RODRIGO ALBUQUERQUE BASÍLIO DOS SANTOS

**Reparação ao redor de implantes de titânio após regeneração óssea guiada
com membrana reabsorvível**

São Paulo

2010

RODRIGO ALBUQUERQUE BASÍLIO DOS SANTOS

**Reparação ao redor de implantes de titânio após regeneração óssea guiada
com membrana reabsorvível**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi
Alves de Lima

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Rodrigo Albuquerque Basílio dos

Reparação ao redor de implantes de titânio após regeneração óssea guiada com membrana reabsorvível / Rodrigo Albuquerque Basílio dos Santos; orientador Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima. -- São Paulo, 2010.

82p. : fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Implantes dentários – Regeneração óssea guiada. 2. Periodontia. I. Lima, Luiz Antonio Pugliesi Alves de. II. Título.

CDD 617.632
BLACK D64

FOLHA DE APROVAÇÃO

Santos RAB. Reparação ao redor de implantes de titânio após regeneração óssea guiada com membrana reabsorvível. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/2010

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu **Senhor Jesus Cristo**, por ter me capacitado a realizar este trabalho, que só foi possível ser feito pelo sustento de suas mãos. Ao meu Deus dedico a minha vida, minha família, meus bens porque apenas Ele é digno de toda honra, glória e louvor.

À minha amada esposa, **Yandra**, que com todo amor e paciência esteve sempre ao meu lado nessa caminhada difícil, sendo uma coluna para mim. De maneira admirável, colaborou intensamente para o meu crescimento acadêmico.

Aos meus pais, **Antônio e Ana**, pelo amor incondicional a mim e aos meus irmãos, pelos valores de vida transmitidos e por nos incentivarem a continuar buscando sempre os sonhos de Deus. À minha mãe, em especial, por não me deixar desistir e acreditar no meu potencial.

Aos meus irmãos, **Matheus e Fabiana**, por fazerem parte da minha vida, me apoiando e estarem no meu coração todos os dias.

Aos meus sogros, **Marcos e Jacira**, pela confiança, incentivo e paciência, durante a realização deste trabalho.

Aos meus cunhados, **Daniel e Adriana**, e co-cunhado **Jairo**, pela ajuda e incentivo em importantes momentos da minha vida pessoal, profissional e acadêmica, desde que os conheci.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Antonio Pugliesi Alves de Lima**, agradeço pela confiança depositada. Obrigado pelos estímulos, correções, críticas e por sempre me fazer acreditar ser capaz.

Ao **Prof. Titular Francisco Emílio Pustiglioni**, responsável pela Disciplina de Periodontia da FOUSP, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, e por ter me aceito no curso de Pós-graduação.

Ao **Prof. Cláudio Mendes Pannuti**, pela contribuição direta no trabalho, através da análise estatística dos resultados.

Ao **Prof. João Batista César Neto** pela amizade, e colaboração em momentos decisivos para conclusão deste trabalho.

Ao **Prof. Jarbas Arruda Bauer**, por disponibilizar seu laboratório, seu conhecimento, durante a fase experimental deste trabalho.

Ao **Prof. Victor Elias Arana-Chavez** pela recepção no Laboratório de Biologia dos Tecidos Mineralizados (ICB/USP) e disposição em contribuir para alcançar bons resultados.

Aos **Professores Giorgio de Micheli, Giuseppe Alexandre Romito, Koto Nakae, Marco Antonio Paupério Georgetti, Cesário Antonio Duarte e Carlos Cheque** pelo apoio e ensinamentos durante o Estágio na Clínica da Graduação e ensinamentos transmitidos durante o curso de Mestrado.

Aos colegas de turma e amigos, **Osmar Shizuo Okuda, Márcio Seto e Rodrigo Carlos Nahas Castro-Pinto** pela amizade, constante ajuda e colaboração durante os anos de estágio e de Mestrado. Por cada momento que estivemos juntos em busca de uma superação e conquista de um sonho.

A todos os colegas da Disciplina de Periodontia, alunos do curso de Mestrado ou Doutorado, por compartilharem suas experiências científicas e de vida. Aos colegas, **Leandro Chambrone, Daniele Salami Lourenção, Flávia Sukekava, Mariana S. R. Zangrando, Silvia Linard Marcelino, Vanessa T. E. Alves, Sabrina Rosa Grande, Ecinele F. Rosa, Juliana C. Aun, Luciana A. Maltagliati, Isabela M. P. de Araújo Britto e Caroline G. Paixão.**

Aos colegas que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho e compartilharam comigo os seus conhecimentos, **André Michelletti Hespanhol e Celey Silveira.**

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia: **Vera, Wilma** e, principalmente, **Márcia e Marília**, por toda a contribuição dispensada ao longo destes anos.

Aos funcionários da biblioteca, pelo profissionalismo e atenção dispensados durante a fase final deste trabalho. À bibliotecária **Glauci Elaine Damasio Fidelis**, sempre disposta a ajudar.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Cirúrgica, **Elisa dos Santos e Beatriz**, que me receberam em seu local de trabalho e com prontidão, proporcionaram a execução deste projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio à pesquisa de n 06/50450-9, que permitiu a realização deste trabalho.

À **CAPES**, pela bolsa de Mestrado.

“Para ser sábio, é preciso primeiro temer a Deus, o Senhor.
Se você conhece o Deus Santo, então você tem compreensão das coisas.”

Provérbios 9:10

Santos RAB. Reparação ao redor de implantes de titânio após regeneração óssea guiada com membrana reabsorvível [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi descrever o padrão de reparação da ROG, após o uso de osso autógeno e membrana de colágeno suíno (*BioGide*). Foram utilizados 30 ratos machos Wistar, nos quais 30 mini-implantes fixaram enxerto ósseo autógeno do tipo *onlay*, originário de osso parietal, na região do ângulo da mandíbula. Os enxertos foram recobertos com membranas de colágeno e os animais sacrificados nos períodos de zero hora, 14, 21, 45 e 150 dias. As amostras foram descalcificadas e processadas pela técnica de fratura (Berglundh et al., 1991). Após 2 semanas, a interface entre o leito e o enxerto encontrava-se preenchida por tecido conjuntivo imaturo rico em vasos e fibroblastos. Aos 21 dias, observou-se osso neoformado sob a membrana e junto aos bordos do enxerto, integrando o enxerto ao leito. Este apresentava intensa remodelação, de modo que junto às fresas do implante observamos osso imaturo e vasos. Aos 45 dias, a estrutura colágena original da membrana apresentou avançado grau de reabsorção e diminuição da sua espessura. O tecido ósseo formado sob a membrana demonstrou início de organização lamelar. No período final, após 150 dias, o enxerto apresentou-se completamente integrado ao osso receptor e com adiantado grau de maturação. Conclui-se que após 21 dias, o osso neoformado estava em contato com o enxerto e o implante. No período de 45 dias, observou-se maturação inicial do tecido ósseo e avançada biodegradação da membrana. Apenas após 150 dias, pudemos assegurar a integração do enxerto ao osso neoformado na região do leito, com ganho adicional de tecido ósseo.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Osseointegração. Membrana. Transplante ósseo. Colágeno. Osteogênese.

SANTOS RAB. Healing around titanium implants after guided bone regeneration with bioresorbable membrane [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the repair pattern after guided bone regeneration (GBR), using an autogenous bone graft covered with a porcine collagen membrane (BioGide). Thirty male Wistar rats received an onlay autogenous bone graft, harvested from parietal bone, laid on the external area near the angle of the mandible with titanium fixtures. The grafts were covered with a collagen membrane and the animals were sacrificed at 0 hour, 14, 21, 45 and 150 days. Decalcified sections were prepared according to the fracture technique (Berglundh et al., 1991). After two weeks, the bed-graft interface presented an immature connective tissue layer, containing fibroblasts-like cells and vessels. After 21 days, under the membrane, newly formed trabecular bone established bridges connecting the bed and the lateral borders of the graft. The receptor bed showed intense remodeling and adjacent to the implant threads, immature bone and vessels could be seen. After 45 days, the collagen structure of the membrane presented extensive resorption and a large decrease in thickness. The bone tissue, under the membrane, exhibited initial lamellar bone arrangement. After 150 days, a complete fusion of the graft with the receptor bed and an advanced level of bone maturity of the graft were observed. It was concluded that, after 21 days, the newly formed bone was in direct contact both with the graft and the implant. At 45 days the porcine collagen membrane showed advanced stage of resorption and an initial bone maturity could be observed. Only at 150 days, we could assure the graft integration to the newly formed bone at bed receptor area, with additional bone tissue gain.

Keywords: Guided bone regeneration. Dental implants. Autogenous bone graft. Collagen membrane. Biodegradation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Periodontia
BG	Membrana <i>BioGide</i>
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
E	Enxerto ósseo
EOA	Enxerto ósseo autógeno
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
ILE	Interface leito/enxerto
L	Leito receptor
ME	Membrana
OR	Osso regenerado
PTFE-e	Politetrafluoretileno expandido
ROG	Regeneração óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SI	Superfície do implante
TM	Tecido muscular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 BIODEGRADAÇÃO DA MEMBRANA	14
2.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E ENXERTO ÓSSEO	19
2.3 OSSEOINTEGRAÇÃO	24
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS	30
4.2 IMPLANTES	30
4.3 MEMBRANAS	30
4.4 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO	31
4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	35
4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	35
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	37
4.8 MENSURAÇÃO DA ESPESSURA DA MEMBRANA	37
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5 RESULTADOS	39
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA	39
5.1.1 Grupo zero hora	39
5.1.2 Grupo 14 dias	42
5.1.3 Grupo 21 dias	47
5.1.4 Grupo 45 dias	53
5.1.5 Grupo 150 dias	57
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

A reparação óssea tem sido abordada com ênfase nas últimas décadas, principalmente após o avanço na utilização de implantes osseointegrados. Diversas informações, para o conhecimento da reparação deste tecido, têm sido obtidas através de estudos experimentais com animais. A utilização destes é recomendada para melhoria do entendimento do processo biológico, desenvolvimento de técnicas de reconstrução óssea e teste de materiais para enxerto ósseo (Hollinger; Kleinschmidt, 1990; Aaboe et al., 1995).

As técnicas de reconstrução óssea, entre elas a regeneração óssea guiada (ROG) e o enxerto ósseo autógeno (EOA), permitiram a colocação de implantes em locais que anteriormente não seria possível (Burchardt et al., 1983; Buser et al., 1996). A literatura comprovou a eficácia e previsibilidade das técnicas de ROG e EOA, através de estudos laboratoriais e clínicos (Simion et al., 1994b; Rasmusson et al., 1997).

A técnica de enxerto ósseo autógeno é considerada o “padrão ouro” das técnicas de reconstrução óssea. A arquitetura interna, a origem embrionária e a taxa de revascularização dos enxertos autógenos contribuem para o sucesso da técnica (Alberious; Gordh, 1998; Ozaki; Buchman, 1998; Buchman; Ozaki, 1999). Porém, o aumento do esqueleto craniomaxilofacial por enxertos ósseos do tipo *onlay* está associado com um grau variado de reabsorção desses enxertos (Davis et al., 1984; Ermis; Poole, 1992; Alberius et al., 1996). Marinucci et al. (2001) relataram uma perda de 50-70% no volume dos enxertos ósseos, um ano após sua inserção, durante o processo de remodelação.

As membranas não-absorvíveis e reabsorvíveis têm sido utilizadas para melhorar a capacidade dos sítios receptores incorporarem os enxertos ósseos, diminuindo a reabsorção dos mesmos (Nevins et al., 1998; Adeyemo et al., 2008; Gielkens et al., 2008). Em 1995, Jensen et al., demonstraram em cães, que enxertos ósseos autógenos colocados simultaneamente ao implante e recobertos por membrana de politetrafluoretileno PTFE-e, não sofreram reabsorção significativa, se comparados ao grupo controle, em que não se utilizou membrana.

Recentemente, um modelo experimental em ratos, para estudar a fase inicial do processo de reparação do enxerto ósseo após ROG, foi apresentado por Jardini et al. (2005). Realizou-se o aumento do rebordo mandibular, por meio de enxerto ósseo autógeno (E) e enxerto ósseo autógeno recoberto por membrana de politetrafluoretileno PTFE-e (ME). O grupo (E) demonstrou perda óssea estatisticamente significativa a partir de 21 até 45 dias (término do estudo), ou seja, diminuição do volume do enxerto. No grupo (ME), foi observado ganho de tecido ósseo na área reconstruída de aproximadamente 55%, além do volume do enxerto original, após 45 dias.

De marco et al. (2005), utilizando a mesma metodologia, avaliaram o processo de revascularização do enxerto ósseo. A revascularização ocorreu em ambos os grupos até o final do experimento (21 dias), embora tenha ocorrido de forma mais intensa no grupo (E), em todos os períodos experimentais. Os autores observaram que no grupo (ME), os capilares se originaram apenas do leito receptor, enquanto que no grupo (E), a revascularização do enxerto ocorreu através de vasos originados tanto do leito receptor, quanto do tecido conjuntivo circundante.

Seguindo esse modelo de estudo, Hespanhol em 2009, avaliou através de cortes histológicos não-descalcificados, o padrão de reparação tecidual após ROG, protegendo o osso autógeno por membrana de colágeno. Houve crescimento significativo de osso regenerado, a partir de 21 dias, preenchendo completamente o defeito pré-existente, até o período final do estudo de 150 dias. As membranas reabsorvíveis surgiram com a finalidade de evitar-se uma segunda cirurgia e melhorar a adaptação tecidual, reduzindo o risco de exposição da membrana (Mcginnis et al., 1998). Esta última complicação está relacionada com a perda do volume de osso reconstruído (Selvig et al., 1992; Hardwick et al., 1994).

A longevidade da estrutura da membrana torna-se importante, para assegurar a função de barreira, até que se obtenham condições biológicas para formação de tecido ósseo. Estudos anteriores descreveram o processo e o tempo de biodegradação da membrana (Owens; Yukna, 2001; Bornstein et al., 2007; Moses et al., 2008). Rothamel et al. (2005), ao instalar membranas de colágeno no dorso de ratos, observaram que o processo de biodegradação ocorreu no período de 28 dias. Portanto, considerando-se que as membranas reabsorvíveis perdem a função de barreira mais precocemente, resta saber se, histologicamente, seu tempo de função

permite a proteção do enxerto, evitando sua reabsorção e favorecendo a integração do enxerto ao leito receptor, com formação adicional de volume ósseo.

Lima et al. (2003), em um estudo em cães, analisaram a osseointegração, utilizando técnica de ROG, com membrana de PTFE-e. Após o período de 24 semanas, o contato osso-implante na área de osso regenerado, em implantes com superfície tratada e implantes com superfície usinada, foi de 32% e 3,6%, respectivamente. Portanto, sabendo-se que a osseointegração ocorre tanto em área de osso regenerado, quanto em área de osso pré-existente (Simion et al., 1994b; Veis et al., 2004), há a necessidade de descrever os eventos que envolvem o processo de formação óssea, junto à superfície do implante, nas áreas de osso pré-existente e osso regenerado, quando utilizamos técnica de ROG com membrana reabsorvível.

Sendo assim, o conhecimento dos eventos biológicos, num aspecto temporal, durante o processo de reparação tecidual, após a utilização de enxerto de osso autógeno recoberto por membrana de colágeno reabsorvível, poderia contribuir para a melhoria da técnica cirúrgica e da previsibilidade de resultados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor compreensão, a revisão será dividida em três tópicos.

2.1 BIODERIVAÇÃO DA MEMBRANA

Para que um material seja utilizado como barreira, em procedimentos de ROG, o mesmo deve possuir diversos requisitos biológicos, entre eles: biocompatibilidade, integração tecidual, oclusividade celular, habilidade de manter espaço e também fácil manuseio clínico (Hardwick et al., 1994). Algumas desvantagens foram associadas à primeira geração de membranas, feitas de materiais não-absorvíveis, como o politetrafluoretileno expandido (PTFE-e). Entre elas, podemos citar a necessidade de uma segunda cirurgia para a remoção da membrana, após o período de cicatrização, e a exposição precoce ao meio bucal, com subsequente colonização bacteriana (Selvig et al., 1992; Temporetti; Nalbandian, 1993; Simion et al., 1994a).

Em estudos experimentais com animais, as membranas reabsorvíveis demonstraram resultados positivos comparáveis àqueles obtidos pelas membranas de PTFE-e (Sandberg et al., 1993; Zellin et al., 1995), como também resultados clínicos semelhantes (Simion et al., 1996; Moses et al., 2005). Outro fator importante é o volume final de osso neoformado alcançado pela ROG utilizando membrana reabsorvível, que apresentou resultados semelhantes àqueles obtidos com membrana de PTFE-e (Carpio et al., 2000; Nociti et al., 2001).

A qualidade de reparação óssea foi analisada histologicamente, em pacientes com necessidade de aumento de rebordo lateral, após utilização de enxerto ósseo bovino desproteínado mineralizado e membrana. Comparando a quantidade de tecido ósseo neoformado, após o período de sete meses, não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas membranas utilizadas: colágeno (39%) e politetrafluoretileno (42%) (Friedmann et al., 2002).

As membranas reabsorvíveis podem ser divididas em dois tipos: biomateriais naturais e polímeros sintéticos (Hutmacher et al., 1996). Apesar de ambos serem

considerados biomateriais, cada um tem aspectos e efeitos biológicos diferentes (Zellin et al., 1995). Alguns estudos demonstraram que membranas de polímeros sintéticos, como o poliéster, induzem uma resposta tecidual inflamatória após sua degradação (Gotfredsen et al., 1994; Dupoirieux et al., 2001).

Após a instalação de implantes, permitindo uma exposição coronal de 4 a 5 mm de sua superfície, membranas foram adaptadas para cobrir o espaço supra-ósseo formado. Utilizando membrana reabsorvível, contendo copolímero de ácido polilático, observou-se uma reação inflamatória moderada, ao redor da mesma, durante o processo de degradação, além de não obter uma quantidade de osso regenerado adequada, em comparação com a membrana não absorvível (Hurzeler et al., 1997). Estudos demonstraram que a reabsorção superficial do osso neoformado pode ocorrer após a degradação dessas membranas (Schliephake et al., 2000; Von Arx et al., 2002).

No que concerne às membranas de materiais naturais, estudos relataram o uso de produtos derivados de colágeno suíno ou bovino, tipos I e III (Bunyaratavej; Wang, 2001), além de albumina e polissacarídeos. As membranas de colágeno têm sido utilizadas com sucesso na regeneração periodontal e óssea, tanto em estudos com animais quanto com humanos (Pitaru et al., 1988; Blumenthal; Steinberg, 1990; Becker et al., 1992; Yukna; Yukna, 1996; Mattson et al., 1999). A segurança e eficácia da membrana de colágeno foram comprovadas para ROG (Sevor et al., 1993; Zitzmann et al., 1997; Hurzeler et al., 1998). As membranas de colágeno são fáceis de manusear, adaptáveis e mecanicamente maleáveis, favorecendo sua aplicação clínica (Wang et al., 1994; Simion et al., 1997). Outras propriedades do colágeno incluem função hemostática, facilitando a estabilização precoce da ferida; semi-permeabilidade, permitindo a passagem de nutrientes; degradação enzimática natural e habilidade quimiotática para atrair fibroblastos (Yaffe et al., 1984; Hutmacher et al., 1996; Locci et al., 1997).

Através de análises com microscópio eletrônico de varredura, pôde-se avaliar células em membranas reabsorvíveis e não absorvíveis (Alpar et al., 2000). Fibroblastos do ligamento periodontal e células tipo osteoblastos, após 21 dias, cresceram intensamente e se aderiram à membrana de colágeno, não ocorrendo o mesmo com membranas de ácido polilático e PTFE-e. Behring et al. (2008) realizaram uma revisão sistemática para avaliar a cultura de células em membranas

de colágeno *in vitro*. Os autores confirmaram que, tanto fibroblastos quanto células derivadas de tecido ósseo, podem ser cultivados em membranas de colágeno.

A biocompatibilidade, através da resposta celular inflamatória associada ou não às membranas de colágeno, foi avaliada em estudos de imunocitoquímica (Patino et al., 2003). Utilizando anticorpos para identificar monócitos, macrófagos e linfócitos, a análise citoquímica revelou que a quantidade de sub-sistemas, encontrada no grupo com membrana, foi similar aquela encontrada no grupo com solução salina. Dessa forma, as membranas de colágeno não foram associadas a respostas inflamatórias locais ou sistêmicas, podendo ser indicadas para regeneração tecidual.

A longevidade e a habilidade de manter espaço são os maiores desafios que envolvem as membranas reabsorvíveis nos procedimentos de ROG (Aaboe et al., 2000). Estudos mostraram que a remoção precoce da membrana resultou na formação reduzida de osso e preenchimento incompleto por este tecido (Becker et al., 1994; Lekholm et al., 1993). Apesar das membranas de colágeno apresentarem-se biocompatíveis, elas possuem propriedades mecânicas desfavoráveis (Hurzeler et al., 1998) e função de barreira inadequada, devido a sua rápida biodegradação pela atividade enzimática dos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (Miller et al., 1996; Zzhao et al., 2000; Owens; Yukna, 2001). Estudos clínicos (Zitzmann et al., 1997; Hammerle; Lang, 2001) demonstraram que membranas, utilizadas para ROG, devem permanecer por mais tempo que membranas utilizadas para regeneração tecidual guiada (RTG). Contudo, a limitação da membrana de colágeno em manter o espaço da ferida cirúrgica, pode diminuir o seu potencial para a ROG (Tatakis et al., 1999).

Entre as membranas de colágeno desenvolvidas para superar esses limites, podemos citar a membrana composta de fibras de colágeno suíno, tipos I e III, sem nenhum outro componente orgânico ou químico (*BioGide*). Este dispositivo apresenta duas camadas: a camada compacta, designada para proteger a invasão de tecido mole; e a camada porosa, designada para facilitar a integração do osso neoformado. Quando usada para ROG, as camadas porosa e compacta devem possibilitar a migração celular osteogênica e evitar a intrusão de tecido conjuntivo, respectivamente.

Estudos com animais avaliaram o processo de biodegradação das membranas de colágeno. Owens e Yukna (2001) utilizaram 12 cães com três

diferentes membranas, inseridas em bolsas cirúrgicas feitas no palato: membrana de colágeno suíno tipos I e III (*BioGide*), membrana alodérmica suína e membrana alodérmica humana. Em um mês, todas as membranas apresentavam de leve a moderada degradação. Em dois meses, todas as membranas apresentavam degradação moderada a severa, com exceção da membrana alodérmica humana, que estava intacta. Em quatro meses, todas as membranas apresentavam degradação severa ou ausência completa das mesmas.

Algumas membranas de colágeno têm sido submetidas ao processo de reticulação (*crosslinking*), com o intuito de aumentar a longevidade desses dispositivos. A eficácia e segurança das membranas de colágeno, submetidas ou não ao processo de reticulação, em suportar a regeneração óssea, em defeitos ósseos críticos, foram comprovadas em estudos com cães. Esses autores não encontraram diferença significativa na cinética de degradação entre os dois tipos de membranas, com ou sem reticulação, mensurada por análise semiquantitativa, ocorrendo a biodegradação completa das mesmas em 24 semanas (Zubery et al., 2007).

Rothamel et al. (2005) utilizaram 8 membranas de colágeno diferentes, em ratos, incluindo membranas de colágeno suíno e bovino, membranas de colágeno submetidas ao processo de reticulação por tratamento com glutaraldeído e membranas experimentais. Os espécimes foram posicionados subcutaneamente no dorso de 40 ratos Wistar e divididos em cinco grupos de oito animais cada (sacrificados após 2, 4, 8, 16 e 24 semanas). A análise histológica demonstrou uma vascularização quase completa e perfeita integração tecidual da membrana de colágeno suíno (*BioGide*), após 2 semanas. O processo de biodegradação dessa membrana ocorreu de forma rápida, em 4 semanas, podendo ocorrer em até 24 semanas em outras membranas. A presença de reação de corpo estranho (células gigantes multinucleadas) foi associada às membranas de colágeno submetidas à reticulação, diferentemente da membrana de colágeno suíno (*BioGide*).

Em uma análise quantitativa, Moses et al. (2008) analisaram três membranas de colágeno: *BioGide* (colágeno não submetido ao processo de reticulação / BG), *BioMend* (colágeno submetido ao processo de reticulação por tratamento com glutaraldeído / BM) e *Ossix* (colágeno submetido ao processo de reticulação por tratamento com ribose / OS). As membranas foram cortadas em discos de 5 mm de diâmetro e implantadas na calvária de 20 ratos Wistar. Os animais foram

sacrificados após 2, 14 ou 28 dias e cortes histológicos descalcificados foram preparados. As mensurações realizadas foram área e espessura residual da membrana. Os resultados demonstraram que as membranas testadas diferem no padrão de biodegradação. Em 28 dias, a menor porcentagem de área de colágeno residual, referente à área inicial, foi observada no grupo BG (13,9%), seguido pelo grupo BM (24,7%) e OS (91,3%). A espessura residual, com relação à espessura inicial, apresentou o mesmo padrão: BG (31%), BM (37%) e OS (94%). Os autores concluíram que as membranas apresentaram características estruturais e físicas diferentes. Uma maior porosidade da membrana (menor conteúdo de colágeno por área) poderia promover maior crescimento celular para dentro da membrana, possibilitando melhor integração tecidual. Porém, isso talvez resulte numa redução da função da barreira.

Em áreas expostas ao meio bucal, nenhum dos dois tipos de membranas (submetidas ou não ao processo de reticulação) instaladas em palato de gatos, resistiu à degradação, nos períodos de 7 e 28 dias (Tal et al. 2008a).

Analisando a regeneração óssea, os resultados encontrados com os dois tipos de membrana são controversos. Bornstein et al. (2007) utilizaram duas membranas de colágeno reabsorvíveis em defeitos tipo sela, em mandíbulas de cães. Três defeitos padronizados foram criados e preenchidos com osso mineral bovino desproteínizado, e tratados por três métodos diferentes: sem membrana (controle), membrana de colágeno (teste 1) e membrana de colágeno submetida ao processo de reticulação (teste 2). Após 8 semanas, não houve diferença estatística significativa entre as modalidades de tratamento na porcentagem de osso regenerado. Após 16 semanas, a porcentagem de osso aumentou, principalmente no grupo teste 2, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O efeito positivo da membrana de colágeno submetida ao processo de reticulação, na regeneração óssea, foi limitado pelo aumento da taxa de complicações, provocado pela exposição prematura da membrana.

Tal et al. (2008b) avaliaram 52 pacientes com necessidade de aumento de rebordo, para posterior instalação de implantes. Os defeitos foram tratados utilizando osso bovino desproteínizado mineralizado (*Bio-Oss*), recobertos com uma membrana submetida ao processo de reticulação (*Ossix*) ou não submetida ao processo de reticulação (*BioGide*). No momento da osteotomia, para a instalação do implante, após 6 meses da ROG, realizou-se uma biópsia da mucosa e do tecido subjacente,

na área aumentada, utilizando um *punch* cirúrgico (3 mm de diâmetro). Os autores concluíram que as membranas submetidas ao processo de reticulação são mais resistentes ao processo de degradação tecidual, apresentando remanescentes após seis meses. Porém, podem estar associadas a uma maior incidência de perfuração tecidual.

2.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA E ENXERTO ÓSSEO

A partir da demonstração do princípio biológico da Regeneração Tecidual Guiada, por Nyman et al. (1982), estudos posteriores confirmaram a ocorrência de uma repopulação do coágulo, formado por células osteogênicas e angiogênicas, que provinham do endóstio e da região medular da parede de defeitos ósseos cobertos por membrana, definindo assim, o conceito de Regeneração Óssea Guiada (Dahlin et al., 1989; Hammerle et al., 1992; Hammerle; Karring, 1998; Hammerle; Lang, 2001).

A técnica foi avaliada dentre outras características quanto: ao potencial de osteopromoção (Alberius et al., 1992), quanto à previsibilidade e sucesso no aumento lateral de rebordo em pacientes parcialmente edêntulos (Buser et al., 1996), quanto à capacidade de regeneração óssea vertical ao redor de implantes osseointegrados inseridos parcialmente no rebordo alveolar (Simion et al., 1998), ou quanto à capacidade de regeneração óssea vertical e horizontal ao redor de implantes osseointegrados inseridos em defeitos ósseos alveolares criados experimentalmente (Schliephake et al., 2000), sendo muitas vezes associada à técnica de utilização de enxertos ósseos de origens variadas.

Os estudos acima comprovaram que a ROG é um procedimento previsível, e que a presença da membrana impede a penetração de células não osteogênicas, induz a neoformação óssea e protege o enxerto ósseo, impedindo que este sofra reabsorção durante o processo de reparação da ferida cirúrgica, favorecendo a utilização de um enxerto de menor tamanho. Concluíram ainda, que o fator limitante para a regeneração óssea é a instabilidade do material de preenchimento, bem como da membrana, a qual deve permanecer livre de movimentação e ser capaz de suportar a pressão do tecido mole.

Com o objetivo de melhor compreender os eventos biológicos relacionados à técnica e eventualmente melhorar os resultados deste procedimento, alguns autores buscaram definir um padrão para os eventos reparativos de regeneração óssea.

O primeiro estudo a detalhar tais acontecimentos foi publicado em 1994 por Schenk et al., através da aplicação da técnica para correção de defeitos ósseos criados em cães. A avaliação histológica demonstrou a organização inicial do coágulo sob a membrana e a posterior formação de osso imaturo, que se iniciava pelas paredes do defeito, ao mesmo tempo em que ocorria a proliferação de vasos na região do espaço medular. Um novo osso cortical foi formado a partir da deposição concêntrica de osso lamelar. Após quatro meses de estudo, observou-se o início da remodelação óssea do osso neoformado.

Lima et al. (2003) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar: o padrão de reparação dos tecidos periimplantares e a influência das características da superfície do titânio na osseointegração, após a colocação do implante simultânea à ROG. Vinte e quatro implantes com superfície usinada ou jateada, com spray de plasma de titânio, foram instalados em defeitos ósseos com dimensões médias de 7x7x7 mm, em mandíbulas de cães. Os animais foram sacrificados após 16 ou 24 semanas. Foi realizado processamento histológico sem descalcificação, e análises descritiva e histométrica dos espécimes. Nos sítios em que a membrana permaneceu em posição durante 16 semanas, houve um crescimento ósseo vertical de 66% do defeito original, enquanto que nos sítios em que a membrana permaneceu em posição durante 24 semanas, esse crescimento foi de 86%. A osseointegração variou de 12-32% na área de osso regenerado em implantes jateados, e de 0-3,6 % em implantes usinados. Da mesma forma, nas áreas de osso pré-existente, houve uma porcentagem de osseointegração de 16-35% para superfícies jateadas, e 0-11% para superfícies usinadas. Portanto, observou-se que a integração osso-implante foi muito maior na área de osso pré-existente, do que de osso regenerado. Segundo os autores, a remoção prematura da membrana afetou negativamente a quantidade de preenchimento ósseo do defeito, porém não impediu a osseointegração em osso regenerado ou pré-existente.

Por sua vez, os enxertos ósseos têm sido utilizados em Odontologia em procedimentos de reconstrução de rebordos atróficos em maxila e mandíbula (Misch et al., 1992; Misch; Misch, 1995; Williamsom, 1996).

Enxertos ósseos autógenos, instalados na região fronto-parietal em calvária de coelhos e fixados com parafusos de titânio, apresentaram áreas de remodelação e osteoclastos em suas extremidades, após 14 dias. Da mesma forma, tecido ósseo neoformado, com vários graus de maturação, pôde ser observado, com presença de osteoblastos na superfície, tanto do enxerto quanto do leito receptor (Saska et al., 2009). Avaliando enxerto ósseo autógeno, removido da crista ilíaca e fixado em mandíbulas de coelhos, comparou-se a remodelação do mesmo em sítios com ou sem perfurações realizadas no leito receptor (Faria et al., 2008). O processo de remodelação do enxerto em sítios com perfurações, acentuou-se no sétimo dia, ocorrendo deposição de osso na interface leito/enxerto, caracterizado pela presença de células parecidas com osteoblastos, na região em que o periósteo encontrava-se elevado com células indiferenciadas. Em sítios, nos quais não foram realizadas perfurações, o processo de deposição óssea iniciou-se apenas nas bordas do enxerto, em que células progenitoras se instalaram entre o periósteo e a interface leito/enxerto. Entre 20 e 60 dias pós-operatórios, a cortical externa do enxerto ainda encontrava-se em processo de remodelação, com presença de lacunas de Howship, sendo que o leito receptor encontrava-se em processo de reabsorção, no vigésimo dia de observação. Nesse estudo, a realização de perfurações no leito receptor não melhorou a manutenção do volume do enxerto.

Apesar de defeitos reparados com o uso de enxertos ósseos mandibulares apresentarem melhor densidade óssea, do que defeitos reparados pelas técnicas de ROG, enxertos como esses, isolados, apresentam maior grau de reabsorção (Misch; Misch, 1995).

Estudos de Alberius et al. (1992), Azem (2002), Donos et al. (2005) e Jardini (2001), realizados em ratos, comprovaram que a associação de enxerto ósseo autógeno em bloco, intramembranoso ou endocondral, e membrana de PTFE-e sofre menor reabsorção que o enxerto isolado a curto e longo prazo, além de apresentar neoformação óssea adicional em curto prazo, favorecendo o uso de enxerto de menor tamanho. Comprovam, ainda, que a revascularização de enxerto ósseo autógeno é mais intensa e ocorre em maior extensão em diversos períodos experimentais, quando o enxerto não é associado à membrana de PTFE-e.

A literatura é rica em estudos que comparam enxertos ósseos autógenos e enxertos alógenos. Em seu estudo, Maletta et al. (1983) concluíram que a cicatrização e a revascularização de enxertos autógenos do tipo *onlay* e alógeno

lioofilizado de crista ilíaca em macacos foram similares, havendo diferença de três meses no tempo de reabsorção dos enxertos, a qual ocorreu posteriormente no enxerto alógeno. Estudos demonstraram que alguns enxertos ósseos funcionam apenas como material de preenchimento ósseo (osteocondução) e que o osso autógeno apresenta maior resposta regenerativa, sendo melhor aceito e incorporado quando comparado aos outros tipos de enxertos (Merkx et al., 1999).

Von Arx et al. (2001) estudaram quatro modalidades de tratamentos para reconstrução óssea, incluindo osso autógeno (grupo 1), osso autógeno recoberto por membrana (grupo 2), fosfato de cálcio recoberto por membrana (grupo 3) e enxerto ósseo alógeno congelado seco desmineralizado (DFDBA) recoberto por membrana (grupo 4). No grupo 2, obteve-se a formação de uma nova cortical óssea sob a membrana, ocorrendo uma excelente reparação óssea, enquanto que nos grupos que utilizaram materiais aloplástico ou alógeno, foram encontradas áreas com encapsulamento de partículas em tecido conjuntivo, reduzindo a espessura da crista óssea.

Ersanli et al. (2004) analisaram a qualidade óssea após ROG, em áreas aumentadas com enxerto de osso mineral bovino desmineralizado e recobertas com membranas de colágeno. O procedimento regenerativo foi realizado em 11 pacientes que apresentavam atrofia severa da crista óssea, com falta de dimensão vestíbulo/lingual. Após o período de cicatrização de sete meses, amostras de tecido ósseo foram obtidas através de uma broca trefina, com 2,5 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento, em média. Os espécimes foram descalcificados e cortes histológicos preparados. Os autores concluíram que, apesar de ainda haver partículas residuais do biomaterial, a osteogênese estava completa após o período de observação. Como também a taxa de vascularização e a atividade osteoclástica encontravam-se reduzidas.

A previsibilidade do uso de enxerto autógeno em bloco, recoberto com osso mineral bovino inorgânico e membrana reabsorvível de colágeno, foi comprovada em 42 pacientes, com atrofia óssea horizontal severa. Após um período de cicatrização de 6 meses, a média da espessura da crista óssea, que inicialmente era de 3,06 mm, foi de 7,66 mm, representando um ganho médio de 4,60 mm (Von Arx; Buser, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Proussaefs e Lozada (2003). Com relação ao aumento ósseo vertical, Rocuzzo et al. (2006), avaliaram 23 pacientes edêntulos, com necessidade de aumento do rebordo de, no mínimo, 4,0 mm. Após

um intervalo de quatro meses, o aumento vertical obtido em sítios, nos quais foi utilizado enxerto ósseo autógeno, removido do ramo da mandíbula, e recobertos com malha de titânio, foi de 5,0 mm, havendo uma reabsorção óssea do enxerto original de 13,5%. Enquanto que em sítios onde se utilizou apenas osso autógeno, essa média foi de 3,4 mm, representando uma reabsorção óssea do enxerto original de 34,5%.

Busenlechner et al. (2005) avaliaram a neoformação óssea em área de crista óssea alveolar, utilizando membrana reabsorvível de colágeno, composta de três camadas, e enxerto ósseo. Os resultados demonstraram a preservação do contorno ósseo do rebordo, em áreas protegidas por membranas, enquanto que, em áreas em que se utilizou apenas enxerto ósseo, houve uma reabsorção severa de tecido ósseo com formação de crista em lâmina de faca.

Quando avaliamos a formação óssea após técnica de ROG associada à instalação de implantes, sem a presença de enxerto ósseo, com o objetivo de alcançar aumento de rebordo vertical, os resultados não são previsíveis (Simion et al., 2007). Portanto, enxertos de diversas origens e áreas doadoras têm sido utilizados em procedimentos associados a implantes osseointegrados.

Em 2002a, Donos et al. avaliaram o efeito do aumento do osso mandibular com enxerto ósseo mandibular coberto por membranas de PTFE-e, de acordo com os princípios da RTG. O estudo, realizado em ratos, avaliou através de cortes histológicos de material não-descalcificado, a reabsorção do enxerto ósseo, a formação de novo osso, o contato direto osso/implante e a continuidade óssea do enxerto/leito receptor, em enxertos isolados e enxertos cobertos com membranas de PTFE-e. O estudo concluiu que a prevenção da invasão do enxerto ósseo, pelos tecidos circunjacentes, torna-se importante para o resultado inicial da enxertia óssea. Da mesma forma, membranas absorvíveis também foram avaliadas, juntamente com a instalação de implantes e osso autógeno em partículas, em calvária de cães, obtendo a formação de tecido ósseo (Sommerlad et al., 2007).

Llambés et al. (2007) avaliaram 11 pacientes, em que a superfície do implante fora do tecido ósseo foi recoberta por partículas de osso autógeno e membrana de colágeno. Após 4 a 6 meses, no momento da segunda etapa cirúrgica para instalação do pilar, amostras para histologia foram obtidas, demonstrando osso trabecular neoformado com grandes espaços medulares, na área regenerada. Através de radiografia periapical, foram obtidas medidas do ombro do implante até o

osso alveolar, sendo no primeiro estágio, uma média de 3,5 mm, e no segundo estágio cirúrgico, 0,5 mm, a medida referente à área de implante fora do tecido ósseo. Além disso, radiografias interproximais demonstraram que após um ano de aplicação da carga funcional, a média de perda óssea marginal foi de 1,4 mm.

A técnica de enxerto ósseo associado a ROG também foi utilizada para tratamento de defeitos ósseos periimplantares. Von Arx e Kurt (1999), em um estudo retrospectivo, comprovaram a efetividade do uso de enxerto ósseo autógeno coberto por uma malha de titânio para o tratamento desses defeitos. Isso também pôde ser demonstrado em um estudo com cães (Hockers et al., 1999), onde defeitos ao redor de implantes foram criados e tratados utilizando quatro procedimentos diferentes: apenas membrana reabsorvível (*BioGide*); osso bovino desproteínado mineralizado (*Bio-Oss*) recoberto com membrana reabsorvível; osso autógeno recoberto com membrana reabsorvível e sem material de preenchimento (controle negativo). A regeneração óssea, após o período de quatro meses, foi observada nos três primeiros grupos, com valores referentes ao crescimento ósseo vertical de 45%, com o uso apenas de membrana, e de 78% e 69% com o acréscimo de osso bovino e autógeno, respectivamente. Contudo, analisando o contato osso-implante, essa porcentagem não passou de 20%, na área de osso neoformado ou regenerado.

2.3 OSSEOINTEGRAÇÃO

Em estudos experimentais com animais, Branemark et al., em 1969, relataram que, através de procedimentos específicos, a ancoragem direta do implante ao tecido ósseo seria possível. Posteriormente, Branemark et al. (1977) demonstraram resultados clínicos, com a utilização de implantes osseointegrados, durante 10 anos.

O conceito de osseointegração começou a ser melhor definido no final da década de 70 e início da década de 80. Através de dois trabalhos, Schroeder et al. (1976 e 1981) analisaram a integração de implantes de titânio em osso, usando o termo “anquilose funcional” para descrevê-lo. Em 1992, a Academia Americana de Periodontia (AAP) definiu osseointegração como o contato direto, ao nível de microscopia óptica, entre tecido ósseo vital e um implante.

Com o desenvolvimento de implantes com composição, formatos e tratamentos de superfície variados, e o aumento das indicações de aplicação dos implantes, diversos estudos procuraram definir as variáveis que influenciam a aposição óssea na proximidade com a superfície do implante. Em seu estudo, Thomas e Cook (1985) concluíram que dos parâmetros estudados, apenas a rugosidade de superfície apresentou um efeito significativo na integração do implante. A análise histológica mostrou que as superfícies lisas apresentaram diversos graus de encapsulamento por tecido conjuntivo denso, enquanto que as superfícies rugosas exibiram aposição óssea direta.

Segundo Shirakura et al. (2003), os padrões de ossificação provavelmente dependem das propriedades da superfície e qualidade do implante. Esses autores avaliaram a resposta tecidual em 36 ratos Wistar, que receberam implantes, na região de primeiro molar, com 2 tratamentos de superfície diferentes: hidroxiapatita e Al_2O_3 . Os implantes com superfície tratada com hidroxiapatita apresentaram formação óssea, ocorrendo do implante para o tecido ósseo pré-existente, enquanto que no outro grupo, esse processo ocorreu no sentido contrário. A osseointegração foi obtida após 28 dias, não ocorrendo reação inflamatória ou interposição de tecido fibroso. Esses dados confirmam o estudo de Fujii et al. (1998), em que houve osseointegração após 30 dias, com osso neoformado cobrindo quase todo o perímetro do implante, exceto por alguns sítios contendo pequenos capilares com células achatadas ao redor.

A osteogênese ao redor de implantes, em períodos precoces, tem sido demonstrada através de alguns estudos. Em 1991, Buser et al., avaliaram implantes de titânio com seis superfícies diferentes, instaladas no fêmur e tíbia de mini-porcos. Os animais foram sacrificados após 3 e 6 semanas, sendo que a ativação da formação óssea ocorreu rapidamente, onde a interface osso-implante se apresentou de forma similar nos 2 períodos. Com relação à superfície, implantes com superfície jateada com hidroxiapatita demonstraram maior porcentagem de contato osso-implante (60-70%), ao passo que essa taxa foi menor em implantes com superfície polida eletricamente (20-25%).

Hayakawa et al. (2000), analisando implantes de titânio com 4 superfícies diferentes, instalados em fêmur e tíbia de coelhos, demonstraram que após 2 semanas não houve formação de novo osso ou sinais de remodelação óssea.

Porém, após 12 semanas, a cicatrização óssea estava quase completa, com formação de osso trabecular maduro.

Outros estudos demonstraram a formação de tecido ósseo imaturo trabecular, ao redor de estruturas vasculares, após duas semanas (Bornstein et al., 2008; Buser et al., 2004). Nesse período já podiam ser observadas pontes de contato de tecido ósseo neoformado, entre o osso original e a superfície do implante. Em quatro semanas, os autores relataram a presença de áreas com reabsorção e aposição óssea, sugerindo remodelação.

Abrahamsson et al. (2004) avaliaram a taxa e o grau de osseointegração em implantes com superfície usinada e superfície tratada (SLA), durante a fase inicial de reparação. A osseointegração demonstrou ser um processo dinâmico, tanto no seu estabelecimento quanto na sua manutenção. Em ambas as superfícies, os autores observaram uma proliferação de estruturas vasculares e migração de células mesenquimais parecidas com fibroblastos, resultando na formação de um osso imaturo, logo após uma semana. Nesse período, formou-se uma linha de osteoblastos junto à superfície dos implantes, parecendo ser mais extensa no grupo com superfície tratada, do que no grupo com superfície usinada. Entre 2 e 4 semanas, o osso primário esponjoso foi substituído por osso lamelar, com deposição fibrilar paralela. Uma osseointegração substancial ocorreu em implantes com superfície SLA, logo na primeira semana, e com grande extensão (50%) durante a segunda semana. Observou-se um padrão distinto de formação óssea, composto por um revestimento ósseo e uma porção central menos mineralizada na área adjacente às fresas, durante as 2 primeiras semanas, em implantes com superfície SLA. Após seis semanas, as diferenças entre os dois grupos, com relação ao padrão ósseo e aos componentes teciduais não foram detectadas, porém o contato osso-implante continuou a ser maior no grupo com superfície tratada.

Franchi et al. (2007) instalaram 72 implantes em tíbias de ovelhas. Após 2 semanas, todos os implantes encontravam-se fixados biologicamente por um osso imaturo neoformado, preenchendo o espaço entre o osso receptor e o implante. A espessura desse tecido aumentou através de uma deposição gradual de osso lamelar em forma de fibras paralelas, após 4 semanas.

Da mesma forma, Slaets et al. (2007) realizaram um estudo com coelhos, e instalaram 3 implantes em ambas as tíbias de 8 animais. Em sete dias, foram observados fragmentos de osso trabecular ao redor do implante, sendo reabsorvidos

por osteoclastos, enquanto osteoblastos iniciavam a formação de cordões de osso neoformado. A deposição máxima de osteóide por estas células ocorreu aos 28 dias (58%). Comparando o osso trabecular com o osso cortical, observou-se que o último apresentou uma cicatrização mais lenta. Contudo, observou-se uma interligação do leito ao implante, imediatamente após a sua instalação. Os processos biológicos observados, em até 42 dias, incluíram a formação de hematoma, fragmentos ósseos adjacentes ao sítio do implante, remodelação óssea intensa e formação de novo tecido ósseo, possivelmente promovendo a osseointegração do implante.

Com o objetivo de avaliar histologicamente a osseointegração em humanos, Grassi et al. (2006), instalaram 28 mini-implantes em 14 pacientes. Os implantes apresentavam superfície usinada ou superfície tratada (jato de areia e ataque ácido), sendo retirados com uma broca trefina, após 2 meses. Os valores médios de contato osso-implante foram 23% e 42%, para superfície usinada e tratada, respectivamente. Porém, a porcentagem média de densidade óssea não diferiu entre os grupos. Os autores concluíram que implantes com superfície tratada demonstraram melhor resposta do tecido ósseo, em condições que não houve aplicação de carga funcional.

Um pré-requisito para ocorrer osseointegração é o estabelecimento de contato direto osso-implante, sem interposição de tecido conjuntivo ou áreas sem tecido ósseo (Albrektsson, 1983; Davies, 1998). Portanto, estudos ultra-estruturais têm demonstrado as interações na interface osso/implante. Em algumas áreas, houve a deposição de um tecido mineralizado denso, enquanto que em outras, ocorreu tecido conjuntivo não mineralizado contendo osteoblastos. Como também encontrou-se zonas de atividades osteoclásticas, associadas com lacunas de Howship, caracterizando o processo de remodelação óssea (Steflik et al., 1998). O processo de formação óssea não se inicia na superfície do implante ou osso pré-existente, mas a calcificação começa em áreas com uma pequena distância da superfície do implante, onde fragmentos aderem-se uns aos outros e se transformam em osso trabecular, se tornando finalmente osso lamelar (Morinaga et al., 2009).

Colnot et al., em 2007, compararam a reparação óssea, de sítios em que foram instalados implantes e sítios vazios. As células ao redor do implante iniciaram a diferenciação em osteoblastos anteriormente àquelas encontradas em sítios vazios, e as respostas celulares e moleculares foram influenciadas pela textura e composição química do material de superfície do implante. Da mesma forma,

implantes oxidados apresentaram uma aposição óssea direta em sua superfície, enquanto que a integração de implantes usinados, ocorreu através de um crescimento ósseo do osso pré-existente e osso medular (Burgos et al., 2008).

Através de análises histológicas e imunohistoquímicas (Schwarz et al., 2007), utilizando implantes com superfícies tratadas quimicamente modificadas, instalados em maxilas e mandíbulas de cães, observou-se o início de nova vascularização, originária da porção esponjosa do osso alveolar, ao redor da superfície do implante, dentro de 24 horas. Em 4 dias, a área de coágulo foi substituída por tecido conjuntivo denso, e posteriormente por pequenas áreas de osso neoformado, após 7 dias. Nesse momento, a densa rede de vasos sanguíneos parecia estar circundada por osso trabecular imaturo, apresentando resultados positivos para análise da proteína osteocalcina. Ao final de 14 dias, foi encontrado um osso maduro com fibras paralelas, através da formação de ósteons primários, apesar de ainda haver áreas de contato da superfície do implante com osso medular.

A estrutura tecidual formada ao redor da superfície de implantes de titânio pode variar após 4 semanas (Okamatsu et al., 2007). Através do uso de microscópio eletrônico, pôde-se encontrar áreas de: contato direto osso/implante, camada amorfa com proteoglicanas, calcificação com células adjacentes à superfície do implante e remodelação óssea. Puderam ser observados osteócitos dentro de lacunas e com prolongamentos que alcançavam a superfície do implante, como também osteoblastos em contato direto com a camada de titânio. Em áreas de enxerto ósseo, a osseointegração pareceu ser menos eficiente em relação às áreas de osso pré-existente, analisando enxerto de tíbia, em cães (Kobayashi et al., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

3.1 Descrever o padrão de reparação após regeneração óssea guiada, utilizando osso autógeno recoberto por membrana de colágeno.

3.2 Descrever e avaliar, quantitativamente, o processo de biodegradação da membrana de colágeno.

3.3 Verificar os eventos biológicos que envolvem a reparação óssea na área de contato osso/implante, após regeneração óssea guiada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº97/2005) (Anexo A).

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados nesse estudo, 30 ratos machos Wistar (*rattus norvegicus*), com peso aproximado de 250 a 300g originários do biotério do ICB - USP.

4.2 IMPLANTES

Foram utilizados mini implantes de titânio (Sistema INP, São Paulo, Brasil) de 1,5 mm de diâmetro de cabeça, 1,4 mm de diâmetro de corpo e 2,5 mm de comprimento.

4.3 MEMBRANAS

Foram utilizadas membranas de colágeno reabsorvíveis (BioGide, Geistlich Pharmaceutical, Wollhausen, Suíça), recobrando o enxerto de osso autógeno do tipo *onlay*, fixados pelos próprios implantes.
do tipo *onlay*, fixados pelos próprios implantes.

4.4 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

Para a realização da cirurgia, os animais foram anestesiados com cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1, 3-tiazina (Rompum, Bayer S.A – Saúde Animal, São Paulo, Brasil) mais Ketamina (Francotar, Vibrac Ind. E Com LTDA, Roseira, Brasil), na proporção de 1/1, sendo administrados 0,3ml para cada 100g de peso do animal. Após anestesia, as regiões temporal e parotídeo-massetérica esquerda e parietal e frontal bilateral foram tricotomizadas, utilizando-se lâmina de barbear. O osso parietal serviu como área doadora de osso autógeno, enquanto a região do ângulo da mandíbula foi a área receptora (Figura 4.1). A anti-sepsia destas áreas foi obtida com solução de gluconato de clorexidina a 0,12%.

Figura 4.1 - Vista lateral de hemi-mandíbula; área tracejada: leito receptor (A) e vista superior do osso parietal; área tracejada: área doadora do enxerto (B)

Foi realizada uma incisão linear na pele do animal, paralela ao arco zigomático, próxima ao ângulo da mandíbula. Desta maneira pode ser visualizado o músculo masseter, o qual foi divulsionado, utilizando-se instrumentos desenvolvidos especialmente para esta finalidade, até ser atingida a tábua óssea vestibular da mandíbula.

O passo seguinte consistiu em promover o deslocamento das estruturas anatômicas linguais até expor a tábua óssea com o auxílio de uma espátula, desenhada para esta finalidade a fim de permitir a fixação do enxerto ósseo e dos implantes.

Para a remoção do enxerto ósseo, assim como para a realização das perfurações, utilizou-se, um motor elétrico que permitiu o controle da velocidade em 800 RPM, e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril.

Com o intuito de remover o enxerto, realizou-se uma incisão linear no centro da calvária do animal, expondo o osso parietal, de onde foi retirado um bloco de osso com o auxílio de uma broca do tipo trefina (Figura 4.2), de diâmetro interno de 3,5 mm (Sistema INP, São Paulo, Brasil). Os enxertos foram perfurados, em sua região central, com uma broca helicoidal de diâmetro 1,2 mm (Sistema INP, São Paulo, Brasil) e em seguida posicionados na região do ângulo da mandíbula, a qual foi previamente perfurada com a mesma broca helicoidal, sendo então fixados ao leito receptor com o uso dos implantes (Figura 4.3A).

As membranas foram posicionadas de maneira que recobrissem todo o enxerto ósseo (Figura 4.3B). Para recortar as membranas de maneira uniforme, utilizou-se um bisturi circular de 6,0 mm de diâmetro interno (Factory Instrumentais Cirúrgicos, São Paulo, Brasil). O recorte foi realizado na porção oclusiva da membrana de colágeno.

Figura 4.2 - Área doadora após remoção do enxerto de osso parietal (A) e implante transpassando o enxerto (B)

Figura 4.3 - Enxerto fixado ao leito por meio do implante (A) e membrana posicionada sobre o enxerto e o implante (B)

As suturas foram realizadas por planos na área experimental, suturando-se primeiro o músculo, com fio 5.0 absorvível de poliglactina 910 (Vicryl, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil). Posteriormente, foi realizada a sutura da pele, utilizando-se fio de poliéster trançado e siliconizado 4.0 (Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil). Na área doadora, a pele, também, foi suturada com este último tipo de fio. Os animais foram colocados em gaiolas aquecidas até o término do efeito da sedação e, em seguida, transferidos para o biotério. Após a cirurgia, os animais receberam dieta pastosa e água à vontade.

Legenda:

- 1- leito receptor
- 2- enxerto
- 3- membrana
- 4- epitélio/tecido muscular
- 5- implante

4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

O sacrifício dos animais foi realizado a 0, 14, 21 e 45, 150 dias. Para cada período, seis animais de cada grupo foram sacrificados.

Para o sacrifício, os animais foram anestesiados como descrito anteriormente e, a seguir realizada a técnica de perfusão transcardíaca. Esta técnica consiste em expor o coração do animal, cortar o vértice esquerdo e o átrio direito, introduzir uma cânula ligada a uma bomba na aorta ascendente, que inicialmente, bombeia a solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) com o objetivo de remover todo o sangue do animal e, em seguida, bombeia a solução fixadora constituída por formaldeído a 3,7%.

Em seguida, o animal foi decapitado, a mandíbula removida, e a hemi-mandíbula, incluindo a área operada, fixada pelo paraformaldeído a 4,0% em tampão. Cada espécime foi catalogado.

4.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os espécimes foram descalcificados em EDTA e processados pela técnica de fratura descrita por Berglundh et al. (1991) (Figuras 4.4 e 4.5). Dos cortes incluídos em parafina, foram obtidos cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina.

Figura 4.4 – Peça descalcificada com implante em posição

Figura 4.5 – Peça descalcificada sem o implante, para posterior inclusão em parafina

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes centrais de cada peça foram escolhidos para análise qualitativa dos diferentes componentes teciduais.

Utilizamos um microscópio de luz (Axioskop 2 Plus, Carl-Zeiss, GMBH, Alemanha), com objetivas que permitiram o aumento de 25 a 400 vezes. A análise foi iniciada em pequeno aumento (25 vezes) para que pudéssemos visualizar o corte como um todo. Com a ampliação da imagem, realizamos, sistematicamente, a análise dos seguintes aspectos dos cortes:

- a) características da membrana, infiltrado inflamatório associado a membrana, reabsorção e espessura da membrana;
- b) características do enxerto ósseo (tipo de osso, vitalidade do tecido ósseo, área de reabsorção óssea, substituição e neoformação óssea, área do enxerto voltada para a membrana, área do enxerto voltada para a interface leito-enxerto e área do enxerto voltada para a superfície do implante);
- c) a interface leito-enxerto, quanto à presença de áreas de tecido conjuntivo interposto, áreas de reabsorção e neoformação óssea, integração do enxerto com o leito receptor através da presença de pontes ósseas e formação óssea sobre a superfície do implante. No leito receptor, avaliamos áreas de reabsorção e neoformação óssea e formação óssea sobre a superfície do implante.

4.8 MENSURAÇÃO DA ESPESSURA DA MEMBRANA

A área mais central do corte histológico foi selecionada, e posterior mensuração da espessura da membrana de colágeno. Foram realizadas três mensurações lineares, da borda inferior até a borda superior da superfície da membrana. Em seguida, calculou-se a média dessas três mensurações, que foi considerada a espessura da membrana.

As mensurações foram feitas em um microscópio de luz (AxioImager A.1, Carl-Zeiss, GMBH, Alemanha), com aumento de 12,5 vezes e através do software AxioVision 4.6.3.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A alteração da espessura da membrana ao longo do período de reparação foi verificada pelo teste de Friedman. As comparações entre os diferentes períodos de tempo foram feitas pelo teste de Dunn.

5 RESULTADOS

Após a cirurgia não foi observada nenhuma complicação clínica e nenhum animal foi perdido no decorrer do experimento. Os procedimentos transcorreram sem quaisquer problemas. Assim, 30 animais deram origem a 30 espécimes para processamento histológico.

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

5.1.2 Grupo zero hora

No período de zero hora, a membrana de colágeno suíno apresentou estrutura colágena com diversos espaços distribuídos entre as fibras preenchidos por hemácias (Figura 5.1).

No enxerto ósseo observou-se a preservação dos elementos celulares, contendo osteócitos no interior de suas lacunas em toda a extensão (Figura 5.2). O enxerto apresentou organização bicortical com deposição lamelar paralela e organização em lamelas concêntricas no seu interior.

A superfície da cortical externa do leito receptor apresentou-se desprovida de perióstio e recoberta por algumas hemácias e espículas ósseas. A cortical do leito apresentou-se constituída por lamelas paralelas entre si e organização em lamelas concêntricas em seu interior. As lacunas estavam preenchidas por osteócitos e vasos preenchidos por hemácias.

Observou-se áreas onde a cortical estava perfurada, com objetivo de favorecer a revascularização da área a ser reconstruída, e preenchida por hemácias (Figura 5.3).

Em algumas regiões, observou-se o perióstio elevado da cortical (Figura 5.4) mostrando sua estrutura celular com células osteoprogenitoras, a estrutura fibrosa e logo acima uma área rica em vasos suprapariosteais. Entre as células e estes vasos, intensa hemorragia com presença de hemácias em grande quantidade.

Também foram encontradas células multinucleadas na porção inferior do leito, na região oposta à área do enxerto.

Figura 5.1 - Espécime do grupo zero. Fotomicrografia mostrando a estrutura da membrana de colágeno, contendo hemácias (setas) entre as fibras colágenas (FC). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.2 - Espécime do grupo zero. Fotomicrografia mostrando área do enxerto ósseo com osteócitos (setas) no interior de lacunas. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.3 - Espécime do grupo zero. Interface leito-enxerto (ILE). Fotomicrografia mostrando perfuração na cortical do leito receptor (setas). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 100x

Figura 5.4 - Espécime do grupo zero. Interface leito-enxerto (ILE). Fotomicrografia mostrando periósteo (setas) elevado da cortical do leito receptor (L). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

5.1.2 Grupo 14 dias

Nessa fase, a membrana estava recoberta por tecido muscular interposto por um tecido conjuntivo imaturo, com fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície da membrana e grande quantidade de fibroblastos (Figura 5.5 e 5.6). Um intenso infiltrado inflamatório pode ser encontrado tanto no tecido conjuntivo imaturo que recobre a membrana, quanto na parte interna da membrana (Figura 5.7). O infiltrado caracterizou-se principalmente por células mononucleares (linfócitos). Observaram-se ainda diversas células multinucleadas no interior da membrana (Figura 5.8).

O enxerto, nesse momento, apresentou diversas lacunas esvaziadas (Figura 5.9), mas ainda encontramos lacunas com elementos celulares preservados e outras com núcleos picnóticos.

A interface entre o leito e o enxerto encontrou-se preenchida por um tecido conjuntivo imaturo rico em vasos e fibroblastos (Figura 5.10). Também foram encontradas fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície do implante.

O leito apresentou áreas de reabsorção em sua cortical e diversas trabéculas de osso imaturo projetando-se a partir do leito. Encontramos espículas ósseas, osteoclastos e osso neoformado depositado diretamente em sua superfície.

Junto à superfície do implante observaram-se áreas de tecido conjuntivo imaturo com suas fibras voltadas perpendicularmente à superfície do implante na região da interface enxerto/leito, assim como fibroblastos (Figura 5.11). Na região do leito, foram observadas trabéculas de osso neoformado em contato com a superfície do implante (Figura 5.12).

Figura 5.5 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando a interface tecido muscular (TM) / membrana de colágeno (ME), interposta por tecido conjuntivo imaturo. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.6 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando a interface tecido muscular/membrana de colágeno, interposta por tecido conjuntivo imaturo. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 1000x

Figura 5.7 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando infiltrado inflamatório no interior da membrana. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.8 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando interior da membrana. Células multinucleadas (setas). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 1000x

Figura 5.9 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando área do enxerto com lacunas esvaziadas (setas). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 1000x.

Figura 5.10 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando área de tecido conjuntivo (TC) interposto entre o leito (L) e o enxerto (E), junto à superfície do implante (SI). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 200x

Figura 5.11 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando área de tecido conjuntivo imaturo junto à superfície do implante (SI). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.12 - Espécime do grupo 14 dias. Fotomicrografia mostrando área de osso neoformado junto à superfície do implante. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

5.1.3 Grupo 21 dias

A membrana apresentou intenso infiltrado celular, na sua periferia e moderadamente no seu interior com características predominantes monocíticas (Figura 5.13). Algumas células multinucleadas foram observadas assim como a desorganização da matriz colágena original da membrana (Figura 5.14); vasos foram observados penetrando o interior da membrana (Figura 5.15).

Observou-se osso neoformado com trabeculado espessado junto aos bordos do enxerto e sob a membrana (Figura 5.16). O enxerto mostrou-se integrado ao leito através de pontes de osso neoformado com trabeculado bastante espessado (Figuras 5.17 e 5.18). O interior do enxerto apresentou diversas lacunas esvaziadas (Figura 5.19), mas é nítida a deposição óssea junto à superfície periférica do enxerto.

A integração do enxerto pode ser demonstrada por áreas de reabsorção e neoformação em seu interior, assim como por lacunas com osteócitos em seu interior. O leito apresentou intensa remodelação (Figura 5.20).

Foram observadas áreas de fresas em contato com tecido conjuntivo imaturo e diversas fibrilas colágenas direcionadas perpendicularmente, assim como outras paralelamente, à superfície do implante.

Junto às fresas do implante observou-se osso imaturo com trabéculas mais espessadas, assim como osteoblastos e vasos (Figura 5.21). Observou-se ainda áreas de enxerto pré-existente em contato direto com o implante, assim como áreas de osso neoformado na região do leito (Figura 5.22). Dessa forma, podemos evidenciar o estágio mais avançado em que se encontra a reparação óssea na região de leito, em relação ao tecido encontrado na interface leito/enxerto.

Figura 5.13 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando a estrutura da membrana (ME) com infiltrado inflamatório moderado no seu interior. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 100x

Figura 5.14 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando região da membrana (ME) junto ao enxerto (E). Desorganização da matriz colágena. Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.15 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando vasos (setas) penetrando no interior da estrutura da membrana (ME). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.16 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando osso regenerado (OR) sob a membrana (ME). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 100x

Figura 5.17 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando pontes de osso regenerado (OR) conectando o enxerto (E) ao leito (L). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 40x

Figura 5.18 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando osso neoformado (OR) entre o enxerto (E) e o leito (L). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 1000x

Figura 5.19 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando interior do enxerto (E). Lacunas esvaziadas (setas). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.20 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando remodelação óssea no leito (L), junto à superfície do implante (SI). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 40x

Figura 5.21 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando reparação óssea na área de osso regenerado (OR), junto à superfície do implante (SI). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.22 - Espécime do grupo 21 dias. Fotomicrografia mostrando osseointegração na área de osso pré-existente, junto à superfície do implante (SI). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

5.1.4 Grupo 45 dias

Após 45 dias, a estrutura colágena original da membrana apresentou avançado grau de reabsorção com grande diminuição da espessura da sua estrutura original. Foram encontrados vasos que penetravam profundamente e possivelmente atravessam a estrutura remanescente da membrana (Figura 5.23). Diversas células em seu interior apresentaram formato fusiforme, lembrando fibroblastos (Figura 5.24).

Observou-se diversas áreas onde a membrana havia sido reabsorvida por completo, assim como áreas onde o leito fundia-se ao enxerto (Figura 5.25). Nessas áreas onde a membrana praticamente foi toda reabsorvida observou-se ainda intensa vascularização.

O tecido ósseo formado sob a membrana apresentou avançado grau de maturação e o início de organização lamelar (Figura 5.26).

Junto às fresas do implante observou-se tecido ósseo neoformado entre o enxerto e o implante, assim como na região da interface leito/enxerto, e ainda na região do leito (Figura 5.27). Todos esses tecidos com avançado grau de maturação. Ainda foram encontradas algumas áreas de tecido conjuntivo em contato com as fresas do implante.

Figura 5.23 - Espécime do grupo 45 dias. Fotomicrografia mostrando vasos penetrando a estrutura da membrana (setas). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.24 - Espécime do grupo 45 dias. Fotomicrografia mostrando remanescente da membrana contendo células que lembram fibroblastos (setas). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 400x

Figura 5.25 - Espécime do grupo 45 dias. Fotomicrografia mostrando área de integração do enxerto (E) ao leito receptor (L), junto à superfície do implante (SI). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 100x

Figura 5.26 - Espécime do grupo 45 dias. Fotomicrografia mostrando tecido ósseo (OR) sob a membrana (ME) com início de organização lamelar. Enxerto (E). Leito receptor (L). Coloração Hematoxilina-eosina. Aumento de 100x

Figura 5.27 - Espécime do grupo 45 dias. Fotomicrografia mostrando osseointegração nas áreas de osso regenerado (OR), enxerto (E) e leito (L). Coloração, junto à superfície do implante (SI). Hematoxilina-eosina. Aumento de 100x

5.1.5 Grupo 150 dias

Em um pequeno número de lâminas observou-se remanescente da estrutura original da membrana e o enxerto apresentava-se completamente integrado ao osso receptor e com adiantado grau de maturação (Figura 5.28).

Figura 5.28 - Espécime do grupo 150 dias. Coloração Hematoxilina-eosina. Fotomicrografia mostrando área de osso regenerado (OR), leito (L) e enxerto integrado ao leito, junto à superfície do implante (SI). Aumento de 40x

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 5.1 – Alteração da espessura da membrana de acordo com o tempo

Tempo experimental	Início (0 hora)	14 dias	21 dias	45 dias	150 dias
Média (µm)	596,1900	858,0383	646,7929	197,9667	27,9300
Desvio padrão	131,3690	393,2871	211,0905	26,7012	14,5423

Inicialmente, houve um aumento na espessura da membrana, entre 0 e 14 dias. Após 14 dias, a espessura foi diminuindo até o período final de 150 dias.

De acordo com o teste de Friedman, houve uma alteração significativa na espessura da membrana com o tempo ($p < 0,05$). Segundo o teste de comparações múltiplas de Dunn, houve diferença significativa entre 14 dias e 150 dias ($P = 0,03$).

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi possível avaliarmos o processo de reparação óssea após a técnica de ROG, utilizando membrana reabsorvível e enxerto ósseo autógeno. De maneira geral, observamos que o modelo experimental é previsível e que todos os espécimes avaliados repararam-se satisfatoriamente, promovendo um aumento de volume ósseo.

Em zero hora, pudemos observar em algumas regiões, o perióstio do leito elevado da cortical, mostrando a estrutura celular do perióstio, com células osteoprogenitoras, a estrutura fibrosa e logo acima uma área rica em vasos supraperiosteais. A irrigação do enxerto, proveniente do leito receptor, faz-se necessária (Dongieux et al., 1998), como também pode-se sugerir a participação de células do perióstio no início do processo de formação e remodelação óssea. Reforça esse raciocínio o estudo de Faria et al. (2008) que avaliou o processo de remodelação do enxerto de crista ilíaca, em mandíbula de coelhos. Após três dias, nas regiões em que as bordas do enxerto estavam próximas do leito receptor, o perióstio do leito encontrava-se destacado, com células indiferenciadas. O processo de remodelação óssea se acentuou nestas áreas, após a primeira semana, havendo a deposição de um novo osso entre o leito e o enxerto, caracterizado por células semelhantes a osteoblastos.

Em nosso estudo, aos 14 dias, a interface entre o leito e o enxerto encontrou-se preenchida por um tecido conjuntivo imaturo, rico em vasos e fibroblastos. Nesse momento, notou-se áreas de reabsorção na cortical do leito, porém diversas trabéculas de osso imaturo projetavam-se a partir do leito, caracterizando o início do processo de formação e reabsorção óssea.

De modo similar, Donos et al. (2002b) avaliaram o processo de reparação de enxertos ósseos autógenos, instalados em sítios intra-orais de ratos e recobertos por dois tipos de membranas, reabsorvível de copolímero e PTFE-e. Embora o modelo experimental e os períodos de sacrifício dos animais permitam uma comparação direta entre os estudos, o fato de apenas um espécime do grupo PTFE-e (1/6) e dois do grupo copolímero (2/6) no estudo de Donos et al. (2002b) não terem apresentado exposição das membranas, limita a comparação entre eles. Este fato ressalta a previsibilidade do presente modelo experimental, o qual não apresentou exposição

de membrana em nenhum dos espécimes avaliados. Além disso, reforça a importância dos nossos achados, uma vez que estes foram obtidos de um número maior de amostras. Em relação à interface leito/enxerto, os resultados dos dois estudos são bastante semelhantes, ao considerar os sítios em que não foi observada exposição de membrana. Na superfície do enxerto, foram observados espículas ósseas e osteoclastos, adjacentes às áreas de deposição direta de osso neoformado. No estudo de Donos et al. (2002b), ainda no período de 14 dias, houve a manutenção do volume do enxerto, e já pode ser observada uma continuidade óssea entre o leito e o enxerto.

Faria et al. (2008) avaliaram o efeito da presença de perfurações, realizadas no leito receptor, na integração do enxerto autógeno. Os autores encontraram, em 20 dias, uma intensa deposição óssea, especialmente nas áreas próximas às perfurações ósseas. Os resultados sugerem que a perfuração pode ter atuado como um importante fator para acelerar a angiogênese no enxerto nos estágios iniciais, apesar de não impedir a perda de volume ósseo nos estágios subseqüentes. Acredita-se que as células ósseas sobrevivam aproximadamente 24h sob condições de hipóxia, e que uma revascularização rápida e eficiente do enxerto é um fator vital para o sucesso do procedimento (Gordh; Alberious, 1999). Contudo, os autores concluíram que as perfurações não impediram que, após 60 dias, houvesse uma reabsorção significativa do enxerto, mas apenas auxiliaram no processo inicial de reparo. Estes dados justificam a realização das perfurações no leito receptor adotadas no presente estudo.

Aos 21 dias, pudemos observar osso neoformado, junto aos bordos do enxerto e sob a membrana. Formaram-se pontes ósseas, com trabeculado espessado, integrando o enxerto ao leito. Essas pontes foram observadas após quatro semanas por Adeyemo et al. (2008), onde enxertos autógenos da crista ilíaca foram instalados na cortical da mandíbula de carneiros. No estudo de Faria et al. (2008), essas pontes foram observadas após 60 dias. A diferença entre os resultados destes estudos pode estar relacionada com o modelo animal utilizado e a origem do enxerto. Faria e Adeyemo utilizaram enxertos de crista ilíaca, enquanto o presente estudo utilizou, como área doadora, a calvária. Estudos têm demonstrado que enxertos ósseos de origem membranosa apresentam uma menor perda de volume e proporcionam formação de tecido ósseo em maior quantidade do que enxertos de origem endocondral, após sua fixação na área doadora (Phillips; Rahn,

1988; Wong; Rabie, 1999). Este fato provavelmente deve-se à rápida revascularização do enxerto membranoso, como também diferenças estruturais e biomecânicas entre os dois tecidos.

Em nosso estudo, no período de 21 dias, pudemos observar o processo de formação e reabsorção óssea em áreas internas do enxerto, bem como a remodelação do leito receptor. Jardini et al. (2005) analisando a integração do enxerto ao leito receptor, recoberto com membrana de PTFE-e, também observaram a remodelação do leito receptor, presença de osso neoformado na interface leito/enxerto e deposição óssea direta na superfície inferior do enxerto. Porém, em algumas áreas, ocorreu a interposição de tecido conjuntivo entre o enxerto e o leito. Com o objetivo de aprimorar essa metodologia e favorecer melhor reparo ósseo, este estudo utilizou parafusos de titânio para fixação do enxerto. Esta fixação oferece maior estabilidade ao enxerto, o que parece ter favorecido o reparo ósseo na interface leito/enxerto.

Após 45 dias, nossos dados demonstraram áreas de osso regenerado com início de organização lamelar. Resultados semelhantes foram observados por Adeyemo et al. (2008), aos 56 dias, após a cirurgia de fixação do enxerto. O enxerto encontrava-se completamente substituído por osso maduro, com um fino trabeculado, osteócitos viáveis e componente medular espesso. Burchardt et al., em 1983, demonstraram que a reparação de enxertos autógenos, em cães, ocorreu através do aumento do processo de reabsorção óssea do enxerto, devido à atividade osteoclástica, e posteriormente, do aumento de osso neoformado e substituição do enxerto, conferindo maior resistência tecidual, em um período de seis meses.

Utilizando o mesmo modelo experimental cirúrgico que este estudo, Hespanhol (2009) observou que, em relação ao osso regenerado, a técnica de ROG com membranas de colágeno, permitiu um crescimento significativo de tecido ósseo. Após o período de 150 dias, a espessura final do tecido ósseo foi cerca de 4,7 vezes maior que espessura original do leito. Os resultados demonstraram a incorporação do enxerto ósseo e completo preenchimento do defeito pré-existente, gerando o aumento da espessura final de osso. Jardini et al. (2005) obtiveram um ganho de tecido ósseo de 55%, além do volume do enxerto ósseo original, em quarenta e cinco dias, após ROG com membrana de PTFE-e associada ao enxerto autógeno. Os diferentes períodos de avaliação e diferenças na metodologia, dos dois últimos

experimentos, dificultam a conclusão sobre a causa do maior volume ósseo obtido no experimento de Hespanhol. Sendo assim, estudos futuros devem isolar essas variáveis, no intuito de investigar se este maior volume realmente acontece e se está relacionado ao tipo de membrana, ao tipo de fixação, ou a ambos.

A avaliação do processo de biodegradação da membrana de colágeno, quando utilizada em procedimentos de ROG, também consistiu em um dos objetivos do presente estudo. O período zero hora representou a situação em que os tecidos se encontravam, imediatamente após a sutura da ferida. Nesse momento, observamos hemácias preenchendo os espaços, entre as fibras colágenas da estrutura da membrana. Essa característica aponta para as propriedades do colágeno de semi-permeabilidade e posterior função hemostática, favorecendo a cicatrização da ferida (Yaffe et al., 1984; Hutmacher et al., 1996; Locci et al., 1997). Em um estudo em coelhos, Miller et al. (1996) observaram um íntimo contato dos tecidos circunjacentes com a membrana e um marcante coágulo sanguíneo. Sendo assim, constatou-se a adaptação da membrana às estruturas anatômicas vizinhas, indicando uma pré-disposição para ocorrer a interação com esses tecidos. Logo após a sua implantação, já pode ser observado o início do processo de degradação da membrana (Von Arx et al., 2005).

No período de 2 a 3 semanas, vemos a formação de tecido conjuntivo imaturo sobre a membrana, favorecendo a integração tecidual (Moses et al., 2008; Tal et al., 2008a). Um aspecto semelhante foi observado por Rothamel et al. (2005). Já na segunda semana, pôde ser observada uma integração tecidual perfeita e uma vascularização quase completa da estrutura da membrana de colágeno suíno (*BioGide*). Em nosso estudo, a vascularização da membrana ocorreu em um período um pouco mais tardio, entre a segunda e a terceira semana. A diferença no tempo de vascularização, com relação ao experimento de Rothamel, provavelmente deveu-se ao fato de que no segundo estudo, a membrana foi instalada no dorso de ratos, proporcionando maior contato com estruturas vasculares. A rápida vascularização da estrutura da membrana implica em um processo inicial de degradação mais acentuado (Owens; Yukna, 2001). Em quatro semanas, os autores observaram quase uma completa biodegradação da membrana.

Nos períodos de 14 e 21 dias, observamos em nosso estudo, um intenso infiltrado inflamatório, na periferia da membrana, e moderado infiltrado inflamatório em seu interior. Sommerman et al. (1991) ressaltaram que a reação de corpo

estranho acentuada pode comprometer a integração tecidual, devido ao fato de fibroblastos serem importantes precursores para deposição de colágeno. Apesar disso, a presença de infiltrado inflamatório parece não afetar o ganho final de volume ósseo neoformado. Outros estudos (Donos et al., 2002b; Rothamel et al., 2005) com membranas reabsorvíveis, confirmam esses dados, nos quais foi observada uma inflamação moderada na superfície da membrana, por até quatro semanas.

Em 45 dias, podemos observar no presente estudo a degradação da estrutura da membrana. Esses resultados são semelhantes àqueles obtidos por outros autores (Donos et al., 2002b; Sandberg et al., 1993; Zellin et al., 1995), apesar de alguns utilizarem outros materiais como copolímeros. Avaliando membranas de colágeno suíno (*BioGide*) e membranas com reticulação, não vemos diferenças entre as mesmas, na espessura ou na perda de colágeno, durante as primeiras semanas (Moses et al., 2008). Os resultados demonstraram que, após o período de 21 dias, a estrutura de ambas as membranas não havia sido reabsorvida.

Por outro lado, Moses et al. (2008), comparando o padrão de biodegradação de membranas de colágeno, demonstraram diferenças estatisticamente significantes na espessura das mesmas e na quantidade de colágeno por área. Membranas com reticulação por ribose tiveram alterações mínimas, enquanto que membranas sem reticulação ou reticulação por glutaraldeído perderam a maioria do colágeno após 28 dias. As mudanças na espessura da membrana não estão diretamente relacionadas com a perda de colágeno. Observamos, em nosso estudo, que o aparente aumento da espessura da membrana aos 14 dias pode estar relacionado com a revascularização e infiltrado inflamatório da membrana. Reforça este raciocínio o fato de nossos dados mostrarem uma pequena redução da espessura da membrana até o período de 21 dias, e em seguida, sua redução acentuada após esse período, com conseqüente redução do infiltrado inflamatório e degradação da membrana.

Da mesma forma, em quatro semanas, Rothamel et al. (2005) observaram quase uma completa biodegradação da membrana sem reticulação (*BioGide*), enquanto que membranas com reticulação por glutaraldeído ou enzimática, apresentavam-se sem sinais de biodegradação e com suas estruturas parcialmente vascularizadas ou sem sinais de vascularização, respectivamente.

Em estudo com cães, Owens e Yukna (2001), analisaram a reabsorção de membranas instaladas no palato e constataram uma degradação parcial da membrana de colágeno suíno no primeiro mês, moderada no segundo e severa no

terceiro mês. Seguindo o mesmo padrão, a rede de vasos sanguíneos apresentava-se moderada, após um mês, havendo um aumento da quantidade de vasos no segundo e terceiro mês. Devido ao modelo animal utilizado, observamos um maior tempo de biodegradação da membrana, comparado com os resultados obtidos em nosso estudo.

Os dados apresentados em outros experimentos (Owens; Yuna, 2001; Rothamel et al., 2005; Bornstein et al., 2007; Moses et al., 2008) referem-se a procedimentos que não aplicaram técnicas de ROG e enxerto ósseo, além de incluírem membranas com reticulação em sua metodologia. Tais diferenças justificam, ao menos em parte, a variabilidade dos resultados de tempo de biodegradação existentes na literatura, incluindo o presente estudo. A camada porosa da membrana de colágeno suíno (*BioGide*) utilizada nesse experimento, contribui para a vascularização rápida da mesma, e simultaneamente permite a transferência de nutrientes, melhorando o meio ambiente e a condição tecidual, para a regeneração óssea. O fato de não haver a exposição da membrana em nossos espécimes favorece o processo de reparação, estando exposta apenas à atividade enzimática de macrófagos infiltrados e leucócitos polimorfonucleares (Brunnel et al., 1996).

Com relação à osseointegração, em duas semanas, a análise histológica de nosso estudo demonstrou a formação de trabéculas de osso neoformado imaturo, em contato com a superfície do implante. Apesar de utilizarem modelos animais e superfícies de implantes diferentes, outros estudos têm demonstrado resultados semelhantes, nesse mesmo período.

Abrahamsson et al. (2004) observaram, em quatro dias, a substituição do coágulo formado logo após a implantação, por um tecido de granulação, com estruturas vasculares circundadas por células mesenquimais parecidas com fibroblastos. Já na primeira semana, se iniciou a formação de osso imaturo, identificando-se claramente centros de formação óssea (ósteons primários), com estrutura trabecular ao redor das roscas do implante. De acordo com Schwarz et al. (2007), nesses sítios encontravam-se osteoblastos e lacunas com osteócitos, no interior da nova trabécula formada. As estruturas vasculares nos tecidos neoformados se originavam da parte esponjosa do osso alveolar. Nesse mesmo período, Médard et al. (2000) verificaram a formação de ilhas de osteóide ao longo do implante, caracterizadas por uma matriz colágena circundada por osteoblastos

cubóides. Porém, em uma semana, raramente foram observados osteoblastos em contato direto com a superfície do implante. Já em superfícies jateadas por areia, osteoblastos têm sido encontrados a partir de um dia após a implantação do implante, depositando proteínas relacionadas ao osso (Meyer et al., 2004).

Outros estudos demonstraram que essas trabéculas de osso neoformado, observadas em nossas lâminas, circundam a rede de vasos sanguíneos, se estendendo a partir do osso nativo em direção à superfície do implante (Bornstein et al., 2008). Em duas semanas, o osso trabecular neoformado, originário do tecido ósseo nativo, não atinge necessariamente a superfície de implantes usinados (Franchi et al., 2007). O trabeculado ósseo é fino, contendo osteócitos em amplas lacunas. Na superfície de osso neoformado, osteoblastos encontram-se alinhados, produzindo osteóide.

Por outro lado, Fujii et al. (1998) observaram o início do processo de reabsorção óssea, já a partir do quinto dia, através de células gigantes multinucleadas na cavidade de osso medular adjacente ao implante. Essa reabsorção acontece na área de osso pré-existente, com lacunas vazias de osteócitos em torno dos implantes.

Em nosso estudo, aos 21 dias, as trabéculas de osso imaturo tornaram-se mais espessas, assim como áreas de osso neoformado já puderam ser observadas na região do leito. Alguns autores, nesse mesmo período, demonstraram que o osso neoformado ao redor da superfície de implantes, instalados na tíbia de ratos, havia se transformado em osso lamelar e a estrutura óssea estava organizada (Médard et al., 2000). Esse tecido se caracterizava por camadas finas paralelas de osso lamelar e alguns osteócitos, na interface osso-implante. Em um estudo com mini-porcos (Buser et al., 1991) foi possível observar o curto período necessário para ocorrer formação óssea. Os resultados demonstraram uma porcentagem de contato osso-implante de 50-60% após três semanas, com resultados semelhantes em seis semanas.

No estudo de Abrahamsson et al. (2004), em quatro semanas, observou-se que grande quantidade de osso imaturo havia sido substituído por osso lamelar, o qual estava presente não somente próximo à área de osso pré-existente, mas também adjacente à superfície do implante. A presença de osso neoformado em contato direto com a superfície de titânio foi encontrada em vários estudos no período de quatro semanas, com áreas de osso maduro e áreas de osso com níveis

relativamente baixos de calcificação (Okamatsu et al., 2007; Bornstein et al., 2008; Franchi et al., 2007). Nesse estágio, ocorre um aumento da densidade óssea, através da deposição de tecido ósseo com fibras paralelas (Buser et al., 2004). Além disso, grandes sinais de remodelação e formação de ósteons secundários podem ser vistos.

Em nosso estudo, em um período um pouco mais tardio (após 45 dias) também foi possível visualizarmos tecido ósseo neoformado com avançado grau de maturação, próximo à superfície do implante. Da mesma forma, o estudo de Abrahamsson et al. (2004) constatou, entre seis e oito semanas, a presença de tecido ósseo mineralizado com um alto nível de osseointegração.

Apesar de encontrarmos no presente experimento, tecido ósseo neoformado junto às roscas do implante, tanto na área de leito quanto na área de enxerto, também puderam ser observadas áreas de tecido conjuntivo, aos 45 dias. Com resultados semelhantes nesse mesmo período, Bornstein et al. (2008) verificaram que a matriz óssea apresentava-se rica em vasos e células parecidas com fibroblastos.

Apenas após 150 dias, é que pudemos observar em nosso estudo, tecido ósseo nas áreas de osso pré-existente e osso regenerado, com avançado grau de maturação. Com resultados similares, Veis et al. (2004) instalaram implantes na crista ilíaca de cães, simultaneamente com enxerto autógeno e recobertos com membrana reabsorvível. Em cinco meses, todos os implantes demonstraram estar integrados ao tecido ósseo, o qual apresentava-se em processo final de remodelação, não permitindo distinguir o limite entre osso regenerado e osso pré-existente.

Através dessa análise histológica, foi possível demonstrar a previsibilidade do modelo experimental que utiliza a técnica de ROG, com membrana reabsorvível, simultaneamente com a instalação de implantes. Estudos futuros devem ser realizados no intuito de documentar com outras metodologias, como imunohistoquímica, o modelo experimental. Além disso, mais estudos devem ser realizados explorando o modelo experimental para investigar outros fatores relacionados com a reparação dos enxertos ósseos, reabsorção das membranas e reparação óssea ao redor de implantes.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, achamos lícito concluir que:

7.1 A reparação óssea do enxerto autógeno, utilizando ROG, ocorreu através de trabéculas ósseas partindo do leito em direção ao enxerto, seguindo-se sua integração e substituição. Houve, após 150 dias, a completa integração do enxerto ao leito receptor, com acréscimo no volume de tecido ósseo.

7.2 O processo de biodegradação da membrana ocorreu dentro do período de 45 dias. Até 21 dias, observou-se intenso infiltrado inflamatório na estrutura da membrana.

7.3 Após 14 dias, a região da interface leito/enxerto mostrou tecido conjuntivo em contato com a superfície do implante, enquanto na região do leito notou-se osso imaturo em contato com sua superfície. Após 21 dias, observamos contato secundário osso/implante na área de osso regenerado.

REFERÊNCIAS¹

Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1995;33(5):312-8.

Aaboe M, Schou S, Hjørting-Hansen E, Helbo M, Vikjaer D. Osseointegration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(1):51-8.

Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(4):381-92.

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, et al. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(7):651-9.

Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1992;50:829-34.

Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Influence of surrounding soft tissues on onlay bone graft incorporation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;82(1):22-33.

Alberius P, Gordh M. Osteoprotein and bone sialoprotein at the bone graft recipient site. *Arch Otolaryngologic Head Neck Surgery*. 1998;124:1382-6.

Albrektsson, T. Direct bone anchorage of dental implants. *J Prosthet Dent*. 1983;50:381-92.

Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig*. 2000;4(4):219-25.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de periódico segundo base de dado Medline

American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms. 3ed. Chicago: American Academy of Periodontology; 1992.

Azem A C. Revascularização de enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não a membrana de PTFE-e [Tese de Mestrado]. São Paulo, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.

Becker J, Neukam FW, Schliephake H. Restoration of the lateral sinus wall using a collagen type I membrane for guided tissue regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1992;21(4):243-6.

Becker W, Becker BE, McGuire MK. Localized ridge augmentation using absorbable pins and e-PTFE barrier membranes: a new surgical technique. Case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994;14(1):48-61.

Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology* 2008 ;96(1):1-11.

Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res*. 1991;2:81-90.

Blumenthal N, Steinberg J. The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone-collagen gel implants in human infrabony defects. *J Periodontol*. 1990;61(6):319-27.

Bornstein MM, Bosshardt D, Buser D. Effect of two different bioabsorbable collagen membranes on guided bone regeneration: a comparative histomorphometric study in the dog mandible. *J Periodontol* 2007;78(10):1943-53.

Bornstein MM, Valderrama P, Jones AA, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Mar;19(3):233-41.

Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100.

Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1977;16 Suppl:1-132.

Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué E, Marin P, Zahedi S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross-linking. *J Periodontol*. 1996;67(12):1342-8.

Buchman SR, Ozaki W. The ultrastructure and resorptive pattern of cancellous onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Annals Plastic Surgery*. 1999; 43: 49-56.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001;72(2):215-9.

Burchardt H, Glowczewskie FP Jr, Enneking WF. The effect of Adriamycin and methotrexate on the repair of segmental cortical autografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am*. 1983;65(1):103-8.

Burgos PM, Rasmusson L, Meirelles L, Sennerby L. Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008;10(3):181-90.

Busenlechner D, Kantor M, Tangl S, Tepper G, Zechner W, Haas R, et al. Alveolar ridge augmentation with a prototype trilayer membrane and various bone grafts: a histomorphometric study in baboons. *Clin Oral Implants Res*. 2005 ;16(2):220-7.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(7):889-902.

Buser D, Dula K, Lang NP, Nyman S. Long-term stability of osseointegrated implants in bone regenerated with the membrane technique. 5-year results of a prospective study with 12 implants. *Clin Oral Implants Res*. 1996;7(2):175-83.

Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res*. 2004 Jul;83(7):529-33.

Carpio L, Loza J, Lynch S, Genco R. Guided bone regeneration around endosseous implants with anorganic bovine bone mineral. A randomized controlled trial comparing bioabsorbable versus non-resorbable barriers. *J Periodontol*. 2000;71(11):1743-9.

Colnot C, Romero DM, Huang S, Rahman J, Currey JA, Nanci A, Brunski JB, Helms JA. Molecular analysis of healing at a bone-implant interface. *J Dent Res*. 2007; 86(9):862-7.

Dahlin C, Sennerby L, Lekholm V, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: a experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4(1),19-25.

Davies, JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*. 1998;11:391-401.

Davis WH, Martinoff JT, Kaminishi RM. Long-term follow up of transoral rib grafts for mandibular atrophy. *J Oral Maxillofac Surg*. 1984;42(9):606-9.

De Marco AC, Jardini MA, Lima LP. Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(6): 867-74.

Dongieux JW, Block MS, Morris G, Gardiner D, Dean K. The effect of different membranes on onlay bone graft success in the dog mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;86(2):145-51.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. *Clin Oral Implants Res*. 2002a;13(2):185-91.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2002b;13(2):203-13.

Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T. Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone regeneration. *Clin Oral Impl Res*. 2005;16:133-9.

Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(1):58-62.

Ermis I, Poole M. The effects of soft tissue coverage on bone graft resorption in the craniofacial region. *Br J Plast Surg.* 1992;45(1):26-9.

Ersanli S, Olga V, Leblebicioglu B. Histologic analysis of alveolar bone following guided bone regeneration. *J Periodontol.* 2004;75(7):750-6.

Faria PE, Okamoto R, Bonilha-Neto RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Apr;19(4):393-401.

Franchi M, Bacchelli B, Giavaresi G, De Pasquale V, Martini D, Fini M, et al. Influence of different implant surfaces on peri-implant osteogenesis: histomorphometric analysis in sheep. *J Periodontol.* 2007;78(5):879-88.

Friedmann A, Strietzel FP, Maretzki B, Pitaru S, Bernimoulin JP. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. *Clin Oral Implants Res.* 2002 ;13(6):587-94.

Fujii N, Kusakari H, Maeda T. A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction. *J Periodontol.* 1998;69(4):485-95.

Gielkens PF, Schortinghuis J, de Jong JR, Paans AM, Ruben JL, Raghoobar GM, et al. The influence of barrier membranes on autologous bone grafts. *J Dent Res.* 2008;87(11):1048-52.

Gordh M, Alberius P. Some basic factors essential to autogeneic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1999;33(2):129-46.

Gotfredsen K, Nimb L, Hjørting-Hansen E. Immediate implant placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforced with polyglactin 910. An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1994;5(2):83-91.

Grassi S, Piattelli A, de Figueiredo LC, Feres M, de Melo L, Iezzi G, et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. *J Periodontol*. 2006;77(10):1736-43.

Hammerle C, Schmid J, Olah A, Lang N. Osseous healing of experimentally created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. A pilot study. *Clin Oral Imp Res*. 1992; 3:144-7.

Hämmerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol* 2000. 1998;17:151-75.

Hämmerle CH, Lang NP. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(1):9-18.

Hardwick R, Scantlebury TV, Sanchez R, Whitley N, Ambruster J. Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge. In: Buser D, Dahlin C & Schenk RK, eds. *Guide bone regeneration in implant dentistry*, 101-136. Chicago: Quintessenz Publishing; 1994.

Hayakawa T, Yoshinari M, Nemoto K, Wolke JG, Jansen JA. Effect of surface roughness and calcium phosphate coating on the implant/bone response. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(4):296-304.

Hespanhol AM. Reparação óssea sobre superfícies de titânio usinadas ou tratadas por óxido de titânio com enxerto autógeno em bloco coberto por membrana reabsorvível [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

Hockers T, Abensur D, Valentini P, Legrand R, Hammerle CH. The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res*. 1999 Dec;10(6):487-98.

Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990;1(1):60-8.

Hürzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998;27(4):315-20.

Hürzeler MB, Quiñones CR, Schüpbach P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in the monkey. *Clin Oral Implants Res.* 1997 ;8(4):323-31.

Hutmacher D, Hürzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBT applications. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11(5): 667-78.

Jardini MAN. Padrão de reparação do enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não à membrana de PTFE-e: estudo histológico em ratos [Tese de Doutorado]. São Paulo; Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2001.

Jardini MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(6):666-73.

Jensen OT, Greer RO Jr, Johnson L, Kassebaum D. Vertical guided bone-graft augmentation in a new canine mandibular model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995;10(3):335-44.

Kobayashi E, Ishihara O, Mataga I. Effects of the placement of endosseous implants in vascularized bone grafts on bone union in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34(6):659-67.

Lekholm U, Becker W, Dahlin C, Becker B, Donath K, Morrison E. The role of early versus late removal of GTAM membranes on bone formation at oral implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 1993;4(3):121-9.

Lima L A, Fuchs-Wehrle A M, Lang N P, Hämmerle C H F, Liberti E, Pompeu E, et al. Surface characteristics of implants influence their bone integration after simultaneous placement of implant and GBR membrane. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14: 669-79.

Llambés F, Silvestre FJ, Caffesse R. Vertical guided bone regeneration with bioabsorbable barriers. *J Periodontol.* 2007 Oct;78(10):2036-42

Locci P, Calvitti M, Belcastro S, Pugliese M, Guerra M, Marinucci L, et al. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1997;68(9):857-63.

Maletta JA, Gasser JA, Fonseca RJ, Nelson JA. Comparison of the healing and revascularization of onlayed autologous and lyophilized allogeneic rib grafts to the edentulous maxilla. *J Oral Maxillofac Surg.* 1983;11:8-23.

Marinucci L, Lilli C, Baroni T, Becchetti E, Belcastro S, Balducci C, et al. In vitro comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in bone regeneration. *J Periodontol.* 2001;72(6):753-9.

Mattson JS, Gallagher SJ, Jabro MH. The use of 2 bioabsorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. *J Periodontol.* 1999;70(5):510-7.

McGinnis M, Larsen P, Miloro M, Beck FM. Comparison of resorbable and nonresorbable guided bone regeneration materials: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998 Jan-Feb;13(1):30-5.

Médard C, Ribaux C, Chavrier C. A histological investigation on early tissue response to titanium implants in a rat intramedullary model. *J Oral Implantol.* 2000; 26(4):238-43.

Merkx MA, Maltha JC, Freihofer HP, Kuijpers-Jagtman AM. Incorporation of the three types of bone block implants in the facial skeleton. *Biomaterials.* 1999;20:639-45.

Meyer U, Joos U, Mythili J, Stamm T, Hohoff A, Fillies T, et al. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials.* 2004 ;25(10):1959-67.

Miller N, Penaud J, Foliguet B, Membre H, Ambrosini P, Plombas M. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric study in a rabbit model. *J Clin Periodontol.* 1996;23(12):1051-9.

Misch CH, Misch CE. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. *Implant Dent.* 1995;4:261-7.

Misch CM, Misch CE, Resnik RR, Ismail YH. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992;7:360-6.

- Morinaga K, Kido H, Sato A, Watazu A, Matsuura M. Chronological changes in the ultrastructure of titanium-bone interfaces: analysis by light microscopy, transmission electron microscopy, and micro-computed tomography. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009;11(1):59-68.
- Moses O, Pitaru S, Artzi Z, Nemcovsky CE. Healing of dehiscence-type defects in implants placed together with different barrier membranes: a comparative clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(2):210-9.
- Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, et al. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study
Biodegradation of three different collagen J Periodontol. 2008;79(5):905-11.
- Nevins M, Mellonig JT, Clem DS, Reiser GM, Buser DA. Implants in regenerated bone: long-term survival. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998;18(1):34-45.
- Nociti FH Jr, Machado MA, Stefani CM, Sallum EA, Sallum AW. Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs. Part I. A clinical investigation. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(2):115-20.
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol*. 1982; 9, 257-65.
- Okamatsu K, Kido H, Sato A, Watazu A, Matsuura M. Ultrastructure of the interface between titanium and surrounding tissue in rat tibiae--a comparison study on titanium-coated and -uncoated plastic implants. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007 Jun;9(2):100-11.
- Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent*. 2001; 10(1): 49-58.
- Ozaki W, Buchman SR. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1998; 102: 291-9.
- Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Cellular inflammatory response to porcine collagen membranes. *J Periodontal Res*. 2003 ;38(5):458-64.

Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Grosskopf A, Noff M. Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. Initial observations in the canine. *J Periodontol.* 1988;59(6):380-6.

Proussaefs P, Lozada J. The use of resorbable collagen membrane in conjunction with autogenous bone graft and inorganic bovine mineral for buccal/labial alveolar ridge augmentation: a pilot study. *J Prosthet Dent.* 2003;90(6):530-8.

Rasmusson L, Sennerby L, Lundgren D, Nyman S. Morphological and dimensional changes after barrier removal in bone formed beyond the skeletal borders at titanium implants. A kinetic study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(2):103-16.

Roccuzzo M, Ramieri G, Bunino M, Berrone S. Autogenous bone graft alone or associated with titanium mesh for vertical alveolar ridge augmentation: a controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(3):286-94.

Rothamel D, Schwarz F, Sager M, Herten M, Sculean A, Becker J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(3):369-78.

Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51(10):1106-14.

Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, Gabrielli MF, Capela MV, Gabrielli MA. Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 38(2):180-6.

Schenk R K, Buser D, Hardwick W R, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histological study in the canine mandible. *Int J Oral and Maxillofac Implants.* 1994; 9, 13-29.

Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Stern U. Alveolar ridge repair using resorbable membranes and autogenous bone particles with simultaneous placement of implants: an experimental pilot study in dogs. *Int Oral Maxillofac Implants.* 2000; 15, 364-373.

Schoeder A, Pohler O, Sutter F. Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer. *Schweizerische Monatszeitschrift Zahnheilkunde.* 1976; 86: 713-27.

Schoeder A, Van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg.* 1981;9:15-25.

Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(4):481-8.

Selvig KA, Kersten BG, Chamberlain AD, Wikesjö UM, Nilvéus RE. Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using ePTFE barrier membranes: scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes versus clinical healing. *J Periodontol.* 1992;63(12):974-8.

Sevor JJ, Meffert RM, Cassingham RJ. Regeneration of dehiscenced alveolar bone adjacent to endosseous dental implants utilizing a resorbable collagen membrane: clinical and histologic results. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1993;13(1):71-83.

Shirakura M, Fujii N, Ohnishi H, Taguchi Y, Ohshima H, Nomura S, et al. Tissue response to titanium implantation in the rat maxilla, with special reference to the effects of surface conditions on bone formation. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(6):687-96.

Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1994a;14(2):166-80.

Simion M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994b;14(6):496-511.

Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11(6):735-42.

Simion M, Misitano U, Gionso L, Salvato A. Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with bone autografts: a comparative clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(2):159-67.

Simion M, Javanovicsa S A, Piatelli A. Vertical ridge augmentation around dental implants using a membrane technique and autogenous bone or allografts in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998;18:8-23.

Simion M, Dahlin C, Rocchietta I, Stavropoulos A, Sanchez R, Karring T. Vertical ridge augmentation with guided bone regeneration in association with dental implants: an experimental study in dogs *Clin Oral Implants Res*. 2007 Feb;18(1):86-94.

Slaets E, Carmeliet G, Naert I, Duyck J. Early trabecular bone healing around titanium implants: a histologic study in rabbits. *J Periodontol*. 2007;78(3):510-7.

Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Norris K, Dickerson K, Argraves WS. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res*. 1991 Jan;26(1):10-6.

Sommerlad S, Mackenzie D, Johansson C, Atwell R. Guided bone augmentation around a titanium bone-anchored hearing aid implant in canine calvarium: an initial comparison of two barrier membranes. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2007;9(1):22-33.

Steflik DE, Corpe RS, Young TR, Buttle K. In vivo evaluation of the biocompatibility of implanted biomaterials: morphology of the implant-tissue interactions. *Implant Dent*. 1998;7(4):338-50.

Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. Cross-linked and non-cross-linked collagen barrier membranes disintegrate following surgical exposure to the oral environment: a histological study in the cat. *Clin Oral Implants Res*. 2008a;19(8):760-6.

Tal H, Kozlovsky A, Artzi Z, Nemcovsky CE, Moses O. Long-term bio-degradation of cross-linked and non-cross-linked collagen barriers in human guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2008b;19(3):295-302.

Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjö UM. Devices for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 1999;19:59-73.

Tempo PJ, Nalbandian J. Colonization of retrieved polytetrafluorethylene membranes: morphological and microbiological observations. *J Periodontol*. 1993; 64(3):162-8.

Thomas KA, Cook SD. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res.* 1985;19(8):875-901.

Veis AA, Trisi P, Papadimitriou S, Tsirlis AT, Parissis NA, Desiris AK, et al. Osseointegration of Osseotite and machined titanium implants in autogenous bone graft. A histologic and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(1):54-61.

Von Arx T, Kurt B. Implant placement and simultaneous ridge augmentation using autogenous bone and a micro titanium mesh: a prospective clinical study with 20 implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10:24-33.

Von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res.* 2001;12(3):260-9.

Von Arx T, Cochran DL, Schenk RK, Buser D. Evaluation of a prototype trilayer membrane (PTLM) for lateral ridge augmentation: an experimental study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31(2):190-9.

Von Arx T, Broggini N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Nov-Dec;20(6):843-53.

Von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res.* 2006 ;17(4):359-66.

Wang HL, O'Neal RB, Thomas CL, Shyr Y, MacNeil RL. Evaluation of an absorbable collagen membrane in treating Class II furcation defects. *J Periodontol.* 1994;65(11):1029-36.

Williamson RA. Rehabilitation of the resorbed maxilla and mandible using autogenous bone grafts and osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11:476-88.

Yaffe A, Ehrlich J, Shoshan S. Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. *J Periodontol.* 1984;55(11):623-8.

Yukna CN, Yukna RA. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human Class II furcations. *J Periodontol.* 1996;67(7):650-7.

Zellin G, Gritli-Linde A, Linde A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials.* 1995;16(8):601-9.

Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, et al. Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J Surg Res.* 2000;94(2):133-44.

Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(6):844-52.

Zubery Y, Goldlust A, Alves A, Nir E. Ossification of a novel cross-linked porcine collagen barrier in guided bone regeneration in dogs. *J Periodontol.* 2007 Jan;78(1):112-21

ANEXO A – Certificado do CEEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: esp@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **097** nas fls. **19** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Jarbas Arruda Bauer, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "***Padrão de ósseointegração sobre superfícies de titânio maquinadas e superfícies tratadas com óxido de titânio após enxerto ósseo autólogo em bloco***" do qual participou(aram) o(s) pesquisadores: **André Micheletti Hespanhol, Luiz A P A Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **16.09.2005**.

São Paulo, 20 de setembro de 2005.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA