



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

VINICIUS DA SILVA FERNANDES

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE MEMBRANA
CORTICAL ABSORVÍVEL DE OSSO BOVINO (GENDERM)
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA INSTALADAS EM
DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIAS DE RATOS**

Araçatuba – SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

VINICIUS DA SILVA FERNANDES

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE MEMBRANA
CORTICAL ABSORVÍVEL DE OSSO BOVINO (GENDERM)
PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA INSTALADAS EM
DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIAS DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – UNESP, como
parte dos requisitos para a obtenção
do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Farnezi Bassi

Araçatuba – SP

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, com amor e gratidão, Patrícia Regina da Silva, que sempre me apoiou e me deu todo suporte nos estudos e na vida. Agradeço também, a todos meus familiares e amigos, que estiveram ao meu lado nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho.

À minha Orientadora Prof.^a Dr.^a **Ana Paula Farnezi Bassi**, pela oportunidade e dedicação, que nos anos de convivência, com carinho e atenção muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico intelectual, sendo uma inspiração como ser humano.

À Prof.^a Dr.^a **Daniela Ponzoni**. Sua habilidade e experiência cirúrgica foram essenciais para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. **Leonardo Perez Faverani**, pelos ensinamentos, paciência e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. **Francisley Ávila Souza**, exímio profissional, que muito me ensinou.

Muito Obrigado!

Avaliação histomorfométrica de membranas absorvíveis para regeneração óssea guiada instaladas em defeitos ósseos críticos de calvárias de ratos.

RESUMO

O uso de membranas que auxiliem no processo de regeneração óssea guiada (ROG) é também uma vertente dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam nesse processo de reparo. O objetivo do trabalho é avaliar por meio de estudo microscópico e histomorfométrico, regeneração óssea guiada utilizando membranas de origens diferentes em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Foram utilizados 36 ratos Albinus Wistar divididos em 3 grupos, sendo 6 animais para cada grupo: grupo controle somente com coágulo; grupo controle positivo (Bio-Gide[®]), e grupo experimental que recebeu a membrana cortical de osso bovino (Gen-Derm[®]). Os períodos experimentais foram de 30 e 60 dias. Os resultados histomorfométricos deste trabalho apontaram que a membrana de colágeno suíno apresentou melhores índices de neoformação óssea. Contudo a membrana de cortical bovina auxiliou no processo de regeneração óssea guiada mostrando que é adequada para procedimentos de ROG.

Palavras-Chave: Materiais biocompatíveis, regeneração, osso, membrana.

Histomorphometric assessment of absorbable membranes for guided bone regeneration in critical-size defects of rat calvaria.

ABSTRACT

The use of membranes that aid in the guided bone regeneration (GBR) process is also a part of compatible biomaterials studies that aid in this repair process. The objective is to compare different membranes used in critical-size defect of rat calvaria through assessment of GBR, histomorphometric reactions. Materials and Methods: 36 male albinuswistar rats were divided into three groups: control group without membrane (only blood clot/negative control); porcine collagen membrane group (Bio-Gide®/positive control); group that received bovine cortical membrane (GenDerm®/experimental group). The animals were euthanized at 30 and 60 days postoperatively. The histomorphometric results showed that porcine collagen membranes presented better newly bone formation values, however the bovine cortical membrane also assisted in the GBR. The GenDerm membrane analysed in this study promoted guided bone regeneration.

Key words: Biocompatible materials, regeneration, bone and bones, membranes

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	PROPOSIÇÃO	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.	RESULTADOS	13
•	4. 1. Avaliação morfológica (microscópica):	13
•	4. 2. Análise histométrica.....	16
5.	DISCUSSÃO	18
6.	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

Uma vez que o elemento dental se encontra ausente no processo alveolar, desencadeia irreversíveis reabsorções ósseas. A ausência de osso em rebordos alveolares é um fator determinante na reabilitação do indivíduo na instalação dos implantes dentários, sendo consequência de traumatismos dento alveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita, ou outras patologias que envolvam a cavidade oral. Esta perda óssea é uma limitação para a reabilitação com implantes, pois volume ósseo insuficiente compromete a estabilidade inicial (Magro-Filho; Bassi; Garcia-Júnior, 2003).

A Odontologia, em seu enfoque reabilitador, tem uma demanda grande na área dos biomateriais, devido à necessidade frequente na região bucomaxilofacial (Oliveira ET al., 2005). Varias pesquisas têm sido feitas tanto na área médico, quanto odontológica, para encontrar substâncias naturais ou sintéticas que possam repor o tecido perdido. Encontramos relatos antigos na literatura que nos demonstram a utilização de substâncias, como marfim, osso seco, ouro, fio de ouro, ligas de prata, entre outros materiais. A partir de 1800 já utilizavam compostos sintéticos para substituição óssea, como o sulfato de cálcio em defeitos ósseos. Atualmente, devido ao desenvolvimento tecnológico dos biomateriais, aliado ao avanço dos conhecimentos sobre tecido ósseo, é possível direcionar seletivamente a formação óssea controlando assim não somente a qualidade, mas também quantidade de osso no local desejado. Contudo, um dos desafios da odontologia moderna está em encontrar o melhor substituto ósseo através de pesquisa do material de implante ideal para substituição do enxerto ósseo autógeno (Carvalho et al., 2010).

O osso autógeno é considerado o “padrão-ouro” na escolha dos materiais para enxerto, devido as suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas (Becker et al., 1995). Porém, sua desvantagem está na necessidade da criação de outro sítio cirúrgico no local doador, muitas vezes, contraindicando sua utilização. (Taga, 1996)

O material/biomaterial de enxerto ideal teria as propriedades descritas do osso autógeno sem a necessidade da remoção cirúrgica em uma área doadora. (BECKER et al., 1995). O uso de membranas que auxiliem no processo de

regeneração óssea guiada (ROG) é uma vertente dos estudos de biomateriais compatíveis que auxiliam no processo de reparo.

A técnica denominada de Regeneração Óssea Guiada (ROG), se baseia no conceito de osseopromoção e é caracterizado pelo uso de meios físicos para promover um selamento de um local anatômico. Esse selamento serve para prevenir que outros tecidos, principalmente o tecido conjuntivo, invadam a região uma vez que sua formação é mais rápida que a do tecido ósseo, interferindo na osteogênese. A ROG também auxilia no direcionamento da formação óssea (Acevedo-Andrade R et al.,).

Desta forma a membrana é colocada em contato direto com o defeito ósseo circundante posicionando o periósteo sobre a mesma. A literatura mostra que certos tecidos no interior do organismo possuem potencial biológico para regeneração, sempre que exista um ambiente adequado durante a cicatrização¹⁴. As principais indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG são: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais¹⁵; alvéolos após exodontias¹⁶; deiscência e fenestrações após colocação de implantes mediatos e imediatos¹⁷.

Estão disponíveis no mercado uma gama grande de biomateriais, sejam sintéticos ou biológicos, apresentando diversos tamanhos de partículas e principalmente classificados quanto ao seu modo de ação. (Carvalho, Violin, Bassi, 2004).

2. PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar por meio da análise histomorfométrica o potencial osteopromotor de membrana cortical osso bovino (GenDem[®]), em comparação com a membrana Porcina (Bio-Guide[®]) no processo de regeneração óssea guiada instaladas em defeitos ósseos críticos de calvárias de ratos aos 30 e 60 dias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento dessa pesquisa, foi utilizado um total de 36 ratos (*Rattusnovergicusalbinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em três grupos (n=12 por grupo), submetidos à eutanásia em dois momentos do experimento, aos 30 e 60 dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba–UNESP. Sendo assim, em cada animal foi realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8 mm), como discriminado a seguir:

GRUPO COÁGULO (Controle Negativo) – n=12: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo sem o recobrimento do defeito, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).

GRUPO GONTROLE POSITIVO (Bio-Gide® Geistlich Wolhusen, Switzerland) - n=12: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia);

GRUPO EXPERIMENTAL (membrana de cortical bovina - GenDerm® Baumer, Mogi Mirim/SP, Brasil) - n=12: O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito uma membrana de cortical bovina, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).

Cirurgia Experimental

Os animais foram mantidos em jejum pré-operatório de doze horas e submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular, com Cloridrato de Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,7ml/Kg e 0,3ml/Kg, respectivamente. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os

procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Em seguida foi realizada a tricotomia na região da calvária, antissepsia com PolivinilPirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, RiodeineDegermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis.

Foram realizadas incisões em V no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2 cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha). Em seguida com auxílio de broca Trefina de 7 mm de diâmetro interno (3i Implantinnovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 7 mm de diâmetro, na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter (Figura01). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos somente com coágulo sanguíneo e os demais grupos preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino (Grupo Controle Positivo: Bio-Gide® – n=12) ou com uma membrana de cortical bovino delgada (grupo experimental: GenDerm® - n=12))(Figura02).

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água ad libitum.

Figura. 01- A. Acesso cirúrgico a calvária. B. Defeito ósseo de 8mm de diâmetro criado no centro da calvária envolvendo a sutura sagital, representada pela linha tracejada vermelha. Remoção da cortical da região de calvária.

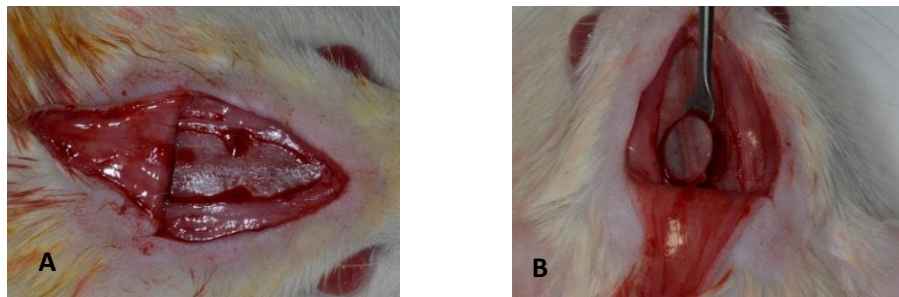


Figura 2. Defeito crítico de 8mm. A Coágulo. B. Controle Positivo -Membrana de colágeno porcino (Bio-Guide® GeistlichWolhusen, Switzerland). C. Grupo Experimental -Membrana de cortical bovina (GenDerm® Baumer, Mogi das Cruzes/SP).



A eutanásia dos animais ocorreu nos períodos de 30 e 60 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico. As calvárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. Posteriormente, as calvárias foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberão cortes de 6µm de espessura e serão montadas em lâminas. As lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

4. RESULTADOS

4. 1. Avaliação morfológica (microscópica):

Os resultados foram avaliados por meio de microscópio óptico com padronização da leitura das lâminas do grupo controle, grupo controle positivo (Bio-Gide® GeistlichWolhusen, Switzerland), grupo experimental (GenDerm®, Baumer, Mogi das Cruzes/SP/Brasil). (Figuras 03 e 04)

GRUPO CONTROLE (GC) - Sem membrana

30 dias: Neste período o Grupo Coágulo apresentava uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado. Observa-se áreas de osteotomia com os cotos ósseos esquerdo e coto direito com discreta neoformação óssea em suas margens. Ao centro do defeito crítico, entre os cotos, é possível notar ausência de neoformação óssea com o defeito ósseo preenchido por tecido conjuntivo fibroso.

60 Dias: Nota-se uma maior aproximação dos cotos do defeito, contudo, sem o fechamento do defeito, sendo o espaço preenchido por um tecido conjuntivo fibroso.

GRUPO CONTROLE POSITIVO (Bio-Gide® - GeistlichWolhusen)

30 Dias: Verifica-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeado por fragmentos da membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® - GeistlichWolhusen, Switzerland). Na observação das lâminas nota-se a presença de neoformação óssea a partir dos cotos ósseos e no centro do defeito, com a presença de remanescente da membrana entre a área de tecido ósseo neoformado e o tecido conjuntivo organizado sobre a membrana remanescente. Em alguns espécimes verificou-se o fechamento do defeito.

60 Dias: Há imagens da neoformação óssea tanto no coto esquerdo quanto no coto direito como centro do defeito eram as mesmas dos animais sacrificados com 30 dias, mas com imagem mais nítida de tecido ósseo neoformado preenchendo praticamente toda a cavidade. Verifica-se também a presença de membrana remanescente, tecido conjuntivo fibroso bem organizado.

GRUPO EXPERIMENTAL (GenDerm®Baumer, Mogi das Cruzes/SP)

30 dias: Área defeito ainda se encontra não reparado, com tecido ósseo em neoformação em direção ao centro do defeito. As imagens em maior aumento demonstram áreas de neoformação óssea ao redor dos fragmentos de membrana.

60 dias: Presença de neoformação óssea em grande parte do defeito, mas sem o fechamento completo do mesmo. Praticamente não se nota a presença mais de fragmentos da membrana. Em um espécime houve o fechamento completo do defeito.

Figura 03 Cortes histológicos panorâmicos corados em eosina e hematoxilina, mostrando a área total do defeito com uso de membranas (Bio-Gide, GemDerm e coágulo). Aumento original de 6,3X.

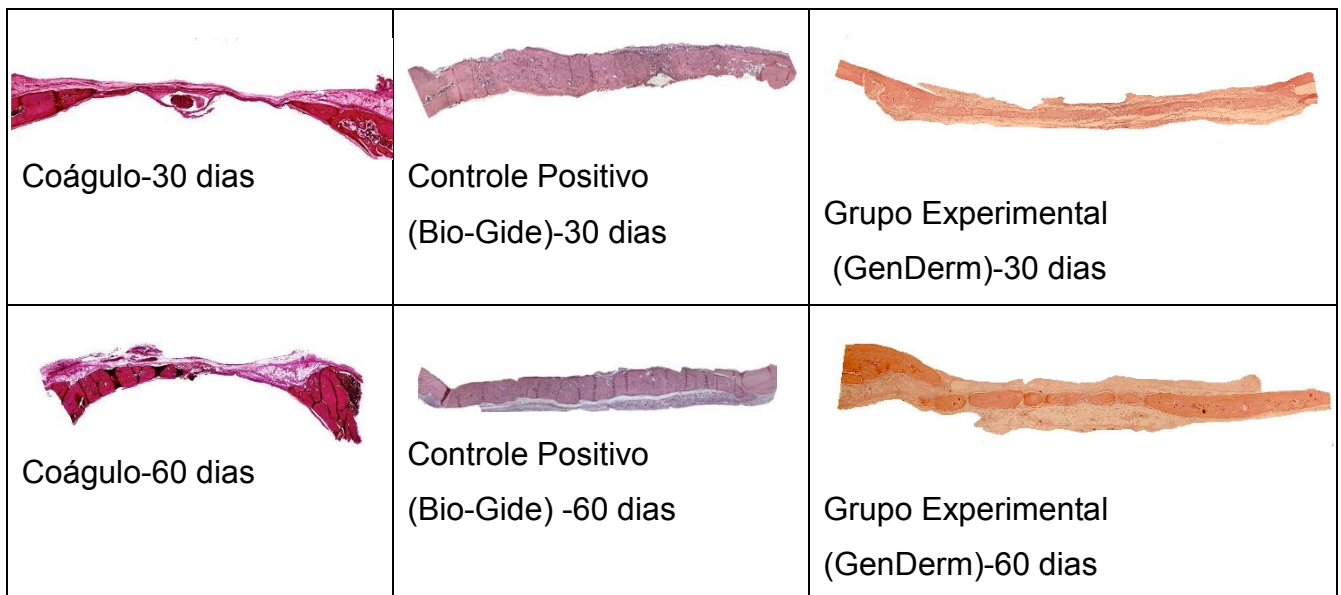
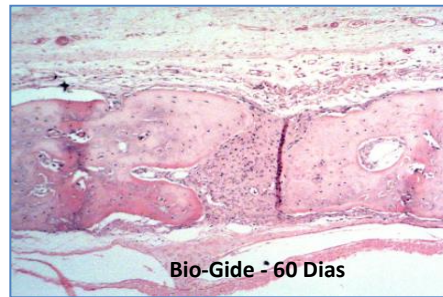
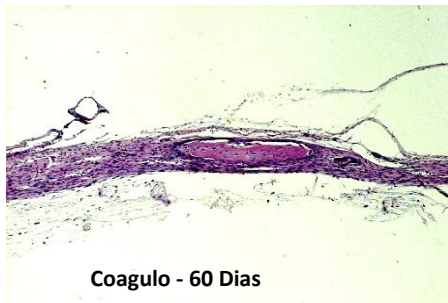
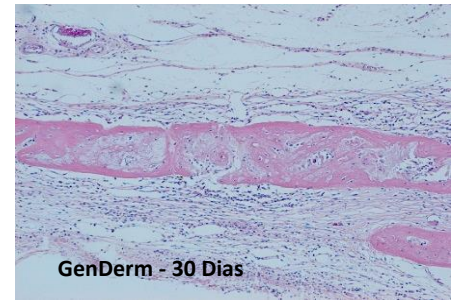
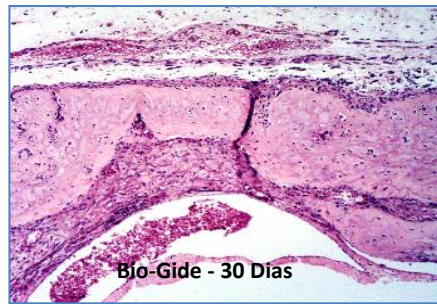
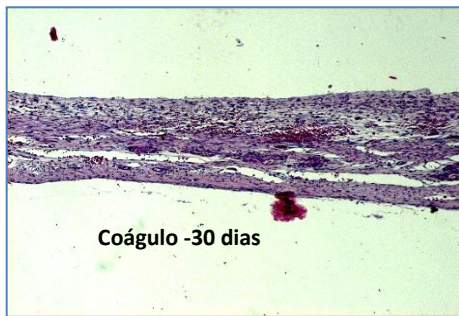


Figura 04 – Fotomicrografias de cortes corados com HE, 30 e 60 dias pós-operatório em maior aumento (Grupos controle negativo, controle positivo e experimental). Aumento original de 12,5.



4. 2. Análise histométrica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck &Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

Foi avaliada a área de tecido ósseo presente na região central dos defeitos ósseos. Os dados obtidos nas análises foram transformados em valores absolutos, de pixels, para valores porcentuais relativos, de modo a minimizar a interferência da diferença do tamanho do negativo.

Todos os testes foram realizados no programa estatístico Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Inc., San Josealifornia, USA). Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), o qual identificou se tratar de

dados homogêneos ($p>0,05$). Assim, o teste ANOVA 2 fatores foi aplicado para as interações “membranas versus períodos”. Todas as interações mostraram alterações significantes estatisticamente ($p<0,05$). Adicionalmente, para a identificação precisa das alterações estatísticas, o pós-teste Tukey foi aplicado, em que para todos os testes, o nível de significância de 5 % foi considerado.

Na avaliação histométrica da evolução cronológica do reparo ósseo (análise intragrupos), o grupo experimental (GenDerm®) apresentou maior área de neoformação óssea aos 60 dias em comparação ao período inicial (30 dias) ($p<0,05$). Os resultados do grupo Coagulo e controle positivo (BioGide®) se mostraram similares na comparação entre os dois períodos analisados ($p>0,05$).

Gráfico 1 . Área de osso neoformado para os grupos experimentais aos 30 dias.

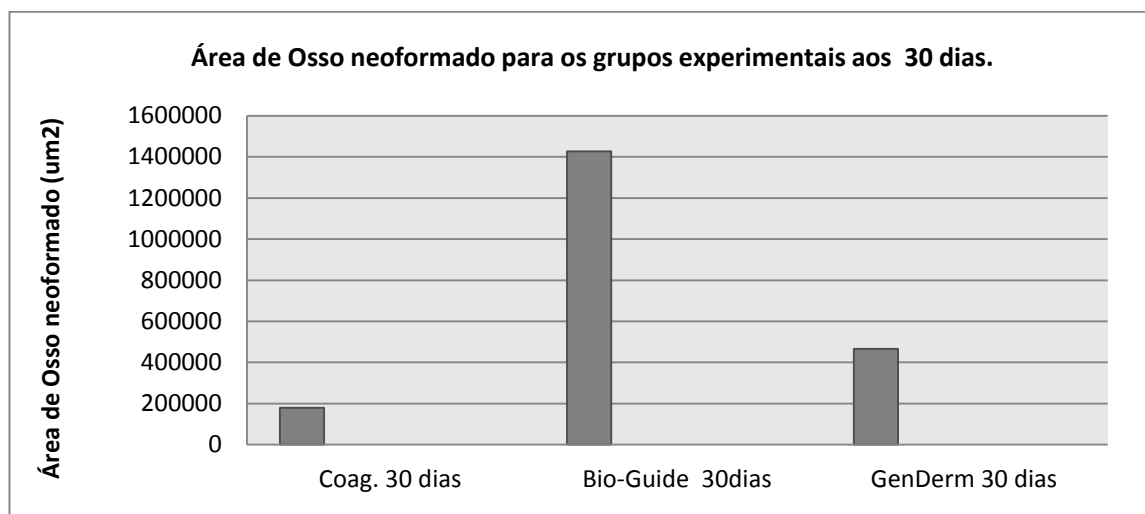
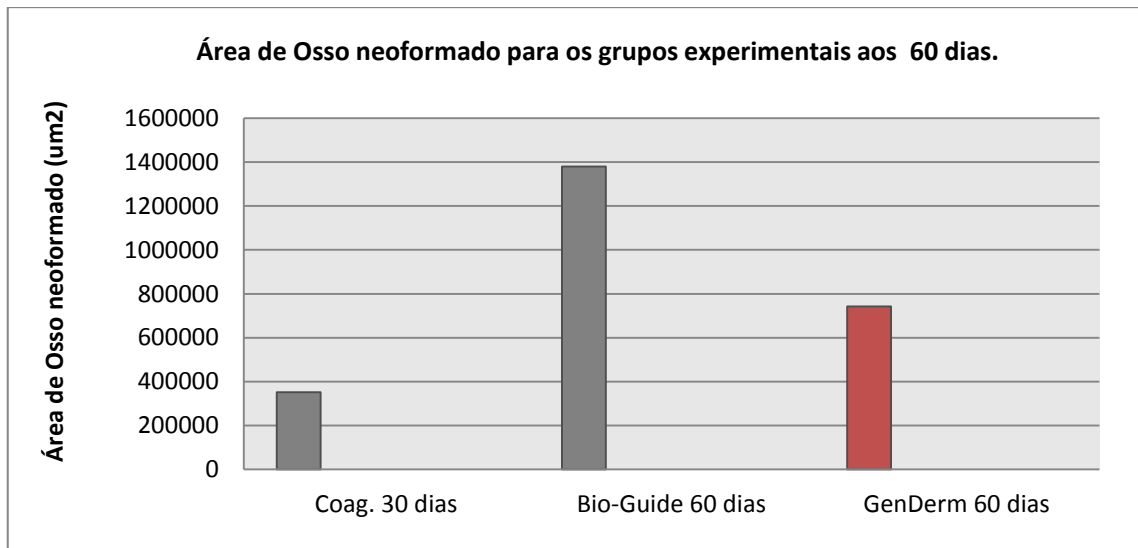


Gráfico 2 . Área de osso neoformado para os grupos experimentais aos 60 dias.



5. DISCUSSÃO

O objetivo primário da ROG é a obtenção de uma regeneração óssea bem sucedida na área de defeito ósseo com alta previsibilidade e baixo risco de complicações. Secundariamente procura-se com a ROG obter um resultado bem sucedido com menor número de intervenções cirúrgicas, baixa morbidade para o paciente e um período de reparo diminuído. É notório que nos últimos 20 anos, progressos significativos ocorreram no desenvolvimento de técnicas e material para que a ROG ocorra de forma esperada (PARL et al., 2008; BUSER 2010).

Quando é realizado defeito controle (coágulo sem membrana), o processo de reparo ocorre de forma padrão, ou seja, a formação óssea fica restrita às margens dos defeitos, sendo que o centro do defeito fica reparado por um tecido conjuntivo fibroso. Quando uma membrana é utilizada, está resulta em uma mudança na quantidade de osso e regeneração tecidual, ou seja, o espaço criado durante a cirurgia separou o compartimento interno do externo, sendo que o interno preenchido inicialmente por coágulo sanguíneo passa por um processo de cicatrização e no final há maior neoformação óssea dos grupos onde a membrana foi utilizada em relação ao grupo sem membrana (SCHENT et al., 1994).

A questão é: Existem diferenças no padrão e na quantidade de neoformação óssea com diferentes tipos de membranas? Atualmente existe no mercado uma grande variedade de membranas para ROG. Para selecionar o material mais adequado, estes deverão estar baseados nas necessidades clínicas, além de ter que apresentar algumas características básicas, entre elas a biocompatibilidade, oclusão celular, integração tecidual, formação e manutenção do espaço, manejo clínico na cirurgia e suscetibilidade limitada às complicações (SHENT, 2000; WERKMEISTER; BUSER, 2000).

Pelo resultado obtido nesta pesquisa foi possível observar que a membrana denominada como grupo controle positivo (Bio-Gide®) manteve seu alto nível de atuação já tão bem descrito na literatura como em Pati et al.(2012) e Behfarnia et al .(2012), em comparação com a membrana teste. O colágeno apresenta muitas vantagens como biomaterial. Além de poder ser preparado em diferentes formas como membranas, filmes e esferas, apresentam como características biológicas: não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade,

facilmente absorção pelo corpo e baixa antigenicidade (PATI et al., 2012; VAISSIERE et al., 2000).

No entanto, seu custo de purificação é extremamente alto e, quando isolado, apresenta alguma variabilidade quanto ao tamanho das fibras, impurezas e densidade de ligações cruzadas que estabilizam a estrutura de suas fibrilas³⁸. Além disso, o colágeno causa alternância no comportamento celular, sofre contração e suas propriedades mecânicas são inadequadas, por isso devem ser manuseados com cuidado (VAISSIERE et al., 2000; KICHARIZ, 1992). Outro fator é a variabilidade do colágeno dependendo da fonte, impurezas, variabilidade na degradabilidade enzimática e propriedades de manipulação complexa (SHEIKH et al., 2017).

Desta forma, buscar alternativas de materiais que possam assumir a função de barreira é importante. Os resultados obtidos nesta pesquisa pelo grupo experimental (GenDerm[®]) mostra que são adequadas para procedimentos de ROG como também demonstrou Oliveira et al 2004. Este fato ficou demonstrado quando é avaliada tanto a histologia quanto a histometria, resultado este que está em concordância com os obtidos por Bernabé et al.(2012).

6. CONCLUSÃO

Dentro da metodologia empregada foi possível concluir que as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram a ROG em defeitos críticos em calotas de ratos. O grupo controle positivo (Bio-Guide) obteve melhor comportamento biológico e maior índice de neoformação óssea no processo. O grupo experimental (GenDerm®) apresentou maior área de regeneração óssea aos 60 dias em comparação ao período inicial (30 dias), ocorrendo uma mudança na quantidade de osso e regeneração tecidual. Assim, há maior neoformação óssea dos grupos onde a membrana foi utilizada em relação ao grupo sem membrana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Park JW et al. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2008; 87: 203-
2. Buser D. 20 anos de regeneração óssea guiada na implantodontia. Quintessence Editora, 2ª edição, São Paulo/SP, 2010, 261p.
3. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: A histologic study in canine mandible. *Int. J. Oral maxillofac Implants*. 1994;9(1):13-29
4. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: A reality. *Periodontol* 2000.1998 17:22-35.
5. Werkmeister JA.; Ramshaw JA. Collagen-based biomaterials. *Mater.*, v. 9, ed. 3-4, 1992, p.137-138.
6. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodntol* 2001;72:215-229
7. BehfarniaP,MohammadKhorasani M,Birang R, Abbas FM. Histological and histomorphometric analysis of animal experimental dehiscence defect treated with three bio absorbable GTR collagen membrane *Dent Res J (Isfahan)*. 2012 Sep-Oct; 9(5): 574–581.
8. Pati F,Datta P,Adhikari B; Dhara S; Ghosh K.; Mohapatra PKD. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility.Mohapatra J. of Biomed. Mat. Res., Part A. 2012,100 (4), p. 1068-1079, 2012.
9. Vaissiere, G; Chevallay B; Herbage D; Damour O. Comparative

analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. Med. Biol. Eng. Comput.2000, v. 38, ed. 2, p. 205-210.

10. Kucharz EJ.The Collagens: biochemistry and pathophysiology. Biosynthesis of Collagen,Ed. Springer-Verlag Berlin, 1992, p. 31-53.
11. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynpas M,Ganss B,Glogaue M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. Biomaterials Research (2017) 21:9, 1-20
12. Bernabé PFE, Melo LGN, Cintra LTA, Gomes-Filho JE, Dezan Jr E, Nagata MJH. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or acombination of both materials: ahistological and histometric study inrat tibiae. Clin. Oral Impl. Res. 2012, 23,384–388
13. .Magro-Filho O, Bassi APF, Garcia-Junior, IR. Utilização experimental de implante heterógeno de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído, na reconstrução do assoalho orbitário: análise histológica em ratos. Revista Odontologica de Araçatuba, v.25, n.1, p.60-4,.
14. Silveira RL; Machado RA; OLIVEIRA RB; Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe v.5, n.4, p. 31 - 36, outubro/dezembro 2005
15. Becker, W. et al. The use of e-PTFE barrier23Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe v.5, n.2, p. 19 - 24, abril/junho 2005 membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. Int. j. oral maxillofac. implants, Lombard, vol. 9, p. 31-40, 1994.

16. Taga, R. et al. Destino da membrana de cortical óssea bovina colocada em posição subperiosteal na calvária de cobaia. Revista Brasileira de Implantodontia, Niterói, v. 3, n. 6, p. 24-29, nov./dez. 1997.
17. Carvalho PSP, Violin LA, Bassi APF. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. Implant News 2004;1:255-60.
18. Taga, E. M. Biomateriais para uso em clínica médica odontológica. Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia, Curitiba, v. 3, n. 1, p.59-70, jul./ago. 1996.
19. Carvalho, A. C. P. et al. Membrana óssea descalcificada implantada em contato com osso e em tecido conjuntivo subcutâneo: análise histológica em ratos. Revista Brasileira de Implantodontia e Prótese sobre Implantes, Curitiba, v. 10, n. 38, p. 137-141, abr./jun. 2003.

