UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS NOVAES TEIXEIRA

**REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA: ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE *IN*
VITRO DA MEMBRANA DO COMPÓSITO DE POLI(VINILIDENO-
TRIFLUORETILENO)/TITANATO DE BÁRIO**

Ribeirão Preto

2009

LUCAS NOVAES TEIXEIRA

REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA: ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DA MEMBRANA DO COMPÓSITO DE POLI(VINILIDENO-TRIFLUORETILENO)/TITANATO DE BÁRIO

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Teixeira, Lucas Novaes

Regeneração tecidual guiada: estudo da biocompatibilidade *in vitro* da membrana do compósito de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário. Ribeirão Preto, 2009.

131 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus.

1. Cultura de células. 2. Membrana. 3. Periodonto.
4. Regeneração tecidual guiada.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Novaes Teixeira

Regeneração tecidual guiada: estudo da biocompatibilidade *in vitro* da membrana do compósito de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

À Deus, por estar presente em minha vida e tornar tudo possível.

Aos meus pais, José Roberto e Goreti, por todos os esforços e sacrifícios realizados para que eu pudesse estudar e alcançar meus objetivos. A vocês, minha eterna gratidão.

Às minhas irmãs, Lívia e Letícia, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Ao meu sobrinho e afilhado, Felipe, por ter me proporcionado momentos de descontração e alegria que foram essenciais na fase final deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, por ter acreditado e confiado em mim para execução deste trabalho, pela paciência e tranquilidade inesgotáveis nos momentos difíceis e pelo exemplo de dinamismo e competência.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, pelo modo generoso e humilde de tratar seus alunos e pelo seu papel fundamental em minha formação como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por sua atitude empreendedora que resultou na criação do Laboratório de Cultura de Células. Foi neste local que pude crescer como pesquisador e onde todo o trabalho desta dissertação de mestrado foi realizado.

À Larissa Moreira Spínola de Castro, pela sólida amizade construída desde a época de graduação, pelas angústias e alegrias compartilhadas durante a pós-graduação e pela constante ajuda em tudo.

À Roger Rodrigo Fernandes, pela amizade, conselhos e, principalmente, pela certeza de que sempre poderei contar com sua ajuda.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada por seu diretor, Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon, pela acolhida durante o curso de graduação e pós-graduação.

À Dra Grasielle Edilaine Crippa Perez, mais conhecida como Grá, pela amizade, paciência e solicitude. Obrigado Grá por compartilhar comigo seus conhecimentos e pela sua inestimável ajuda neste trabalho. Só nós sabemos como foi difícil fazer a tal da PCR!

À Prof. Dra. Daniela Bazan Palioto e à Annelissa Zorzetto Rodrigues, pela disponibilidade e ajuda com os fibroblastos do ligamento periodontal.

À Fabíola Singaretti de Oliveira, pela amizade, apoio e por me ensinar, entre uma técnica de biologia molecular e outra, que Jesus nos ama e isto é o que importa! Que Deus te abençoe sempre!

À Larissa Sverzut Bellesini, companheira da “salinha” de todas as horas, pelas conversas e pela paciência em ler meus textos e esclarecer minhas dúvidas.

À Luciana Batista Pereira, por me ensinar a encarar as tarefas da pós-graduação com tranquilidade.

À Alice Dias Petri, pelas risadas e principalmente, pelo seu exemplo de persistência.

À Adriana Cláudia Lapria Faria, pela ajuda com os queratinócitos.

Ao Walter Raucci Neto, pela amizade, pelos filmes emprestados e por saber que existem pessoas tão “estressadas” quanto eu.

À Junia Ramos, pelo auxílio prestado nos procedimentos do Laboratório.

Ao Prof. Dr. Rossano Gimenes, pela solicitude em responder meus e-mails e esclarecer minhas dúvidas a respeito da membrana de P(VDF-TrFE)/BT.

À Amanda Cristina Trabuco, Mariana Umekita Shirozaki e Rafael Augusto Ferreira, pela dedicação e colaboração como alunos de iniciação científica.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Células, pelos bons momentos compartilhados e pelo excelente ambiente de trabalho.

Aos professores do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia e do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pelas disciplinas que contribuíram em minha formação acadêmica.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela dedicação e auxílio diário.

Aos amigos e colegas do curso de pós-graduação.

À FAPESP e ao CNPq, pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de mestrado concedida.

À todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho

RESUMO

TEIXEIRA, L. N. **Regeneração tecidual guiada: estudo da biocompatibilidade *in vitro* da membrana do compósito de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário**. 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O princípio da regeneração tecidual guiada (RTG) baseia-se na utilização de membranas biocompatíveis com a finalidade de impedir a migração dos tecidos conjuntivo e epitelial para a ferida, permitindo que células do ligamento periodontal repovoem a superfície radicular e regenerem o aparato de inserção do dente. A RTG tem sido utilizada em diversas situações clínicas para facilitar o reparo de defeitos ósseos e periodontais, sendo as membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) as mais utilizadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de uma nova membrana do compósito de poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT). Para isso, osteoblastos, fibroblastos e queratinócitos, células com as quais a membrana entrará em contato durante o processo de RTG, foram cultivados sobre membranas de P(VDF-TrFE)/BT e PTFE (controle). Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1) adesão celular por contagem em hemocitômetro; 2) proliferação celular por MTT e 3) adesão e morfologia celular por fluorescência, para as linhagens osteoblástica, fibroblástica e de queratinócitos; 1) medida do conteúdo de proteína total; 2) medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP) e 3) formação de matriz mineralizada, para as linhagens osteoblástica e fibroblástica; 1) imunolocalização de ALP por fluorescência; 2) detecção histoquímica *in situ* da atividade de ALP e 3) expressão dos genes Runx2, Colágeno I (COL I), Osteopontina (OPN), ALP, Sialoproteína óssea (BSP), Osteocalcina (OC), Bax, Bcl-2 e Survivina (SUR) por PCR em tempo real, para a linhagem osteoblástica; 1) expressão dos genes Periostin (PRT), *Periodontal Ligament Specific 17* (PDLs17), *Calcium-binding protein* (S100A4), Fibromodulina (FBM), Bax, Bcl-2 e SUR por PCR em tempo real, para a linhagem fibroblástica e 1) expressão dos genes Involucrina (IVL), Queratina 1 (QRT-1), Queratina 10 (QRT-10), Queratina 14 (QRT-14), Bax, Bcl-2 e SUR por PCR em tempo real, para a linhagem de queratinócitos. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste estatístico Mann-Whitney (nível de significância: 5%). A adesão de células osteoblásticas foi semelhante entre P(VDF-TrFE)/BT e PTFE em 30 min, 2 e 4 h ($p>0,05$). A proliferação de células osteoblásticas foi maior em culturas crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 1, 7 e 10 dias ($p<0,05$). A epifluorescência indicou que as células osteoblásticas estavam aderidas e mais espalhadas sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 30 min, 4 e 24 h. A imunofluorescência revelou presença de ALP apenas em culturas crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias. O conteúdo de proteína total foi semelhante entre as duas membranas em 10 dias ($p>0,05$) e maior sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias ($p<0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa para atividade de ALP em 7 dias ($p>0,05$),

entretanto em 10 e 14 dias ($p < 0,05$) a atividade de ALP foi maior em culturas sobre o P(VDF-TrFE)/BT. A detecção histoquímica *in situ* revelou atividade de ALP apenas em culturas crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT, tanto aos 7 quanto aos 14 dias. A formação de matriz mineralizada ocorreu apenas em culturas crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT. A expressão dos genes Runx2, COL I, OPN, ALP, BSP, OC, Bax e SUR foi maior em células cultivadas sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias ($p < 0,05$). Não houve expressão de Bcl-2 em culturas sobre as duas membranas. A adesão de células fibroblásticas foi semelhante entre P(VDF-TrFE)/BT e PTFE em 30 min ($p > 0,05$) e maior sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 2 e 4 h ($p < 0,05$). A proliferação de células fibroblásticas foi estatisticamente semelhante entre as duas membranas em 3 dias ($p > 0,05$) e maior em culturas crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 1 e 7 dias ($p < 0,05$). Os ensaios de fluorescência direta revelaram que as células fibroblásticas estavam aderidas sobre as duas membranas, porém em estágios mais avançados de espraiamento sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 30 min, 2 e 4 h. O conteúdo de proteína total foi maior sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 10, 14 e 21 dias ($p < 0,05$). Não se observou atividade de ALP em culturas fibroblásticas sobre as membranas de P(VDF-TrFE)/BT e PTFE aos 7 dias. Contudo, em 14 dias ($p > 0,05$) a atividade de ALP foi semelhante entre as duas membranas e em 21 dias ($p < 0,05$) foi estatisticamente significativa em culturas crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT. Aos 21 dias não se notou formação de matriz mineralizada em ambas as membranas. A expressão dos genes PRT, PDLs17, S100A4, FBM, Bax e SUR foi maior em culturas sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias ($p < 0,05$). A expressão de Bcl-2 foi maior em células fibroblásticas cultivadas sobre o PTFE em 7 e 14 dias ($p < 0,05$). A adesão de queratinócitos foi semelhante entre P(VDF-TrFE)/BT e PTFE em 30 min, 2 e 4 h ($p > 0,05$). A proliferação de queratinócitos foi estatisticamente semelhante entre as duas membranas em 4, 7, 10 e 14 dias ($p > 0,05$) e maior sobre culturas crescidas sobre P(VDF-TrFE)/BT em 1, 17 e 21 dias ($p < 0,05$). Por fluorescência direta notou-se que células cultivadas sobre ambas as membranas exibiam morfologia predominantemente arredondada em 30 min, 4 e 24 h. A expressão do gene IVL foi semelhante em culturas crescidas sobre as duas membranas em 7 dias ($p > 0,05$) e maior sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 14 dias ($p < 0,05$). Os genes QRT-1, QRT-10 e QRT-14, Bax e SUR estavam mais expressos em culturas sobre o P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias ($p < 0,05$). A expressão de Bcl-2 foi maior em queratinócitos crescidos sobre o PTFE em 7 dias ($p < 0,05$) e semelhante entre as duas membranas em 14 dias ($p > 0,05$). Por favorecer eventos relacionados ao desenvolvimento tecidual, como a adesão, proliferação e diferenciação celular, a membrana de P(VDF-TrFE)/BT pode representar uma boa alternativa ao PTFE para procedimentos de RTG.

Palavras-chave: Cultura de célula, Membrana, Periodonto, Regeneração tecidual guiada

ABSTRACT

ABSTRACT

TEIXEIRA, L. N. **Guided tissue regeneration: *in vitro* biocompatibility of the membrane of poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite.** 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The principle of guided tissue regeneration (GTR) is based on the use of physical barrier to isolate periodontal defects of the gingival connective and epithelial tissues so that bone, periodontal ligament, and cementum can be regenerated from their own cells. RTG procedure has been used in many clinical situations to promote bone and periodontal regeneration. Membranes of expanded polytetrafluoroethylene (e-PTFE) are the most commonly used material for GTR. However, several membranes have been tested to be applied in GTR. The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* biocompatibility of the membrane of poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate (P (VDF-TrFE) / BT) composite. For that, osteoblasts, fibroblasts and keratinocytes, cells that will interact with the membrane during RTG, were culture P(VDF-TrFE)/BT and PTFE (control) membranes for up to 21 days. The following parameters were evaluated: 1) cell adhesion by counting in hemocytometer, 2) cell proliferation and 3) cell morphology by fluorescent labeling, for osteoblastic, fibroblastic and keratinocyte lineages; 1) total protein content; 2) alkaline phosphatase (ALP) activity and 3) mineralized bone-like nodule formation, for osteoblastic and fibroblastic lineages; 1) immunolocalization of ALP by fluorescent labeling; 2) histochemistry detection *in situ* of ALP activity and 3) gene expression of Runx2, Collagen I (COL I), Osteopontin (OPN), ALP, Bone Sialoprotein (BSP), Osteocalcin (OC), Bax, Bcl-2 and Survivin (SUR) by *real-time* PCR, for osteoblastic lineage; 1) gene expression of Periostin (PRT), Periodontal ligament specific (PDLs17), Calcium-binding protein (S100A4), Fibromodulin (FBM), Bax, Bcl-2 and SUR by *real-time* PCR, for fibroblastic lineage; 1) gene expression of Involucrin (IVL), Keratin-1 (QRT-1), Keratin-10 (QRT-10), Keratin-14 (QRT-14), Bax, Bcl-2 and SUR days by *real-time* PCR, for keratinocyte lineage. Data were submitted to Mann-Whitney test (level of significance: 5%). The adhesion of osteoblastic cells was similar between P(VDF-TrFE)/BT and PTFE at 30 min, 2 and 4 h ($p>0.05$). Cell proliferation was higher in osteogenic cultures grown on P(VDF-TrFE)/BT at 1, 7 and 10 days ($p<0.05$). Epifluorescence showed that osteoblastic cells grown on P(VDF-TrFE)/BT were more adhered and spread compared to PTFE at 30 min, 4 and 24 h. Immunofluorescence revealed the presence of ALP only in osteogenic cultures grown on P(VDF-TrFE)/BT at 7 and 14 days. Total protein content was similar between the membranes at 10 days ($p>0.05$) and higher on the P(VDF-TrFE)/BT at 7 and 14 days ($p<0.05$). There was no differences in ALP activity at 7 days ($p>0.05$). However, ALP activity was higher in osteogenic cultures on the P(VDF-TrFE)/BT at 10 and 14 days ($p<0.05$). The histochemistry reveals that only osteogenic

cultures grown on P(VDF-TrFE)/BT had ALP activity *in situ* at 7 and 14 days. Bone-like nodule formation occurred only in cultures on the P(VDF-TrFE)/BT at 21 days. Gene expression of Runx2, COL I, OPN, ALP, BSP, OC, Bax and SUR was higher in cultures grown on P(VDF-TrFE)/BT at 7 and 14 days ($p < 0.05$). There was no expression of Bcl-2 in cultures on both membranes. The adhesion of fibroblastic cells was similar between P(VDF-TrFE)/BT and PTFE at 30 min ($p > 0.05$) and greater in fibroblastic cultures on P(VDF-TrFE)/BT at 2 and 4 h ($p < 0.05$). Cell proliferation was similar in fibroblastic cultures grown on both membranes at 3 days ($p > 0.05$) and higher in cultures on P(VDF-TrFE)/BT at 1 and 7 days ($p < 0.05$). Epifluorescence showed that fibroblastic cells grown on P(VDF-TrFE)/BT were more adhered and more spread compared to PTFE at 30 min, 4 and 24 h. Total protein content was greater on P(VDF-TrFE)/BT at 10, 14 and 21 days ($p < 0.05$). There was no ALP activity in fibroblastic cultures grown on both membranes at 7 days. The ALP activity was similar between P(VDF-TrFE)/BT and PTFE at 14 day ($p > 0.05$) and higher on P(VDF-TrFE)/BT at 21 days ($p < 0.05$). Bone-like nodule formation was not observed in fibroblastic cultures on both membranes at 21 days. Gene expression of PRT, PDLs17, S100A4, FBM, Bax and SUR was higher in cultures on the P(VDF-TrFE)/BT at 7 and 14 days ($p < 0.05$). Bcl-2 expression was higher in fibroblastic cultures on the PTFE at 7 and 14 days ($p < 0.05$). Keratinocyte adhesion was similar for P(VDF-TrFE)/BT and PTFE at 30 min, 2 and 4 h ($p > 0.05$). Keratinocyte proliferation was statistically similar on both membranes at 4, 7, 10 and 14 days ($p > 0.05$) and higher in cultures grown on P(VDF-TrFE)/BT at 1, 17 and 21 days ($p < 0.05$). Keratinocytes displayed a round morphology and was not observed any evidence of cell spreading at 30 min, 4 and 24 h. The gene expression of IVL was similar in cultures grown on P(VDF-TrFE)/BT and PTFE at 7 days ($p > 0.05$) and higher on the P(VDF-TrFE)/BT at 14 days ($p < 0.05$). Genes expression of QRT-1, QRT-10, QRT-14, Bax and SUR was greater in keratinocytes grown on P(VDF-TrFE)/BT at 7 and 14 days ($p < 0.05$). Bcl-2 expression was higher in keratinocytes cultured on PTFE at 7 days ($p < 0.05$) and similar on both membranes at 14 days ($p > 0.05$). Our study indicates that P(VDF-TrFE)/BT membrane promote events related to tissue development/regeneration, such as cell adhesion, proliferation and differentiation. Thus, the membrane of P(VDF-TrFE)/BT could be used as an advantageous alternative to PTFE in GTR procedures.

Key-words: Cell culture, Membrane, Periodontium, Guided tissue regeneration

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A especificidade da reação de amplificação foi analisada por meio da curva de dissociação, comparando os picos obtidos da dissociação do produto amplificado à temperatura de dissociação (T_D) do fragmento gênico esperado. A presença de um único pico indica a especificidade na formação do produto..... 55
- Figura 2.** O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras pela análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de nucleases fluorogênicas SYBR Green 1 aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar). A figura demonstra o resultado obtido para a amplificação de uma amostra, exemplificando as fases de amplificação, a determinação do *threshold*, assim como o valor de Ct da amostra 56
- Figura 3.** Adesão de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como porcentagem de células aderidas em relação ao número inicialmente plaqueado (2×10^4), em 30 min, 2 e 4 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão 62
- Figura 4.** Proliferação de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa em valores de absorbância em 1, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 63
- Figura 5.** Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre PTFE (A, C e E) e P(VDF-TrFE)/BT (B, D e F). Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) indica o citoesqueleto de actina, enquanto que a fluorescência azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. Em 30 min, as células cultivadas sobre ambas as membranas exibiam morfologia predominantemente arredondada. Em 4 e 24 h, as células crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT apresentavam-se em estágios mais avançados de espreadimento quando comparado ao PTFE. Barra = 50 μ m 64

- Figura 6.** Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre o PTFE (A e C) e P(VDF-TrFE)/BT (B e D). Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-ALP, verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. Nota-se a intensa produção de ALP pelas células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias. Barra para A-D = 50 μ m 65
- Figura 7.** Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre PTFE (A) e P(VDF-TrFE)/BT (B). Fluorescência azul indica núcleos celulares marcados por DAPI. Note a formação de aglomerados celulares sobre o PTFE, enquanto que sobre o P(VDF-TrFE)/BT as células se distribuem uniformemente. Barra= 100 μ m 65
- Figura 8.** Medida do conteúdo de proteína total avaliado aos 7, 10 e 14 dias em culturas de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como μ g de proteína/mL. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 66
- Figura 9.** Medida da atividade de ALP avaliada aos 7, 10 e 14 dias em culturas de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como μ mol de timolftaleína/h/mg proteína. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental 67
- Figura 10.** Imagens macroscópicas das culturas de células osteoblásticas crescidas sobre o PTFE (A e C) e P(VDF-TrFE)/BT (B e D) em 7 e 14 dias, coradas com *Fast Red*. Áreas vermelhas indicam atividade *in situ* de ALP. Barra = 1,2 mm 68
- Figura 11.** Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre o PTFE (A e C) e P(VDF-TrFE)/BT (B e D) em 7 e 14 dias. Fluorescência vermelha indica marcação positiva para *Fast Red* enquanto que a azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. As células crescidas sobre PTFE não apresentaram atividade de ALP, enquanto as cultivadas sobre o P(VDF-TrFE)/BT exibiram atividade de ALP progressivamente maior com o tempo. Barra = 100 μ m 68

- Figura 12.** Formação de matriz mineralizada detectada por vermelho de Alizarina aos 21 dias em culturas células osteoblásticas osteogênicas. Nódulos mineralizados foram observados apenas sobre o P(VDF-TrFE)/BT (cabeças de setas). Barra = 100 μ m..... 69
- Figura 13.** Estudo da eficiência dos *primers* para Runx2, COL I, OPN, ALP, BSP, OC, Bax, Bcl-2, SUR e β -Gus. A eficiência da reação de cada *primer* foi avaliada em reações contendo cDNA (RNA) em diferentes concentrações. Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas (STÅHLBERG et al., 2003)..... 71
- Figura 14.** Validação dos *primers* para Runx2, COL I, OPN, ALP, BSP, OC, Bax, Bcl-2 e SUR pelo método $\Delta\Delta C_t$. *Slope* menor que 0,1 indica similaridade entre as eficiências das reações determinadas pelo *primer* do gene alvo e do controle endógeno..... 73
- Figura 15.** Curva de amplificação para os fragmentos de Runx2 (A), COL I (B), OPN (C), ALP (D), BSP (E), OC (F), Bax (G), Bcl-2 (H), SUR (I) e β -Gus (J). O C_t foi determinado pela intersecção entre linha de corte e de amplificação..... 75
- Figura 16.** Curva de dissociação dos produtos de amplificação das amostras Runx2 (A), COL I (B), OPN (C), ALP (D), BSP (E), OC (F), Bax (G), Bcl-2 (H), SUR (I) e β -Gus (J). A obtenção de um único pico para cada produto indica especificidade da reação de amplificação 76
- Figura 17.** Expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Gus e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 78

Figura 18. Expressão de genes marcadores de apoptose em culturas de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Gus e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 79

Figura 19. Adesão de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como porcentagem de células aderidas em relação ao número inicialmente plaqueado (2×10^4), em 30 min, 2 e 4 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental 80

Figura 20. Proliferação de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa em valores de absorbância em 1, 3 e 7 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 80

Figura 21. Epifluorescência de células fibroblásticas crescidas sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) indica o citoesqueleto de actina, enquanto que a fluorescência azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. Ao final de 30 min, 4 e 24 h as células crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT apresentavam-se mais espalhadas quando comparadas às células crescidas sobre o PTFE. Barra = 50 μ m..... 81

Figura 22. Medida do conteúdo de proteína total avaliado aos 7, 14 e 21 dias em culturas de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como μ g de proteína/mL. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental 82

- Figura 23.** Medida da atividade de ALP avaliada aos 7, 14 e 21 dias em culturas de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como μmol de timolftaleína/h/mg proteína. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental 83
- Figura 24.** Formação de matriz mineralizada detectada por vermelho de Alizarina aos 21 dias em culturas de células fibroblásticas. Não se observou nódulos de mineralização em culturas crescidas sobre ambas as membranas. Barra = 100 μm 83
- Figura 25.** Estudo da eficiência dos *primers* para PRT, PDLs17, S100A4, FBM, Bax, Bcl-2, SUR e β -Actina. A eficiência da reação de cada *primer* foi avaliada em reações contendo cDNA (RNA) em diferentes concentrações. Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas (STÅHLBERG et al., 2003) 85
- Figura 26.** Validação dos *primers* para PRT, PDLs17, S100A4, FBM, Bax, Bcl-2 e SUR pelo método $\Delta\Delta\text{Ct}$. *Slope* menor que 0,1 indica similaridade entre as eficiências das reações determinadas pelo *primer* do gene alvo e do controle endógeno 86
- Figura 27.** Curva de amplificação para os fragmentos de PRT (A), PDLs17 (B), S100A4 (C), FBM (D), Bax (E), Bcl-2 (F), SUR (G) e β -Actina (H). O Ct foi determinado pela intersecção entre linha de corte e de amplificação 87
- Figura 28.** Curva de dissociação dos produtos de amplificação das amostras PRT (A), PDLs17 (B), S100A4 (C), FBM (D), Bax (E), Bcl-2 (F), SUR (G) e β -Actina (H). A obtenção de um único pico para cada produto indica especificidade da reação de amplificação 88

- Figura 29.** Expressão de genes marcadores do fenótipo fibroblástico em células crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 89
- Figura 30.** Expressão de genes marcadores de apoptose em células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 90
- Figura 31.** Adesão de queratinócitos crescidos sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como porcentagem de células aderidas em relação ao número inicialmente plaqueado (2×10^4), em 30 min, 2 e 4 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão 91
- Figura 32.** Proliferação de queratinócitos cultivados sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como número de células $\times 10^4$ /poço, avaliada aos 1, 4, 7, 10, 14, 17 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental..... 92
- Figura 33.** Epifluorescência de queratinócitos crescidos sobre PTFE (A, C e E) e P(VDF-TrFE)/BT (B, D e F). Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) revela o citoesqueleto de actina, enquanto que a fluorescência azul (marcação de DNA por DAPI) indica o núcleo celular. Ao final de 30 min, 4 e 24 h as células apresentavam morfologia arredondada sobre as duas membranas. Barra = 50 μ m 93

- Figura 34.** Estudo da eficiência dos *primers* para IVL, QRT-1, QRT-10, QRT-14, Bax, Bcl-2, SUR e β -Actina. A eficiência da reação de cada *primer* foi avaliada em reações contendo cDNA (RNA) em diferentes concentrações. Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas (STÅHLBERG et al., 2003) 95
- Figura 35.** Validação dos *primers* para IVL, QRT-1, QRT-10, QRT-14, Bax, Bcl-2 e SUR pelo método $\Delta\Delta C_t$. *Slope* menor que 0,1 indica similaridade entre as eficiências das reações determinadas pelo *primer* do gene alvo e do controle endógeno 96
- Figura 36.** Curva de amplificação para os fragmentos de IVL (A), QRT-1 (B), QRT-10 (C), QRT-14 (D), Bax (E), Bcl-2 (F) SUR (G) e β -actina (H). O C_t foi determinado pela intersecção entre linha de corte e de amplificação 97
- Figura 37.** Curva de dissociação dos produtos de amplificação das amostras IVL (A), QRT-1 (B), QRT-10 (C), QRT-14 (D), Bax (E), Bcl-2 (F), SUR (G) e β -Actina (H). A obtenção de um único pico para cada produto indica especificidade da reação de amplificação 98
- Figura 38.** Expressão de genes marcadores do fenótipo de queratinócitos em células crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental 99
- Figura 39.** Expressão de genes marcadores de apoptose em queratinócitos crescidos sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> , propriedades da reação e do produto de amplificação	59
Tabela 2. RNA total extraído de células osteoblásticas cultivadas sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT.....	69
Tabela 3. RNA total extraído de células fibroblásticas cultivadas sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT.....	84
Tabela 4. RNA total extraído de queratinócitos cultivados sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT	94

ÍNDICE

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxvi
1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO DA LITERATURA	33
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Membranas	46
4.2 Obtenção e cultura de células da linhagem osteoblástica derivadas de fragmentos ósseos de processos alveolares humanos	46
4.3 Avaliação das respostas de células da linhagem osteoblástica.....	47
4.3.1 Adesão celular	47
4.3.2 Proliferação celular.....	48
4.3.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta e imunolocalização de fosfatase alcalina (ALP) por fluorescência indireta	48
4.3.4 Medida do conteúdo de proteína total	49
4.3.5 Medida da atividade de ALP	50
4.3.6 Detecção histoquímica <i>in situ</i> da atividade de ALP	50
4.3.7 Formação de matriz mineralizada.....	51
4.3.8 Expressão quantitativa de genes por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)	51
4.4 Obtenção e cultura de células da linhagem fibroblástica derivadas de fragmentos de ligamento periodontal humano	57
4.5 Avaliação das respostas de células da linhagem fibroblástica	57
4.6 Obtenção e cultura de queratinócitos humanos	58
4.7 Avaliação das respostas dos queratinócitos.....	58
4.8 Análise estatística	60

5 RESULTADOS	61
5.1 Linhagem osteoblástica	62
5.1.1 Adesão celular	62
5.1.2 Proliferação celular	62
5.1.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta e imunolocalização de ALP por fluorescência indireta	63
5.1.4 Medida do conteúdo de proteína total	66
5.1.5 Medida da atividade de ALP	66
5.1.6 Detecção histoquímica <i>in situ</i> da atividade de ALP	67
5.1.7 Formação de matriz mineralizada.....	69
5.1.8 Expressão quantitativa de genes por PCR em tempo real	69
5.2 Linhagem fibroblástica	79
5.2.1 Adesão celular	79
5.2.2 Proliferação celular	80
5.2.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta.....	81
5.2.4 Medida do conteúdo de proteína total	82
5.2.5 Medida da atividade de ALP	82
5.2.6 Formação de matriz mineralizada.....	83
5.2.7. Expressão quantitativa de genes por PCR em tempo real	84
5.3 Linhagem de queratinócitos	91
5.3.1 Adesão celular	91
5.3.2 Proliferação celular	91
5.3.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta.....	92
5.3.4 Expressão quantitativa de genes por PCR em tempo real	93
6 DISCUSSÃO	101
7 CONCLUSÕES.....	110
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXO.....	130

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, pesquisadores de uma nova área, a engenharia de tecidos, vêm desenvolvendo novas tecnologias objetivando acelerar o processo de reparação tecidual, empregando princípios de engenharia (CAPLAN; BRUDER, 1997). Tem sido postulado que um reparo tecidual rápido, controlado e previsível pode ser obtido pela combinação de células e biomateriais (PETITE, 2000; SERVICE, 2000). Uma das primeiras aplicações da engenharia de tecidos foi para o reparo de tecidos periodontais, utilizando-se barreiras físicas. Nesse procedimento, conhecido como regeneração tecidual guiada (RTG), uma membrana é utilizada para isolar defeitos periodontais dos tecidos epiteliais e conjuntivos, permitindo que o tecido ósseo, o ligamento periodontal e o cimento possam regenerar a partir de suas próprias células (NYMAN et al., 1982; GOTTLOW et al., 1984; AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2005,). Tal técnica tem sido empregada na clínica odontológica em diversos casos, incluindo terapias com implantes dentários, aumento de rebordo alveolar e reparo de defeitos ósseos de origem traumática e patológica (PERSSON et al., 1996; BUSER et al., 1990; DAHLIN et al., 1990).

Membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) são as mais comumente empregadas em RTG e alguns pesquisadores têm demonstrado regeneração óssea satisfatória utilizando tal material (PIATTELLI; SCARANO; PAOLANTONIO, 1996; SCHENK et al., 1994). Embora as membranas de e-PTFE apresentem algumas vantagens, resultados insatisfatórios podem ocorrer por micromovimentos da membrana, migração de fibroblastos gengivais através da membrana e infecções (NYMAN, 1991). Além disso, membranas de e-PTFE não podem ser utilizadas na reconstrução de grandes defeitos ósseos por apresentarem propriedades inertes (TAKATA; WANG; MIYAUCHI, 2001; SANDBERG; DAHLIN; LINDE, 1993). Sendo assim, biomateriais alternativos têm sido investigados por muitos

pesquisadores com vistas a serem utilizados em RTG (LIAO et al., 2005; IGNATIUS et al., 2001; COONTS et al., 1998).

Um biomaterial ideal deveria apresentar propriedades eletromecânicas e biocompatibilidade adequadas para favorecer a regeneração dos tecidos periodontais. Enquanto resistência, flexibilidade e facilidade de processamento são características dos polímeros, alta piezoelectricidade é característica típica das cerâmicas (DIAS; DAS-GUPTA, 1994). Portanto, a combinação de polímero e cerâmica pode resultar em um compósito com potencial para ser utilizado em RTG. Com base nesses princípios, Gimenes et al. (2004) desenvolveram um novo compósito do polímero poli(vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT), o qual apresenta propriedades eletromecânicas adequadas ao uso em RTG. Resultados preliminares mostraram que osteoblastos humanos apresentam maiores adesão celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de matriz mineralizada quando cultivados sobre membranas de P(VDF-TrFE)/BT que sobre membranas de e-PTFE (BELOTI et al., 2006). No entanto, uma avaliação detalhada da biocompatibilidade *in vitro* desse compósito ainda não foi realizada e não foi comparada com outras membranas comercialmente disponíveis.

Previamente à aplicação *in vivo*, os biomateriais podem ser avaliados quanto à biocompatibilidade utilizando sistemas *in vitro*, objetivando o estudo dos eventos biológicos que ocorrem na interface tecido/biomaterial (ROSA; BELOTI, 2003; BELOTI et al., 2003; SALONEN; PERSSON, 1990). Para ocorrer a regeneração tecidual é necessário que haja o recrutamento, a adesão e a proliferação de células progenitoras, que as mesmas se diferenciem e produzam matriz extracelular (SCHWARTZ; BOYAN, 1994). Modelos de cultura de células proporcionam a oportunidade de se examinar, em um ambiente controlado, eventos celulares como adesão, proliferação, diferenciação e apoptose, fundamentais para o sucesso da regeneração tecidual (IRIE et al., 1998).

Tem sido gradativamente maior a utilização de modelos de cultura de células, derivadas de tecido ósseo ou tecido gengival, para a avaliação das interações entre células e membranas utilizadas em RTG (WANG; MIYAUCHI; TAKATA, 2002; HILLMANN et al., 2002). No entanto, não há estudos em que a biocompatibilidade de membranas tenha sido avaliada utilizando células de diferentes linhagens, presentes nos tecidos periodontais. Portanto, novos estudos com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de membranas para serem utilizadas em RTG deveriam empregar culturas de osteoblastos, fibroblastos e queratinócitos, células com as quais a membrana entrará em contato durante o processo de RTG.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O periodonto é uma estrutura complexa, que pode ser dividida em duas partes: a primeira constituída pelo cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar, responsável pela ancoragem do dente ao alvéolo, e a segunda, pela gengiva, que recobre a crista do processo alveolar e estabelece continuidade do epitélio da mucosa oral com o colo do dente através do epitélio juncional (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2004). As patologias que afetam a integridade destes tecidos são denominadas doenças periodontais.

A doença periodontal pode ser definida como uma infecção polimicrobiana, onde as interações entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e os produtos do metabolismo bacteriano desencadeiam um processo inflamatório que afeta a composição e a integridade dos tecidos periodontais, levando à destruição da matriz dos tecidos conjuntivos e de suas células, perda da inserção fibrosa e reabsorção do osso alveolar. Todas essas alterações freqüentemente culminam com a perda dos elementos dentais. (LINDHE; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1983; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1986; BENATTI et al., 2007).

Na pele ou mucosa oral, o processo de cicatrização envolve uma série de eventos biológicos perfeitamente controlados. Após a injúria, com o rompimento de capilares e vasos, ocorre a formação do coágulo sanguíneo, que é constituído por componentes celulares do sangue incluídos em uma matriz rica em fibrina (MARTIN, 1997) e tem por funções principais proteger áreas desnudas e atuar como arcabouço para migração celular (CLARK, 1996). Em resposta a microrganismos e partículas de material estranho, células inflamatórias migram para o sítio da lesão e removem bactérias e tecidos necróticos. Em seguida, ocorre a invasão de macrófagos, que iniciam sua atividade fagocitária. Além desta função, os macrófagos exercem importante papel na formação do tecido de granulação, uma vez que sintetizam e secretam citocinas e fatores de crescimento envolvidos na proliferação e migração de fibroblastos e células endoteliais (POLIMENI; XIROPAIDIS; WIKESJÖ, 2006).

Superficialmente, células epiteliais migram rapidamente a partir das margens da ferida, recobrando o coágulo maduro de fibrina e formando uma barreira protetora, estruturalmente semelhante ao epitélio original (ALPISTE-ILLUECA et al., 2006). Finalmente, a maturação da matriz tecidual da ferida é observada junto com a contração do coágulo (FINE, 1981).

A cicatrização do periodonto, contudo, apresenta-se mais complexa devido à características intrínsecas desta estrutura. Diferentes tipos celulares estão envolvidos na cicatrização dos tecidos periodontais, entre eles, queratinócitos, fibroblastos, células do ligamento periodontal e osteoblastos (AUKHIL, 2000). As duas partes da lesão apresentam aspectos distintos: o retalho, constituído por tecido conjuntivo vascularizado é posicionado sobre o osso alveolar e sobre a raiz dental, um tecido avascular. Assim, para que o processo de cicatrização seja satisfatório, a interação e regeneração sincronizada de tecidos moles e mineralizados devem ocorrer. Além disso, todo o processo de cicatrização acontece em um ambiente contaminado, a cavidade oral. Em conjunto, estes fatores dificultam o processo de cicatrização do periodonto (ALPISTE-ILLUECA et al., 2006).

A cicatrização pode acontecer, basicamente, por dois processos: regeneração ou reparo. O termo regeneração significa reprodução ou reconstituição de um tecido lesionado e/ou perdido. Histologicamente, a regeneração periodontal compreende a regeneração do cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar sobre a superfície radicular previamente afetada pela doença periodontal (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2005). Além disso, a regeneração do periodonto inclui a formação de inserção do epitélio juncional ao dente e o restabelecimento funcional das fibras gengivais da lâmina própria e das fibras do ligamento periodontal, após a cicatrização (WIKESJÖ; SELVIG, 1999). O reparo, por outro lado, é uma regeneração incompleta, pois não restabelece a arquitetura e a função dos tecidos perdidos. Neste caso, tecidos danificados são substituídos por tecidos cuja função não é, necessariamente, igual àquela do tecido original

(STOCUM, 2002). Em periodontia, o termo reparo tem sido descrito como adesão colagenosa ou reparo por tecido conjuntivo (ODA; CARVALHO, 2004)

Pesquisas na área da terapia periodontal têm buscado a regeneração dos tecidos perdidos. Contudo, por muito tempo o conceito de regeneração foi confundido com reparação. Os primeiros trabalhos a questionar o verdadeiro conceito de regeneração periodontal e o modo de obtê-la surgiram em meados dos anos 70 (NOVAES; NOVAES JR, 2004). Em 1976, Melcher propôs uma teoria do potencial de reparo dos tecidos periodontais e postulou que o tipo de célula que repovoa a superfície radicular determina a natureza da inserção formada. Segundo este autor, as células provenientes do ligamento periodontal seriam as responsáveis pela regeneração do sistema de suporte do dente. Tal hipótese foi confirmada por Nyman et al. (1980, 1982a, 1982b), Karring et al. (1985), e posteriormente por Warrer et al. (1993).

Após estes estudos, pesquisadores buscaram desenvolver técnicas cirúrgicas que permitissem o repovoamento da superfície radicular por células do ligamento periodontal. Assim, Gottlow et al. (1984), por meio do uso de membranas, impediram o contato dos tecidos conjuntivo e epitelial com a superfície radicular durante o período de cicatrização e observaram que, após 3 meses, raízes recobertas pelas membranas exibiram inserção consideravelmente maior do que aquelas não recobertas. A partir destes resultados, sugeriu-se que a exclusão de células dos tecidos conjuntivo e epitelial da área de cicatrização, por meio do uso de uma barreira física, permite o repovoamento da superfície radicular por células do ligamento periodontal. Essa observação proporcionou a base para aplicação clínica do princípio de tratamento denominado RTG (LINDHE, 2004).

O potencial regenerativo da RTG é reconhecido e evidências histológicas da técnica têm sido relatadas (CORTELLINI; TONETTI, 2004; GRAZIANI et al., 2005). A RTG é indicada no tratamento de defeitos infra-ósseos de 2 ou 3 paredes, lesões de furca classe II,

aumento e/ou preservação do rebordo alveolar, recessão gengival, perfuração do seio maxilar após extração dental, em cirurgias parendodônticas, na estabilização de implantes dentários (WOLFF; MULLALLY, 2000) e em combinação com materiais de enxerto para correção de defeitos com anatomia crítica, onde não existe suporte ósseo suficiente para sustentar a membrana (PAOLANTONIO, 2002). Os resultados clínicos da RTG normalmente são medidos a partir de alterações no nível clínico de inserção, nível ósseo, profundidade de sondagem e com base na posição da gengiva marginal (LINDHE, 2004).

O estabelecimento dos princípios biológicos da RTG tem contribuído sobremaneira em pesquisas visando o desenvolvimento de membranas a serem aplicadas neste tipo de tratamento periodontal (MACEDO et al., 2004). Alguns fatores devem ser considerados em relação às características do material e da estrutura das membranas utilizadas. Estes materiais devem preencher requisitos básicos como biocompatibilidade, oclusividade, integração tecidual, capacidade de manutenção do espaço e fácil manuseio (HARDWICK et al., 1994). A membrana não deve afetar os tecidos circundantes, os tecidos neoformados e a saúde do paciente (OH, et al., 2003). A oclusividade visa impedir a migração de células do retalho para interior do defeito; enquanto a integração tecidual estabiliza a ferida e cria um selamento biológico entre os tecidos. A manutenção do espaço produzido pela membrana é fundamental para a formação do coágulo sangüíneo e posterior regeneração dos tecidos. A função de barreira deve ser mantida por tempo suficiente para permitir a regeneração dos tecidos periodontais, evitando ao máximo a migração epitelial, além de reduzir o risco de infecção secundária (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999)

Membranas utilizadas nos procedimentos de RTG são classificadas em absorvíveis ou não absorvíveis. As membranas absorvíveis podem ser compostas por colágeno (BLUMENTHAL, 1993), polímeros de poligalactina (CATON; GREENSTEIN; ZAPPA, 1994) e dos ácidos polilático (LAURELL et al., 1994, POLSON et al., 1995) e poliglicólicos

(MATTSON; MCLEY; JABRO, 1999) enquanto as não absorvíveis geralmente são constituídas de politetrafluoroetileno expandido (BECKER et al., 1988; CAFFESSE et al., 1990), politetrafluoroetileno denso (MACEDO et al., 1995) ou celulose (NOVAES JR et al., 1995; DOS ANJOS et al., 1998).

As primeiras membranas aplicadas em RTG eram não absorvíveis e compostas por celulose (NYMAN et al., 1982) ou pelo polímero de politetrafluoretileno (PTFE) (BECKER et al., 1988). Entretanto, por apresentarem alta estabilidade em sistemas biológicos e não gerarem respostas imunológicas (HÄMMERLE et al., 2003), as membranas de PTFE são as mais utilizadas (DOWELL et al., 1991). Muitos relatos na literatura têm ratificado a eficácia destes materiais nos procedimentos de RTG (GOTTLOW; NYMAN; KARRING, 1992; LAURELL; GOTTLOW, 1998; WALTERS et al., 2003; SALATA et al., 2003). Contudo, as membranas não absorvíveis apresentam algumas desvantagens como necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, elevada taxa de exposição à cavidade oral devido recessão gengival, desconforto para o paciente, elevado custo e infecções pós-operatórias (ELHARAR et al., 1998; SIMION et al., 1999).

Com o objetivo de eliminar a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para a remoção da membrana, diversos estudos têm sido conduzidos para a produção de membranas absorvíveis (TRIPLETT et al., 2001). Entre as membranas absorvíveis, as compostas de colágeno são reconhecidas por sua biocompatibilidade e influência na atividade celular (OLIVER, 1982; DE LUSTRO, 1986). Estudos em modelos animais e experimentos clínicos em humanos indicam que as membranas de colágeno são capazes de impedir a migração apical de células epiteliais e, assim, promover a regeneração dos tecidos periodontais (WANG et al., 1994; CHEN et al., 1995; WANG; MACNEIL, 1998). Além disso, o colágeno apresenta alguns aspectos positivos que o torna um excelente material para ser aplicado em RTG, como função hemostática (STEINBERG, 1986), quimiotaxia para fibroblastos

gingivais e do ligamento periodontal (POSTLETHWAITE; SEYER; KANG, 1978; YAFFE; EHRLICH; SHOSHAN, 1984) e baixa imunogenicidade (COOPERMAN; MICHAELI, 1984; SCHLEGEL et al., 1997). Estudos têm demonstrado resultados significantes na redução da profundidade de sondagem e melhora nos níveis de inserção clínica e preenchimento ósseo em defeitos periodontais infra-ósseos e lesões de furca grau II tratados com membranas de colágeno (CHUNG et al., 1990; VAN SWOL et al., 1993; AL-ARRAYED et al., 1995; MATTSON; MCLEY; JABRO, 1995; BENQUÉ et al., 1997).

Apesar dos resultados favoráveis, as membranas de colágeno apresentam algumas limitações como baixa resistência mecânica e alta taxa de degradação (HOCKERS, 1999). Assim, trabalhos têm sido realizados com intuito de superar estas deficiências do colágeno, como o desenvolvimento de técnicas que promovam aumento do número de ligações cruzadas entre as fibras de colágenos (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). Rothmel et al. (2005) e Shwartz et al. (2006) demonstraram que o aumento destas ligações não interferem no processo de integração da membrana aos tecidos adjacentes e são eficazes em retardar a degradação enzimática do colágeno. Estudos em humanos indicaram que membranas de colágeno com ligações cruzadas, permaneceram íntegras por mais de 6 meses após sua colocação, indicando sua aplicabilidade em RTG (FRIEDMANN et al., 2001; FRIEDMANN et al., 2002).

Membranas sintéticas absorvíveis derivadas dos poli(α -hidróxi ácidos), uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos da qual fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e seus copolímeros, também são amplamente utilizadas em RTG (TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999; BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2003). As membranas sintéticas diferem das membranas de colágeno por aspectos físicos-químicos e pela forma de

reabsorção. Enquanto os polímeros sintéticos sofrem hidrólise, o colágeno é degradado por atividade enzimática (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996).

Joly et al. (2002) avaliaram, clínica e radiograficamente, o tratamento de defeitos infra-ósseos em caninos e pré-molares com membranas de PLA/PGA em relação à cirurgia convencional. Os autores notaram diferenças clínicas estatisticamente significantes entre os grupos em relação ao nível da margem gengival, profundidade de sondagem e nível do defeito ósseo. Contudo, em relação ao nível clínico de inserção, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados. Radiograficamente também foram observadas alterações na área e na densidade óptica dos defeitos tratados com RTG quando comparados a cirurgia a retalho convencional.

Em um estudo com cães, Bogle et al.(1997) testaram a eficácia da membrana de PLA no tratamento de lesões de bifurcação grau II em comparação à cirurgia convencional. A análise histológica indicou maior formação de cemento radicular e osso nas lesões recobertas com a membrana de PLA. No grupo controle, notou-se formação de epitélio juncional longo. Enquanto o grupo experimental apresentou 71% de regeneração periodontal em relação ao defeito original, o grupo controle exibiu apenas 14%, demonstrando assim que o uso da membrana de PLA favorece a regeneração periodontal.

Resultados similares foram observados por Hürzeler et al. (1997). Neste trabalho, lesões de furca grau II foram tratadas com a membrana de PLGA. As lesões recobertas pelo retalho cirúrgico foram utilizadas como controle. Clinicamente a cicatrização foi semelhante entre os dois grupos. Contudo, a análise histológica revelou formação de nova inserção conjuntiva e regeneração significativa de cemento e osso alveolar apenas em lesões recobertas pela membrana de PLGA. Os autores concluíram que a membrana de PLGA é eficaz no tratamento de lesões de furca grau II.

Embora sejam eficazes em regenerar defeitos periodontais, as membranas absorvíveis sintéticas apresentam algumas limitações. Durante o processo de hidrólise, as membranas sintéticas perdem a integridade mecânica e se fragmentam. A natureza física e a quantidade destes fragmentos podem interferir na resposta tecidual local. Além disso, alguns copolímeros e seus subprodutos desencadeiam reações inflamatórias que podem prejudicar o processo de regeneração (HARDWICK et al., 1996; TATAKIS; TROMBELLI, 1999; SCHMITZ et al., 2000, TRIPLETT et al., 2001). Polimeni et al. (2008), utilizando membranas de PLA em defeitos em calvária de ratos, observaram que os produtos de degradação da membrana de PLA produziram reações inflamatórias que interferiram negativamente no processo de regeneração óssea.

Neste contexto, materiais compósitos têm sido introduzidos no estudo de RTG com o objetivo de minimizar os efeitos do meio fisiológico sobre as membranas absorvíveis. Estes materiais são assim denominados por apresentar uma fase predominante denominada matriz, e por uma fase secundária, denominada carga (GIMENES, 2005). Elementos utilizados como carga devem apresentar funções específicas, como por exemplo, contribuir com o processo de regeneração tecidual, como a sílica, que apresenta efeitos benéficos à formação óssea (MAEDA; KASUGA, 2007) e a prata, por sua atividade antibacteriana (TOKUDA; OBATA; KASUGA, 2008).

Outra tendência nesta área é a produção de compósitos polímero-cerâmica, que buscam associar as características mecânicas dos polímeros com a biocompatibilidade das cerâmicas (GIMENES, 2004). Ignatius et al. (2001) demonstraram que a membrana de PLA, quando exposta ao ambiente fisiológico por 28 semanas, sofre degradação e perda de suas propriedades mecânicas. Por outro lado, as propriedades mecânicas do compósito de PLA/tricálcio-fosfato permaneceram constantes por 8 semanas e não foram comprometidas até a 28ª semana. Liao et al.(2007), em estudo com o compósito de

PGLA/colágeno/hidroxiapatita carbonatada, observaram que após imersão em saliva artificial por 4 semanas, o material manteve sua integridade física e apresentou uma taxa de degradação mais lenta em relação à membrana de PGLA. Kikuchi et al. (2004) demonstraram que a membrana do compósito tricálcio-fosfato/ácido poli(lático-glicólico-caprolático) foi eficaz na regeneração de defeitos ósseos em mandíbulas de cães e preservou sua termoplasticidade e resistência mecânica após exposição ao ambiente fisiológico por 12 semanas. Sui et al. (2007) demonstraram que a introdução de nanopartículas de hidroxiapatita (HA) no polímero de poli(l-ácido láctico) (PLLA) melhora consideravelmente suas propriedades mecânicas e aumenta sua área superficial, além de favorecer a adesão e o crescimento de osteoblastos da linhagem MG-63.

As cerâmicas de titanato de bário são reconhecidas por sua biocompatibilidade, visto que não geram respostas inflamatórias (reações de corpo estranho) e são capazes de se ligarem ao tecido ósseo (PARK et al , 1977; PARK et al , 1981). Recentemente, pesquisadores do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista desenvolveram um compósito polímero-cerâmico a partir da associação entre polímero de poli(vinilideno-trifluoretileno) e a cerâmica de titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT) (GIMENES et al., 2004). Estudos iniciais realizados por Beloti et al. (2006) comprovaram a biocompatibilidade da membrana de P(VDF-TrFE)/BT em culturas de células osteoblásticas humanas. Contudo, considerando as estruturas que compõem o periodonto e os eventos necessários à sua cicatrização, mais estudos são necessários para avaliar as interações desta membrana com os tecidos envolvidos na regeneração periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Investigar a biocompatibilidade *in vitro* da membrana do compósito P(VDF-TrFE)/BT e comparar com a membrana de PTFE disponível comercialmente.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as respostas de células da linhagem osteoblástica derivadas de fragmentos ósseos de processos alveolares humanos cultivadas sobre membranas de P(VDF-TrFE)/BT e PTFE.
- Avaliar as respostas de células da linhagem fibroblástica provenientes da digestão enzimática de ligamento periodontal humano cultivadas sobre membranas de P(VDF-TrFE)/BT e PTFE.
- Avaliar as respostas de células SCC9, uma linhagem de queratinócitos provenientes de carcinomas espinocelulares bucais humanos, cultivadas sobre membranas de P(VDF-TrFE)/BT e PTFE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Membranas

Membranas de P(VDF-TrFE)/BT foram preparadas conforme descrito previamente por Gimenes et al. (2004) e membranas de PTFE disponíveis comercialmente foram utilizadas como controle. Todas as membranas foram cortadas na forma de discos com 12 mm de diâmetro e autoclavadas antes de serem utilizadas nos experimentos com culturas de células.

4.2 Obtenção e cultura de células da linhagem osteoblástica derivadas de fragmentos ósseos de processos alveolares humanos

As células foram obtidas de fragmentos de osso do processo alveolar de humanos (explantes), descartados durante procedimentos cirúrgicos em doadores saudáveis, sob aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As células foram isoladas e cultivadas como descrito previamente (BELOTI et al., 2006; BELOTI et al., 2008). Os explantes foram fragmentados e submetidos a seis digestões enzimáticas sequenciais em tubos de centrífuga estéreis contendo solução de collagenase tipo II (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) a 1 mg/mL, por períodos de 30 min a 37°C, sob agitação constante. Os sobrenadantes das duas primeiras digestões foram desprezados e aqueles das quatro últimas digestões, agrupados, transferidos para tubo de centrífuga contendo meio de cultura e centrifugados a 2000 RPM por 5 min. O *pellet* formado por células isoladas e os fragmentos ósseos remanescentes foram cultivados em meio essencial mínimo (MEM), modificação α (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μ g/mL de vancomicina (Acros Organics, Gell, Bélgica), 0,3 μ g/mL de fungizona (Gibco), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma) em frascos de cultura de 75 cm² (Corning Incorporated, Costar,

Corning, NY, EUA). Na subconfluência da cultura primária, foi removido o meio de cultura e adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, foram plaqueadas 2×10^4 células/poço sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT contidas em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated). As subculturas foram mantidas por períodos de até 21 dias e sua progressão foi avaliada em poços sem a presença de membranas em microscópio de fase invertido (Axiovert 25, Zeiss, Jena, Alemanha). O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

4.3 Avaliação das respostas de células da linhagem osteoblástica

4.3.1 Adesão celular

Para a avaliação quantitativa da adesão celular, as células foram cultivadas por 30 min, 2 e 4 h. Após cada período, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco) aquecida a 37°C para remover as células não aderidas. Em seguida, os poços foram preenchidos com 1,5 mL de uma solução de EDTA a 1 mM, colagenase a 1,3 mg/mL e tripsina a 0,25% (Gibco) para remover as células aderidas, etapa que foi monitorada pela observação em microscópio de fase invertido (Zeiss). O número de células foi contado utilizando hemocitômetro (Fischer Scientific). A adesão celular foi expressa como porcentagem do número de células aderidas em relação ao número inicialmente plaqueado (2×10^4).

4.3.2 Proliferação celular

A proliferação celular foi determinada quantitativamente pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma). O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis. (MOSMANN, 1983). Em 1, 7 e 10 dias, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS aquecida a 37°C, preenchidos com 1 mL de meio de cultura contendo MTT à 10% (5 mg/mL) e incubados a 37°C por 4 h. A seguir, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais solubilizados utilizando 1 mL de uma solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 minutos e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. A proliferação celular foi expressa como absorbância.

4.3.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta e imunolocalização de fosfatase alcalina (ALP) por fluorescência indireta

Para o estudo da adesão e morfologia celulares em 30 min, 4 e 24 h e imunolocalização de ALP em 7 e 14 dias, as culturas crescidas sobre a superfície das membranas foram processadas para fluorescência, como descrito detalhadamente por de Oliveira et al. (2003) e de Oliveira e Nanci (2004). Brevemente, as culturas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 min à temperatura ambiente. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB, durante 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB, durante 30 min. Para a visualização do citoesqueleto de actina e dos núcleos celulares foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR,

EUA), 1:200, e *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* (DAPI, Molecular Probes) 300 nM. Para a imunolocalização de ALP as culturas foram incubadas com anticorpo primário anti-ALP (B4-78, DSHB, Iowa, EUA) 1:100, por 1 h, seguido de anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes), por 50 min. Após a montagem de lamínula de vidro sobre as membranas, com meio de montagem *anti-fade* (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), as marcações foram examinadas por epiluminação em microscópio de fluorescência (Leica, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmara fotográfica digital (Leica DC 300F). As imagens adquiridas foram processadas utilizando-se o software *Adobe Photoshop*.

4.3.4 Medida do conteúdo de proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada aos 7, 10 e 14 dias, seguindo o método de Lowry et al. (1951). O meio de cultura dos poços foi removido, os poços lavados três vezes com PBS aquecida a 37°C e preenchidos com 2 mL de água deionizada. As amostras foram submetidas a 5 ciclos de choque térmico, cada um consistindo em 20 min a -20°C e 15 min a 37°C. Ao final dos ciclos, 1 mL do lisado de células de cada poço foi transferido para tubos de ensaio, misturado com 1 mL de solução de Lowry (Sigma) e deixados em repouso à temperatura ambiente por 20 min. Após esse período, foi adicionado a cada tubo 0,5 mL da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteau's (Sigma) e novamente deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, a absorbância de cada tubo foi medida em um espectrofotômetro (CE3021, Cecil, Cambridge, Inglaterra) utilizando-se o comprimento de onda de 680 nm e a concentração de proteína total, em µg/mL, em cada poço foi calculada a partir de uma curva padrão feita com albumina bovina (Sigma).

4.3.5 Medida da atividade de ALP

A atividade de ALP foi medida através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Para isso foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/mL, pH 10,1. No tubo padrão foi acrescentado 50 µL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 min. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo teste, 50 µL do lisado de células dos mesmos poços utilizados para medida da proteína total. Os tubos foram mantidos a 37°C por 10 min. Após esse período foi adicionado em todos os tubos, branco, padrão e testes, 2 mL do reagente de cor (Na_2CO_3 0,09 µmol/mL e NaOH 0,25 µmol/mL) e em seguida a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Cecil) utilizando-se o comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP, µmol de timoftaleína/h/mL, foi calculada a partir da medida do tubo padrão e foi normalizada pelo conteúdo de proteína total

4.3.6 Detecção histoquímica *in situ* da atividade de ALP

Nos períodos de 7 e 14 dias, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com Solução de Hank's (Hank's Balanced Salts (Sigma), 9,8 g/L e NaHCO_3 Hybrimax® (Sigma), 350 mg/L) aquecida a 37°C. Após esse procedimento foi incubado, em cada poço, 1 mL de solução tampão Tris (Sigma) 120 mM, pH 8,4; contendo *Fast red* TR (Sigma) 1,8 mM, naftol-ASMX-fosfato (Sigma) 0,9 mM e dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha) 1:9, por 30 min em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Após esse período, os poços foram lavados com solução PB e processados para epifluorescência para evidenciação dos núcleos celulares com DAPI, como descrito anteriormente.

4.3.7 Formação de matriz mineralizada

Ao final de 21 dias, o meio de cultura foi removido, os poços lavados três vezes com PBS aquecida a 37°C e preenchidos com formalina 10% por 2 h. Em seguida, foram desidratados em série crescente de alcoóis e processados para coloração com vermelho de Alizarina (Sigma), que colore, em vermelho, áreas de mineralização ricas em cálcio.

4.3.8 Expressão quantitativa de genes por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

Aos 7 e 14 dias foi avaliada a expressão quantitativa dos genes Runx2, Colágeno I (COL I), Osteopontina (OPN), Fosfatase alcalina (ALP), Sialoproteína óssea (BSP) e Osteocalcina (OC), que caracterizam o fenótipo osteoblástico. Além destes, foram analisados os genes Bax, Bcl-2 e Survivina (SUR), expressos por células em apoptose (Tabela 1). Para o estudo da expressão gênica a densidade de plaqueamento foi de 8×10^4 células/poço sobre as membranas de P(VDF-TrFE)/BT e PTFE. A análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real como descrita a seguir.

4.3.8.1 Extração de RNA total e transcrição reversa

A extração de RNA total das células foi realizada por meio da adição do reagente Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, após remoção do meio de cultura contido nos poços, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol LS (Invitrogen) no primeiro poço de cada uma das amostras (PTFE e P(VDF-TrFE)/BT) permanecendo à temperatura ambiente, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A fim de se obter uma quantidade de RNA suficiente para realização dos experimentos a suspensão foi transferida para o poço seguinte da placa contendo a mesma amostra e assim sucessivamente, constituindo um *pool* de RNA correspondente a 24 poços

para cada um dos grupos experimentais. As amostras foram transferidas para tubos *eppendorf* (1,5 mL) e armazenados em freezer a -20°C por 48 h. A seguir foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) para cada mL de Trizol LS. Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 seg, e logo após, mantidos em repouso à 4°C por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 12000 g, por 15 min e a fase aquosa superior foi recolhida em tubos *eppendorf* de 1,5 mL e mantidas refrigeradas.

Após a coleta da fase aquosa determinada pela adição do clorofórmio, o RNA foi precipitado com isopropanol (Merck) gelado, na mesma proporção da fase aquosa. As amostras foram estocadas a -20°C por 24 h e posteriormente centrifugadas a 4°C e 12000 g, por 10 min, para obtenção dos precipitados, que foram lavados com etanol a 70% (Merck) e centrifugados a 4°C e 7500 g, por 5 min. Essa etapa de lavagem e centrifugação foi repetida por duas vezes. A seguir, as amostras foram deixadas por 5 min em banho de gelo para evaporação do excesso de etanol. Os precipitados formados foram dissolvidos em 10 µL de água Mili-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC – Sigma) (livre de RNase) e estocados em freezer a -80°C. Aliquotas de 3 µL de cada amostra de RNA total obtido, foram diluídas em 297 µL de água livre de RNase para quantificação do RNA das amostras em espectrofotômetro.

Em seguida, em caso de RNA total suficiente, 3 µg de RNA foram submetidos ao tratamento com DNase (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante. Para isso, foram adicionados à amostra 1 µL de tampão, 1 unidade de DNase livre de RNase, e o volume foi ajustado em 10 µL com água DEPC. A amostra foi submetida a 37°C por 1 h no termociclador. O RNA foi novamente quantificado e 1 µg foi utilizado para a confecção do cDNA e 2 µg para a realização da eletroforese desnaturante e avaliação da integridade da amostra.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA, por reação de transcrição reversa, com a utilização do *Kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA, 1 µL de Oligo dT e 1 µL de dNTP. A suspensão foi mantida no termociclador nas seguintes condições: 65°C por 5 min, 4°C por 2 min. A seguir foi adicionado em cada amostra, 7 µL do Mix constituído por: 4 µL do tampão 5x, 2 µL do DTT (0,1M) e 1 µL de inibidor de RNase. A suspensão referente a cada uma das amostras foi mantida a 42°C por 2 min e adicionou-se 1 µL da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, as suspensões foram submetidas a 42°C por 50 min, 70°C por 15 min e resfriadas a 4°C.

4.3.8.2. Reações de PCR em tempo real

Para a realização do PCR em tempo real foi utilizado o sistema SYBR *Green*, em um aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). *Primers* adequados para tais reações foram desenhados a partir do programa *Primer Express* (Applied Biosystems) e estão apresentados na Tabela 1. Foram utilizados 7 µL do reagente SYBR *Green Master Mix* (Applied Biosystems) que contém o fluoróforo SYBR *Green 1*, a enzima polimerase *AmpliTaq Gold*, dNTPs com dUTP e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão, 2,5 µL da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 2,5 µL de água Mili-Q tratada com DEPC, e 0,5 µL da solução contendo cada *primer* com as concentrações adequadas.

A concentração adequada dos *primers* foi indicada por meio da curva concentração-efeito (concentrações entre 900 e 200 nM), tendo sido utilizada nos experimentos, a menor concentração de *primer* no qual a eficiência de reação se mantém.

A eficiência da reação de cada *primer* foi avaliada em reações contendo cDNA (RNA) em diferentes concentrações (2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 ng/reação) de acordo com o protocolo

descrito no *User Bulletin #2* (Applied Biosystems). Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas (STÅHLBERG et al., 2003). A eficiência de reação determinada por cada *primer* foi calculada utilizando a fórmula:

$$\text{Eficiência} = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

**Slope representa a inclinação da reta gerada no gráfico $C_t \times \log$ da concentração de RNA, em que valores próximos a $-3,32$ indicam uma eficiência de aproximadamente 100%.*

A reação de amplificação compreendeu 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, quarenta ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C, além de um ciclo final de 20 min, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação (Figura 1). As reações de PCR em tempo real foram padronizadas com relação às concentrações ideais de cada par de *primers* e temperatura de *annealing*, de modo a maximizar a eficiência e a especificidade de amplificação.

O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção e, quantifica as amostras (termociclador ABI 7500 associado ao *Software ABI Prism*, Applied Biosystems) por meio da análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de SYBR Green 1 aos produtos de amplificação, durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de C_t (*cycle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado (Figura 2). As

amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro da β -Actina ou do β -Gus, genes de expressão constitutiva utilizados como controle positivo da reação de amplificação. Os níveis de expressão de β -Actina ou β -Gus foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (*no template* - NTC) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos *primers* utilizados.

Exemplo de análise da curva de dissociação para determinação da especificidade da reação de amplificação por PCR em tempo real

Figura 1. A especificidade da reação de amplificação foi analisada por meio da curva de dissociação, comparando os picos obtidos da dissociação do produto amplificado à temperatura de dissociação (T_D) do fragmento gênico esperado. A presença de um único pico indica a especificidade na formação do produto.

Exemplo da análise quantitativa da amplificação ou expressão do RNAm

Figura 2. O sistema utilizado realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica as amostras pela análise do nível de fluorescência gerado pela incorporação de SYBR Green 1 aos produtos de amplificação durante o curso da reação. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold – ou ciclo limiar). A figura demonstra o resultado obtido para a amplificação de uma amostra, exemplificando as fases de amplificação, a determinação do *threshold*, assim como o valor de Ct da amostra.

4.3.8.3. Validação para uso do método $\Delta\Delta Ct$

A validação do método foi realizada conforme descrito em *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR – Applied Biosystems*. O gráfico $\Delta Ct \times \log$ das diferentes concentrações de cDNA foi construído (no gráfico representado por $\log$ conc ng RNA) para cada *primer*. *Slope* menor que 0,1 indica similaridade entre as eficiências das reações determinadas pelo *primer* do gene alvo e do controle endógeno, validando o emprego desse método para o cálculo da expressão relativa. Os cálculos foram realizados utilizando como calibrador a membrana de PTFE ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.4 Obtenção e cultura de células da linhagem fibroblástica derivadas de fragmentos de ligamento periodontal humano

As culturas primárias de fibroblastos do ligamento periodontal foram obtidas pela técnica do explante como descrito por Somerman et al. (1988) com algumas modificações, sob aprovação do Comitê de Ética em pesquisa com espécimes de tecidos humanos. Os fragmentos obtidos foram acondicionados em frascos de cultura de 25 cm² contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) 50 µg/mL de vancomicina (Acros), 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen) e 0,3 µg/mL de fungizona (Gibco). Na subconfluência da cultura primária, foi removido o meio de cultura e adicionada solução de tripsina a 0,05% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, foram plaqueadas 2×10⁴ células/poço sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT contidas em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated). As subculturas foram mantidas por períodos de até 21 dias e sua progressão foi avaliada em poços sem a presença de membranas em microscópio de fase invertido (Zeiss). O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. Durante todo o tempo de cultivo, as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

4.5 Avaliação das respostas de células da linhagem fibroblástica

Foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) adesão celular por contagem em hemocítmetro em 30 min, 2 e 4 h; 2) proliferação celular por MTT em 1, 3 e 7 dias; 3) morfologia e adesão celular por fluorescência direta em 30 min, 4 e 24 h; 4) medida do conteúdo de proteína total em 7, 14 e 21 dias; 5) medida da atividade de ALP em 7, 14 e 21 dias; 6) formação de matriz mineralizada em 21 dias e 7) expressão quantitativa dos genes *Periostin* (PRT), *Periodontal ligament specific 17* (PDLs17), *Calcium-binding protein* (S100A4) e *Fibromodulina* (FBM), característicos de fibroblastos do ligamento periodontal, e

dos genes Bax, Bcl-2 e SUR, expressos por células apoptóticas, por PCR em tempo real em 7 e 14 dias (Tabela 1).

4.6 Obtenção e cultura de queratinócitos humanos

Células SCC9, uma linhagem de queratinócitos provenientes de carcinomas espinocelulares bucais humanos, adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA), foram utilizadas neste estudo. As células foram descongeladas e transferidas para tubos de centrifuga contendo 10 mL de DMEM/Ham's F12 (Gibco) e centrifugadas a 2000 RPM por 3 min. O sobrenadante foi desprezado e as células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² contendo DMEM/Ham's F12 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 50µg/mL de vancomicina (Acros), 50µg/mL de gentamicina e 0,4µg/mL de hidrocortisona (Sigma). Na subconfluência, foi removido o meio de cultura e adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, foram plaqueadas 2×10^4 células/poço sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT contidas em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Incorporated). As subculturas foram mantidas por períodos até 21 dias e sua progressão foi avaliada em poços sem a presença de membranas em microscópio de fase invertido (Zeiss). O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

4.7 Avaliação das respostas dos queratinócitos

Foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) adesão celular por contagem em hemocitômetro em 30 min, 2 e 4 h; 2) proliferação celular por MTT em 1, 4, 7, 10, 14, 17 e 21 dias; 3) morfologia e adesão celular por fluorescência direta em 30 min, 4 e 24 h e 4)

expressão quantitativa dos genes Involucrina (IVL), Queratina 1 (QRT-1), Queratina 10 (QRT-10), e Queratina 14 (QRT-14), típicos de queratinócitos humanos, e dos genes Bax, Bcl-2 e SUR, expressos por células apoptóticas, por PCR em tempo real em 7 e 14 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers*, propriedades da reação e do produto de amplificação.

Gene	Sequência <i>primer sense</i> Sequência <i>primer anti-sense</i>	T _D (°C)	bp
Osteoblastos	Runx2 TATGGCACTTCGTCAGGATCC AATAGCGTGCTGCCATTCTG	83	110
	COL I CCACAAAGAGTCTACATGTCTAGGGTC GTCATCGCACAAACACCTTGC	84	114
	OPN AGACACATATGATGGCCGAGG GGCCTTGTATGCACCATTCAA	79	154
	ALP ACGTGGCTAAGAATGTCATC CTGGTAGGCGATGTCCTTA	86	475
	BSP AATCTGTGCCACTCACTGCCTT CCTCTATTTTGACTCTTCGATGCAA	79	201
	OC CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTC TCACAGTCCGGATTGAGCTCA	85	150
Fibroblastos	PRT TCACTTCACACTCTTTGCTCCAC TCCCATAATAGACTCAGAACTGGAGA	78	151
	PDLs17 TGAGACTAAGGCCCTCACTCCAG AATGGAGGAGACTGTGTGTTGAACT	46	152
	S100A4 TTCCACAAGTACTCGGGCAAA TGTTGCTGTCCAAGTTGCTCAT	80	151
	FBM AAGGAGGCCAGACAGAGGGA GGTCATCTTCATACTGGGCC	82	128
	IVL GGCCACCCAAACATAAATAACC CCATTAAAGAGACATGTAGAGGGACAG	81	159
Queratinócitos	QRT-1 CGAGAATGCCCTCAAGGAT GCTCACAGACACACTCACG	85	220
	QRT-10 GTGAATGTGGAAATGAATGCTG AGTAGCGACCTTCTGTTTCTG	81	55
	QRT-14 GATTCTCACAGCCACAGTGGAC CCTCCTTCAGGCTCTCAATCTG	82	209
	Bax GCAAAGTGGTGCTCAAGGCC CTCCCGCCACAAAGATGGTC	85	186
Apoptose	Bcl-2 CGCCCTGTGGATGACTGAGTAC CACTTGTGGCCCAGATAGGC	83	201
	SUR GTTAATAAAGCCGTAGGCCCTTGT TTGGAACCTCACCCATAGCC	79	151
Padrão	β-Actina ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	75	495
	β-Gus GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA	80	101

T_D: Temperatura de dissociação; **bp**: pares de base do produto de amplificação. Para todas as reações a temperatura de annealing foi de 60°C.

4.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em quintuplicata ($n=5$) utilizando células de dois diferentes doadores, exceto os experimentos de análise da expressão gênica que foram realizados em triplicata ($n=3$). Os resultados foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes (nível de significância: 5%).

5 RESULTADOS

5.1 Linhagem osteoblástica

5.1.1 Adesão celular

A contagem em hemocítômetro revelou não haver diferenças estatisticamente significantes em relação ao número de células aderidas sobre as duas membranas, em 30 min ($p=0,291$), 2 ($p=0,592$) e 4 h ($p=0,162$) (Figura 3).

Figura 3. Adesão de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como porcentagem de células aderidas em relação ao número inicialmente plaqueado (2×10^4), em 30 min, 2 e 4 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5.1.2 Proliferação celular

O ensaio de MTT indicou maior proliferação celular em culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 1 ($p=0,016$), 7 ($p=0,009$) e 10 dias ($p=0,047$) (Figura 4).

Figura 4. Proliferação de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa em valores de absorbância em 1, 7 e 10 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.1.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta e imunolocalização de ALP por fluorescência indireta

Ao final dos períodos de 30 min, 4 e 24 h, as células cultivadas sobre ambas as membranas foram submetidas à fluorescência direta para avaliação da adesão e morfologia celulares. A epifluorescência das culturas marcadas com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde) revelou que as células crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT apresentavam-se mais espalhadas e em maior número quando comparada à PTFE em todos os tempos experimentais (Figura 5).

Figura 5. Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre PTFE (A, C e E) e P(VDF-TrFE)/BT (B, D e F). Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) indica o citoesqueleto de actina, enquanto que a fluorescência azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. Em 30 min, as células cultivadas sobre ambas as membranas exibiam morfologia predominantemente arredondada. Em 4 e 24 h, as células crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT apresentavam-se em estágios mais avançados de espraçamento quando comparado ao PTFE. Barra = 50 μ m.

Em 7 e 14 dias, as células cultivadas sobre as duas membranas foram submetidas ao protocolo de imunofluorescência indireta para localização de ALP. Em ambos os períodos avaliados, a expressão de ALP ocorria em culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT, enquanto que as células cultivadas sobre o PTFE não sintetizaram tal proteína. Notadamente, observou-se um maior número de células sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT nos dois tempos experimentais (Figura 6).

Figura 6. Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre o PTFE (A e C) e P(VDF-TrFE)/BT (B e D). Fluorescência vermelha (anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594) indica marcação com anticorpo anti-ALP, verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) indica o citoesqueleto de actina e azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. Nota-se a intensa produção de ALP pelas células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias. Barra para A-D = 50 μ m.

Por epifluorescência observou-se que as poucas células presentes sobre o PTFE não se distribuíam de maneira uniforme; a maioria apresentava-se concentrada em aglomerados celulares, possivelmente devido a características topográficas desta membrana (Figura 7A). Células cultivadas sobre o P(VDF-TrFE)/BT localizavam-se por toda sua superfície, formando uma camada uniforme (Figura 7B).

Figura 7. Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre PTFE (A) e P(VDF-TrFE)/BT (B). Fluorescência azul indica núcleos celulares marcados por DAPI. Note a formação de aglomerados celulares sobre o PTFE, enquanto que sobre o P(VDF-TrFE)/BT as células se distribuem uniformemente. Barra= 100 μ m.

5.1.4 Medida do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi determinado usando o método de Lowry, nos tempos experimentais de 7, 10 e 14 dias. Os resultados demonstraram que a síntese de proteína total foi maior nas culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 7 ($p=0,028$) e 14 dias ($p=0,016$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas membranas em 10 dias ($p=0,075$) (Figura 8).

Figura 8. Medida do conteúdo de proteína total avaliado aos 7, 10 e 14 dias em culturas de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como µg de proteína/mL. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.1.5 Medida da atividade de ALP

A atividade de ALP foi maior nas células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 10 ($p=0,016$) e 14 dias ($p=0,009$), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre as membranas no período de 7 dias ($p=0,916$) (Figura 9).

Figura 9. Medida da atividade de ALP avaliada aos 7, 10 e 14 dias em culturas de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como μmol de timolftaleína/h/mg proteína. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.1.6 Detecção histoquímica *in situ* da atividade de ALP

Em 7 e 14 dias as células cultivadas sobre as duas membranas foram coradas com *Fast Red*, para detecção *in situ* da atividade de ALP. A análise macroscópica (Figura 10) e por epifluorescência (Figura 11) evidencia a diferença significativa de marcação para *Fast Red* entre as duas membranas. As células cultivadas sobre o P(VDF-TrFE)/BT exibiram maior atividade de ALP em comparação àquelas crescidas sobre o PTFE.

Figura 10. Imagens macroscópicas das culturas de células osteoblásticas crescidas sobre o PTFE (A e C) e P(VDF-TrFE)/BT (B e D) em 7 e 14 dias, coradas com *Fast Red*. Áreas vermelhas indicam atividade *in situ* de ALP. Barra = 1,2 mm

Figura 11. Epifluorescência de células osteoblásticas crescidas sobre o PTFE (A e C) e P(VDF-TrFE)/BT (B e D) em 7 e 14 dias. Fluorescência vermelha indica marcação positiva para *Fast Red* enquanto que a azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. As células crescidas sobre PTFE não apresentaram atividade de ALP, enquanto as cultivadas sobre o P(VDF-TrFE)/BT exibiram atividade de ALP progressivamente maior com o tempo. Barra = 100 μm .

5.1.7 Formação de matriz mineralizada

Aos 21 dias as membranas foram coradas com vermelho de Alizarina para detecção da formação de matriz calcificada. A presença de nódulos mineralizados foi observada apenas no P(VDF-TrFE)/BT (Figura 12).

Figura 12. Formação de matriz mineralizada detectada por vermelho de Alizarina aos 21 dias em culturas de células osteoblásticas. Nódulos mineralizados foram observados apenas sobre o P(VDF-TrFE)/BT (cabeças de setas). Barra = 100 μ m.

5.1.8 Expressão quantitativa de genes por PCR em tempo real

5.1.8.1 RNA

A quantificação de RNA das culturas de células osteoblásticas por espectrofotometria (260 nm) indicou maior quantidade de RNA nas amostras do P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias (Tabela 2). Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados a partir de quantidades iguais de RNA de cada uma das amostras.

Tabela 2. RNA total extraído de células osteoblásticas cultivadas sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT.

Amostra	Período (dias)	RNA Total (ng)
PTFE	7	680
	14	680
P(VDF-TrFE)/BT	7	6240
	14	20280

5.1.8.2 Eficiência

O estudo da eficiência foi realizado para cada *primer*, utilizando 3 ou 4 diluições seriadas da amostra (*template*). Os resultados indicaram que todos os *primers* utilizados no presente estudo apresentaram eficiência entre 93 e 106% (Figura 13).

Figura 13. Estudo da eficiência dos *primers* para Runx2, COL I, OPN, ALP, BSP, OC, Bax, Bcl-2, SUR e β-Gus. A eficiência da reação de cada *primer* foi avaliada em reações contendo cDNA (RNA) em diferentes concentrações. Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas (STÅHLBERG et al., 2003).

5.1.8.3 Validação para uso do método $\Delta\Delta C_t$

O método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK;SCHMITTGEN, 2001) foi validado para o cálculo da expressão relativa de todos os genes avaliados por meio dos *primers* utilizados no presente estudo, uma vez que apresentaram *slope* menor ou igual a 0,1 (Figura 14).

Figura 14. Validação dos *primers* para Runx2, COL I, OPN, ALP, BSP, OC, Bax, Bcl-2 e SUR pelo método $\Delta\Delta C_t$. *Slope* menor que 0,1 indica similaridade entre as eficiências das reações determinadas pelo *primer* do gene alvo e do controle endógeno.

5.1.8.4 Amplificação

A análise das curvas de amplificação dos fragmentos obtidos pela reação de PCR em tempo real indicou que todos os genes investigados, exceto o Bcl-2, foram amplificados, embora em níveis diferentes, possibilitando assim a análise quantitativa da expressão relativa de cada um deles (Figura 15). O gene Bcl-2 não foi amplificado nas amostras PTFE nem mesmo nas amostras P(VDF-TrFE)/BT, em qualquer dos períodos avaliados, 7 ou 14 dias. Entretanto, a curva de amplificação foi observada na amostra de poliestireno, utilizada como controle positivo da cultura (Figura 15H).

Figura 15. Curva de amplificação para os fragmentos de Runx2 (A), COL I (B), OPN (C), ALP (D), BSP (E), OC (F), Bax (G), Bcl-2 (H), SUR (I) e β -Gus (J). O Ct foi determinado pela intersecção entre linha de corte e de amplificação.

5.1.8.5 Dissociação

A curva de dissociação dos fragmentos amplificados indicou especificidade na reação para todos os *primers* avaliados na concentração utilizada, observada por meio da presença de um único pico de dissociação (Figura 16).

Figura 16. Curva de dissociação dos produtos de amplificação das amostras Runx2 (A), COL I (B), OPN (C), ALP (D), BSP (E), OC (F), Bax (G), Bcl-2 (H), SUR (I) e β -Gus (J). A obtenção de um único pico para cada produto indica especificidade da reação de amplificação.

5.1.8.6 PCR em tempo real

A expressão relativa dos genes Runx2, COL I, OPN, ALP, BSP e OC revelou-se maior tanto aos 7 (p=0,049; p=0,033; p=0,033; p=0,036; p=0,043 e p=0,046; respectivamente) quanto aos 14 dias (p=0,049; p=0,036; p=0,036; p=0,036; p=0,049 e p=0,046; respectivamente), em células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT (Figura 17).

Figura 17. Expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Gus e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

A expressão dos genes Bax e SUR foi estatisticamente maior sobre as culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 7 ($p=0,036$ e $p=0,036$; respectivamente) e 14 dias ($p=0,049$ e $p=0,049$; respectivamente). A expressão do gene Bcl-2 não foi observada em células cultivadas sobre as duas membranas, em 7 e 14 dias (Figura 18).

Figura 18. Expressão de genes marcadores de apoptose em culturas de células osteoblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Gus e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.2 Linhagem fibroblástica

5.2.1 Adesão celular

A contagem em hemocítômetro não indicou diferença estatisticamente significativa entre as membranas para o número de células aderidas em 30 min ($p=0,345$). Entretanto, em 2 ($p=0,008$) e 4 h ($p=0,004$), observou-se maior número de células fibroblásticas aderidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT (Figura 19).

Figura 19. Adesão de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como porcentagem de células aderidas em relação ao número inicialmente plaqueado (2×10^4), em 30 min, 2 e 4 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.2.2 Proliferação celular

O ensaio de MTT indicou maior proliferação celular em culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 1 ($p=0,004$) e 7 dias ($p=0,028$), enquanto em 3 dias ($p=0,753$) a proliferação celular foi semelhante entre ambas as membranas (Figura 20).

Figura 20. Proliferação de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa em valores de absorbância em 1, 3 e 7 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.2.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta

Em 30 min, 4 e 24 h as células cultivadas sobre as duas membranas foram submetidas ao protocolo de fluorescência direta para avaliação da adesão e morfologia celulares. Notou-se um maior espreadimento celular, bem como maior número de células fibroblásticas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em todos os tempos experimentais. (Figura 21)

Figura 21. Epifluorescência de células fibroblásticas crescidas sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT. Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) indica o citoesqueleto de actina, enquanto que a fluorescência azul (marcação de DNA por DAPI), o núcleo celular. Ao final de 30 min, 4 e 24 h as células crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT apresentavam-se mais espreadidas quando comparadas às células crescidas sobre o PTFE. Barra = 50 μ m.

5.2.4 Medida do conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi maior nas células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 7 ($p=0,028$), 14 ($p=0,048$) e 21 dias ($p=0,048$) (Figura 22).

Figura 22. Medida do conteúdo de proteína total avaliado aos 7, 14 e 21 dias em culturas de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como µg de proteína/mL. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.2.5 Medida da atividade de ALP

Aos 7 dias não se observou atividade de ALP em culturas fibroblásticas sobre as membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT. Contudo, em 14 dias a atividade de ALP foi semelhante ($p=0,075$) entre as duas membranas e em 21 dias foi estatisticamente maior ($p=0,048$) em culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT (Figura 23).

Figura 23. Medida da atividade de ALP avaliada aos 7, 14 e 21 dias em culturas de células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como μmol de timolftaleína/h/mg proteína. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.2.6 Formação de matriz mineralizada

Aos 21 dias, as culturas de células fibroblásticas foram coradas com vermelho de Alizarina para a localização de depósitos de cálcio em áreas de matriz extracelular mineralizada, mas não foram observadas áreas de mineralização em nenhuma das membranas analisadas (Figura 24).

Figura 24. Formação de matriz mineralizada detectada por vermelho de Alizarina aos 21 dias em culturas de células fibroblásticas. Não se observou nódulos de mineralização em culturas crescidas sobre ambas as membranas. Barra = 100 μm .

5.2.7. Expressão quantitativa de genes por PCR em tempo real

5.2.7.1. RNA

A quantificação de RNA das culturas fibroblásticas por espectrofotometria (260 nm) indicou maior quantidade de RNA nas amostras do P(VDF-TrFE)/BT em 14 dias (Tabela 3). Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados a partir de quantidades iguais de RNA de cada uma das amostras.

Tabela 3. RNA total extraído de células fibroblásticas cultivadas sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT.

Amostra	Período (dias)	RNA Total (ng)
PTFE	7	3600
	14	2280
P(VDF-TrFE)/BT	7	2760
	14	5520

5.2.7.2 Eficiência

O estudo da eficiência foi realizado para cada *primer*, utilizando 3 ou 4 diluições seriadas da amostra (*template*). Os resultados indicaram que todos os *primers* utilizados no presente estudo apresentaram eficiência entre 93 e 107% (Figura 25).

Figura 25. Estudo da eficiência dos *primers* para PRT, PDLs17, S100A4, FMB, Bax, Bcl-2, SUR e β-Actina. A eficiência da reação de cada *primer* foi avaliada em reações contendo cDNA (RNA) em diferentes concentrações. Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas (STÅHLBERG et al., 2003).

5.2.7.3 Validação para uso do método $\Delta\Delta Ct$

O método $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi validado para o cálculo da expressão relativa de todos os genes avaliados por meio dos *primers* utilizados no presente estudo, uma vez que apresentaram *slope* menor ou igual a 0,1 (Figura 26).

Figura 26. Validação dos *primers* para PRT, PDLs17, S100A4, FBM, Bax, Bcl-2 e SUR pelo método $\Delta\Delta Ct$.

Slope menor que 0,1 indica similaridade entre as eficiências das reações determinadas pelo *primer* do gene alvo e do controle endógeno.

5.2.7.4 Amplificação

A análise das curvas de amplificação dos fragmentos obtidos pela reação de PCR em tempo real indicou que todos os genes investigados foram amplificados, possibilitando assim a análise quantitativa da expressão relativa de cada um deles (Figura 27).

Figura 27. Curva de amplificação para os fragmentos de PRT (A), PDLs17 (B), S100A4 (C), FBM (D), Bax (E), Bcl-2 (F), SUR (G) e β -Actina (H). O Ct foi determinado pela intersecção entre linha de corte e de amplificação.

5.2.7.5 Dissociação

A curva de dissociação dos fragmentos amplificados indicou especificidade na reação para todos os *primers* avaliados na concentração utilizada, observada por meio da presença de um único pico de dissociação (Figura 28).

Figura 28. Curva de dissociação dos produtos de amplificação das amostras PRT (A), PDLs17 (B), S100A4 (C), FBM (D), Bax (E), Bcl-2 (F), SUR (G) e β -Actina (H). A obtenção de um único pico para cada produto indica especificidade da reação de amplificação.

5.2.7.6 PCR em tempo real

A expressão relativa dos genes PRT, PDLs17, S100A4 e FBM revelou-se maior em células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT aos 7 ($p=0,049$; $p=0,049$; $p=0,049$; e $p=0,046$; respectivamente) e 14 dias ($p=0,049$ para todos os genes avaliados) (Figura 29).

Figura 29. Expressão de genes marcadores do fenótipo fibroblástico em células crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

A expressão relativa dos genes marcadores de apoptose Bax e SUR foi maior nas células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 7 ($p=0,049$ para ambos os genes) e 14 dias ($p=0,049$ para ambos os genes). A expressão de Bcl-2 foi estatisticamente maior em culturas fibroblásticas crescidas sobre o PTFE tanto em 7 ($p=0,046$) quanto em 14 dias ($p=0,046$) (Figura 30)

Figura 30. Expressão de genes marcadores de apoptose em células fibroblásticas crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.3 Linhagem de queratinócitos

5.3.1 Adesão celular

A contagem em hemocítômetro não indicou diferença estatisticamente significativa entre as membranas para o número de células aderidas em 30 min ($p=0,055$), 2 ($p=0,055$) e 4 h ($p=0,343$) (Figura 31).

Figura 31. Adesão de queratinócitos crescidos sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como porcentagem de células aderidas em relação ao número inicialmente plaqueado (2×10^4), em 30 min, 2 e 4 h. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5.3.2 Proliferação celular

Devido à baixa proliferação dos queratinócitos sobre as duas membranas não foi possível realizar o ensaio de MTT. Assim, a proliferação desta linhagem celular foi avaliada por contagem em hemocítômetro. Os resultados indicaram um maior número de células sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em 1 ($p=0,014$), 17 ($p=0,014$) e 21 dias ($p=0,029$). Nos demais períodos, 4 ($p=0,254$), 7 ($p=0,556$), 10 ($p=0,467$) e 14 dias ($p=0,881$), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as duas amostras estudadas (Figura 32).

Figura 32. Proliferação de queratinócitos cultivados sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, expressa como número de células $\times 10^4$ /poço, avaliada aos 1, 4, 7, 10, 14, 17 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

5.3.3 Adesão e morfologia celulares por fluorescência direta

A epifluorescência das culturas de queratinócitos revelou não haver diferenças na morfologia e no número de células crescidas sobre ambas as membranas em 30 min, 4 e 24 h, sendo que em todos os períodos as células apresentavam-se predominantemente arredondadas (Figura 33).

Figura 33. Epifluorescência de queratinócitos crescidos sobre PTFE (A, C e E) e P(VDF-TrFE)/BT (B, D e F). Fluorescência verde (faloidina conjugada com Alexa Fluor 488) revela o citoesqueleto de actina, enquanto que a fluorescência azul (marcação de DNA por DAPI) indica o núcleo celular. Ao final de 30 min, 4 e 24 h as células apresentavam morfologia arredondada sobre as duas membranas. Barra = 50 μm .

5.3.4 Expressão quantitativa de genes por PCR em tempo real

5.3.4.1 RNA

A quantificação de RNA das culturas de queratinócitos por espectrofotometria (260 nm) indicou maior quantidade de RNA nas amostras do P(VDF-TrFE)/BT em 7 e 14 dias (Tabela 4). Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados a partir de quantidades iguais de RNA de cada uma das amostras.

Tabela 4. RNA total extraído de queratinócitos cultivados sobre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT.

Amostra	Período (dias)	RNA Total (ng)
PTFE	7	1360
	14	2880
P(VDF-TrFE)/BT	7	2160
	14	7600

5.3.4.2 Eficiência

O estudo da eficiência foi realizado para cada *primer*, utilizando 3 ou 4 diluições seriadas da amostra (*template*). Os resultados indicaram que todos os *primers* utilizados no presente projeto apresentam eficiência entre 90 e 105% (Figura 34).

Figura 34. Estudo da eficiência dos *primers* para IVL, QRT-1, QRT-10, QRT-14, Bax, Bcl-2, SUR e β-Actina.

A eficiência da reação de cada *primer* foi avaliada em reações contendo cDNA (RNA) em diferentes concentrações. Os valores de amplificação foram submetidos à análise de regressão linear em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo os coeficientes angulares das retas obtidas, utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação dos *primers* e determinação das diluições a serem utilizadas (STÅHLBERG et al., 2003).

5.3.4.3 Validação para uso do método $\Delta\Delta Ct$

O método $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi validado para cálculo da expressão relativa de todos os genes avaliados por meio dos *primers* utilizados no presente estudo, uma vez que apresentaram *slope* menor ou igual a 0,1 (Figura 35).

Figura 35. Validação dos *primers* para IVL, QRT-1, QRT-10, QRT-14, Bax, Bcl-2 e SUR pelo método $\Delta\Delta Ct$. *Slope* menor que 0,1 indica similaridade entre as eficiências das reações determinadas pelo *primer* do gene alvo e do controle endógeno.

5.3.4.4 Amplificação

A análise das curvas de amplificação dos fragmentos obtidos pela reação de PCR em tempo real indicou que todos os genes investigados foram expressos, embora em níveis diferentes, possibilitando a análise quantitativa da expressão gênica relativa de cada um deles (Figura 36).

Figura 36. Curva de amplificação para os fragmentos de IVL (A), QRT-1 (B), QRT-10 (C), QRT-14 (D), Bax (E), Bcl-2 (F) SUR (G) e β -actina (H). O Ct foi determinado pela intersecção entre linha de corte e de amplificação.

5.3.4.5 Dissociação

A curva de dissociação dos fragmentos amplificados indicou especificidade na reação para todos os *primers* avaliados na concentração utilizada, observada por meio da presença de um único pico de dissociação (Figura 37).

Figura 37. Curva de dissociação dos produtos de amplificação das amostras IVL (A), QRT-1 (B), QRT-10 (C), QRT-14 (D), Bax (E), Bcl-2 (F), SUR (G) e β -Actina (H). A obtenção de um único pico para cada produto indica especificidade da reação de amplificação.

5.3.4.6 PCR em tempo real

A expressão relativa do gene IVL foi maior em culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT apenas aos 14 dias ($p=0,049$), enquanto aos 7 dias a expressão deste gene foi semelhante entre as duas membranas ($p=0,512$). A expressão de QRT-1, QRT-10 e

QRT-14 foi estatisticamente maior em células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT tanto aos 7 ($p=0,046$; $p=0,049$ e $p=0,049$; respectivamente) quanto aos 14 ($p=0,049$; $p=0,033$ e $p=0,046$; respectivamente) dias (Figura 38).

Figura 38. Expressão de genes marcadores do fenótipo de queratinócitos em células crescidas sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

A expressão relativa dos genes marcadores de apoptose Bax e SUR revelou-se maior em células cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT aos 7 ($p=0,049$ e $p=0,046$; respectivamente) e 14 dias ($p=0,046$ e $p=0,049$; respectivamente). O gene Bcl-2 foi mais expresso nas células cultivadas sobre a membrana de PTFE apenas aos 7 dias ($p=0,046$). Aos 14 dias não se observou diferença estatisticamente significativa ($p=0,512$) da expressão de Bcl-2 entre as células cultivadas sobre as membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT (Figura 39).

Figura 39. Expressão de genes marcadores de apoptose em queratinócitos crescidos sobre membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT, avaliada aos 7 e 14 dias. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e calibrados pelo PTFE. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para comparação entre PTFE e P(VDF-TrFE)/BT no mesmo tempo experimental.

6 DISCUSSÃO

Nos procedimentos de RTG utilizam-se membranas como as de sulfato de cálcio, ácido polilático, colágeno e politetrafluoretileno expandido (KAMOI; IINO; ISHIGURO, 2006), com o intuito de impedir a migração de células epiteliais e conjuntivas para o interior do defeito, permitindo assim que células com potencial regenerativo, provenientes do ligamento periodontal, repovoem a região (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2005). Entretanto, para que uma membrana possa ser aplicada em RTG e obtenha sucesso, caracterizado pela regeneração do aparato de inserção do dente, esta deve permitir a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, além de não apresentar efeitos deletérios às células com as quais entrará em contato (WANG; MIYAUCHI; TAKATA, 2002). O objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a biocompatibilidade do compósito de P(VDF-TrFE)/BT e compará-la à do PTFE, utilizando células das linhagens osteoblástica e fibroblástica e queratinócitos.

Para iniciar o processo de regeneração, as células necessitam primeiramente aderir ao substrato, para que em seguida ocorram os eventos de proliferação e diferenciação celular (GRINNELL, 1978). Relatos na literatura demonstram que a adesão celular sobre biomateriais é mediada por proteínas adsorvidas em sua superfície (FORGET et al., 2007; GRAFAHREND et al., 2008). Esta adsorção, por sua vez, está relacionada à química, à topografia, ao molhamento e à energia de superfície do material (BOYAN et al., 1996). Os ensaios de adesão celular indicaram um maior número de células fibroblásticas aderidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT. Embora não seja possível afirmar que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT promova a adsorção de proteínas, Klee et al. (2004) demonstraram que o polímero de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) permite a adsorção de fibronectina, proteína envolvida no processo de adesão celular. A adesão celular inicial sobre a membrana contribui para a formação do coágulo sanguíneo e estabilização do sítio cirúrgico (WIKESJÖ et al.,

1995), reduzindo assim micromovimentos da membrana que poderiam romper as fibras recém-formadas (TAKATA; WANG; MIYAUCHI, 2001). Wikesjö e Selvig (1999) demonstraram que a baixa estabilidade da membrana/sítio cirúrgico é o principal fator envolvido na formação do epitélio juncional longo, que em RTG é considerado falha no processo de regeneração. A reduzida adesão celular observada em culturas crescidas sobre o PTFE está de acordo com os resultados *in vitro* obtidos por Gabriel et al. (1996) e Vallières et al. (2007) e *in vivo*, por Selvig et al. (1990). Neste estudo *in vivo*, membranas de PTFE foram removidas 4-6 semanas após a colocação e submetidas à microscopia eletrônica de varredura e um reduzido número de células foi observado sobre o PTFE quando comparado às demais membranas avaliadas. Segundo Takata et al. (2001), a baixa adesão celular sobre o PTFE, pode estar relacionada à sua reduzida capacidade de adsorver proteínas, ao seu baixo grau de molhamento e à sua topografia. A adesão de células osteoblásticas e queratinócitos foi semelhante sobre as duas membranas. Contudo, observou-se, em alguns períodos, tendência a um maior número de células sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT. Richert et al. (2008) demonstraram que células de linhagens distintas respondem diferentemente a um mesmo material. Desta forma, ainda que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT seja capaz de adsorver proteínas, osteoblastos e queratinócitos apresentam uma dinâmica de adesão celular diferente da de fibroblastos, contribuindo para que as diferenças entre as membranas de PTFE e P(VDF-TrFE)/BT não fossem notadas nos tempos iniciais de cultura.

A epifluorescência do citoesqueleto de actina revelou que células osteoblásticas e fibroblásticas cultivadas sobre o P(VDF-TrFE)/BT estavam aderidas e mais espreiadas em relação àquelas crescidas sobre o PTFE, que permaneciam predominantemente arredondadas. Entretanto, para a linhagem de queratinócitos, não se observou diferenças morfológicas relevantes, visto que estas células se mostravam majoritariamente redondas em ambas as membranas. O espreiamento celular somente ocorre após a adesão da célula ao substrato.

Além disso, a qualidade desta adesão afeta diretamente os eventos celulares subsequentes como proliferação e diferenciação (ANSELME, 2000). Como descrito acima, a adesão de células osteoblásticas, fibroblásticas e queratinócitos ocorre de forma distinta sobre ambas as membranas, podendo ter afetado a cinética de espraiamento. A proliferação de células dependentes de ancoragem (*anchorage dependent cells*) está relacionada diretamente à sua morfologia. Células arredondadas possuem baixa taxa de proliferação, quando comparadas às células mais espraiadas (FOLKMAN; MOSCANA, 1978). A relação morfologia-proliferação poderia explicar os maiores valores de absorbância nos ensaios de MTT das culturas de células osteoblásticas e fibroblásticas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT, bem como a reduzida proliferação das culturas de queratinócitos sobre as duas membranas.

Os fibroblastos constituem a população celular mais abundante no ligamento periodontal e são responsáveis pelo desenvolvimento, função e regeneração do periodonto de inserção (LEKIC; SODEK; MCCULLOCH, 1996). O desenvolvimento do fenótipo fibroblástico foi verificado pela expressão dos genes PRT, PDLs17, S100A4 e FBM, característicos de células do ligamento periodontal (PI et al., 2007). PRT e S100A4 são considerados marcadores fenotípicos de fibroblastos do ligamento periodontal, uma vez que estes genes não são expressos por fibroblastos gengivais (DUARTE et al., 1998). Além de fibroblastos do ligamento periodontal, células do periósteo também expressam PRT, revelando sua especificidade tecidual e seu envolvimento na formação de tecidos mineralizados (HORIUCHI et al., 1999). S100A4 inibe a mineralização e, assim, contribui para manutenção do espaço do ligamento periodontal (DUARTE et al., 1999). PDLs17 está altamente expresso em células osteoblásticas, da medula óssea e do ligamento periodontal, mas não em fibroblastos gengivais (PARK et al., 2001), enquanto que a FBM é seletivamente expressa por fibroblastos do ligamento periodontal (LALLIER; SPENCER; FOWLER, 2005). Os ensaios de PCR em tempo real indicaram uma expressão significativa destes genes em

culturas crescidas sobre o P(VDF-TrFE)/BT, sugerindo uma maior diferenciação fibroblástica sobre esta membrana. Corrobora com esses achados, o maior conteúdo de proteína total observado em culturas fibroblásticas sobre o P(VDF-TrFE)/BT, o que indica que a membrana além de favorecer a diferenciação fibroblástica, estimula a síntese de proteínas e a conseqüente produção de matriz extracelular. Tendo em vista que a matriz extracelular proporciona suporte estrutural para os tecidos e age como um arcabouço para regeneração tecidual (ROBINSON et al., 2005; ZANTOP et al., 2006), esta propriedade da membrana de P(VDF-TrFE)/BT será importante em estágios mais tardios do processo de cicatrização dos tecidos periodontais, em que a formação de feixes de fibras colágenas será essencial para restabelecer a ancoragem do dente no alvéolo.

A regeneração periodontal é definida histologicamente como a regeneração dos tecidos de suporte do dente, que incluem além do ligamento periodontal e cemento, a formação de osso alveolar (WANG et al., 2005). Este evento ocorre por um processo denominado osteogênese e é marcado pela expressão sincronizada de determinados grupos de genes (DE CROMBRUGGHE; LEFEBVRE; NAKASHIMA, 2001). A primeira etapa deste processo biológico é o comprometimento das células indiferenciadas com a linhagem osteoblástica (PERINPANAYAGAM et al., 2005). Vários fatores de transcrição atuam neste estágio inicial, sendo o Runx2 considerado o principal fator envolvido na diferenciação osteoblástica (MARIE, 2008). Komori et al. (1997) demonstraram que ratos *knock-out* para o gene Runx2 são incapazes de desenvolver o tecido ósseo devido à ausência de osteoblastos. A expressão do gene Runx2 foi maior em culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT em relação às cultivadas sobre o PTFE. Este resultado sugere que membrana de P(VDF-TrFE)/BT favorece a diferenciação osteoblástica.

Após a diferenciação, as células iniciam, em momentos específicos, a expressão de genes que codificam proteínas que caracterizam o fenótipo osteoblástico, como COL I, OPN,

ALP, BSP, e OC e por esse motivo, a expressão destes genes são parâmetros importantes para o estudo da osteogênese *in vitro* (BECK, 2003). O COL I é o componente mais abundante da fase orgânica do tecido ósseo (BURR, 2002; CURREY, 2003). Esta proteína proporciona integridade estrutural e resistência mecânica ao tecido ósseo. Além disso, o COL I atua como um arcabouço para a nucleação de hidroxiapatita (BAHT; HUNTER; GOLDBERG, 2008). As células osteoblásticas cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT apresentaram maior expressão de RNA mensageiro para o COL I, sugerindo que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT favorece a síntese de colágeno.

A matriz extracelular óssea é constituída por proteínas colágenas e não-colágenas, como a OPN, BSP e OC (ROACH, 1994). Estas proteínas são consideradas moduladores biológicos, uma vez que interagem com receptores de membrana, fatores de crescimento, proteases e com outros componentes estruturais da matriz óssea (BORNSTEIN; SAGE, 2002) e desta maneira, são capazes de afetar a atividade celular, bem como a função de outras proteínas (ALFORD; HANKENSON, 2006). Embora OPN e BSP compartilhem semelhanças bioquímicas e biofísicas (GANSS; SODEK, 1999; SODEK; GANSS; MCKEE, 2000), suas funções no tecido ósseo são distintas. Enquanto a BSP é um potente nucleador de hidroxiapatita (HUNTER; GOLDBERG, 1993), a OPN inibe o processo de mineralização (GOLDBERG; HUNTER, 1995). A OC é a mais abundante das proteínas não-colágenas presentes na matriz óssea (WOLF, 1996) e sua função é controlar o crescimento dos cristais de hidroxiapatita (HUNTER, 1996).

A expressão de OPN, BSP e OC foi maior em culturas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT comparadas àquelas cultivadas sobre o PTFE. Lima et al. (2008) demonstraram que a expressão de genes relacionados a diferenciação osteoblástica é estimulada pela presença de membranas nos procedimentos de RTG. Neste estudo, os autores observaram uma maior expressão gênica em defeitos recobertos pela membrana de PTFE em

relação àqueles recobertos apenas pelo retalho. Os ensaios de PCR em tempo real indicaram que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT favorece a diferenciação osteoblástica, uma vez que todos os genes específicos desta linhagem apresentavam maior expressão em culturas crescidas sobre este material em relação à membrana controle. Assim, é possível especular que a utilização da membrana de P(VDF-TrFE)/BT nos procedimentos de RTG, representaria um estímulo adicional na regeneração do osso alveolar.

A ALP é uma enzima glicoprotéica produzida por osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal (LALLIER; SPENCER; FOWLER, 2005), cuja função é hidrolisar fosfatos orgânicos, liberando assim íons fosfatos necessários ao processo de mineralização (HAMADE et al., 2003). Em nossos experimentos, uma expressiva atividade de ALP foi observada, tanto pelo ensaio bioquímico quanto pela detecção histoquímica, em culturas osteogênicas sobre o P(VDF-TrFE)/BT. Este resultado ratifica aqueles obtidos pelos ensaios de PCR em tempo real, em que se observou uma maior expressão do gene da ALP. A ausência de áreas de matriz calcificada, em culturas osteoblásticas sobre o PTFE, pode estar relacionada à baixa expressão e/ou atividade desta enzima. Notadamente, em culturas osteoblásticas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT foi possível observar nódulos de matriz mineralizada.

Assim como para linhagem osteoblástica, a atividade de ALP foi maior em culturas de células fibroblásticas crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT. Considerando que a inserção das fibras colágenas do periodonto ao osso alveolar e ao cimento é acompanhada por sua mineralização, é possível sugerir que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT propicie condições que favorecem a formação de uma nova inserção, contribuindo desta forma para o restabelecimento do sistema de suporte do dente

No epitélio de revestimento, durante a diferenciação dos queratinócitos, observa-se uma mudança no padrão de expressão de queratinas (MOLL et al., 2006). Ao longo deste

processo, as QRT-5, QRT-14 e QRT-15 são substituídas pelas QRT-1 e QRT-10 (FUCHS; GREEN, 1980; STOLER et al., 1988). Além destas alterações na expressão das queratinas, a diferenciação dos queratinócitos envolve a expressão de outras proteínas, como a IVL (KASSAR et al., 2008). O desenvolvimento do fenótipo de queratinócitos foi confirmado pela expressão dos genes IVL, QRT-1, QRT-10 e QRT-14. Sob uma densidade de plaqueamento maior, notou-se uma maior expressão destes genes em culturas sobre o P(VDF-TrFE)/BT indicando maior diferenciação celular sobre esta membrana. Entretanto, notou-se elevado nível de expressão da QRT-14 em células crescidas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT, o que segundo Ratnam et al (1996) representa uma característica intrínseca às linhagens SCC, que permanecem expressando genes típicos de células menos diferenciadas. Considerando a função protetora do epitélio oral, a capacidade da membrana P(VDF-TrFE)/BT de permitir a proliferação e diferenciação de queratinócitos será fundamental durante a cicatrização do periodonto, pois possibilitará o selamento do sítio cirúrgico (AUKIL et al., 2000), impedindo a exposição e contaminação da membrana, eventos que poderiam comprometer o processo de regeneração periodontal (POLIMENI et al., 2006).

Apoptose é um importante fenômeno biológico envolvido em diversos processos como diferenciação celular, crescimento e desenvolvimento/regeneração tecidual (WYLLIE et al., 1980; MAJNO; JORIS, 1995). Neste estudo, foi avaliada a expressão dos genes Bcl-2 e Bax, pertencentes à família Bcl-2, e do gene Survivina da família IAP (*Inhibitors of apoptosis proteins*), ambos expressos por células apoptóticas. A família Bcl-2 é composta por proteínas indutoras e repressoras da morte celular. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois impedem a liberação do citocromo *c* pelas mitocôndrias e são classificados como reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax, BID e Bak são proteínas pró-apoptóticas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). As IAPs exercem seu papel pela inibição das caspases e modulação do fator de transcrição NF- κ B. A survivina, menor

proteína desta família, inibe a apoptose pela degradação das caspases 3, 7 e 9 (ALTIERE, 2003). A maior expressão de Bax, Bcl-2 e Survivina em células das três linhagens cultivadas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT, sugere a ocorrência de apoptose nestas culturas. Considerando que ao final do processo de diferenciação e/ou término de seu papel no processo de regeneração as células entram em apoptose, a expressão destes genes pode estar relacionada a uma maior diferenciação celular, visto que os genes específicos das linhagens osteoblástica, fibroblástica e de queratinócitos humanos apresentavam-se mais expressos em culturas sobre a membrana de P(VDF-TrFE)/BT.

Durante a RTG, queratinócitos, osteoblastos e fibroblastos entram em contato direto com a membrana e uma interação adequada entre estas células e a membrana é fundamental para o sucesso deste procedimento. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a membrana de P(VDF-TrFE)/BT favoreceu eventos relacionados ao desenvolvimento tecidual, como a adesão, espraçamento, proliferação e diferenciação de células do periodonto de inserção. Sendo assim, a membrana de P(VDF-TrFE)/BT pode representar uma excelente alternativa ao PTFE nos procedimentos de RTG.

7 CONCLUSÕES

- A comparação entre as membranas do compósito P(VDF-TrFE)/BT e de PTFE mostrou que o P(VDF-TrFE)/BT apresenta biocompatibilidade *in vitro*.
- A expressão do fenótipo osteoblástico em células derivadas de fragmentos ósseos de processos alveolares humanos cultivadas sobre membrana de P(VDF-TrFE)/BT foi maior quando comparada à PTFE.
- A membrana P(VDF-TrFE)/BT, quando comparada à PTFE, permitiu uma maior expressão do fenótipo fibroblástico em células da linhagem fibroblástica provenientes da digestão enzimática de ligamento periodontal humano.
- A expressão do fenótipo de queratinócitos em células SCC9, uma linhagem proveniente de carcinomas espinocelulares bucais humanos, foi maior nas células cultivadas sobre membrana de P(VDF-TrFE)/BT quando comparada à PTFE.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ARRAYED, F.; ADAM, S.; MORAN, J.; DOWELL, P. Clinical trial of cross-linked human type I collagen as a barrier material in surgical periodontal treatment. J Clin Periodontol., v.22, n.5, p.371-9, May. 1995.

ALFORD, AI.; HANKENSON, K.D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. Bone., v.38, n.6, p.749-57, Jan. 2006.

ALPISTE-ILLUECA, F.M.; BUITRAGO-VERA, P.; DE GRADO-CABANILLES, P.; FUENMAYOR-FERNANDEZ, V.; GIL-LOSCOS, F.J. Periodontal regeneration in clinical practice. Med Oral Patol Oral Cir Bucal., v.11, n.4, p.382-92, Jul. 2006.

ALTIERI, D.C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. Oncogene., v.22, n.53, p.8581-9, Nov. 2003.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Periodontal regeneration (position paper). J Periodontol., v.76, n.9, p.1601-1622, Sep. 2005.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials., v.21, n.7, p.667-81, Apr. 2000.

AUKHIL, I. Biology of wound healing. Periodontol 2000., v.22, p.44-50, Feb. 2000.

BAHT, G.S.; HUNTER, G.K.; GOLDBERG, H.A. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. Matrix Biol., v.27, n.7, p.600-8, Sep. 2008.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A. C.; DUEK, E.A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. Polímeros: Ciência e Tecnologia., vol. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.

BECK, G.R.JR. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. J Cell Biochem., v.90, n.2, p.234-43, Oct. 2003.

BECKER, W.; BECKER, B.E.; BERG, L.; PRICHARD, J.; CAFFESSE, R.; ROSENBERG, E. New attachment after treatment with root isolation procedures: report for treated Class III and Class II furcations and vertical osseous defects. Int J Periodontics Restorative Dent., v.8, n.3, p.8-23. 1988.

BELOTI, M.M.; DE OLIVEIRA, P.T.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M.A.; BERTOLINI, M.J.; ROSA, A.L. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. J Biomed Mater Res A, v.79, n.2, p.282-8, Nov. 2006.

BELOTI, M.M.; HIRAKI, K.R.N.; BARROS, V.M.R.; ROSA, A.L. Effect of chemical composition of Ricinus communis polyurethane on rat bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. J Biomed Mater Res., v.64, n.1, p.171-6, Jan. 2003.

BELOTI, M.M.; MARTINS, W. JR.; XAVIER, S.P.; ROSA, A.L. In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. Clin Oral Implants Res., v.19, n.1, p.48-54, Jan. 2008.

BENATTI, B.B.; SILVÉRIO, K.G.; CASATI, M.Z.; SALLUM, E.A.; NOCITI, F.H. JR. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. J Biosci Bioeng., v.103, n1, p.1-6, Jan. 2007.

BENQUÉ, E.; ZAHEDI, S.; BROCARD, D.; OSCABY, F.; JUSTUMUS, P.; BRUNEL, G. Guided tissue regeneration using a collagen membrane in chronic adult and rapidly progressive periodontitis patients in the treatment of 3-wall intrabony defects. J Clin Periodontol., v.24, n.8, p.544-9, Aug. 1997.

BLUMENTHAL, N.M. A clinical comparison of collagen membranes with e-PTFE in the treatment of human mandibular class II furcation defects. J Periodontol., v.64, n.10, p.925-933, Oct. 1993.

BOGLE, G.; GARRETT, S.; STOLLER, N.H.; SWANBOM, D.D.; FULFS, J.C.; RODGERS, P.W.; WHITMAN, S.; DUNN, R.L.; SOUTHARD, G.L.; POLSON, A.M. Periodontal regeneration in naturally occurring Class II furcation defects in beagle dogs after guided tissue regeneration with bioabsorbable barriers. J Periodontol., v.68, n.6, p.536-44, Jun. 1997.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol., v.14, n.5, p.608-16, Oct. 2002.

BOYAN, B.D.; HUMMERT, T.W.; DEAN, D.D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. Biomaterials., v.17, n.2, p.137-46, Jan. 1996.

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

BURR, D.B. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. Bone., v.31, n.1, p.8-11, Jul. 2002.

BUSER, D.; BRÄGGER, U.; LANG, N.P.; NYMAN, S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. Clin Oral Implants Res., v.1, n.1, p.22-32, Dec. 1990.

CAFFESSE, R.G.; SMITH, B.A.; DUFF, B.; MORRISON, E.C.; MERRILL, D.; BECKER, W. Class II furcations treated by guided tissue regeneration in humans: case reports. J Periodontol., v.61, n.8, p.510-4, Aug. 1990.

CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. In Lanza RP, Langer R, Chick WL. Cell and molecular engineering of bone regeneration. Principles of bone engineering, New York: Academic Press. 1997.

CATON, J.; GREENSTEIN, G.; ZAPPA, U. Synthetic bioabsorbable barrier for regeneration in human periodontal defects. J Periodontol., v.65, n.11, p.1037-45, Nov. 1994.

CHEN, C.C.; WANG, H.L.; SMITH, F.; GLICKMAN, G.N.; SHYR, Y.; O'NEAL, R.B. Evaluation of a collagen membrane with and without bone grafts in treating periodontal intrabony defects. J Periodontol., v.66, n.10, p.838-47, Oct. 1995.

CHUNG, K.M.; SALKIN, L.M.; STEIN, M.D.; FREEDMAN, A.L. Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. J Periodontol., v.61, n.12, p.732-6, Dec. 1990.

CLARK, R.A.F. Wound repair. Overview and general considerations. In: Clark RAF, editor. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. 2 Ed. New York: Plenum Press. 1996.

COONTS, B.A.; WHITMAN, S.L.; O'DONNELL, M.; POLSON, A.M.; BOGLE, G.; GARRETT, S.; SWANBOM, D.D.; FULFS, J.C.; RODGERS, P.W.; SOUTHARD, G.L.; DUNN, R.L. Biodegradation and biocompatibility of a guided tissue regeneration barrier membrane formed from a liquid polymer material. J Biomed Mater Res., v.42, n.2, p.303-311, Nov. 1998.

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

CORTELLINI, P.; TONETTI, M.S. Long-term tooth survival following regenerative treatment of intrabony defects. J Periodontol., v.75, n.5, p.672-8, May. 2004.

CURREY, J.D. Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. Osteoporos Int., v. 14, n.5, p.29-36, Sep. 2003.

DAHLIN, C.; GOTTLow, J.; LINDE, A.; NYMAN, S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg., v.24, n.1, p.13-9. 1990.

DE CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. Curr Opin Cell Biol., v.31, n.6, p.721-7, Dec. 2001.

DE LUSTRO, F.; CONDELL, R.A.; NGUYEN, M.A.; MCPHERSON, J.M. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. J Biomed Mater Res., v.20, n.1, p.109-20, Jan. 1986.

DE OLIVEIRA, P.T.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials., v.25, n.3, p.403-13, Feb. 2004.

DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S.F.; IRIE, K.; NANJI, A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. J Histochem Cytochem., v.51, n.5, p.633-641, May. 2003.

DIAS, C.J.; DAS-GUPTA, D.K. Poling behaviour of ceramic/polymer ferroelectric composites. Ferroelectrics., v.157, p.405-410. 1994.

DOS ANJOS, B.; NOVAES, A.B.JR.; MEFFERT, R.; BARBOZA, E.P. Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry J Periodontol., v.69, n.4, p.454-9, Apr. 1998.

DOWELL, P.; MORAN, J.; QUTEISH, D. Guided tissue regeneration. Br Dent J., v.171, n.5, p.125-7, Sep. 1991.

DUARTE, W.R.; IIMURA, T.; TAKENAGA, K.; OHYA, K.; ISHIKAWA, I.; KASUGAI, S.; Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. Biochem Biophys Res Commun., v.16, n.2, p.416-20, Feb. 1999.

DUARTE, W.R.; KASUGAI, S.; IIMURA, T.; OIDA, S.; TAKENAGA, K.; OHYA, K.; ISHIKAWA, I. cDNA cloning of S100 calcium-binding proteins from bovine periodontal ligament and their expression in oral tissues. J Dent Res., v.77, n.9, p.1694-9, Sep. 1998.

ELHARAR, F.; RODRIGUEZ, H.J.; BENQUÉ, E.P.; CAFFESSE, R.G. Guided tissue regeneration with bioabsorbable and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes in the treatment of naturally occurring periodontal defects in dogs. J Periodontol., v.69, n.11, p.1218-28, Nov. 1998.

FINE, A. S. Bioquímica da cicatrização de feridas. In: STAHL, S. S. Cirurgia Periodontal: bases biológicas e técnicas. São Paulo: Panamericana, 1981. p. 60-121.

FOLKMAN, J.; MOSCANA, A. Role of cell shape in growth control. Nature., v.273, n.5661, p.345-9, Jun. 1978.

FORGET, G.; LATXAGUE, L.; HÉROGUEZ, V.; LABRUGÈRE, C.; DURRIEU, M.C. RGD nanodomains grafting onto titanium surface. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc., p.5107-10. 2007.

FRIEDMANN, A.; STRIETZEL, F.P.; MARETZKI, B.; PITARU, S.; BERNIMOULIN, J.P. Observations on a new collagen barrier membrane in 16 consecutively treated patients. Clinical and histological findings. J Periodontol., v.72, n.11, p. 1616-23. Nov. 2001.

FRIEDMANN, A.; STRIETZEL, F.P.; MARETZKI, B.; PITARU, S.; BERNIMOULIN, J.P. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. Clin Oral Implants Res., v.13, n.6, p.587-94, Dec. 2002.

FUCHS, E.; GREEN, H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell., v.19, n.4, p.1033-42. Apr. 1980.

GABRIEL, B.F.; RIVERA-HIDALGO, F.; STANFORD, T.W.; DILL, R.E. Attachment of fibroblasts to membranes used for guided tissue regeneration in vitro. J Dent Res., v. 75. 1996.

GANSS, B.; KIM, R.H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. Crit Rev Oral Biol Med., v.10, n.1, p.79-98. 1999.

GIMENES, R.; ZAGHETE, M.A.; BERTOLINI, M.; VARELA, J.A.; COELHO, L.O.; SILVA JR, N.F. Composites PVDF-TrFE/BT used as bioactive membranes for enhancing bone regeneration. In: Bar-Cohen Y, org. Proceedings of SPIE: Smart Structures and Materials. Bellinghan, WA, 2004. v. 5385, p. 539-547.

GOLDBERG, H.A.; HUNTER, G.K. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. Ann N Y Acad Sci., v.21, n.760, p.305-8, Apr. 1995.

GOTTLOW, J.; NYMAN, S.; KARRING, T. Maintenance of new attachment gained through guided tissue regeneration. J Clin Periodontol., v.19, n.5, p.315-7, May. 1992.

GOTTLOW, J.; NYMAN, S.; KARRING, T.; EGELBERG, J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J Clin Periodontol., v.11, n.8, p.494-503, Sep. 1984.

GRAFAHREND, D.; CALVET, J.L.; KLINKHAMMER, K.; SALBER, J.; DALTON, P.D.; MÖLLER, M.; KLEE, D. Control of protein adsorption on functionalized electrospun fibers. Biotechnol Bioeng., v.15, n.3, p.609-21, Oct. 2008.

GRAZIANI, F.; LAURELL, L.; TONETTI, M.; GOTTLOW, J.; BERGLUNDH, T. Periodontal wound healing following GTR therapy of dehiscence-type defects in the monkey: short-, medium- and long-term healing. J Clin Periodontol., v.32, n.8, p.905-914, Aug. 2005

GRINNELL, F. Cellular adhesiveness and extracellular substrata. Int Rev Cytol., v.53, p.65-144. 1978.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia., v.53, v.3, p.335-343. 2007.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Attachment level changes in destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol., v.13, n.5, p.461-75, May. 1986.

HAMADE, E.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BUCHET, R.; ROUX, B. Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro. Eur J Biochem., v.270, n.9, p.2082-90, May. 2003.

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

HARDWICK, R et al. Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge. In: Buser et al. Guided bone regeneration in implant dentistry. Quintessence. p.101-136. 1994.

HILLMANN, G.; STEINKAMP-ZUCHT A.; GEURTSSEN, W.; GROSS, G.; HOFFMANN, A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. Biomaterials., v.23, n.6, p.1461-9, Mar. 2002.

HOCKERS, T.; ABENSUR, D.; VALENTINI, P.; LEGRAND, R.; HAMMERLE, C.H. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. Clin Oral Implants Res., v.10, n.6, p.487-98, Dec. 1999.

HORIUCHI, K.; AMIZUKA, N.; TAKESHITA, S.; TAKAMATSU, H.; KATSUURA, M.; OZAWA, H.; TOYAMA, Y.; BONEWALD, L.F.; KUDO, A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. J Bone Miner Res., v.14, n.7, p.1239-49, Jul. 1999.

HUNTER G.K.; GOLDBERG H.A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A., v.90, n.18, p.8562-5, Sep. 1993.

HUNTER, G.K.; HAUSCHKA, P.V.; POOLE, A.R.; ROSENBERG, L.C.; GOLDBERG, H.A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. Biochem J., v. 1, n.317, p.59-64, Jul. 1996.

HÜRZELER, M.B.; QUIÑONES, C.R.; CAFFESSE, R.G.; SCHÜPBACH, P.; MORRISON, E.C. Guided periodontal tissue regeneration in Class II furcation defects following treatment with a synthetic bioabsorbable barrier. J Periodontol., v.68, n.5, p.498-505, May. 1997.

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

IGNATIUS, A.A.; OHNMACHT, M.; CLAES, L.E.; KREIDLER, J.; PALM, F. A composite polymer/tricalcium phosphate membrane for guided bone regeneration in maxillofacial surgery. J Biomed Mater Res., v.58, n.5, p.564-9. 2001.

IRIE, K.; ZALZAL, S.; OZAWA, H.; MCKEE, M.D.; NANJI, A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. Anat Rec., v.252, n.4, p.554-67, Dec. 1998.

JOLY, J.C.; PALIOTO, D.B.; DE LIMA, A.F.; MOTA, L.F.; CAFFESSE, R. Clinical and radiographic evaluation of periodontal intrabony defects treated with guided tissue regeneration. A pilot study. J Periodontol., v.73, n.4, p.353-9, Apr. 2002.

KAMOI, K.; IINO, M.; ISHIGURO, H. Regeneration therapy for oral disease. Hum Cell., v.19, n.2, p.76-82, May. 2006.

KARRING, T.; ISIDOR, F.; NYMAN, S.; LINDHE, J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. J Clin Periodontol., v.12, n.1; p.51-60, Jan. 1985.

KASSAR, S.; CHARFEDDINE, C.; ZRIBI, H.; TOUNSI-KETTITI, H.; BCHETNIA, M.; JERBI, E.; CASSIO, D.; MOKNI, M.; ABDELHAK, S.; BEN OSMAN, A.; BOUBAKER, S. Immunohistological study of involucrin expression in Darier's disease skin. J Cutan Pathol., v.35, n.7, p.635-40, Jul. 2008.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e Embriologia Oral. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KIKUCHI, M.; KOYAMA, Y.; YAMADA, T.; IMAMURA, Y.; OKADA, T.; SHIRAHAMA, N.; AKITA, K.; TAKAKUDA, K.; TANAKA, J. Development of guided bone regeneration membrane composed of beta-tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co-epsilon-caprolactone) composites. Biomaterials., v.25, n.28, p.5979-86, Dec. 2004.

KLEE, D.; ADEMOVIC, Z.; BOSSERHOFF, A.; HOECKER, H.; MAZIOLIS, G.; ERLI, H.J. Surface modification of poly(vinylidene fluoride) to improve the osteoblast adhesion. Biomaterials., v.24, n.21, p.3663-70, Sep. 2003.

KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S.; YAMAGUCHI, A.; SASAKI, K.; DEGUCHI, K.; SHIMIZU, Y.; BRONSON, R.T.; GAO, Y.H.; INADA, M.; SATO, M.; OKAMOTO, R.; KITAMURA, Y.; YOSHIKI, S.; KISHIMOTO, T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell., v.89, n.5, p.755-64, May. 1997.

LALLIER, T.E.; SPENCER, A.; FOWLER, M.M. Transcript profiling of periodontal fibroblasts and osteoblasts. J Periodontol., v.76, n.7, p.1044-55, Jul. 2005.

LAURELL, L.; FALK, H.; FORNELL, J.; JOHARD, G.; GOTTLLOW, J. Clinical use of a bioresorbable matrix barrier in guided tissue regeneration therapy. Case series. J Periodontol., v.65, n.10, p.967-75. Oct. 1994.

LAURELL, L.; GOTTLLOW, J. Guided tissue regeneration update. Int Dent J., v.48, n.4, p.386-98, Aug. 1998.

LEKIC, P.; SODEK, J.; MCCULLOCH, C.A. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. Anat Rec., v. 244, n.1, p.50-8, Jan. 1996.

LIAO, S.; WANG, W.; UO, M.; OHKAWA, S.; AKASAKA, T.; TAMURA, K.; CUI, F.; WATARI, F. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. Biomaterials., v.26, n.36, p.7564-71, Dec. 2005.

LIAO, S.; WATARI, F.; ZHU, Y.; UO, M.; AKASAKA, T.; WANG, W.; XU, G.; CUI, F. The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro. Dent Mater., v.23, n.9, p.1120-8, Sep. 2007.

LIMA, L.L.; GONÇALVES, P.F.; SALLUM, E.A.; CASATI, M.Z.; NOCITI, F.H, JR. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. J Periodontal Res., v.43, n.4, p.459-64, Aug. 2008.

LINDHE, J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LINDHE, J.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. J Clin Periodontol., v.10, n.4, p.433-42, Jul. 1983.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem., v.193, n.1, p.265-75, Nov. 1951.

MACEDO, N. L.; MATUDA, F. S.; DE MACEDO, L. G. S.; MONTEIRO, A. S. F.; VALERA, M. C.; CARVALHO, Y. R. Evaluation of two membranes in guided bone tissue regeneration: histological study in rabbits. Brazilian Journal of Oral Science, v.3, n.8, p. 395-400, 2004.

MACEDO, N.L. et al. Reação tecidual à membranas para regeneração tecidual guiada. Rev Gaúcha Odont., n.43, p.101-104. 1995.

MAEDA, H.; KASUGA, T. Control of silicon species released from poly(lactic acid)-polysiloxane hybrid membranes. J Biomed Mater Res A, v.85, n.3, p.742-6, Jun. 2008.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. AM J PATHOL., v.146, n.1, p.3-15, Jan. 1995.

MARIE, P.J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. Arch Biochem Biophys., v.15, n.2, p.98-105, May. 2008.

MARTIN P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. Science 1997; 276: 75–81.

MATTSON, J.S. MCLEY LL, JABRO MH. Treatment of intrabony defects with collagen membrane barriers. Case reports. J Periodontol., v.66, n.7, p.635-45, Jul. 1995.

MATTSON, J.S.; GALLAGHER, S.J.; JABRO, M.H. The use of 2 bioabsorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. J Periodontol., v.70, n.5, p.510-7, May. 1999.

MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol., v. 47, n. 5, p.256-260, May. 1976.

MOLL, R.; DIVO, M.; LANGBEIN, L. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol., v.129, v.6, p.705-33, Jun. 2008.

NOVAES, A.B. JR.; GUTIERREZ, F.G.; FRANCISCHETTO, I.F.; NOVAES, A.B. Bacterial colonization of the external and internal sulci and of cellulose membranes at time of retrieval. J Periodontol., v.66, n.10, p.864-9, Oct. 1995.

NOVAES, A.B.; NOVAES JR, A.B. Procedimentos cirúrgicos em periodontia e implantodontia. São Paulo. Artes Médicas, 2004.

NYMAN, S. Bone regeneration using the principle of guided tissue regeneration. J Clin Periodontol., v.18, n.6, p.494-98, Jul. 1991.

NYMAN, S.; GOTTLOW, J.; KARRING, T.; LINDHE, J. The regeneration potential of the periodontal ligament: an experimental study in the monkey. J Clin Periodontol., v. 9, p. 257-265, May. 1982a.

NYMAN, S.; KARRING, T.; LINDHE, J.; PLANTÉN, S. Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. J Clin Periodontol., v.7, n.5, p.394-401, Oct. 1980.

NYMAN, S.; LINDHE, J.; KARRING, T.; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol., v.9, n.4, p.290-6, Jul. 1982b.

ODA, J.Y.; CARVALHO, J. Cicatrização do periodonto: revisão. Arq. Ciênc. Saúde Unipar., v.8, n.2, p.159-172, Maio/Agos. 2004.

OH, T.; MERAW, S. J.; LEE, E.; GIANNOBILE, W. V.; WANG, H. L. Comparative analyses of implant dehiscence defects. Clinical Oral Implant Research., v.14, n.1, p.80-90, 2003.

OLIVER, R.F.; BARKER, H.; COOKE, A.; GRANT, R.A. Dermal collagen implants. Biomaterials., v.3, n.1, p.38-40, Jan. 1982.

PAOLANTONIO, M. Combined periodontal regenerative technique in human intrabony defects by collagen membranes and anorganic bovine bone. A controlled clinical study. J Periodontol., v.73, n.2, p.158-66, Feb. 2002.

PARK, J.B.; KELLY, B.J.; KENNER, G.H.; VON RECUM, A.F.; GREYER, M.F.; COFFEEN, W.W. Piezoelectric ceramic implants: in vivo results. J Biomed Mater Res., v.15, n.1, p.103-10, Jan. 1981.

PARK, J.B.; KENNER, G.H.; BROWN, S.D.; SCOTT, J.K. Mechanical property changes of barium titanate (ceramic) after in vivo and in vitro aging. Biomater Med Devices Artif Organs, v.5, n.3, p.267-76. 1977.

PARK, J.C.; KIM, Y.B.; KIM, H.J.; JANG, H.S.; KIM, H.S.; KIM, B.O.; HAN, K.Y. Isolation and characterization of cultured human periodontal ligament fibroblast-specific cDNAs. Biochem Biophys Res Commun, v.20, n.5, p.1145-53, Apr. 2001.

PERINPANAYAGAM, H.; MARTIN, T.; MITHAL, V.; DAHMAN, M.; MARZEC, N.; LAMPASSO, J.; DZIAK, R. Alveolar bone osteoblast differentiation and Runx2/Cbfa1 expression. Arch Oral Biol, v.51, n.5, p.406-15, May.2006.

PERSSON, L.G.; ERICSSON, I.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Guided bone regeneration in treatment of periimplantitis. Clin Oral Implants Res, v.7, n.4, p.366-372, Dec. 1996.

PETITE, H. Tissue-engineered bone regeneration. Nature Biotech, v.18, n.9, p.959-963, Sep. 2000.

PI, S.H.; LEE, S.K.; HWANG, Y.S.; CHOI, M.G.; LEE, S.K.; KIM, E.C. Differential expression of periodontal ligament-specific markers and osteogenic differentiation in human papilloma virus 16-immortalized human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. J Periodontal Res, v.42, n.2, p.104-13, Apr. 2007.

PIATTELLI, A.; SCARANO, A.; PAOLANTONIO, M. Bone formation inside the material interstices of e-PTFE membranes: a light microscopical and histochemical study in man. Biomaterials, v.17, n.17, p.1725-31, Sep. 1996.

POLIMENI, G.; KOO, K.T.; PRINGLE, G.A.; AGELAN, A.; SAFADI, F.F.; WIKESJÖ, U.M. Histopathological observations of a polylactic acid-based device intended for guided bone/tissue regeneration. Clin Implant Dent Relat Res, v.10, n.2, p.99-105, May. 2008.

POLIMENI, G.; XIROPAIDIS, A.V.; WIKESJÖ, U.M. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. Periodontol 2000, v.41, p.30-47. 2006.

POLSON, A.M.; GARRETT, S.; STOLLER, N.H.; GREENSTEIN, G.; POLSON, A.P.; HARROLD, C.Q.; LASTER, L. Guided tissue regeneration in human furcation defects after using a biodegradable barrier: a multi-center feasibility study. J Periodontol, v.66, n.5, p.377-85, May. 1995.

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

RATNAM, A.V.; BIKLE, D.D.; SU, M.J.; PILLAI, S. Squamous carcinoma cell lines fail to respond to 1, 25-dihydroxyvitamin D despite normal levels of the vitamin D receptor. J Invest Dermatol, v.106, n.3, p.522-5, Mar. 1996.

RE, F.; ZANETTI, A.; SIRONI, M.; POLENTARUTTI, N.; LANFRANCONE, L.; DEJANA, E.; COLOTTA, F. Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. J Cell Biol, v.127, n.2, p.537-46, Oct. 1994.

RICHERT, L.; VETRONE, F.; YI, J.H.; ZALZAL, S.F.; WUEST, J.D.; ROSEI, F.; NANJI, A. Surface nanopatterning to control cell growth. Adv Mater, v.15, p.1-5. 2008.

ROACH, H.I. Why does bone matrix contain noncollagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin, and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. Cell Biol Int, v.18, n.6, p.617-28, Feb. 1994.

ROBINSON, K.A.; LI, J.; MATHISON, M.; REDKAR, A.; CUI, J.; CHRONOS, N.A.; MATHENY, R.G.; BADYLAK, S.F. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. Circulation, v.30, n.112, p.135-143. Aug. 2005.

ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. Braz Dent J, v.14, n.1, p.16-21. 2003.

ROTHAMEL, D.; SCHWARZ, F.; SAGER, M.; HERTEN, M.; SCULEAN, A.; BECKER, J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. Clin Oral Implants Res, v.16, n.3, p.369-78, Jun. 2005.

ROUSLAHTI, E. Integrins. J Clin Invest, v. 87, n.1, p.1-5, Jan. 1991.

SALATA, L. A.; HATTON, P. V.; DEVLIN, A. J.; BROOK, I. M.; CRAIG, G. In vitro and in vivo evaluation of e-PTFE and alkali-cellulose membranes for guided bone regeneration. Clinical Oral Implants Research, v.12, n.1, p.62-8, Feb. 2001.

SALONEN, J.I.; PERSSON, R.G. Migration of epithelial cells on materials used in guided tissue regeneration. J Periodont Res, v.25, n.4, p.215-221, Jul. 1990.

SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. J Oral Maxillofac Surg., v.51, n.10, p.1106-14, Oct. 1993.

SCHENK, R.K.; BUSER, D.; HARDWICK, W.R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. Int J Oral Maxillofac Implants., v.9, n.1, p.13-29, Jan. 1994.

SCHLEGEL, A.K.; MÖHLER, H.; BUSCH, F.; MEHL, A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). Biomaterials., v.18, n.7, p.535-8, Apr. 1997.

SCHMITZ, J.P.; LEMKE, R.R.; ZARDENETA, G.; HOLLINGER, J.O.; MILAM, S.B. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a Guidor membrane for guided bone regeneration: case report. J Oral Maxillofac. Surg., vol. 58, n.58, n.8, p. 888-93, Aug. 2000.

SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. J Cell Biochem., v.56, n.3, p.340-347, Nov. 1994.

SCHWARZ, F.; ROTHAMEL, D.; HERTEN, M.; SAGER, M.; BECKER, J. Angiogenesis pattern of native and cross-linked collagen membranes: an immunohistochemical study in the rat. Clin Oral Implants Res., v.17, n.4, p.403-9, Aug. 2006.

SELVIG, K.A.; NILVEUS, R.E.; FITZMORRIS, L.; KERSTEN, B.; KHORSANDI, S.S. Scanning electron microscopic observations of cell populations and bacterial contamination of membranes used for guided periodontal tissue regeneration in humans. J Periodontol., v.61, n.8, p.515-20, Aug. 1990.

SERVICE, R.F. Tissue engineers build new bone. Science., v.289, n.5484, p.1498-500, Sep. 2000.

SIMION, M.; DAHLIN, C.; BLAIR, K.; SCHENK, R. Effect of different microstructures of e-PTFE membranes on bone regeneration and soft tissue response: a histologic study in canine mandible. Clin Oral Implants Research., v.10, n.2, p.73-84, Apr. 1999.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M.D. Osteopontin. Crit Rev Oral Biol Med., v.11, n.3, p.279-303. 2000.

SOMERMAN, M.J.; ARCHER, S.Y.; IMM, G.R.; FOSTER, R.A. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J Dent Res., v.67, n.1, p.66-70, Jan. 1988.

STEINBERG, A.D.; LEBRETON, G.; WILLEY, R.; MUKHERJEE, S.; LIPOWSKI, J. Extravascular clot formation and platelet activation on variously treated root surfaces. J Periodontol., v.57, n.8, p.516-22, Aug.1986.

STOCUM, D.L. Regenerative Biology and Medicine. Massachusetts: Academic Press. (2002).

STOLER, A.; KOPAN, R.; DUVIC, M.; FUCHS, E. Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. J Cell Biol., v.107, n.2, p.427-46, Aug. 1988.

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 A., v.82, n.2, p.445-54, Aug. 2007.

TAKATA, T.; WANG, H.L.; MIYAUCHI, M. Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. Clin Oral Implants Res., v.12, n.4, p.332-8, Aug. 2001.

TATAKIS, D.N.; PROMSUDTHI, A.; WIKESJÖ, U.M. Devices for periodontal regeneration. Periodontol 2000., v.19, p.59-73, Feb. 1999.

TATAKIS, D.N.; TROMBELLI, L. Adverse effects associated with a bioabsorbable guided tissue regeneration device in the treatment of human gingival recession defects. A clinicopathologic case report. J Periodontol., v.70, n.5, p.542-7, May. 1999.

TOKUDA, S.; OBATA, A.; KASUGA, T. Preparation of poly(lactic acid)/siloxane/calcium carbonate composite membranes with antibacterial activity. Acta Biomater., Oct. 2008.

TRIPLETT, R.G.; SCHOW, S.R.; FIELDS, R.T. Bone augmentation with and without biodegradable and nonbiodegradable microporous membranes. Oral Maxillofac. Surg. Clin. Noth Am., v.13, n.3, p.411-22. 2001.

VALLIÈRES, K.; PETITCLERC, E.; LAROCHE, G. Covalent grafting of fibronectin onto plasma-treated PTFE: influence of the conjugation strategy on fibronectin biological activity. Macromol Biosci., v.7, n.5, p.738-45, May. 2007.

VAN SWOL, R.L.; ELLINGER, R.; PFEIFER, J.; BARTON, N.E.; BLUMENTHAL, N. Collagen membrane barrier therapy to guide regeneration in Class II furcations in humans. J Periodontol., v.64, n.7, p.622-9, Jul. 1993.

WALTERS, S. P.; GREENWELL, H.; HILL, M; DRISKO, C.; PICKMAN, K.; SCHEETZ, J. P. Comparison of porous and non-porous Teflon membranes plus a xenograft in the treatment of vertical osseous defects: a clinical reentry study. J Periodontol., v.74, p.1161-8, Aug. 2003.

WANG, H.L.; GREENWELL, H.; FIORELLINI, J.; GIANNOBILE, W.; OFFENBACHER, S.; SALKIN, L.; TOWNSEND, C.; SHERIDAN, P.; GENCO, R.J.; RESEARCH, SCIENCE AND THERAPY COMMITTEE. Periodontal regeneration. J Periodontol., v.76, n.9, p.1601-22, Sep. 2005.

WANG, H.L.; MACNEIL, R.L. Guided tissue regeneration. Absorbable barriers. Dent Clin North Am., v.42, n.3, p.505-22, Jul. 1998.

WANG, H.L.; MIYAUCHI, M.; TAKATA, T. Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study. J Periodont Res., v.37, n.5, p.340-4, Oct. 2002.

WANG, H.L.; O'NEAL, R.B.; THOMAS, C.L.; SHYR, Y.; MACNEIL, R.L. Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating Class II furcation defects. J Periodontol., v.65, n.11, p.1029-36, Nov. 1994.

WARRER, K.; KARRING, T.; GOTFREDSEN, K. Periodontal ligament formation around different types of dental titanium implants. I. The self-tapping screw type implant system. J Periodontol., v.64, n.1, p.29-34, Jan. 1993.

WIKESJO, U. M.; SELVIG, K. A. Periodontal wound healing and regeneration. Periodontology 2000., v. 19, p. 21-39, 1999.

WIKESJÖ, U.M.; SELVIG, K.A. Periodontal wound healing and regeneration. Periodontol 2000., v.19, p.21-39, Feb. 1999.

WIKESJÖ, U.M.; SIGURDSSON, T.J.; LEE, M.B.; TATAKIS, D.N.; SELVIG, K.A. Dynamics of wound healing in periodontal regenerative therapy. J Calif Dent Assoc., v.23, n.12, p.30-5, Dec. 1995.

WOLF, G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. Nutr Rev., v.54, n.10, p.332-3, Oct. 1996.

WOLFF, L.F.; MULLALLY, B. New clinical materials and techniques in guided tissue regeneration. Int Dent J., v.50, n.5, p.235-44, Oct. 2000.

WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol., v.68, p.251-306. 1980.

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

ZANTOP, T.; GILBERT, T.W.; YODER, M.C.; BADYLAK, S.F. Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of Achilles tendon reconstruction. J Orthop Res., v.24, n.6, p.1299-309, Jun. 2006.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3970
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/05106/FORP/030406

Prezado(a) Professor(a),

Ref.: Processo n. 2006.1.222.58.2
Caae n. 0004.0.138.000-06

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 65ª Sessão realizada no dia 31 de março de 2006, deliberou **aprovar** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Regeneração tecidual guiada: Estudo da biocompatibilidade *in vitro* da membrana do compósito de poli (vinilideno-trifluoretileno)/titanato de bário"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria, na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final, ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria do Comitê, com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável, o **Relatório Parcial** no dia **31 de maio de 2007**, e o **Relatório Final** no dia **31 de maio de 2008**.

Atenciosamente,

Glauce Della Rosa

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. MÁRCIO MATEUS BELOTI

Professor Doutor do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - FORP/USP

GDR/bgcp