

REABSORÇÃO ÓSSEA GUIADA EM CALVÁRIA DE RATOS USANDO-SE MEMBRANAS DE CORTICAL ÓSSEA BOVINA

**Stéfani Caroline Ferrioli¹, Ana Maira Pereira Baggio², Vinícius Ferreira Bizelli³,
Edith Umasi Ramos⁴, Ana Paula Farnezi Bassi⁵**

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/ FOA-UNESP
(stefani.ferrioli@hotmail.com)

² Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/FOA-UNESP,
(anamairabaggio@gmail.com)

³ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / FOA-UNESP,
(viniciusbizelli@gmail.com)

⁴ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / FOA-UNESP,
(yassed_20@hotmail.com)

⁵ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / FOA-UNESP,
(ana.bassi@unesp.br)

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 foi avaliar e comparar por meio de estudo microscópico histológico e histomorfométrico o potencial de regeneração óssea de membranas de origens e espessuras diferentes em defeitos críticos criados em calvária de ratos. Para realizar a pesquisa, foram utilizados 48 ratos Albinus Wistar divididos em quatro grupos, (n = 12): GC – grupo livre de membrana (somente coágulo, controle negativo); BG – grupo membrana de colágeno porcino, (Bio-Gide® - controle positivo); GD – grupo membrana de cortical óssea bovina mais delgada (Gen-Derm® - grupo teste 1) e GDF - grupo membrana de cortical óssea bovina mais espessa (Gen-Derm Flex® - grupo teste 2). As eutanásias foram realizadas nos períodos experimentais de 30 e 60 dias pós-operatórios. Os dados quantitativos da análise histométrica foram submetidos aos testes de ANOVA 2-fatores e pós teste Tukey p<0.05; intervalo de confiança 95%. Os resultados histomorfométricos da membrana de cortical óssea bovina mais espessa (GDF) aos 30 e 60 dias foram promissores, demonstrando ótima capacidade de neoformação óssea (p<0.05). O grupo GD apresentou resultados inferiores em ambos períodos experimentais, sendo superado pelos grupos BG e GDF (p>0.05), contudo, também auxiliou no processo de ROG. No entanto, todas as membranas estudadas nesta pesquisa promoveram a ROG, sendo que esse processo foi melhor nos grupos controle positivo e teste 2.

Palavras-chave: Biomateriais; Regeneração Óssea Guiada; Membrana absorvíveis.

1 INTRODUÇÃO

A busca por biomateriais compatíveis, capazes de suprir as necessidades de uma regeneração óssea, bem como também cumprir as exigências para promover uma reconstrução físico biológica em defeitos ósseos tem sido um grande desafio ao longo dos anos, não só na odontologia como também em diversas outras áreas da saúde. Portanto, várias linhas de pesquisas são criadas, buscando provar a eficácia desses materiais. Uma vez que provada essa eficácia, estes biomateriais são utilizados para reestabelecer a dimensão óssea adequada, usando-se enxertos e membranas, em defeitos ósseos, que podem ter sido causados por alterações traumáticas, fisiológicas ou razões patológicas, e com isso, o paciente possa ser reabilitado posteriormente (Lazzara et al.,1989; Jovanovic et al.,1992).

A técnica denominada de Regeneração Óssea Guiada (ROG), se baseia no conceito de osteopromoção 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 et al.,2004).

Desta forma a membrana é colocada em contato direto com o defeito ósseo circundante posicionando o perióstio 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 cicatrização (Schenk et al.,1994). As principais indicações do uso das membranas biológicas em processos de ROG são: correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais (Cortellini et al.,1993); alvéolos após exodontias (Wilson et al.,1993) deiscência e fenestrações após colocação de implantes mediatos e imediatos (Becker et al., 994).

Para neoformação óssea ser completa pela ROG, devem existir as seguintes condições: fonte de células osteogênicas (osso viável adjacente ao defeito); fonte adequada de vascularização; o local da ferida deve permanecer mecanicamente estável durante a cicatrização, já que os micromovimentos poderão influenciar no tecido a ser formado, deve existir um espaço apropriado entre a membrana e a superfície óssea, impedindo o colapso da membrana neste espaço e desta forma que este seja preenchido por um coágulo sanguíneo, já que nele as células osteogênicas irão se multiplicar; as membranas devem possuir propriedades de permeabilidade que permita a difusão de plasma e nutrientes, porém não a passagem de

células não osteogênicas; biocompatibilidade da membrana; proteger a delicada rede vascular durante a organização do coágulo (Phillips et al.,1990).

Para criação e manutenção do volume desse espaço bem como de uma geometria adequada, a membrana deve suportar seu peso e resistir à pressão dos tecidos adjacentes e forças externas, como a mastigação. O colapso da membrana está diretamente relacionado com a eliminação do espaço. A manutenção do espaço durante todo processo de cicatrização depende, também, da integridade física da membrana. Uma membrana deve ter rigidez suficiente (memória), para criar o espaço, entretanto deve também adaptar-se ao contorno ósseo, permitindo que retorne à sua forma, já que o mesmo não possui memória. Quanto melhor a adaptação da membrana, mais completa será a regeneração (Buser et al., 1990; Schmitz et al.,2000).

A natureza física e a quantidade de fragmentos gerados por degradação por hidrólise podem ter um efeito significativo na resposta tecidual local, podendo conduzir à uma reabsorção óssea (Hardwick et al.,1995). Assim muitos fatores podem interferir na biodinâmica óssea e no reestabelecimento do arcabouço ósseo e a forma de ação desses fatores irão interferir diretamente no reestabelecimento do tecido ósseo neoformado assim como nos resultados estéticos-funcionais. (Stal et al., 2001).

Recentemente foi lançado no mercado uma membrana de cortical bovina com uma diferença de espessura com a finalidade de melhorar o processo de ROG. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a ação osteopromotora de 3 tipos de membranas existentes, baseado na metodologia da confecção de defeitos críticos provocados em calvária de ratos (Park et al.,2009).

2 MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Animal processo FOA: 00217-2016 e seguiu as orientações do ARRIVE Guidelines. (Anexo I e II)

Foi utilizado um total de 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos (3 a 4 meses), com aproximadamente 200g a 300g, os quais foram divididos em quatro grupos (n=12 por grupo), submetidos à eutanásia em dois períodos experimentais, aos 30 (n=6) e 60 (n=6) dias após a cirurgia. Estes animais foram mantidos em gaiolas (3 animais por gaiola), 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. Em cada animal será realizado um defeito ósseo crítico na calvária (8mm), como discriminado a seguir:

- **GRUPO CG (Controle Negativo)** – n=12: O defeito ósseo crítico será 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 BG (GONTOLE POSITIVO)** (Bio-Guide® Geistlich Wolhusen, Switzerland) - n=12: O defeito ósseo crítico será 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 GD (teste 1)** – (Gem-Derm® Baumer, Mogi Mirim/SP, Brasil) - n=12: O defeito ósseo crítico será preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito uma membrana de cortical óssea bovina delgada, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).
- **GRUPO GDF (teste 2)** – (Gem-Derm Flex® Baumer, Mogi Mirim/SP, Brasil) – n=12: O defeito ósseo crítico será preenchido com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de cortical óssea bovina espessa, sendo 6 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (30 e 60 dias após a cirurgia).

A divisão dos grupos experimentais foi realizada pelo método de randomização com loteria manual, no qual, em um envelope, foram colocados 48 papeis com a nomenclatura de cada grupo. Sendo assim, os animais foram sorteados aleatoriamente.

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 associado à Xilazina, 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, antisepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante, associado ao PVPI tópico e aposição de campos estéreis.

Foram realizadas realizada incisão em V no sentido occipito-frontal de aproximadamente 2cm, com lâmina nº 15 montada em cabo de bisturi nº 3 e o descolamento

total do retalho com descolador tipo Molt. Em seguida com auxílio de broca trefina de 7mm de diâmetro interno acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% foi confeccionado um defeito cirúrgico crítico de 8mm de diâmetro (Furlaneto et al.,2007), na porção central da calvária envolvendo a sutura sagital, mantendo-se a integridade da dura-máter. De acordo com os tratamentos propostos em cada grupo, os defeitos foram preenchidos. Grupo GC somente com coágulo sanguíneo e os demais grupos preenchidos com coágulo sanguíneo e sobre o defeito colocado uma membrana de colágeno porcino para o grupo BG (Bio-Guide[®] - n=12), com uma membrana de cortical bovino delgada para o grupo GD (Gem-Derm[®] - n=12) e com a membrana de cortical bovina mais espessa para o grupo GDF (Gem-Derm Flex[®] - n=12).

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon) com pontos interrompidos no plano mais externo. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

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 ósseo, depois, incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6µm de espessura sendo assim, montadas em lâminas histológicas para realizar a coloração em hematoxilina e eosina.

2.1 Análise Histológica

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).

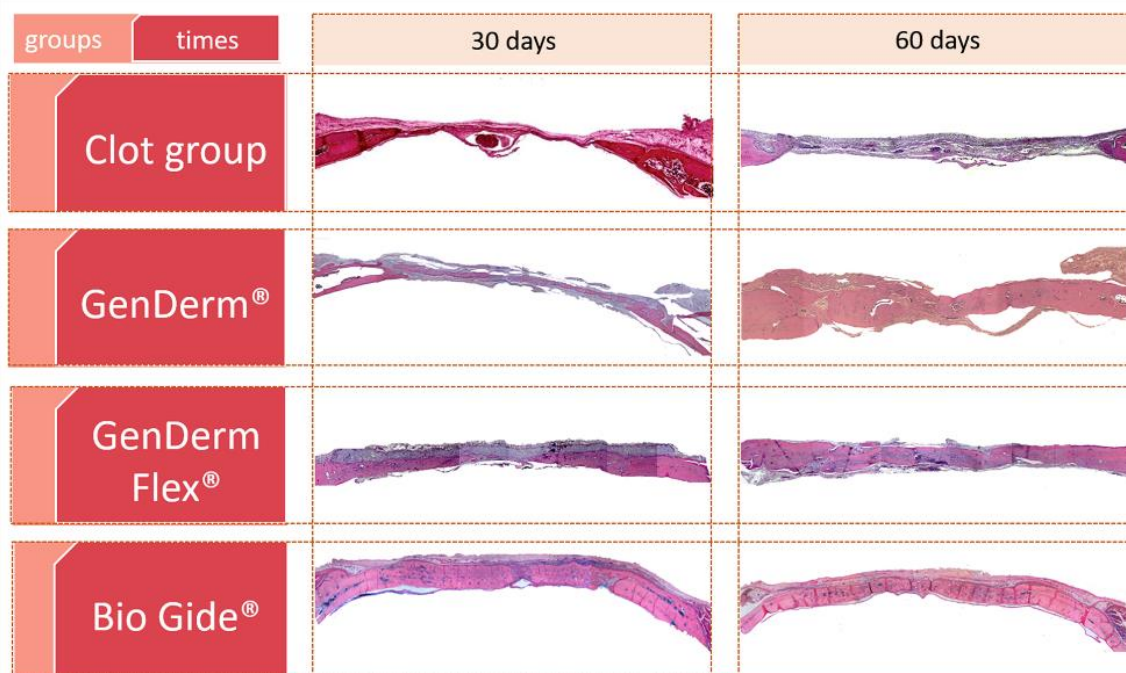
Todos os testes foram realizados no programa estatístico Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Inc., San Jose alifornia, USA). Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk), o qual identificou se tratar de dados homogêneos ($p > 0,05$). Assim, o teste ANOVA 2 fatores foi aplicado 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação morfológica (microscópica)

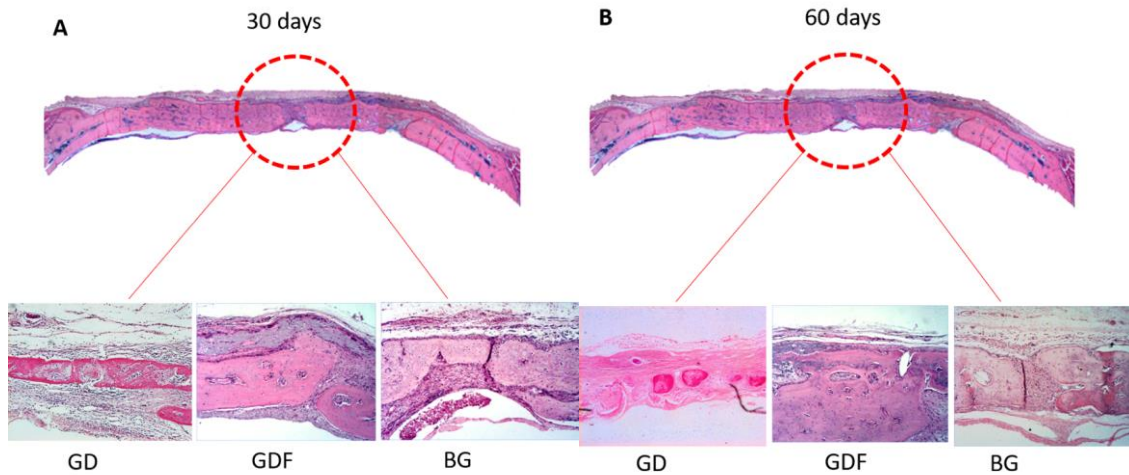
Os resultados foram avaliados por meio de microscópio óptico com padronização de leitura das lâminas para todos os grupos. (Figuras I e II A e B).

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



Fonte : Autores

Figure II: Secção panorâmica histológica corada com Hematoxilina e Eosina. As imagens mostram a área central do defeito de cada grupo (GD), (GDF) e (BG) em uma magnificação de 25x para os tempos de 30 (A) e 60 (B) dias, respectivamente.



Fonte: Autores

Grupo GC (controle negativo)

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 as 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 BG (Bio-Gide® - controle positivo)

30 Dias: Verifica-se uma grande quantidade de tecido ósseo neoformado entremeadado por fragmentos da membrana de colágeno porcino (Bio-Gide® - Geistlich Wolhusen, 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 GD - (Gen Derm® -Teste 1)

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.

Grupo GDF (Gen-Derm Flex® - teste 2)

30 dias: Nota-se a presença de uma neoformação óssea a partir do coto em direção ao centro do defeito. O remanescente da membrana é observado na parte superior do defeito sendo envolvida por tecido conjuntivo rico em fibroblastos e rico em vascularização. Junto ao coto ósseo, observa-se presença de tecido conjuntivo ainda recoberto pela membrana. Na parte superior do defeito ósseo nota-se a presença da membrana sendo envolvida por tecido ósseo neoformado como também tecido ósseo no seu interior Adjacente a superfície externa da membrana, pode-se observar algumas células gigantes, e entre a membrana e o tecido ósseo neoformado, observa-se tecido conjuntivo desenvolvido e fibroblastos dispostos paralelamente à membrana. Foi possível verificar em alguns espécimes o fechamento do defeito.

60 Dias: Junto ao coto uma neoformação grande óssea com a presença ainda de remanescente de membrana totalmente envolvida por tecido ósseo no seu interior e exteriormente por tecido conjuntivo fibroso. No centro do defeito em grande parte dos espécimes foi observado o fechamento do defeito, contudo encontramos espécimes onde o defeito não foi fechado. Ainda em maior aumento pode-se observar a presença de células gigantes junto ao remanescente de membrana.

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 (Park et al.,2008; Buser et al.,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(Schenk et al.,1994; Schenk et al.,2000; Werkmeister et al.,1992) .

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 (Bunyaratavej et al., 2001; Behfarnia et al.,2012) em comparação as membranas testes. O colágeno apresenta muitas vantagens como biomaterial. Além de poder ser preparado em diferentes formas como membranas, filmes e esferas, apresenta 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 fibrilas (Vaissiere et al.,2000). 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; Kucharz et al.,1992). Outro fator é a variabilidade do colágeno dependendo da fonte, impurezas, variabilidade na degradabilidade enzimática e propriedades de manipulação complexas (Sheikh et al.,2017).

Desta forma, buscar alternativas de materiais que possam assumir a função de barreira é importante. Os resultados obtidos nesta pesquisa tanto pelo grupo experimental 1 (Gem-Derm[®]) como pelo grupo experimental 2 (Gem-Derm Flex[®]), mostra que membranas de cortical bovina

são adequadas para procedimentos de ROG como também demonstrou Oliveira et al (Oliveira et al.,2004). Este fato ficou demonstrado quando é avaliada a histologia, resultado este que está em concordância com os obtidos por Bernabé et al (Bernabé et al.,2012). Contudo, ao analisar o grupo experimental 1 e o grupo experimental 2 verifica-se que o primeiro obteve uma área de neoformação óssea menor quando comparado com o segundo grupo, que teve um comportamento biológico muito próximo ao do grupo controle positivo (BioGide®). Esse fato foi reforçado pela imunohistoquímica que demonstrou que na análise entre esses dois grupos, ambos se comportaram de forma muito semelhante, tanto na comparação da osteopontina quanto da osteocalcina.

É importante lembrar que os processos de reparos são diferentes. No grupo controle positivo (BioGide®), quando da presença da membrana, ocorre neoformação óssea em forma de grumos sugerindo reabsorção parcial e penetração de tecido ósseo, provavelmente devido a sua alta permeabilidade o que permite a penetração de sangue no seu interior. Não apresenta células gigantes, e o tecido conjuntivo é menos celularizado e há penetração de tecido no seu interior. Parece que há maior neoformação óssea nos grupos com um processo de reabsorção mais rápida. Aos 30 e 60 dias houve fechamento de mais animais, parecendo que o volume ósseo obtido aos 30 dias é mantido até o final do processo de reparo aos 60 dias. Já no grupo experimental 2 (Gem-Derm Flex®), a neoformação óssea é mais progressiva dando a entender que desempenhou o papel de barreira com manutenção do espaço biológico. Pelas análises das lâminas apresentou um processo de reabsorção mais lenta, e em alguns animais foi possível verificar a presença da membrana quase na integralidade aos 60 dias.

O fator espessura da membrana também parece interferir nos resultados de ROG quando comparamos os dois grupos constituído de cortical bovina (grupo experimental 1 e 2), variando somente a espessura. Foi possível observar que o grupo onde há maior espessura da membrana de cortical bovina (grupo experimental 2), o processo de ROG foi mais efetivo quando comparado ao grupo de espessura mais delgada (grupo experimental 1). Este fato pode estar relacionado a manutenção por mais tempo da integridade da membrana favorecendo o processo reparativo do defeito ósseo.

Desta forma, foi possível verificar neste trabalho que a variação de espessura influenciou significativamente nos resultados, uma vez que a membrana mais espessa permitiu uma quantidade de tecido ósseo neoformado maior que sua similar mais delgada. Assim, parece que a oclusão celular se tornou mais efetiva e com isso os resultados foram mais adequados.

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 e o grupo experimental 2 obtiveram melhores comportamentos biológico e maior índice de neoformação óssea no processo de ROG.

REFERÊNCIAS

Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, et al. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9:31-40.

Behfarnia P, Mohammad Khorasani 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.* 2012;9:574–81.

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 a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Impl Res.* 2012;23:384–8.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol.* 2001;72:215-29.

Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 1990;1:22-32.

Buser D. 20 anos de regeneração óssea guiada na implantodontia. 2nd ed. São Paulo: Quintessence Editora; 2010.

Cortellini P, Piniprato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *J Periodontol.* 1993;64:261-8.

Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messoria MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18:311-8.

Hardwick R; Hayes B.K; Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. *J Periodontol.* 1995;66:495-505.

Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone augmentation around titanium dental implants in dehiscenced defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7:233-45.

Kucharz EJ. The Collagens: biochemistry and pathophysiology. In: Kucharz EJ. *Biosynthesis of Collagen.* Berlin: Springer-Verlag; 1992. p. 31-53.

Lazzara RJ. Immediate implant placement into extraction sites: Surgical and restorative advantages. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1989;9:332-43.

Oliveira RC, Menezes R, Cestary TM, Taga EM, Taga R, Buzalaf MAR, et al. Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical Bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. *Braz Dent J.* 2004;15: 3-8.

Park JW, Bae SR, Suh JY, Lee DH, Kim SH, Kim H, Lee CS. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. *J Biomed Mater Res A.* 2008;87:203-14

Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:372-8.

Pati F, Datta P, Adhikari B, Dhara S, Ghosh K, Das Mohapatra PK. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100:1068-79.

Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast Reconstr Surg.* 1990;85:891-7.

Stal S, Tjelmeland K, Hicks J, Bhatia N, Eppley B, Hollier L. Compartmentalized bone regeneration of cranial defects with biodegradable barriers: an animal model. *J Craniofac Surg.* 2001;12(1):41-7.

Schmitz JP. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a guinea pig membrane of guided bone regeneration case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58:888-93.

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;9:13-29

Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000.* 1998;17:22-35

Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Grynopas M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res.* 2017;21:9.

Vaissiere, G; Chevally 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;38:205-10.

Wilson GJ, MacGregor DC, Klement P, Weber BA, Binnington AG, Pinchuk L. A compliant Corethane/Dacron composite vascular prosthesis. Comparison with 4-mm ePTFE grafts in a canine model. *ASAIO J.* 1993;39:M526-31.

Werkmeister JA, Ramshaw JA. Collagen-based biomaterials. *Clin Mater. Mat.* 1992;9:137-8.