

ASPECTOS HISTOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO DE MATRIZ ÓSSEA BOVINA MINERALIZADA COM MEMBRANA DE COLÁGENO NA REPARAÇÃO ALVEOLAR DA MANDÍBULA DE CÃO¹

Gisele Fófano²
Andréa Pacheco Batista Borges³
Cláudio César Fonseca⁴
Marlene Isabel Vargas Vitoria⁵
Emily Correna Carlo⁶
Vinícius Winter Viana⁷
Érica Batista Fontes⁸
Tatiana Schmitz Duarte⁹

RESUMO

A doença periodontal, freqüentemente observada em cães adultos, pode levar à reabsorção do osso alveolar. O objetivo deste trabalho foi avaliar histologicamente a matriz óssea bovina mineralizada em associação com uma membrana de colágeno, seguindo a técnica da regeneração tecidual guiada (RTG) na reparação alveolar da mandíbula de cães. Para tal, foram utilizados 32 animais, distribuídos em dois grupos. Defeitos de aproximadamente 6 x 5 x 5 mm foram criados entre as raízes do quarto pré-molar direito na superfície vestibular do osso alveolar. Em um grupo, o defeito foi totalmente preenchido com o xenoenxerto e coberto pela membrana, enquanto no outro a falha permaneceu sem

¹ Aceito para publicação em 13.04.2005.

² Rua Alfredo Rodrigues da Costa, 15. Bairro Santos Anjos. 36062-350 Juiz de Fora, MG.
E-mail: giselefofano@zipmail.com.br

³ Dep. de Veterinária da UFV. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: andrea@ufv.br

⁴ De. de Veterinária da UFV. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: fonseca@ufv.br

⁵ Dep. de Veterinária da UFV. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: bebel@ufv.br

⁶ Bolsista de Iniciação Científica. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: emily.carlo@bol.com.br

⁷ Acadêmico de Medicina Veterinária da UFV. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: viniciuswinter@hotmail.com

⁸ Bolsista de Iniciação Científica. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: ericabfontes@hotmail.com

⁹ Dep. de Veterinária da UFV. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: tduarte_br@yahoo.com.br

tratamento, sendo utilizado como controle. Foram feitas biópsias em dois animais de cada grupo aos 7, 14, 21, 30, 42, 60, 90 e 120 dias e realizadas avaliações histológicas. No grupo de controle, o processo de formação óssea se iniciou aos 14 dias e evoluiu progressivamente até os 120 dias, quando não foi mais distinguível o limite entre o defeito e o novo osso formado. No grupo tratado, observou-se o processo de reparação mais avançado em relação ao grupo de controle até os 42 dias. Depois, observou-se um processo inflamatório crônico, até os 120 dias, levando à estagnação da reparação óssea. Apesar disso, nenhuma reação do tipo corpo estranho foi observada. Portanto, pode-se concluir que os materiais utilizados têm biocompatibilidade, característica desejável para substitutos ósseos, e que a membrana, a partir dos 42 dias, provoca reação indesejável.

Palavras chave: regeneração tecidual guiada, xenoenxerto, osso alveolar, reparação óssea.

ABSTRACT

HISTOLOGICAL ASPECTS OF THE ASSOCIATION OF MINERALIZED BONE BOVINE GRAFT WITH COLLAGEN MEMBRANE IN THE ALVEOLAR REPAIRING OF THE JAW OF DOG

The periodontal disease, frequently observed in adult dogs, it can take to the reabsorption of the alveolar bone. The objective of this work was to evaluate histologically the association of mineralized bovine bone matrix with a collagen membrane following the guided tissue regeneration technique in the alveolar reparation of the jaw of dogs. For such, 32 animals were used, divided in two groups. Defects of approximately 6 x 5 x 5 mm were created among the roots of the fourth right premolar in the vestibular surface of the alveolar bone. In a group, the defect was totally filled out with the xenograft and covered by the membrane, while in the other it did not receive any treatment, being used as control. It was collected, from two animals of each group, biopsy of the operated ranch at the 7, 14, 21, 30, 42, 60, 90 and 120 days and histological evaluations were accomplished. In the control group, the bone formation process began at the 14th day and it developed progressively until the 120th day, when the limit between of the flaw and the new formed bone was not more distinguishable. In the group treated with the mineralized bovine bone matrix and collagen membrane, a more advanced repairing process was observed in relation to the control group until the 42th day. Then, a chronic inflammatory process was observed, until the 120th day, taking it to a repairing bone stagnation. In spite of that, no reaction of the strange body type was observed and, therefore, it can be concluded that the used materials present biocompatibility, desirable characteristic to substitute bone and that the membrane, starting from the 42th day, provokes undesirable reaction.

Key words: guided tissue regeneration, xenograft, alveolar bone, bone repair.

INTRODUÇÃO

A regeneração periodontal possui uma seqüência bem definida de atividades celulares: migração, proliferação, diferenciação e formação de diferentes componentes da matriz óssea⁸. Os osteoblastos iniciam a secreção da matriz óssea, que posteriormente será mineralizada.¹⁶ Os materiais biocompatíveis passam a ser boa opção por induzir, promover ou tornar mais rápida a reparação tecidual⁷. Diferentes materiais têm sido

propostos para dar suporte à reparação alveolar⁹, podendo ser classificados como osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Os osteogênicos são capazes de estimular a formação óssea diretamente a partir de osteoblastos. Os osteoindutores induzem a diferenciação celular, aumentando a formação de osso ou estimulando a formação óssea em um sítio heterotópico. Os osteocondutores permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, orientando a proliferação celular, requerendo, entretanto, a presença de tecido ósseo como fonte de células osteoprogenitoras^{10, 12, 14}.

A técnica de regeneração tecidual guiada (RTG) impede que fibroblastos proliferem para dentro da região do defeito ósseo em detrimento dos osteoblastos, mais lentos^{10, 12, 14}. Esse impedimento se dá por uma barreira mecânica (física), uma vez que impossibilita a penetração de células epiteliais e conjuntivais^{5, 7}, responsáveis pela inibição da osteogênese^{2, 4}.

Diferentes materiais são utilizados como barreira^{7, 15}. Há dois tipos básicos: as membranas reabsorvíveis e as não-reabsorvíveis. As últimas apresentam como aspectos negativos a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção e o risco de contaminação de sua porção coronária exposta à cavidade bucal⁷. O uso de materiais biodegradáveis, como membranas de colágeno (membranas reabsorvíveis), confirma o potencial reconstrutivo da RTG⁹.

A utilização isolada da membrana não é indicada, uma vez que sua invaginação no defeito compromete a quantidade do novo osso. Assim, vários materiais são utilizados em conjunto com barreiras mecânicas (RTG) para a manutenção do espaço sob estas e para servir como um arcabouço osteocondutor acelerando a reparação óssea¹³.

As barreiras utilizadas em RTG são freqüentemente suportadas por biomateriais, incluindo enxertos xenógenos, extraídos principalmente do feto bovino^{6, 7, 10, 12}. A matriz óssea bovina mineralizada foi sugerida como material de preenchimento por promover resposta tecidual semelhante à descrita na implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado^{10, 14}. Assim, o objetivo deste trabalho foi, por meio de análises histológicas, estudar o efeito da associação de uma membrana de colágeno do tipo I modificado, seguindo a RTG, com uma matriz óssea bovina mineralizada no processo reparativo do osso alveolar mandibular de cão, bem como a resposta tecidual a esses materiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 32 cães, clinicamente saudáveis, isentos de doença periodontal, pesando de 8 a 16 kg, provenientes do canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Os animais

foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos iguais e receberam ivermectina¹ (0,3 mg/kg) como medicação antiparasitária. Enquanto um grupo não recebeu tratamento, o outro foi tratado com matriz óssea bovina mineralizada² em associação com uma membrana de colágeno³.

Os cães receberam, como antibioticoterapia profilática, uma associação de espiramicina (23,5 mg/kg) e metronidazol (12,5 mg/kg)⁴ por via oral, a cada 24 horas, durante os três dias que precederam o procedimento cirúrgico e no dia deste. Após jejum hídrico e sólido de 12 horas, os animais foram sedados com acepromazina⁵ (0,1 mg/kg) por via intravenosa, receberam indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico 3%⁶ (dose total de 15 mg/kg) e foram intubados com sonda endotraqueal. Seqüencialmente, foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. A cavidade oral foi higienizada com solução de clorexidina 2% e foi colocado um abre-boca.

A área a ser operada foi infiltrada com lidocaína 2% com vasoconstritor⁷ com o objetivo de diminuir o sangramento transoperatório. Fez-se um retalho mucoperiosteal na gengiva correspondente ao quarto pré-molar mandibular direito. Para isso, com uma lâmina de bisturi número 11, foi feita uma incisão no sulco gengival no sentido rostrocaudal, que se estendeu ventralmente partindo das bordas rostral e caudal. O retalho foi então deslocado apicalmente, expondo a superfície vestibular do osso alveolar (Fig.1A). Um defeito ósseo de aproximadamente 6 x 5 x 5 mm foi provocado no osso alveolar, entre as raízes do quarto dente pré-molar (Fig.1B), com o auxílio de uma broca esférica número 8⁸ acoplada a um motor de baixa rotação⁹, sob irrigação constante de solução salina isotônica¹⁰.

Em um grupo, o defeito não recebeu tratamento, enquanto no outro foi completamente preenchido com matriz óssea bovina mineralizada Figuras 1A e B, com granulação média na faixa de 450 a 750 microns. O material foi colocado no defeito contendo sangue, prensado levemente com

¹Ivomec 1 % - Merial Ltda.

²Pro - Bone - Matriz Mineral Óssea Bovina Granulada - Proline Biomédica.

³Pro - Guided - Membrana de Colágeno - Proline Biomédica.

⁴Stomorgyl 10 - Merial Ltda.

⁵Acepran 2,1% - Univet S. A. - Indústria Veterinária.

⁶Pentobarbital sódico 3% - Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.

⁷Lidovet - Bravet Ltda.

⁸KG Sorensen ®.

⁹Microdent ® Aparelhos Odontológicos.

¹⁰Solução fisiológica ARBORETO ®.

um instrumento de ponta romba ¹¹, para preencher todos os espaços. Depois, a área foi abundantemente lavada com solução fisiológica, e uma membrana de colágeno fibrilado do tipo I modificado, ligeiramente maior do que o defeito produzido, foi colocada recobrendo toda a região. Em todos os cães, o retalho mucoperiosteal foi reposicionado e suturado com pontos simples e separados, utilizando-se fio absorvível de poliglactina 4-0¹².

No pós-operatório, os cães receberam tratamento com uma associação de espiramicina (23,5 mg/kg) e metronidazol (12,5 mg/kg), por via oral, e ketoprofeno 1% ¹³ (0,1 mg/kg) injetável, por via subcutânea, a cada 24 horas durante três dias. O local operado foi higienizado diariamente com solução de clorexidine a 2%, por quatorze dias.

Os animais, durante uma semana, foram mantidos em baias individuais e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial¹⁴ amolecida e água à vontade. Posteriormente, os cães passaram para baias coletivas, com quatro animais cada uma, uma alimentados com a mesma ração comercial, porém em sua forma sólida, até o término do experimento.

Aos 7, 14, 21, 30, 42, 60, 90 e 120 dias do pós-operatório, foi coletada amostra para biópsia em dois animais de cada grupo, utilizando o mesmo acesso e seguindo o mesmo protocolo anestésico-cirúrgico descrito.

A amostra foi retirada do quarto pré-molar direito em seu alvéolo, medindo aproximadamente 1,5 x 1,0 x 0,5 cm. Cada amostra foi seccionada longitudinal e transversalmente e fixada em formol a 10% tamponado durante cinco dias. Após a fixação, os fragmentos foram descalcificados em ácido fórmico a 8% associado ao ácido clorídrico a 8%, durante 30 dias, em vácuo moderado. Em seqüência, foram lavados em água corrente, por 10 minutos, e, então, desidratados em álcool 70, 80, 90, 95 e 100 %, por 24 horas cada um, sendo realizadas duas passagens no álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram imersas em xilol, por 30 a 40 minutos, para que se processasse a diafanização. Os fragmentos foram colocados em dois banhos de parafina, de 40 minutos cada, em estufa a 60°C e, então, incluídos em parafina, em temperatura ambiente, durante 24 horas. A seguir, cortes de cinco micrômetros de espessura foram obtidos em micrótomo e montados em lâmina de vidro. Os fragmentos foram.

¹¹ Brunidor para amálgama - Golgran.

¹² Vicryl 4-0 ® - Ethicon.

¹³ Ketofen 1 % - Rhodia - Mérieux.

¹⁴ Selection Special Croc - Royal Canin Ltda.

¹⁵ Microscópio Óptico Binocular - Eclipse E 600 - Nikon - Japan.

corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e examinados por microscopia óptica .

Foi feita uma análise qualitativa descritiva dos resultados e comparação entre os dois grupos, avaliando as reações aos materiais e a reparação alveolar.

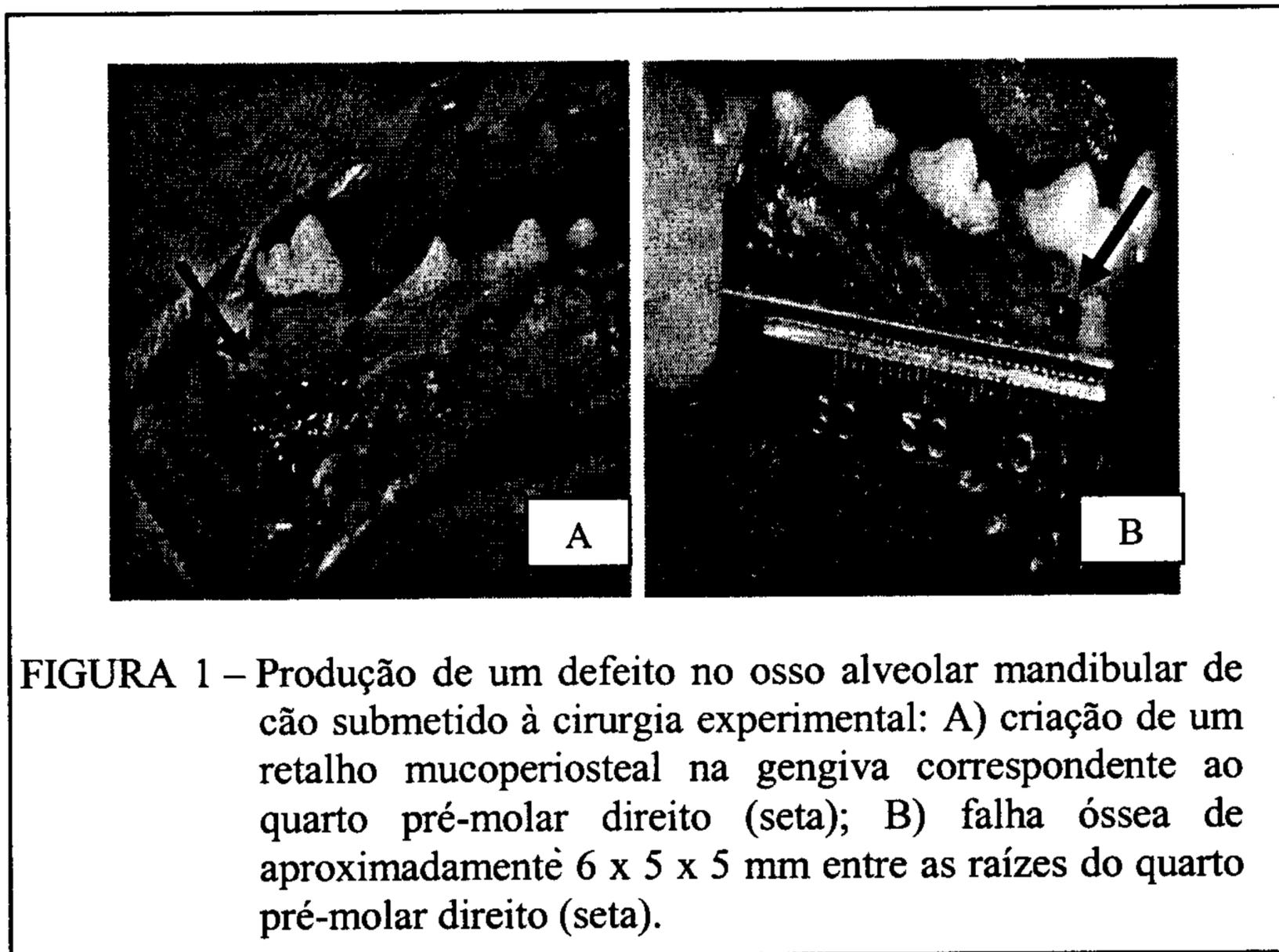


FIGURA 1 – Produção de um defeito no osso alveolar mandibular de cão submetido à cirurgia experimental: A) criação de um retalho mucoperiosteal na gengiva correspondente ao quarto pré-molar direito (seta); B) falha óssea de aproximadamente 6 x 5 x 5 mm entre as raízes do quarto pré-molar direito (seta).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na amostra colhida no 7º dia pós-operatório, nos animais do grupo de controle, observou-se início de reabsorção das bordas do defeito com formação de matriz óssea e grande proliferação de tecido conjuntivo frouxo na sua superfície. O defeito estava preenchido por um tecido de granulação pouco vascularizado (Figuras 2A e B), com grande quantidade de fibras colágenas. No 7º dia, nos cães tratados, visualizou-se uma vascularização precária na região central do defeito, em comparação àquela abundante nas bordas, sugestiva de início da reparação, uma vez que o crescimento ósseo acontece primeiramente na periferia da falha⁸. Foram observados, ainda, partículas do enxerto xenógeno (Figuras 3A e 3B) e um tecido conjuntivo frouxo mais organizado, em comparação ao

observado no grupo de controle. O processo de reparação do tecido ósseo é altamente dependente da angiogênese ¹¹. Assim, atribui-se a abundante vascularização observada na periferia do defeito, no grupo tratado, a um início do processo reparativo, especialmente quando se compara com a vascularização que aconteceu no grupo de controle, bem menos exuberante.

Aos 14 dias, a maior parte das bordas do defeito havia sido reabsorvida no grupo de controle. No grupo tratado, observou-se um tecido conjuntivo frouxo ainda bastante desorganizado na região central da falha, em comparação ao localizado nas bordas, demonstrando que o crescimento acontece primeiramente na periferia da lesão ³. Observaram-se, ainda, na região mais vestibular (superficial) do defeito, próxima à membrana, reabsorção óssea (Figuras 3C e D) e intensa vascularização.

Após 21 dias, no grupo de controle, foi observada formação de tecido ósseo na forma de trabéculas espessas (Figura 2B), quadro que se repetiu aos 30 dias. No grupo tratado, também se observaram início da formação óssea e de um tecido conjuntivo mais organizado, presença de celularidade e vascularização abundantes.

Nas lâminas do grupo tratado, aos 30 dias, visualizou-se grande reação inflamatória nas bordas da falha criada, diferentemente de outro trabalho que não encontrou sinais inflamatórios aos 30 dias ⁶. Possivelmente, tal discrepância de resultados se deva ao fato de os produtos utilizados apresentarem talvez, diferenças quanto à forma de processamento.

Nos animais do grupo de controle, aos 42 dias, foram observados aumento na formação de osso trabecular apenas na periferia do defeito, com algumas regiões ainda não reabsorvidas, e ausência de organização em osso lamelar, quadro que se repetiu aos 60 dias. Nos cães do grupo tratado, observaram-se tecido ósseo praticamente na mesma proporção do tecido conjuntivo e persistência de grande infiltrado inflamatório.

Aos 60 dias, no grupo tratado, estavam evidentes um tecido conjuntivo frouxo e delgado osso trabecular sofrendo remodelação. A presença de infiltrado inflamatório contribuiu para o retardo na reparação do osso alveolar.

No grupo de controle, aos 90 dias, somente a periferia do defeito havia sido totalmente preenchida por osso compacto. No centro do defeito, observou-se osso trabecular. Todavia, no grupo de controle, aos 120 dias, não havia mais limite entre as margens do defeito e do osso formado. Portanto, o defeito encontrava-se completamente preenchido com osso compacto ou lamelar. Esse processo de cicatrização observado nos cães do grupo de controle foi considerado reparação óssea normal espontânea.

Diferentemente, no grupo tratado, aos 90 e 120 dias, o processo de cicatrização apresentou-se bastante tecido conjuntivo frouxo, apesar de estar evidente o osso trabecular. Infiltrado inflamatório proeminente foi

ainda observado. Esses resultados estão diferentes de outros que demonstram que partículas ósseas mineralizadas, de origem bovina, são completamente encapsuladas no osso novo quando este tipo de xenoenxerto é utilizado em conjunto com a RTG para a reconstrução de defeitos vizinhos a implantes dentário. Atribui-se tal discordância ao maior tempo de observação desses outros estudos ⁴. Segundo os autores, o processo de reabsorção dessas partículas não segue um padrão específico, sendo necessários mais estudos. Concluíram, ainda, que a falta de sinais de reações do tipo corpo estranho indica que tal associação é bem tolerada pelos tecidos bucais ⁴.

Os resultados revelaram que no grupo tratado observou-se um processo mais avançado de reparação óssea em relação ao grupo de controle, até os 42 dias, apesar de já se visualizar o processo inflamatório. A partir dessa data, houve uma estagnação no processo. Este fato leva a crer que o processo inflamatório tornou-se crônico e, conseqüentemente, interferiu na cicatrização tecidual de maneira negativa. Como a localização desse infiltrado inflamatório foi predominantemente nas bordas do defeito criado, não se visualizando células inflamatórias na região central do defeito, atribuiu-se tal processo à presença da membrana de colágeno e não do xenoenxerto. Assim, a resposta biológica tecidual causada pelas alterações inflamatórias (alterações vasculares e infiltrado inflamatório) ¹², em especial a falta de sinais de reações do tipo corpo estranho ⁴, sugere que o xenoenxerto foi bem tolerado pelos tecidos orais, enquanto a membrana de colágeno provocou uma reação inflamatória crônica, mesmo sendo considerada um produto biodegradável, com período de reabsorção de 120 a 180 dias. Os resultados deste estudo sugerem que a membrana de colágeno seja mantida apenas por 42 dias.

Do ponto de vista clínico, a aplicação combinada de matriz óssea bovina mineralizada com a RTG pode ser recomendada em situações em que propriedades osteocondutivas são desejáveis ⁴. As análises histológicas, quando esse material é associado à barreira de colágeno, demonstram um crescimento ósseo favorável entre seis e nove meses ⁷. Portanto, mais uma vez, a diferença entre os resultados foi atribuída ao tempo de observação (120 dias) deste experimento, em relação ao longo tempo utilizado por outros autores. Ainda assim, acredita-se em uma resposta melhor à associação matriz óssea bovina mineralizada e membrana de colágeno (RTG), se tal barreira mecânica for retirada aos 42 dias do período pós-operatório. O xenoenxerto, demonstrou capacidade de dar suporte à reparação alveolar ¹⁵confirmado como "mantenedor de espaço" ⁴.



FIGURA 2 – Histologia da região do defeito provocado no osso alveolar de cães. Animais do grupo de controle. A) aos 7 dias, preenchimento do defeito com um tecido de granulação pouco vascularizado (seta). 120X; B) aos 21 dias, formação de tecido ósseo sob a forma de trabéculas espessas (seta). 130X.

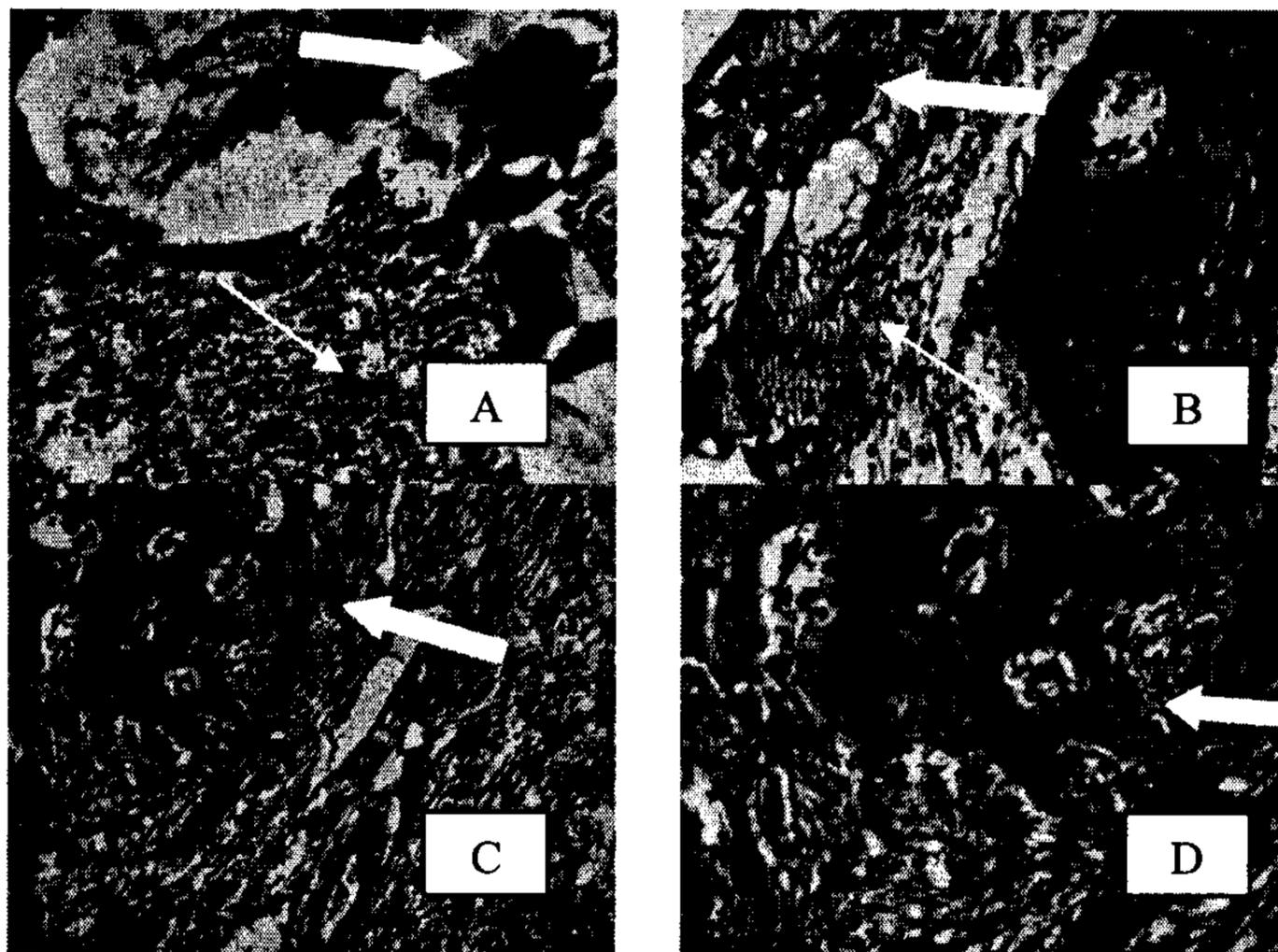


FIGURA 3 – Histologia da região do defeito provocado no osso alveolar de cães submetidos à cirurgia experimental. Animais do grupo tratado. A) Aos 7 dias, observação de infiltrado inflamatório (seta delgada) e partículas do enxerto xenógeno (seta espessa) (80X); B) aos 7 dias, visualização abundante celularidade (seta delgada) envolvendo as partículas do xenoenxerto (seta espessa) (160X); C) aos 14 dias, observação reabsorção óssea na região mais vestibular (superficial) do defeito, próxima à membrana, (seta) (80X); D) aos 14 dias, reabsorção óssea (seta) (150X).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados histológicos obtidos e nas condições deste estudo, foi possível chegar às seguintes conclusões:

1) A associação matriz óssea bovina mineralizada e membrana de colágeno comporta-se de maneira biocompatível quando enxertada no processo alveolar da mandíbula de cão;

2) A matriz óssea bovina mineralizada demonstrou boa capacidade de suporte da membrana de colágeno (RTG), podendo ser utilizado como "mantenedor de espaço" sob barreiras mecânicas;

3) A partir de 42 dias, a membrana de colágeno provoca um processo inflamatório indesejável à reparação óssea alveolar da mandíbula de cães.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao cirurgião-dentista Renato Francisco Visconti Filho, professor da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), pelas orientações e ajuda imprescindíveis, e à Proline Biomédica que gentilmente nos forneceu o material utilizado nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. BASDRA, E.K.; MAYER, T. & KOMPOSCH, G. Guided tissue regeneration precedes tooth movement and crossbite correction. *Angle Orthodontist*, 65 (5): 307-10, 1995.
2. BORGES, A.P.B. O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço distal da tíbia de cães (*Canis familiares*). Estudo clínico-cirúrgico, radiográfico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de retrodispersão. Belo Horizonte, UFMG, Escola de Veterinária, 1998. 111 p. (Tese de doutorado).
3. DONOS, N.; LANG, N.P.; KAROUSSIS, I.K.; BOSSHARDT, D.; TONETTI, M. & KOSTOPOULOS, L. Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. *Clinical Oral Implants Research*, 15 (1): 101-11, 2004.
4. ISAKA, J.; OHAZAMA, A.; KOBAYASHI, M.; NAGASHIMA, C.; TAKIGUCHI, T.; KAWASAKI, H.; TACHIKAWA, T. & HASEGAWA, K. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *Journal of Periodontology*, 72 (3): 314-23, 2001.
5. JUNG, R.E.; GLAUSER, R.; SCHÄRER, P.; HÄMMERLE, C.H.F.; SAILER, H.F. & WEBER, F.E. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. A randomized, controlled clinical and histomorphometric study. *Clinical Oral Implants Research*, 14(5): 556-68, 2003.
6. MAGALHÃES, D.; MENEZES, H.H.M. & TAGA, M. Perspectivas atuais na utilização dos biomateriais em regeneração periodontal. *Revista do Conselho Regional de Odontologia de Minas Gerais*, 8(1): 9-15, 2002.
7. MATSUURA, M.; HERR, Y.; HAN, K.; LIN, W.; GENCO, R.J. & CHO, M. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and

- healing periodontal tissues in the beagle dog. *Journal of Periodontology*, 66(7): 579-93, 1995.
8. MOON, I.; CHAI, J.; CHO, K.; WIKESJÖ, U.M. & KIM, C.K. Effects of polyglactin mesh combined with resorbable calcium carbonate or replamineform hydroxyapatite on periodontal repair in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(10): 945-51, 1996.
 9. OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C.M.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; OLIVEIRA, D.T.; BUZALAF, M.A.R.; TAGA, R.; TAGA, E.M. & GRANJEIRO, J.M. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru*, 7(¾): 85-93, 1999.
 10. SAADEH, P.B.; MEHRARA, B.J.; STEINBRECH, D.S.; SPECTOR, J.A.; GREENWALD, J.A.; CHIN, G.S.; UENO, H.; GITTES, G.K. & LONGAKER, M.T. Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology*, 141(6): 2075-83, 2000.
 11. SANADA, J.T.; RODRIGUES, J.G.R.; CANOVA, G.C.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; TAGA, R.; BUZALAF, M.A.R. & GRANJEIRO, J.M. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. *Journal of Applied Oral Science*, 11(3): 209-15, 2003.
 12. SCHOU, S.; HOLMSTRUP, P.; SKOVGAARD, L.T.; STOLTZE, K.; HANSEN, E.H. & GUNDERSEN, H.J.G. Autogenous bone graft and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis. II. Stereologic and histologic observations in cynomolgus monkeys. *Clinical Oral Implants Research*, 14(4): 404-11, 2003.
 13. SICCA, C.M.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, T.L.; CESTARI, T.M.; OLIVEIRA, D.T.; BUZALAF, M.A.R.; TAGA, R.; TAGA, E.M.; GRANJEIRO, J.M. & KINA, J.R. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru*, 8(1/2): 1-10, 2000.
 14. TAL, H.; PITARU, S.; MOSES, O. & KOZLOVSKY, A. Collagen gel and membrane in guided tissue regeneration in periodontal fenestration defects in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(1): 1-6, 1996.
 15. VALÉRIO, P. Cultura primária de osteoblastos e a prática clínica. *Jornal do Conselho Regional de Odontologia de Minas Gerais*, novembro, 2003. p. 18.