

Estado da publicação: Não informado pelo autor submissor

# RESPOSTAS TECIDUAIS E PADRÃO DE CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS PERIOSTAIS NA CALVÁRIA ENTRE DOIS TIPOS DE MEMBRANAS PRODUZIDAS POR MEIO DE BIOENGENHARIA: ESTUDO EM COELHOS

Josemael de Oliveira Ribas Filho, Allan Fernando Giovanini, Carlos Cesar Bof Bufon, Elora Sampaio Lourenço, Fernanda Piraja Figueiredo, Jurandir Marcondes Ribas Filho, Nicolau Gregori Czecko

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4328>

Submetido em: 2022-06-21

Postado em: 2022-06-21 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

## RESPOSTAS TECIDUAIS E PADRÃO DE CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS PERIOSTAIS NA CALVÁRIA ENTRE DOIS TIPOS DE MEMBRANAS PRODUZIDAS POR MEIO DE BIOENGENHARIA: ESTUDO EM COELHOS

*TISSUE RESPONSES AND HEALING PATTERN OF PERIOSTAL DEFECTS IN CALVARY BETWEEN TWO TYPES OF MEMBRANES PRODUCED THROUGH BIOENGINEERING: STUDY IN RABBITS*

Josemael de Oliveira **RIBAS-FILHO**<sup>1,2</sup>, Allan Fernando **GIOVANINI**<sup>1,2</sup>, Carlos Cesar Bof **BUFON**<sup>1,2</sup>, Elora Sampaio **LOURENÇO**<sup>1</sup>, Fernanda Piraja **FIGUEIREDO**<sup>1</sup>, Jurandir Marcondes **RIBAS-FILHO**<sup>1,2</sup>, Nicolau Gregori **CZECZKO**<sup>1,2</sup>

Trabalho realizado na <sup>1</sup>Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; <sup>2</sup>Hospital Universitário Evangélico Mackenzie, Curitiba, PR, Brasil

### ORCID

Josemael de Oliveira Ribas Filho - <https://orcid.org/0000-0002-9698-8118>

Allan Fernando Giovanini - <https://orcid.org/0000-0002-1637-2955>

Carlos Cesar Bof Bufon - <https://orcid.org/0000-0002-1493-8118>

Elora Sampaio Lourenço - <https://orcid.org/0000-0002-3281-0433>

Fernanda Piraja Figueiredo - <https://orcid.org/0000-0001-5982-7668>

Jurandir Marcondes Ribas Filho - <https://orcid.org/0000-0002-5251-7672>

Nicolau Gregori Czezko - <https://orcid.org/0000-0002-5926-150X>

### Correspondência:

Josemael de Oliveira Ribas Filho

Email: [josemaelfilho@gmail.com](mailto:josemaelfilho@gmail.com)

Conflito de interesse: Nenhum

Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

Este artigo como preprint possui endosso do Prof. Dr. Osvaldo Malafaia - <https://orcid.org/0000-0002-1829-7071>

### Contribuição dos autores

Conceituação: Josemael de Oliveira Ribas Filho

Análise formal: Nicolau Gregori Czezko

Investigação: Josemael de Oliveira Ribas Filho

Metodologia: Allan Giovanini

Administração do projeto: Josemael de Oliveira Ribas Filho

Supervisão: Elora Sampaio Lourenço, Fernanda Piraja Figueiredo

Redação (esboço original): Carlos Cesar Bof Bufon

Redação (revisão e edição): Jurandir Marcondes Ribas Filho

**RESUMO – Introdução:** Simultaneamente ao desenvolvimento de novos biomateriais, abundantes modalidades cirúrgicas têm sido propostas, com a finalidade de promover adequada regeneração de defeitos ósseos, sem proporcionar

fenestrações ou deiscências. Entre as técnicas regenerativas atualmente aceitas para este propósito, destaca-se a regeneração tecidual guiada (RTG). **Objetivo:** Avaliar o padrão de cicatrização e a resposta histológica do organismo frente à inserção de uma membrana a base de gelatina tipo A, e compará-la com membrana comercial. **Métodos:** Foram selecionadas 15 coelhas adultas. Na região parietal da calvária foram realizados retalhos para criação de uma bolsa supraperiosteal e implantação de 2 tipos de membranas reabsorvíveis: membrana Marquette e membrana Bio-Gide®. Após o procedimento cirúrgico os animais foram alocados em 3 grupos randomicamente selecionados (n=5) para o período de eutanásia, que ocorreu em 2, 4 e 6 semanas pós-operatórias. Posteriormente, as áreas da calvária foram removidas e coradas por H&E e analisadas para averiguar formação de perióstio, infiltrado inflamatório na área de inserção de membrana, degradação/reabsorção da membrana, e fibrose perimembranar. **Resultados:** Ao redor da membrana Bio-Gide® ocorreu discreta infiltração inflamatória e a membrana sofreu reabsorção ao decorrer do período pós-operatório com reconstrução de perióstio prevalentemente de caráter fibroso. A membrana Marquette também não desencadeou importante reação inflamatória. Contudo, não foi verificada reabsorção significativa durante o período, também ocorreu significativa formação de cápsula fibrosa cerceando toda área membranar. **Conclusão:** A membrana Marquette produz reação de isolamento tecidual, minimizando a formação periosteal ao mesmo tempo que não proporciona sua degradação.

**DESCRITORES** - Regeneração óssea guiada. Biomateriais. Reação tecidual. Biocompatibilidade tecidual.

**ABSTRACT – Introduction:** Simultaneously with the development of new biomaterials, numerous surgical modalities have been proposed, with the aim of promoting adequate regeneration of bone defects, without providing fenestrations or dehiscence. Among the regenerative techniques currently accepted for this purpose, guided tissue regeneration (GTR) stands out. **Objective:** To evaluate the healing pattern and the histological response of the organism to the insertion of a type A gelatin-based membrane, and to compare it with a commercial membrane. **Methods:** Fifteen adult rabbits were selected. In the parietal region of the calvaria, flaps were performed to create a supraperiosteal pouch and implantation of 2 types of resorbable membranes: Marquette membrane and Bio-Gide® membrane. After the surgical procedure, the animals were allocated into 3 randomly selected groups (n=5) for the period of euthanasia, which occurred at 2, 4 and 6 postoperative weeks. Subsequently, the calvaria areas were removed and stained by H&E and analyzed for periosteum formation, inflammatory infiltrate in the area of membrane insertion, membrane degradation/resorption, and perimembrane fibrosis. **Results:** A slight inflammatory infiltration occurred around the Bio-Gide® membrane and it underwent resorption during the postoperative period with periosteum reconstruction, predominantly of a fibrous nature. The Marquette membrane also did not trigger an important inflammatory reaction. However, there was no significant resorption during the period; there was also significant formation of fibrous capsule surrounding the entire membrane area. **Conclusion:** The Marquette membrane produces tissue isolation reaction, minimizing periosteal formation while not providing its degradation.

**KEYWORDS** - Guided bone regeneration. Biomaterials. Tissue reaction. Tissue biocompatibility.

## INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual, ou medicina regenerativa, é a área que se alicerça na aplicação de princípios das ciências biológicas e das engenharias de materiais no desenvolvimento de técnicas que promovam a expansão *in vitro* de células sobre um suporte de biopolímeros bioreabsorvíveis. Visa proporcionar a produção e o aperfeiçoamento de novos materiais que sejam biocompatíveis à natureza tecidual a ser reparada, e que também possam reunir elementos tissulares e celulares que, quando inseridos em áreas anatômicas receptoras, não incitam reação imunitária do enxerto contra o hospedeiro ou degradação tecidual. Constitui abordagem terapêutica fundamental que propõe solucionar consequências cirúrgicas de deformidades de alguns órgãos e *loci* teciduais perdidos por traumas, cistos ou ressecções tumorais (DRAGOO et al., 2003; GOUDY et al., 2009) cuja finalidade é proporcionar ambiente tecidual que mimetize a histofisiologia, homeostase e morfostase usual da região a ser regenerada (PLACE et al., 2009).

Diversos materiais, sejam de origem naturais ou sintéticos, vêm sendo propostos como de auxílio na reconstrução tecidual, como os derivados do colágeno animal ou o politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) (AYUB et al 2011; COSTA et al 2016). Nessa semântica, algumas membranas sintéticas têm sido testadas e utilizadas na ortopedia e na cirurgia craniofacial para regeneração tecidual guiada (RTG). Entende-se por RTG, especialmente na regeneração óssea guiada (ROG), o fato de permitir que células osteoprogenitoras possam se proliferar e migrar para a região do defeito ósseo e realizar a função de proteger *locus* ósseo contra a migração de um contingente celular não osteogênico, minimizando complicações reparadoras, como, por exemplo, deiscências e fenestrações ósseas (RETZEPI 2010; DIMITRIOU 2012).

Assim, inúmeros materiais vêm ganhando espaço no campo da RTG e aplicados frequentemente na terapêutica dos distúrbios que levam à perda óssea. As membranas não reabsorvíveis, como por exemplo o politetrafluoretileno expandido (e-PTFE), parece exibir boa propriedade biológica quanto à proteção e à invasão local de células não osteogênicas ao local a ser regenerado, e apresenta, também, facilidade de manipulação clínica. Porém, apresenta a desvantagem da obrigatoriedade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção do leito cirúrgico receptor, condição que proporciona maior morbidade. Por essa razão, o desenvolvimento de biomateriais poliméricos que sejam absorvíveis pelo tecido receptor sem perder a propriedade de RTG, vem sendo desenvolvido e testado principalmente em modelos animais (BUSER, 2010).

As membranas de colágeno parecem possuir ampla aceitação para uso clínico; todavia, apresentam como desvantagem sua origem heteróloga, sendo obtidas, por exemplo a partir de tecido dérmico de suínos, podendo proporcionar resposta inflamatória e reação à corpo estranho do organismo hospedeiro (LEE et al 2019).

Em contrapartida, as membranas de gelatina, desenvolvidas a partir do colágeno, têm recebido atenção especial. Em tese, as gelatinas derivadas do colágeno são submetidas às técnicas que buscam o aprimoramento físico e químico do material, buscando melhora da sua biocompatibilidade. Os resultados parecem ser promissores quando utilizadas em procedimentos de regeneração óssea guiada (ROG) (LAZÍĆ et al., 2014).

Baseado na perspectiva de que diversos pesquisadores procuram desenvolver materiais que possam substituir e reconstruir tecidos vivos, este estudo comparativo entre 2 membranas tem por objetivo: 1) desenvolver e inserir na literatura um novo

biomaterial gelatinoso produzido através de impressão 3D; 2) averiguar sua funcionalidade quanto à barreira física e biocompatibilidade; e 3) auxiliar a neoformação óssea e sua inserção nos tecidos adjacentes.

## MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil no. CAAE 1782/2017.

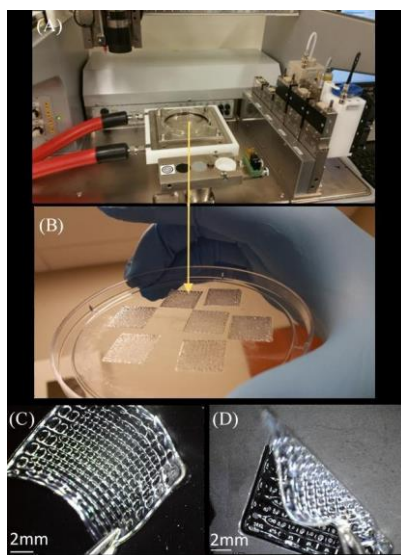
### Amostra

Foram selecionadas 15 coelhas brancas da raça Nova Zelândia, com idade variando de 180-300 dias, sem doenças prévias e com peso entre 2800-3500 g. Os animais foram condicionados em biotério durante toda a duração do experimento e tratados conforme os preceitos de ética no estudo dos animais.

### Membranas

A membrana teste utilizada foi produzida pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Marquette, na cidade de Milwaukee, Estados Unidos e desenvolvida pelo Instituto de Engenharia Biomédica, Departamento de Ciências da Engenharia, Universidade de Oxford e pela Faculdade de Odontologia da Universidade de Marquette, na cidade de Milwaukee. Tayebi et al. (2018), foram os que a idealizaram e construíram a membrana denominada aqui de Marquette (Figura 1). A membrana a ser testada foi confeccionada a base de gelatina (tipo A) proveniente da derme de suínos, espessa, estruturada e com criação de porosidades. A confecção também proporcionou camadas, as quais são multidirecionais, propriedade que visa criar estrutura organizada em forma de *scaffold* e permitir o crescimento e migração simultânea de diferentes tipos celulares em cada face membranar.

Em sua construção, após a solidificação do *scaffold* o material foi submetido à criação de ligações cruzadas por imersão em 12 mg/ml de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 1,5 mg/ml N-hidroxisuccinimida (NHS) em 90% solução de etanol por 4 h. Para remover o agente tóxico do processo de reticulação, os *scaffolds* foram embebidos por 3 h consecutivas em 1 litro de água deionizada, a qual foi substituída a cada hora. Após este processo, a desidratação foi realizada usando 50, 70 e 90% de etanol e armazenados em solução com 90% etanol em freezer a -20 °C até o uso, quando foram reidratados e lavados cuidadosamente como descrito acima.



Fonte: Tayebi L. et al 2018

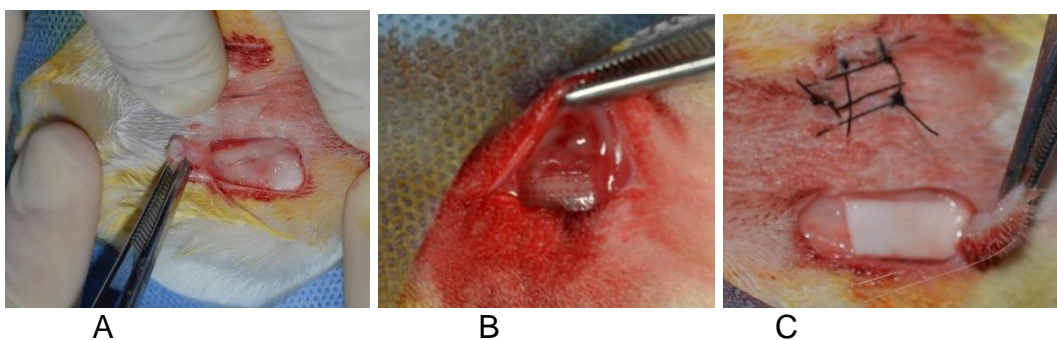
**FIGURA 1** – Processo de fabricação da membrana Marquette: A) impressora 3D; B) imagens macroscópicas dos “scaffolds” fabricados impressos em 3D imediatamente após a impressão; C e D) após a reticulação

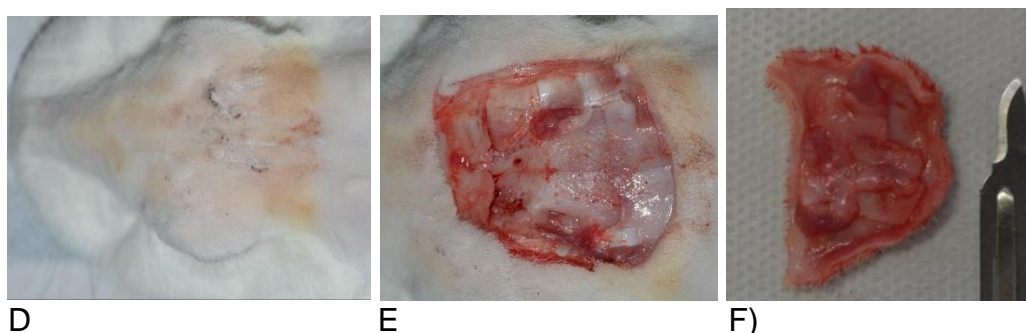
A membrana Bio-Gide® foi escolhida como controle devido sua vasta literatura associada à ROG e por já estar liberada para comercialização a vários anos.

#### **Procedimento cirúrgico**

Ele foi realizado pelo mesmo cirurgião e os animais foram anestesiados através da administração de solução estéril de cloridrato de cetamina 5% via intramuscular na proporção de 60 mg/kg e relaxante muscular cloridrato xilazina 2% via intramuscular na proporção de 10 mg/kg. Após a anestesia, foi realizada tricotomia na área de interesse cirúrgico, antissepsia com PVPI degermante e tópico.

Na área de calvária, na região frontal e parietal foi realizada infiltração local com 1 ml de lidocaína 2% associada à adrenalina 1:100.000 e 2 retalhos trapezoidais superficiais utilizando lâmina de bisturi no. 11 com aproximadamente 1 cm de aresta ao longo da calvária. Manteve-se a base de maior comprimento para possibilitar melhor nutrição dos retalhos. A confecção das bolsas supraperiostais se deu através da divulsão dos tecidos superficiais do periósteo com tesoura (Figura 2A). As bolsas foram preenchidas com membrana Marquette (Figura 2B) e Bio-Gide (Figura 2C), respectivamente e a sutura realizada em plano único com náilon 4-0.





**FIGURA 2** – A) Retalho na calvária e divulsão dos tecidos; B) membrana Marquette; C) membrana Bio-Gide; D) aspecto da cicatrização em 6 semanas; E) remoção da peça anatômica; F) peça anatômica no momento da eutanásia

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram transferidos para a sala de recuperação de procedimentos operatórios e, em seguida, mantidos no biotério no mesmo local e nas mesmas condições do pré-operatório. Para fins de analgesia, foi administrado cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg durante 7 dias, via intramuscular. Para fins de profilaxia antimicrobiana, foi administrado amoxicilina tri-hidratada na proporção de 20 mg/kg em dose única.

As eutanásias foram realizadas randomicamente (n=5) nos períodos de 2, 4 e 6 semanas pós-operatórias, através da administração de pentobarbital 100 mg/kg via intravenosa. Constatado o óbito, a região de interesse foi removida e acondicionada em solução de formalina 10% e encaminhados ao estudo histológico.

### **Procedimentos histológicos e histomorfométricos**

Após eutanásia, a porção do crânio contendo a pele e as áreas com membrana foram cuidadosamente removidas, deixando o perióstio intacto e cobrindo os fragmentos de membrana situados nos defeitos da calvária (Figuras 2E e 2F). Das amostras foram obtidos cortes seriados longitudinais, e de cada fragmento emblocado, foram obtidos 4 cortes seriados de 5 micrômetros, estendidos em lâmina de vidro e corados com H&E.

### **Análise das peças**

A análise histológica foi realizada por microscopia convencional e de luz para medir o diâmetro das peças e averiguar presença de área de membrana remanescente e de fibrose perimembranar, presença de membrana e grau de fibrose. Para delineamento da mensuração, um único histologista que não conhecia previamente o grupo a que pertencia cada espécime observado, realizou a avaliação microscópica e as medidas histopatológicas. Todas as imagens foram obtidas com câmera digital com resolução de 300 dpi acoplada a microscópio de luz com aumento original de  $\times 40$ . Produziu-se assim imagem virtual de 110,12 x 76,17 cm. Imagem digital composta de toda a área foi contada manualmente. Usando-se o software Image J (US National Institutes of Health) foi delineado o perímetro externo e interno da membrana e fibrose presentes em toda a área de interesse. Imagem de lâmina de 1000  $\mu\text{m}$  foi usada para calibrar todas as mensurações. Média das 3 medições para cada parâmetro foi calculada para cada amostra.

Dados, como infiltrado neutrofílico (agudo) e mononuclear (crônico), foram quantificados por escores determinados com base nas células contabilizadas na área perimembranar da seguinte forma: negativo = de 0-1%; positivo += entre 1-25%;

positivo ++=entre 25-50% positivo +++=maior que 50%.

### Análise estatística

Cada parâmetro foi avaliado dentro do período de monitoramento. A análise de Shapiro-Wilk foi utilizada para determinar a normalidade, seguida do teste não paramétrico de Kruskal Wallis para averiguar diferenças significativas entre os grupos. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

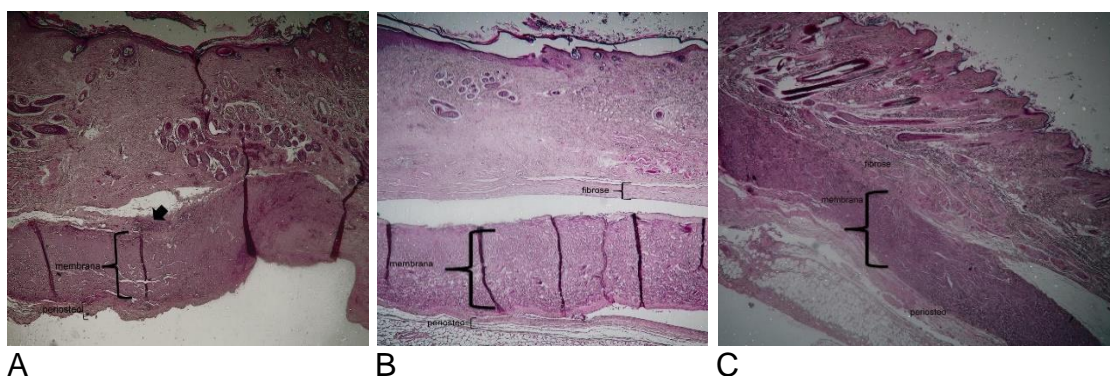
## RESULTADOS

Nenhum dos animais que fizeram parte deste estudo apresentaram deiscência dos pontos em pós-operatório. Como não havia exposição das membranas, todos os espécimes foram considerados para avaliação. As feridas e os animais foram tratados até o momento de eutanásia, as quais ocorreram em 2, 4 e 6 semanas do pós-operatório.

### Análise histológica

#### *Membrana Marquette*

Em 2 semanas foi verificado fragmento de pele com derme reticular e derme papilar com aspectos usuais composto por tecido conjuntivo, pelos quais permeavam glândulas sebáceas e folículos pilosos. Na derme profunda verificou-se membrana exógena íntegra, sem áreas sugestivas de degradação e invasão de tecido conjuntivo no interior da membrana. Periféricamente identificou-se discreta área de periósteo de aspecto fibroso, e áreas focais de processo inflamatório crônico de aspecto linfoplasmocitário periféricamente. Não foram observadas áreas de células gigantes multinucleadas, e a fibrose peri membranar foi discreta (Figura 3).



**FIGURA 3** –Aspecto histológico pós-operatório da membrana Marquette e tecido conjuntivo em: A) 2 semanas (seta aponta foco discreto de processo inflamatório perimembranar); B) 4 semanas, com cápsula de tecido conjuntivo destacada como fibrose; C) 6 semanas, com cápsula de tecido conjuntivo destacada como fibrose

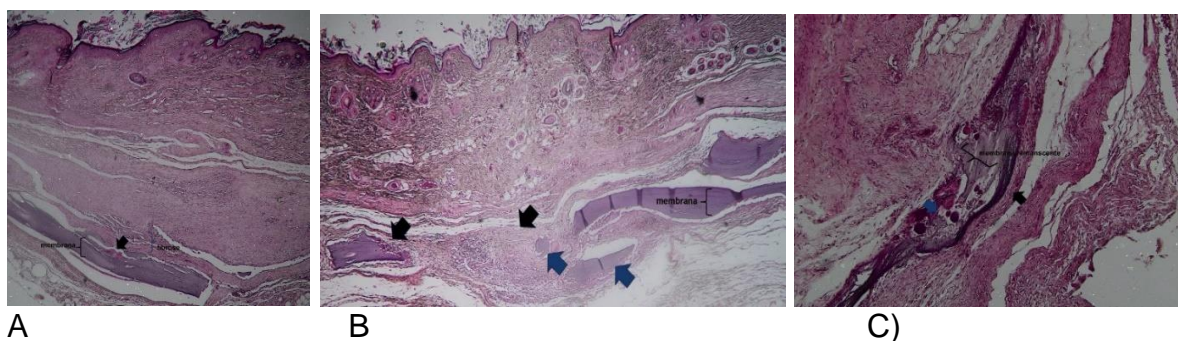
Em 4 semanas pós-operatório, o quadro histológico averiguado foi similar à segunda semana. A derme reticular apresentava maior fibrose com áreas sugestivas cicatriciais, com perda de tecido glandular. Na derme reticular profunda, a matriz membranosa era evidente. A membrana ainda se apresenta compacta sem áreas de penetração de tecido conjuntivo, regiões compatíveis com angiogênese ou presença de sítios de reabsorção. Notava-se periféricamente tecido conjuntivo denso, com

quadro de fibrose (Figura 3B), e área discreta de periósteo fibroso, composto por poucas células fusiformes, compatível com fibroblasto.

Em 6 semanas a matriz membranosa permanecia evidente. A membrana mantinha-se compacta com ausências de áreas sugestivas de reabsorção, migração de tecido conjuntivo ao interior membranar ou áreas de angiogênese. Notava-se perifericamente tecido conjuntivo denso, aumento de área de fibrose, composto por poucas células fusiformes, de aspecto fibroblástico (Figura 3C).

### *Bio-Gide*

Na 2ª. semana de análise foi verificado fragmento de pele com derme reticular e derme papilar com aspecto usuais, composto por tecido conjuntivo pelos quais permeavam glândulas sebáceas e folículos pilosos. Na derme profunda verificava-se membrana exógena íntegra, sem áreas sugestivas de degradação e invasão de tecido conjuntivo no interior da membrana. Perifericamente identificava-se discreta área de periósteo de aspecto fibroso e áreas focais de processo inflamatório crônico de aspecto linfoplasmocitário perifericamente. Não foi observada áreas de células gigantes multinucleadas e a fibrose perimembranar foi moderada (Figura 4A).



**FIGURA 4** – Membrana Bio-Gide: A) demonstra fragmento de pele, onde na derme profunda identifica-se membrana com áreas de reabsorção (seta) e fibrose circunjacente em 2 semanas; B) verificam-se áreas de reabsorção evidente (setas negras) e remanescente membranar (seta azul) em 4 semanas; C) remanescente de membrana verificando-se áreas de reabsorção e reentrância de tecido conjuntivo nas áreas de degradação do Bio-Gide (seta azul), e área de periósteo osteogênico, revelados por seta negra em 6 semanas.

Na 4ª. semana, o aspecto histológico revelou fragmento de pele com derme reticular e derme papilar com aspecto usuais, composto por tecido conjuntivo pelos quais permeavam glândulas sebáceas e folículos pilosos. Na derme profunda verificava-se membrana exógena com evidentes áreas de reabsorção (seta negra), ainda com remanescente de membrana em dissolução no interior de áreas sugestivas de degradação (seta azul). Evidenciava-se invasão de tecido conjuntivo entre as áreas, sítios de reabsorção de membrana, pelo qual verificou-se local de tecido de granulação de aspecto discreto e área de remodelação em periósteo fibroso foi verificado (Figura 4B).

Na 6ª. semana o aspecto histológico demonstrou que a derme reticular e a derme papilar mostravam-se com aspecto fibróticos, compostas por tecido conjuntivo denso não modelado de aspecto cicatricial. Na derme profunda verificava-se remanescente de membrana Bio-Gide com intensa área de reabsorção (seta negra), pela qual circundavam tecido conjuntivo com angiogênese e presença de células

gigantes tipo corpo estranho. Na face profunda do remanescente da membrana, verificava-se tecido sugestivo de periósteo, com reorganização em porção fibrosa e áreas sugestivas de periósteo osteogênico.

### Avaliação quantitativa (Tabelas 1 e 2)

Para análise quantitativa os parâmetros área de membrana remanescente e áreas de fibrose periósteo foram mensuradas em mm<sup>2</sup>.

**TABELA 1** - Mediana da área em mm<sup>2</sup>, valores mínimos e máximos, da presença de membrana e fibrose

|                  | Período   | Membrana           | Membrana           | p        |
|------------------|-----------|--------------------|--------------------|----------|
|                  |           | Marquette          | Bio-Gide           |          |
| Área de membrana | 2 semanas | 4,03 (4,01 – 4,07) | 5,03 (5,12 – 5,00) | p=0,06   |
|                  | 4 semanas | 3,41 (3,28 – 3,63) | 5,01 (5,32 – 4,89) | p=0,02   |
|                  | 6 semanas | 1,26 (1,42 – 0,96) | 4,93 (5,02 – 4,79) | p=0,0004 |
| Fibrose          | 2 semanas | 1,26 (1,11 – 1,42) | 1,13 (1,08 – 1,32) | p=0,09   |
|                  | 4 semanas | 3,26 (3,08 – 3,39) | 1,45 (1,08 – 1,32) | p=0,006  |
|                  | 6 semanas | 4,61 (4,44 – 4,69) | 2,18 (2,15- 2,31)  | p=0,002  |

**TABELA 2** – Revela escore do processo inflamatório na área perimembranar

|  | Período   | Membrana  | Membrana |
|--|-----------|-----------|----------|
|  |           | Marquette | Bio-Gide |
| Processo inflamatório agudo (neutrófilico) | 2 semanas | -         | +        |
|  | 4 semanas | -         | -        |
|  | 6 semanas | -         | -        |
| Processo inflamatório crônico              | 2 semanas | +         | +        |
|  | 4 semanas | -         | ++       |
|  | 6 semanas | -         | ++       |

## DISCUSSÃO

Nos procedimentos de RTG utilizam-se diversas membranas, como as de colágeno (KAMOI; IINO; ISHIGURO, 2006), com o intuito de impedir a migração de células epiteliais e derivadas do tecido conjuntivas para o interior do defeito, permitindo assim que células com potencial regenerativo, provenientes da área que cerceiam o periósteo e células endósteas, repovoem a região. Entretanto, para que uma membrana possa ser aplicada em RTG e obtenha sucesso, ela deve permitir a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, além de não proporcionar efeitos deletérios às células com as quais entrará em contato (WANG; MIYAUCHI; TAKATA, 2002).

Assim, para iniciar o processo de regeneração, o conteúdo celular, primeiramente, deve se aderir ao substrato membranar, para que em seguida ocorram os eventos de proliferação e diferenciação celular (GRINNELL, 1978). Evidências na literatura demonstram que a adesão celular sobre a superfície dos biomateriais é mediada por proteínas adsorvidas em sua superfície (FORGET et al., 2007; GRAFAHREND et al., 2008). Esta absorção, por sua vez, está relacionada à química, à topografia, e a energia de superfície do material (BOYAN et al., 1996).

Conforme já relatado anteriormente, a proposta deste trabalho foi avaliar a integração de uma membrana teste produzida através de bioimpressão 3D com os tecidos biológicos adjacentes e propor a sua utilização dentro da RTG. Segundo a literatura consultada, as vantagens deste biomaterial seriam a maior facilidade de produção em série com custo menor e maior disponibilidade de confecção em diferentes formatos (BAKARICH et al., 2010; SHIM et al., 2014; CHIA et al., 2015;

VANDEBURGH et al.,2016; WON et al.,2016; TAYEBI, et al., 2018; TURNBULL et al.,2018; MAROULAKOS et al., 2019).

Os resultados desejados seriam a eficácia clínica e biocompatibilidade tão boa quanto àquela conseguida pelas outras membranas já disponíveis no mercado e cuja utilização em RTG já é descrita na literatura. A reação de corpo estranho é algo que normalmente ocorre no emprego de membranas ou demais materiais no meio biológico, sendo o grau de resposta dependente do tipo de material, quantidade e do modo de fabricação (ANDERSON & RODRIGUEZ, 2008; MACLAUCHLAN et al., 2009; SHEIKH et al.,2015).

Quando se comparam as 2 membranas estudadas após 2 semanas, já é possível observar certo grau de reabsorção da membrana Bio-Gide, e praticamente nenhuma alteração na Marquette foi identificada.

Evidências substanciais parecem ser delineadas em 4 semanas quando se compara a Bio-Gide e a Marquette. Na Marquette foi identificado exuberante tecido conjuntivo denso, caracterizado como fibrose e evidente encapsulamento de toda a área de membrana, sem evidente degradação dela, situação que permaneceu *sine qua non* a avaliação histológica no período de 6 semanas pós-operatórias.

Estes resultados podem ser considerados como esperados, uma vez que encapsulamento e a resposta de corpo estranho sempre ocorrem, variando os graus de intensidade. A membrana teste (Marquette) mostrou-se ser de material menos reabsorvível quando comparado à de controle. É relevante ressaltar que o processo de degradação é processo complexo. Grizzi et al. (1995), usando diferentes placas de polímero polilactídeo amorfo, observaram que o processo de degradação membranar ocorre de forma heterogênea, e agrega a informação de que a adsorção do polímero ocorre centrifugamente, *i.e.*, ocorre de forma mais intensa no centro quando comparado à superfície, quando em contato com o meio aquoso, em tecido mesenquimais, como ocorreu no presente estudo. O padrão químico da degradação inicia-se por meio de hidrólise e conseqüentemente clivagem das ligações ésteres, induzindo decréscimo da massa molar membranar diminuindo a estequiometria e volume da membrana inserida.

Lam et al. (1994), confirmaram essa hipótese ao mostrarem que membranas não porosas de poliglicanos degradam mais rapidamente do que as porosas, pois no caso das membranas não porosas o efeito autocatalítico é favorecido enquanto para nas porosas ocorre a facilidade na dissolução dos produtos intrínsecos à membrana. É provável que a degradação ocorra na superfície devido ao gradiente de absorção de água, mas pode se dissolver mais facilmente no centro quando comparado com os locais distantes do centro da membrana e todo esse efeito parece ser simultâneo à concentração de grupos finais carbonila, os quais aumentam no centro e passam a catalisar o processo degradativo. Essa teoria pode ser sugerida na membrana Bio-Gide, a qual mostrou padrão centrifugo de degradação e explica em parte a falta de degradação na membrana Marquette, a qual apresenta-se de caráter porosa.

É sobrepujante dizer que o processo de degradação hidrolítica pode proporcionar a redução da massa molar, perda de tensão e perda de massa, simultaneamente. Neste contexto, primeiramente a água infiltra pelo polímero e compromete a integridade de suas cadeias poliméricas causando cisão por hidrólise e a degradação do polímero. Este fenômeno é de crucial importância, pois determina o tipo e a intensidade da resposta biológica ao biomaterial implantado, pois a ocorrência de partículas poli, oligo e monoméricas liberadas durante a degradação do polímero *in vivo* está diretamente correlacionada com mudança no tipo e intensidade da resposta inflamatória.

Além disso, a própria fagocitose dos fragmentos remanescentes, também atua como importante fator na modificação da resposta inflamatória. A fagocitose modifica o processo funcional do macrófago, que é o pivô na resposta inflamatória no tecido e na reação de corpo estranho. As células gigantes observadas nesta fase são formadas pela fusão de macrófagos. A fagocitose de fragmentos também pode causar morte celular e a liberação do conteúdo destas células mortas pode causar reação inflamatória aguda (Hyon, 1984; Lam et al., 1995). É importante destacar, que a medida em que ocorre, o quadro inflamatório contribui para a formação do tecido de granulação na área inflamada e secreção de citocinas VEGF, e TGF-1 e, em conjunto, proporcionam anfigênese e formação neovascular na área a ser regenerada, bem como atuam na diferenciação celular, a qual inclui a área periostal. Essas teorias criam explicação plausível, para o desenvolvimento e reparo perimembranar à medida em que a membrana se dissolve.

Diferentemente dessas perspectivas, a degradação e reação imune não foi observada na membrana Marquette. O fenômeno da falta de reação imune não é clara. Contudo, segundo Takata et al. (2001), a baixa adesão celular sobre uma membrana, pode estar relacionada à sua reduzida capacidade de adsorver proteínas, ao seu baixo grau de hidratação e à sua topografia.

Interessante, a membrana Marquette é polimérica desenvolvida a partir de um gel de gelatina, proteína comumente solúvel obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno. Para sua obtenção, inicialmente, foi realizado pré-tratamento químico com rompimentos das ligações não-covalentes, condição que favorece a desorganização da estrutura macromolecular e rompimento das pontes de hidrogênio. Essa última situação proporciona desestabilidade na tripla hélice proteica, mas com a capacidade de produzir géis estáveis em temperaturas abaixo de 40 °C - como ocorre na temperatura corpórea -, sendo que este gel é termorreversível. Por estar completamente desnaturada, a gelatina pode apresentar-se como agente emulsificante (GOMÉZ-GUILLÉN et al., 2011).

A emulsificação é processo químico onde transforma agente polar em apolar. Esse fenômeno proporciona um núcleo hidrofóbico o qual repulsa eletricamente a água da área membranar, minimizando o fenômeno de hidrólise.

Associado a este processo, deve-se ressaltar que os compostos gelatinosos são materiais muito biocompatíveis, impedindo adesão de proteínas do sistema complemento, condição *sine qua non* para atração de processo inflamatório local. Talvez essa condição, bem como seu armazenamento e a porosidade possam ter influenciado o resultado neste estudo, uma vez que o processo inflamatório e a degradação (hidrolítica) foram minimizadas.

Essas condições tornam a membrana Marquette, insuficiente para RTG, uma vez que impede o desenvolvimento para a formação periostal, e há necessidade de sua remoção cirúrgica, o que aumenta a morbidade do paciente.

## CONCLUSÃO

O menor grau de fibrose ao redor da membrana e maior taxa de reabsorção foi encontrada na Bio-Gide. Portanto, nas condições reproduzidas neste estudo, a membrana Marquette não se mostrou superior no ponto de vista de biocompatibilidade. Fator que pode estar associado a este resultado é a arquitetura do *scaffold*, pois o tamanho e a direção das suas porosidades afetam diretamente a migração e interação celular da região devido à particularidade que cada tecido possui, como os tipos de células, pH ou suprimento sanguíneo.

## REFERÊNCIAS

1. ALVAREZ-LORENZO, Carmen; BLANCO-FERNANDEZ, Barbara; PUGA, Ana M.; et al. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 9, p. 1148–1171, 2013.
2. ANDERSON, James M.; RODRIGUEZ, Analiz; CHANG, David T. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, v. 20, n. 2, p. 86–100, 2008.
3. AYUB, Lauro Garrastazu; NOVAES JÚNIOR, Arthur Belém; GRISI, Márcio Fernando de Moraes et al. *Revista Periodontia*, v. 21, n. 04, p. 8, 2011.
4. BACELAR, Ana H.; SILVA-CORREIA, Joana; OLIVEIRA, Joaquim M.; et al. Recent progress in gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 4, n. 37, p. 6164–6174, 2016.
5. BAKARICH, Shannon E.; GORKIN, Robert; IN HET PANHUIS, Marc; et al. Three-Dimensional Printing Fiber Reinforced Hydrogel Composites. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 6, n. 18, p. 15998–16006, 2014.
6. BENAM, Kambez H.; DAUTH, Stephanie; HASSELL, Bryan; et al. Engineered In Vitro Disease Models. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 10, n. 1, p. 195–262, 2015.
7. BOYAN, B. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, v. 17, n. 2, p. 137–146, 1996.
8. BUSER, D. Vinte Anos de Regeneração óssea guiada na implantodontia. ed. São Paulo: Editora Santos, 2009.
9. CAMELO M, NEVINS M L, SCHENK R K, SIMION M, RASPERINI G, LYNCH S E, NEVINS M. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, v. 18, n. 4, p. 321-31, 1998.
10. CHAN, B. P.; LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, v. 17, n. S4, p. 467–479, 2008.
11. CHANG, Yung-Chi; WANG, Zhipeng; FLAX, Lindsay A.; et al. glycosaminoglycan Binding Facilitates Entry of a Bacterial Pathogen into Central Nervous Systems. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 6, p. e1002082, 2011.
12. CHIA, Helena N; WU, Benjamin M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering*, v. 9, n. 1, p. 4, 2015.
13. COSTA, J. B. Z. O Uso De Membranas Biológicas Para Regeneração Óssea Guiada Em Implantodontia. *Revista Bahiana de Odontologia*, p. 8, 2016.
14. CUI, Xiaofeng; BOLAND, Thomas. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*, v. 30, n. 31, p. 6221– 6227, 2009.
15. DIMITRIOU, Rozalia; MATALIOTAKIS, George I; CALORI, Giorgio Maria; et al. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Medicine*, v. 10, n. 1, p. 81, 2012.
16. DRAGOO, Jason L.; CHOI, Joon Y.; LIEBERMAN, Jay R.; et al. Bone induction byBMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 21, n. 4, p. 622–629, 2003.
17. ENIWUMIDE, Joshua O.; TANAKA, Masaru; NAGAI, Nobuhiro; et al. The Morphology and Functions of Articular Chondrocytes on a Honeycomb- Patterned Surface. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–10, 2014.
18. FORGET, G.; LATXAGUE, L.; HEROGUEZ, V.; et al. RGD nanodomains grafting onto titanium surface. In: 2007 29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Lyon, France: IEEE, 2007, p. 5107–5110. Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/document/4353489/>. Acesso em: 25 jul. 2021.
19. GHAEEMMAGHAMI, Amir M.; HANCOCK, Matthew J.; HARRINGTON, Helen; et al. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 17, n. 3–4, p. 173–181, 2012.
20. GILBERT, S.F. *Developmental Biology*: 6ª edição, Sunderland: Sinauer Associates Inc, 2000.
21. GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.
22. GOUDY, Steven; LOTT, David; BURTON, Richard; et al. Secondary Alveolar Bone Grafting: Outcomes, Revisions, and New Applications. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, v. 46, n. 6, p. 610–612, 2009.
23. GRAFAHREND, Dirk; CALVET, Julia Lleixa; KLINKHAMMER, Kristina; et al. Control of protein adsorption on functionalized electrospun fibers. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 101, n. 3, p. 609–621, 2008.
24. GRIFFITH, Linda G.; SWARTZ, Melody A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 3, p. 211– 224, 2006.
25. GRINNELL, F.; Cellular Adhesiveness and Extracellular Substrata, *International Review of Cytology*, v. 53, p. 65-144, 1978.
26. GRIZZI, I; GARREAU, H; LI, S; et al. Hydrolytic degradation of devices based on poly[m-lactic acid) size-dependence. v. 16, n. 4, p. 7, 1995.
27. GU, Qi; HAO, Jie; LU, YangJie; et al. Three-dimensional bio-printing. *Science China Life Sciences*, v. 58, n. 5, p. 411–419, 2015.
28. GUARINO, Vincenzo; CAUSA, Filippo; AMBROSIO, Luigi. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Review of Medical Devices*, v. 4, n. 3, p. 405–418, 2007.

28. GUILLEMOT, Fabien; SOUQUET, Agnès; CATROS, Sylvain; et al. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. *Nanomedicine*, v. 5, n. 3, p. 507–515, 2010.
29. GUNGOR-OZKERIM, P. Selcan; INCI, Ilyas; ZHANG, Yu Shrike; et al. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*, v. 6, n. 5, p. 915–946, 2018.
30. HYON, S.-H.; JAMSHIDI, K.; IKADA, Y. Melt Spinning of Poly-L-Lactide and Hydrolysis of the Fiber in Vitro. In: SHALABY, Shalaby W.; HOFFMAN, Allan S.; RATNER, Buddy D.; et al (Orgs.). *Polymers as Biomaterials*. Boston, MA: Springer US, 1984, p. 51–65. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-2433-1\\_5](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-2433-1_5)>. Acesso em: 25 jul. 2021.
31. INAMDAR, Niraj K; BORENSTEIN, Jeffrey T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 681–689, 2011.
32. KAI, Dan; PRABHAKARAN, Molamma P; JIN, Guorui; et al. Guided orientation of cardiomyocytes on electrospun aligned nanofibers for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 98B, n. 2, p. 379–386, 2011.
33. KAMOI, Kyuichi; IINO, Masako; ISHIGURO, Hitomi. Regeneration therapy for oral disease. *Human Cell*, v. 19, n. 2, p. 76–82, 2006.
34. KIM, June Sic; SINGH, Vivek; LEE, Jun Ki; et al. Automated 3-D extraction and evaluation of the inner and outer cortical surfaces using a Laplacian map and partial volume effect classification. *NeuroImage*, v. 27, n. 1, p. 210–221, 2005.
35. LAM, K. H.; SCHAKENRAAD, J. M.; GROEN, H.; et al. The influence of surface morphology and wettability on the inflammatory response against poly(L-lactic acid): A semi-quantitative study with monoclonal antibodies. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 29, n. 8, p. 929–942, 1995.
36. LANGER R., VACANTI J. P., *Tissue Engineering*. Science v. 260 p. 920- 926, 1993.
37. LEE, Dae Hoon; TAMURA, Atsushi; ARISAKA, Yoshinori; et al. Mechanically Reinforced Gelatin Hydrogels by Introducing Slidable Supramolecular Cross-Linkers. *Polymers*, v. 11, n. 11, p. 1787, 2019.
38. LIU, Jianing. Chapter Twelve - Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. p. 43,
39. MACLAUCHLAN, S.; SKOKOS, E.A.; MEZMARICH, N. et al. Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 85, n. 4, p. 617–626, 2009.
40. MALTMAN, Daniel J.; PRZYBORSKI, Stefan A. Developments in three- dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. *Biochemical Society Transactions*, v. 38, n. 4, p. 1072–1075, 2010.
41. MAROULAKOS, Michael; KAMPEROS, George; TAYEBI, Lobat; et al. Applications of 3D printing on craniofacial bone repair: A systematic review. *Journal of Dentistry*, v. 80, p. 1–14, 2019.
42. MATTEI, G.; DI PATRIA, V.; TIRELLA, A.; et al. Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 2, p. 875–882, 2014.
43. MATTEI, G; TIRELLA, A; AHLUWALIA, A. Functionally Graded Materials (FGMs) with Predictable and Controlled Gradient Profiles: Computational Modelling and Realisation. *Functionally Graded Materials*, p. 22, .
44. MATTEI, G.; VOZZI, G. CFD modelling of a mixing chamber for the realisation of functionally graded scaffolds. *Computers & Chemical Engineering*, v. 84, p. 43–48, 2016.
45. MELCHELS, Ferry P. W.; DHERT, Wouter J. A.; HUTMACHER, Dietmar W.; et al. Development and characterisation of a new bioink for additive tissue manufacturing. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, n. 16, p. 2282, 2014.
46. MIYAGAWA, Shigeru; SAITO, Atsuhiko; SAKAGUCHI, Taichi; et al. Impaired Myocardium Regeneration With Skeletal Cell Sheets—A Preclinical Trial for Tissue-Engineered Regeneration Therapy. *Transplantation*, v. 90, n. 4, p. 364–372, 2010.
47. MURPHY, Sean V; ATALA, Anthony. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, v. 32, n. 8, p. 773–785, 2014.
48. OSTROVIDOV, Serge; ANNABI, Nasim; SEIDI, Azadeh; et al. Controlled Release of Drugs from Gradient Hydrogels for High-Throughput Analysis of Cell–Drug Interactions. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 3, p. 1302–1309, 2012.
49. PAMPALONI, Francesco; STELZER, Ernst HK. Three-Dimensional Cell Cultures in Toxicology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 26, n. 1, p. 117–138, 2009.
50. PHILLIPPI, Julie A.; MILLER, Eric; WEISS, Lee; et al. Microenvironments Engineered by Inkjet Bioprinting Spatially Direct Adult Stem Cells Toward Muscle- and Bone-Like Subpopulations. *Stem Cells*, v. 26, n. 1, p. 127–134, 2008.
51. PLACE, Elsie S.; EVANS, Nicholas D.; STEVENS, Molly M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, v. 8, n. 6, p. 457–470, 2009.
52. RETZEPI, Maria; LEWIS, Mark P.; DONOS, Nikolaos. Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration: Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation. *Clinical Oral Implants Research*, v. 21, n. 1, p. 71–79, 2010.
53. ROTHAMEL, Daniel; SCHWARZ, Frank; SAGER, Martin. Et al. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, n. 3, p. 369–378, 2005.
54. ROUWKEMA, Jeroen; GIBBS, Susan; LUTOLF, Matthias P.; et al. In vitro platforms for tissue engineering:

- implications for basic research and clinical translation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 5, n. 8, p. e164–e167, 2011.
55. SCHACHT, Kristin; JÜNGST, Tomasz; SCHWEINLIN, Matthias; et al. Biofabrication of Cell-Loaded 3D Spider Silk Constructs. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 54, n. 9, p. 2816–2820, 2015.
  56. SCHUURMAN, Wouter; LEVETT, Peter A.; POT, Michiel W.; et al. Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs: Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication .... *Macromolecular Bioscience*, v. 13, n. 5, p. 551–561, 2013.
  57. SHEIKH, Zeeshan; BROOKS, Patricia; BARZILAY, Oriyah; et al. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. *Materials*, v. 8, n. 9, p. 5671–5701, 2015.
  58. SHIM, Jin-Hyung; YOON, Min-Chul; JEONG, Chang-Mo; et al. Efficacy of rhBMP-2 loaded PCL/PLGA/  $\beta$  -TCP guided bone regeneration membrane fabricated by 3D printing technology for reconstruction of calvaria defects in rabbit. *Biomedical Materials*, v. 9, n. 6, p. 065006, 2014.
  59. SUNAMI, Hiroshi; YOKOTA, Ikuko; IGARASHI, Yasuyuki. Influence of the pattern size of micropatterned scaffolds on cell morphology, proliferation, migration and F-actin expression. *Biomater. Sci.*, v. 2, n. 3, p. 399–409, 2014.
  60. TAKATA, Takashi; WANG, Hom-Lay; MIYAUCHI, Mutsumi. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *Journal of Periodontal Research*, v. 36, n.5, p. 322–327, 2001.
  61. TAYEBI, Lobat; RASOULIANBOROUJENI, Morteza; CUI, Zhanfeng; et al. 3D-printed thick structured gelatin membrane for engineering of heterogeneous tissues. *Materials Letters*, v. 217, p. 39–43, 2018.
  62. TERESA RAIMONDI, Manuela. Engineered Tissue as a Model to Study Cell and Tissue Function from a Biophysical Perspective. *Current Drug Discovery Technologies*, v. 3, n. 4, p. 245–268, 2006.
  63. TURNBULL, Gareth; CLARKE, Jon; PICARD, Frédéric; et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, v. 3, n. 3, p. 278–314, 2018.
  64. VANDERBURGH, Joseph; STERLING, Julie A.; GUELCHER, Scott A. 3D Printing of Tissue Engineered Constructs for In Vitro Modeling of Disease Progression and Drug Screening. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 45, n. 1, p. 164–179, 2017.
  65. VEPARI, Charu; KAPLAN, David L. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 8–9, p. 991–1007, 2007.
  66. WANG, H.-L.; MIYAUCHI, M.; TAKATA, T. Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study: Osteoblast attached to GBR membranes. *Journal of Periodontal Research*, v. 37, n. 5, p. 340–344, 2002.
  67. WON, J-Y; PARK, C-Y; BAE, J-H; et al. Evaluation of 3D printed PCL/PLGA/  $\beta$  -TCP versus collagen membranes for guided bone regeneration in a beagle implant model. *Biomedical Materials*, v. 11, n. 5, p. 055013, 2016.
  68. XING, Qi; YATES, Keegan; VOGT, Caleb; et al. Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels by Divalent Metal Ion Removal. *Scientific Reports*, v. 4, n. 1, p. 4706, 2015.
  69. ZHU, Junmin; MARCHANT, Roger E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*, v. 8, n. 5, p. 607–626, 2011.
  70. ZITZMANN, Nicola U; NAEF, Roger; SCHÄRER, Peter. Resorbable Versus Nonresorbable Membranes in Combination With Bio-Oss for Guided Bone Regeneration. p. 20, 1997.
  71. ZONG, X; BIEN, H; CHUNG, C; et al. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials*, v. 26, n. 26, p. 5330–5338, 2005.
  72. ZORAN, Lazić; MARIJA, Bubalo; RADOMIR, Milović; et al. Comparison of Resorbable Membranes for Guided Bone Regeneration of Human and Bovine Origin. *Acta Veterinaria*, v. 64, n. 4, p. 477–492, 2014.

## Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.