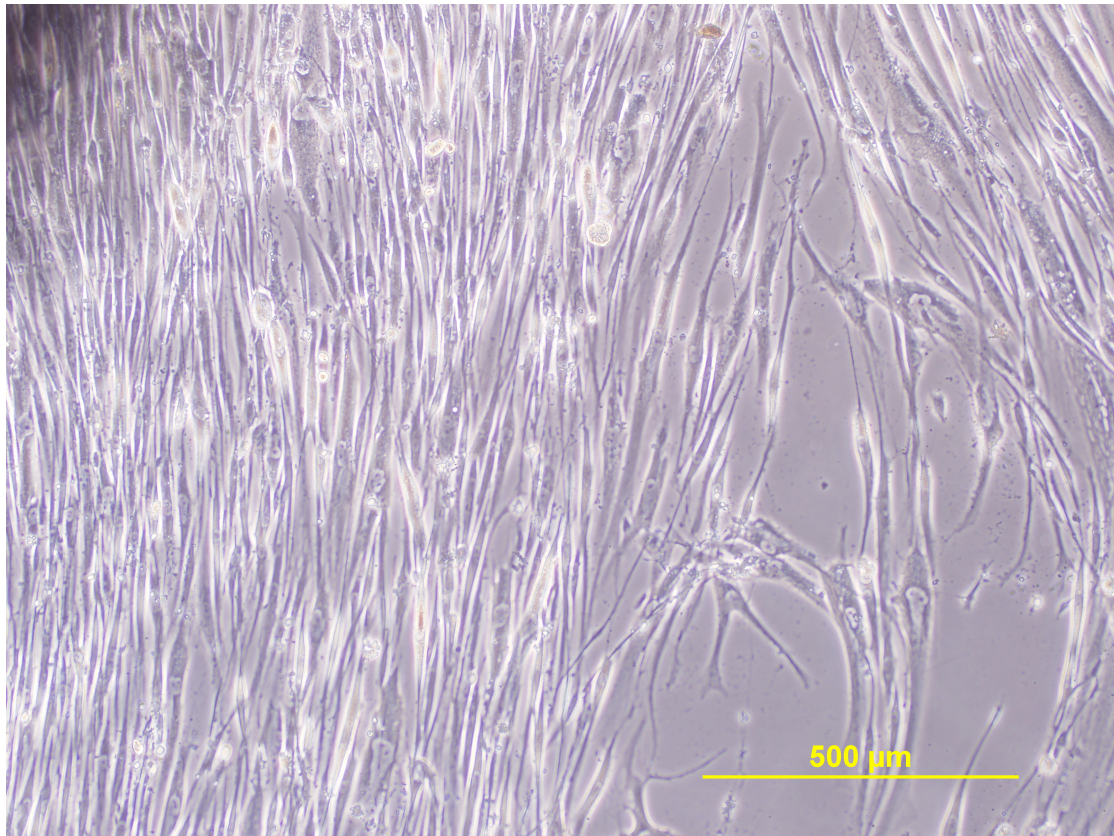


Fig. 5 – Fibroblastos após 20 dias da cultura primária.



Fig. 6 – Placa de 96 cavidades com meios de cultura e membranas no dia 0.

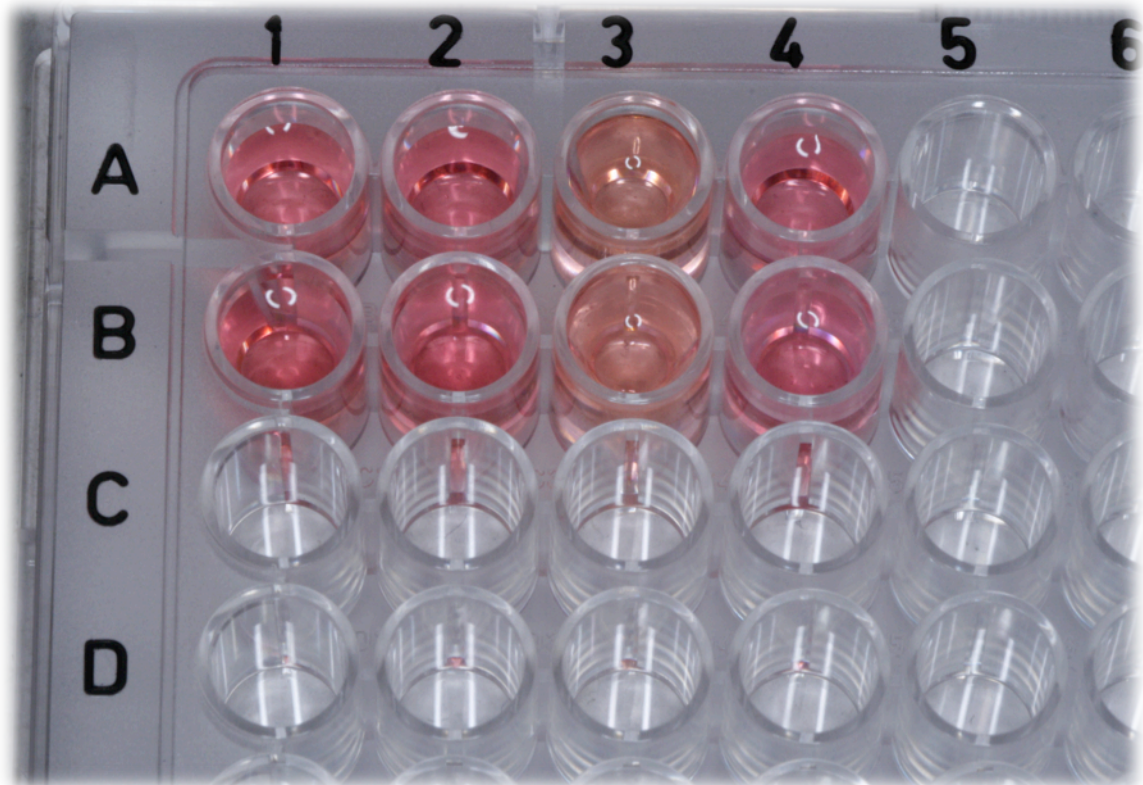


Fig. 7 – Placa de 96 cavidades com meios de cultura e membranas após 48h. Notem alteração de coloração do meio indicando pH ácido.

INSERIR COMITE DE ETICA

2 - PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

Lista de trabalhos publicados e/ou aceitos para a publicação durante o Mestrado

Malta DAMP, Pereira-Neto ARL, Mattevi GS, Ponte-Filho MX, Bosco VL, Rath IB da S. O uso do termo de consentimento livre e esclarecido e o respeito à dignidade humana. *Revista Ciências da Saúde (UFSC)* 27:7-12, 2008.

Siqueira AF, Cunha HA, Pereira-Neto ARL, Resende DRB, Nary-Filho H, Benfatti CAM, Magini RS. O uso da prototipagem para planejamento de implantes zigomáticos em maxila atrófica. *Revista Dental Press de periodontia e implantologia*, 3:62-70, 2009.

Pereira-Neto ARL, Benfatti CAM, Sella GC, Cordero EB, Souza JGO, Magini RS. Previsibilidade na obtenção de estética e função com retalhos pediculados na Implantodontia: revisão de literatura. *Implant News*, aceito para publicação 2010.

Souza JGO, Benfatti CAM, Bianchini MA, Pereira-Neto ARL, Magini RS. Estética e previsibilidade do enxerto conjuntivo subepitelial no recobrimento radicular. *Perionews*, aceito para publicação 2010.

Capítulo de Livro publicado

Pereira-Neto ARL, Souza-Junior JM, Bianchini MA. Importância da mucosa ceratinizada na prevenção e tratamento das doenças peri-implantares. In: Sescad, ABO. (Org). PRO-ODONTO IMPLANTE – Programa de atualização em Implantodontia.. 1 ed. Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2010, v. 4-1, p. 137-168.

Artigos enviados para publicação

Bianchini MA, Fortes CF, Benfatti CAM, Pereira-Neto ARL, Bez LV, Buttendorf AR. Non-surgical peri-implantitis treatment: A ten year clinical and radiographic follow-up. *Quintessence International*, 2010.

Bianchini MA, Cordero EB, Sella GC, Bez LV, Perira-Neto ARL, Souza JGO. Injerto gingival libre como mantenimiento de los tejidos peri implantares: reporte de caso clínico. *Acta Odontológica Venezolana*, 2009.

Resumos Publicados em Anais de Eventos

Lucchiari-Junior NB, Magini RS, Cardoso AC, Bianchini MA, Andrade PCAR, Lopes DK, Perira-Neto, ARL, Ely LMB. O papel da mucosa ceratinizada peri-implantar na manutenção de saúde: estudo retrospectivo. *Brazilian Oral Research*, 23:314-314. 2009

Ely LMB, Boff LL, Oderich E, Bianchini MA, Lucchiari-Junior NB, Perira-Neto ARL, Cordero EB, Sella GC. Avaliação da experiência de dor nas cirurgias de

primeiro e segundo estágio de implantes dentários em 115 pacientes. 2009. *Brazilian Oral Research*, 23:128-128, 2009

Lopes DK, Andrade PCAR, Bianchini MA, Souza JGO, Lucchiari-Junior NB, Pereira-Neto ARL, Cordero EB, Benfatti CAM. Avaliação clínica e radiográfica da condição de saúde peri-implantar em pacientes diabéticos. *Brazilian Oral Research*, 23:178-178, 2009

Pereira-Neto ARL, Bianchini MA, Benfatti CAM, Bez LV, Magini RS, Ferreira CF, Pontual MAB. Bone promotion evaluation by associating bovine bone screws and membrane. In: 87th General Session & Exhibition of the IADR, 2009, Miami. *Journal of Dental Research*, 88 (A):2078, 2009

Bianchini MA, Ferreira CF, Benfatti CAM, Buttendorf AR, Cordero EB, Pereira-Neto ARL, Lucchiari-Junior NB, Souza JGO. Gingival graft prior to and after delivery of implant supported prostheses. In: 87th General Session & Exhibition of the IADR, 2009, Miami. *Journal of Dental Research*, 88(A):2873 2009

Andrade PCAR, Ribeiro CG, Cardoso AC, Leão MP, Sella GC, Benfatti CAM, Pereira-Neto ARL. Influence of laboratory procedures on the UCLA abutments' rotation degree. In: 87th General Session & Exhibition of the IADR, 2009, Miami. *Journal of Dental Research*, 88(A):1224, 2009.

Lucchiari-Junior NB, Magini RS, Cordero EB, Bez LV, Lopes DK, Binchini MA, Pereira-Neto ARL, Benfatti CAM. Análise microscópica de explantes de tecido epitelial e conjuntivo após expansão: estudo in vivo. *Brazilian Oral Research*, 22:178-178, 2008

Lopes DK, Benfatti CAM, Magini RS, Lucchiari-Junior NB, Pinto-Junior DS, Pereira-Neto ARL, Araújo MAR, Binchini MA. Análise dos efeitos tóxicos do tratamento de periimplantite em osteoblastos, sobre diferentes tipos de superfícies de implantes. *Brazilian Oral Research*, 22:234-234, 2008.

Pereira-Neto ARL, Magalhães-Junior EB, Magini RS, Bianchini MA, Cordero EB, Benfatti CAM, Andrade PCAR, Buttendorf AR. Análise da frequência de ressonância de implantes zigomáticos submetidos a função imediata/precoce: estudo clínico comparativo de 6 meses. *Brazilian Oral Research*, 22:235-235, 2008.

Cordero EB, Siqueira AF, Magini RS, Bianchini MA, Cardoso AC, Pereira-Neto ARL, Sella GC, Fernandes MF. Análise pelo método dos elementos finitos de um dispositivo para estabilização de implantes em áreas de pneumatização de seio maxilar. *Brazilian Oral Research*, 22:263-263, 2008.