

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEIO DO USO DE  
MEMBRANA COM PROPRIEDADE BIOATIVA EM DEFEITOS  
CRÍTICOS DE CALVÁRIA EM RATOS: ANÁLISE  
HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

**FLÁVIO FIDÊNCIO DE LIMA**

**São Paulo**

**2022**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEIO DO USO DE  
MEMBRANA COM PROPRIEDADE BIOATIVA EM DEFEITOS  
CRÍTICOS DE CALVÁRIA EM RATOS: ANÁLISE  
HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Grazieli Corrêa

**FLÁVIO FIDÊNCIO DE LIMA**

**São Paulo**

**2022**

Lima, Flávio Fidêncio de

Regeneração óssea guiada por meio do uso de membrana com propriedade bioativa em defeitos críticos de calvária em ratos: análise histológica e histomorfométrica / Flávio Fidêncio de Lima. - 2021.

17 f. : il. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Clínica Odontológica; Semiologia/ Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Grazieli Corrêa.

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati.

1. Regeneração óssea guiada. 2. Membrana bioativa. 3. Defeito de calvária. I. Corrêa, Mônica Grazieli (orientadora). II. Casati, Márcio Zaffalon (orientador). III. Título.

**FLÁVIO FIDÊNCIO DE LIMA**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA POR MEIO DO USO DE  
MEMBRANA COM PROPRIEDADE BIOATIVA EM DEFEITOS  
CRÍTICOS DE CALVÁRIA EM RATOS: ANÁLISE  
HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Grazieli Corrêa  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcio Zaffalon Casati  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_ - \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Rodrigues Esposito Cabrera  
UNICAMP

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado, com muito carinho, a minha esposa, Catarina P. Bezerra de Lima; a minha filha, Manuela B de Lima, um presente de Deus nessa etapa da vida, e aos meus pai, Delvair Fidêncio de Lima e Fátima Helena B. de Lima, por sempre me apoiarem.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me iluminou durante essa jornada.

A minha esposa, Catarina B Lima, pelo incentivo e paciência.

A minha filha Manuela Lima, razão de eu me empenhar cada vez mais profissionalmente.

Aos meus pais, Delvair e Fátima, que sempre me incentivaram em tudo na vida.

Aos meus amigos de pesquisa, Pedro Denofrio e Matheus Uzai.

Aos professores do Departamento de Implantodontia e Periodontia da FOUNIP, por aceitarem me orientar, e, em especial, a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mônica Grazieli Corrêa, sempre disposta a me ajudar, e ao Professor Dr Marcio Zaffalon Casati, por incentivar seus alunos e colegas de profissão ao senso crítico. Obrigado, Professor!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Rodrigues Esposito Cabrera, ao nosso lado em todos os momentos da pesquisa, solucionando dúvidas técnicas do produto, de extrema importância para a conclusão deste trabalho.

A Cris Salomão, pela ajuda na parte laboratorial da pesquisa.

A todos os funcionários da FOUNIP que, de alguma forma, contribuíram para esta pesquisa, meu muito obrigado.

*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira, você chega lá”.*

*Ayrton Senna*

## RESUMO

Este estudo teve, como objetivo, determinar o efeito da regeneração óssea guiada (ROG) por meio do uso de uma membrana com propriedade bioativa, composta por polímeros ácido polilático (PLA), policaprolactona (PCL) e polietileno glicol (PEG), associada à incorporação de bioativos sintéticos [beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCF), hidroxiapatita (HA) e nano-HA], no reparo ósseo em defeitos de calvária em ratos. Para isso, 21 ratos foram distribuídos nos grupos: Teste (n=7): Membrana Bioativa; Controle Positivo (n=7): Membrana BioGide®; Controle Negativo (n=7): sem biomaterial. Os animais foram submetidos à confecção de dois defeitos de calvária de tamanho crítico de 5mm de diâmetro. Quatro semanas após a confecção dos defeitos, ocorreu a eutanásia dos animais e as calvárias foram processadas para análise histológica e histomorfométrica. Resultados: o grupo controle positivo (Bio-Gide) apresentou maior fechamento do defeito ósseo, em comparação ao grupo teste (Membrana Bioativa) e ao controle negativo (sem tratamento). Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o uso da Membrana com propriedade Bioativa não proporcionou regeneração óssea dos defeitos críticos em calvária de ratos.

Palavras- Chave: Regeneração Óssea Guiada. Membrana Bioativa. Defeito Calvária.



## ABSTRACT

This study aimed at determining the effect of guided bone regeneration using a membrane with polylactic acid polymers by polylactic acid polymers), polycaprolactone (PCL) and polyethylenel (PEG) associated with the incorporation of bioactives [beta-tricalcium ( $\beta$ -TCF), hydroxyapatite (HA) and nano-HA], in the repair of calvaria repair in rats. For this, 21 rats were divided into groups: Test (n=7): Bioactive Membrane; Positive Control (n=7): BioGide® Membrane; Negative Control (n=7): no treatment. Two critical defects were created in each animal at the start of the study (day 0). The animals were euthanized after 4 weeks of defects creation and the calvaria defects were processed for histological and histomorphometric analysis. The results indicate that the positive control group (Bio-Gide) presented grater closure of the bone defects compared to the test group (Bioactive Membrane) and the negative control (no treatment). The use of the bioactive membrane did not promote bone generation (GBR) of calvaria defects in rats.

Key-words: Guided Bone Regeneration. Bioactive Membrane. Calvaria defect.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>14</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com a democratização da reabilitação e os avanços tecnológicos na implantodontia oral, hoje cada vez mais os profissionais da área devem conhecer os princípios e fundamento básico e avançados para se fazer uma efetiva Regeneração Óssea Guiada<sup>1</sup>. Alguns fundamentos básicos devem ser pontos chaves para um tratamento regenerativo bem sucedido<sup>1,2,3</sup>.

O tecido ósseo, é composto por um tipo especializado de tecido conjuntivo organizado, contendo células ósseas vivas dispostas em um meio biomineral que contém cerca de 30% de segmentos orgânicos e 70% de inorgânicos<sup>4,5,6,7,8,9</sup>. Aproximadamente 90% desse segmento orgânico é composto por colágeno e os 10% residuais, são proteínas não colágenas, moléculas de proteoglicanos, lipídios, osteopontina e outras proteínas da matriz óssea, as quais desempenham papel vital na resistência mecânica e nas características metabólicas do tecido ósseo<sup>10</sup>. As células responsáveis por regular a renovação do esqueleto são os osteoblastos e osteoclastos, os quais encontram-se em equilíbrio nesse processo, por meio de fenômenos de reabsorção e neoformação óssea<sup>11</sup>.

Para que se tenha um bom processo de reparo ou de regeneração do tecido ósseo é necessário que se tenha três principais fases: inflamação, produção óssea e remodelação óssea. A produção óssea é iniciada, no pós operatório imediato, ou seja, assim que o sangue coagulado é substituído por tecido fibroso e cartilagem. A inflamação faz parte do início do processo, a partir da formação de coágulo no local a ser reparado<sup>1,6,12,13</sup>. Já a produção do tecido ósseo, além de possuir uma estrutura fisicoquímica característica, tem a capacidade de regeneração e remodelação durante todo o período de vida, fazendo que isso se diferencie dos demais tecidos<sup>14</sup>.

O tecido ósseo, além da sua estrutura fisicoquímica característica, tem a capacidade de regeneração e remodelação durante todo o período pós fetal, fazendo com que este tecido se diferencie dos demais<sup>15</sup>. Essa capacidade de regeneração ocorre em função de dois processos combinados, devendo-se tanto à proliferação de células osteoprogenitoras pré-formadas, como a indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas. Porém, esta capacidade regenerativa pode ser limitada pelo tamanho da lesão, fazendo com que grandes defeitos ósseos não se regenerem espontaneamente, o que pode representar um problema estético e funcional em diversas situações clínicas<sup>16</sup>.

A regeneração óssea guiada (ROG) é uma das abordagens mais utilizadas clinicamente e com ampla documentação na literatura para regeneração de defeitos nos maxilares ou associados a implantes, seja utilizada isoladamente ou associada a enxertos ósseos ou outras

abordagens terapêuticas<sup>14,17,18</sup>. Por princípio a ROG consiste da utilização de barreiras físicas que isolam a área a ser regenerada da influência não osteogênica das células do tecido conjuntivo gengival, protegendo o coágulo formado no espaço entre esta barreira e o tecido ósseo pré-existente contra traumas mecânicos e micro-movimentações<sup>10,12,19</sup>. De acordo com Dahlin et al. (2010)<sup>14</sup>, as características desejáveis das barreiras para ROG incluem: (a) Biocompatibilidade: o material deve funcionar com resposta tecidual apropriada, devendo haver interação harmoniosa entre o material e o leito receptor, sem prejuízo aos tecidos subjacentes; (b) Propriedades oclusivas: o material deve impedir invasão de tecidos moles e evitar a colonização bacteriana, a qual pode comprometer os resultados desejados em termos de ganho ósseo; (c) Capacidade de criação e manutenção de espaço: a membrana deve proporcionar espaço adequado para a regeneração óssea ocorrer; (d) Maleabilidade: a membrana deve ser clinicamente maleável; (e) Integração com os tecidos circundantes: a integração da membrana com os tecidos adjacentes estabiliza o ambiente de cicatrização e contribui para a criação de uma barreira entre os tecidos moles e o defeito ósseo<sup>5,13,20</sup>.

Considerando a aplicação terapêutica da barreira agindo não apenas de forma passiva, mas também atuando biologicamente de forma ativa no processo regenerativo por meio da incorporação de bioativos, algumas investigações têm analisado o papel de fatores de crescimento em associação às membranas, tendo em vista suas múltiplas funções durante a cicatrização óssea, incluindo recrutamento celular, proliferação e diferenciação<sup>9</sup>. Diversos estudos in vivo compararam a o impacto da ROG associada à BMP-2 humano recombinante (rhBMP-2), BMP-7, fator de crescimento derivado do fibroblasto (FGF)-2<sup>21,22</sup>. De forma geral, os resultados mostraram que a ROG associada a moléculas bioativas otimizou o processo de regeneração óssea<sup>23</sup>. Apesar de haver alguns estudos mostrando o papel bioativo da ROG na reconstrução de defeitos ósseos por meio da incorporação de diferentes moléculas e/ou células, o impacto do uso de bioativos sintéticos incorporados às barreiras são ainda pouco conhecidos. Com o desenvolvimento das pesquisas de biomateriais, alternativas sintéticas de destaque na literatura atual também utilizadas na regeneração óssea são as biocerâmicas à base de fosfato de cálcio e silicato<sup>24</sup>, um estudo recente mostrou que a combinação de PCL e nano-HA não somente melhorou as propriedades mecânicas do biomaterial, como também estimulou macrófagos a produzirem fatores de crescimento como Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e PDGF, e moléculas relacionadas à osteogênese, incluindo BMP2, TGF- $\beta$ 1, e PGE2<sup>23</sup>.

Recentemente, estudos têm também mostrado que a membrana pode ser efetiva nos processos regenerativos não apenas agindo como uma barreira passiva, mas também atuando biologicamente de forma ativa nos defeitos ósseos. Neste contexto, a incorporação de fatores

biológicos, como fatores de crescimento [Proteína óssea morfogenética (BMP)-2, BMP-7 e Fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)], agregados celulares [como células mesenquimais indiferenciadas (MSCs)] ou materiais bioativos sintéticos [como Hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP)], tem sido sugerida como uma abordagem promissora para aumentar o efeito osteogênico da ROG, ao invés desta atuar apenas como uma barreira passiva<sup>25</sup>.

A incorporação de células, derivados celulares ou de proteínas à ROG tem também sido promissora, como demonstrado em diversos estudos<sup>11,26,27</sup>. Ji et al. (2013)<sup>11</sup> mostraram que o uso do fator-1 $\alpha$  derivado de células do estroma (SDF-1 $\alpha$ ) incorporado à barreira de policaprolactona (PCL) pode otimizar o processo regenerativo em abordagens de ROG. A incorporação de proteínas como colágeno e fibronectina derivadas de células ósseas mesenquimais indiferenciadas (BMSC) de ratos condicionadas em um meio de copolímeros polilático-coglicolídico (PLGA), aumentou a proliferação celular e atividade da fosfatase alcalina (ALP) in vitro e promoveu maior formação óssea in vivo do que a membrana PLGA isolada<sup>22</sup>. Ainda, a incorporação de células junto à ROG tem sido avaliada, sendo que a maioria dos estudos in vitro tem analisado o uso de MSCs ou de células osteoprogenitoras<sup>11,28</sup>. Em geral, esses estudos in vitro demonstraram aumento da proliferação, migração e diferenciação osteogênica durante o processo de reparo<sup>11,28</sup>. Corroborando com tais achados, Liao et al. (2011)<sup>29</sup> mostraram que a injeção de uma mistura de células mesenquimais autólogas e PRF no defeito ósseo, em conjunto com a membrana de polietileno, aumentou a formação óssea comparado à membrana sozinha.

Apesar de haver alguns estudos mostrando o papel bioativo da ROG na reconstrução de defeitos ósseos por meio da incorporação de diferentes moléculas e/ou células, o impacto do uso de bioativos sintéticos incorporados às barreiras são ainda pouco conhecidos. Com o desenvolvimento das pesquisas de biomateriais, alternativas sintéticas de destaque na literatura atual também utilizadas na regeneração óssea são as biocerâmicas à base de fosfato de cálcio e silicato<sup>22</sup>, por conta da elevada estabilidade e adequada taxa de biodegradação, o  $\beta$ -TCP tem sido amplamente utilizado na regeneração óssea<sup>23</sup>, com capacidade osteocondutora e osteoindutora, induzindo a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e estimulando a proliferação de osteoblastos<sup>30</sup>. No estágio avançado da regeneração óssea, a hidrólise e a fagocitose ativa desintegram gradualmente este biomaterial, o qual é substituído por tecido ósseo neoformado<sup>30</sup>. Algumas evidências sugerem que partículas de  $\beta$ -TCP possuem potencial regenerativo semelhante ao osso autógeno e ao aloenxerto congelado e seco, desmineralizado ou não<sup>31</sup>.

O avanço dos conhecimentos envolvendo biomateriais sintéticos tem mostrado também que a combinação de alternativas sintéticas pode ser promissora em diversos mecanismos relacionados à formação óssea. Neste contexto, um estudo recente mostrou que a combinação de PCL e nano-HA não somente melhorou as propriedades mecânicas do biomaterial, como também estimulou macrófagos a produzirem fatores de crescimento como Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e PDGF, e moléculas relacionadas à osteogênese, incluindo BMP2, TGF- $\beta$ 1, e PGE2<sup>11</sup>.

Tendo em vista o avanço no desenvolvimento dos biomateriais sintéticos, seria interessante investigar se o uso de uma membrana incorporada à bioativos sintéticos poderia otimizar os resultados da ROG alcançados pelo uso isolado das barreiras, especialmente em condições mais desafiadoras à neoformação óssea, como em áreas de grandes defeitos ou em pacientes com condições sistêmicas que interferem negativamente no reparo ósseo. A modulação de eventos moleculares relacionados ao uso de bioativos sintéticos em barreiras são ainda pouco conhecidos. Desta forma, um maior conhecimento sobre os mecanismos biológicos que governam a sequência de neoformação óssea durante processos regenerativos frente ao uso de membranas associadas à bioativos sintéticos seria importante.

Modelos experimentais pré-clínicos têm sido amplamente utilizados para investigar a aplicabilidade de diferentes biomateriais e tais ensaios em animais são capazes de fornecer uma “prova de princípio” estabelecendo a eficácia, segurança e previsibilidade das intervenções quando aplicadas, subsequentemente, na clínica<sup>32</sup>.

Embora a seleção de modelos pré-clínicos possa levar em consideração a árvore filogenética, se dados confiáveis puderem ser conseguidos usando animais de pequeno porte, como roedores, é preferível<sup>32</sup>. Nos processos para avaliação da regeneração óssea, roedores podem oferecer algumas vantagens, como uma melhor relação custo-benefício, facilidade na realização do estudo, além de permitir melhor padronização dos experimentos em condições de amostras geneticamente semelhantes<sup>33</sup>.

A utilização de modelos experimentais em calvária tem contribuído para um melhor entendimento do processo de reparo de defeitos ósseos<sup>3</sup>. Como a calvária de ratos é relativamente inerte e possui características semelhantes aos ossos maxilares como ossificação membranosa e a mesma origem embriológica, ela tem sido utilizada como modelo experimental para regeneração óssea, inclusive por meio da utilização de membranas e/ou materiais de preenchimento<sup>34</sup>. A calvária é um local fácil de receber enxerto e os tecidos moles podem ser suturados de modo que a ferida cirúrgica fique totalmente protegida, o que reduz o risco de exposição da membrana ou contaminação<sup>32</sup>. Um aspecto importante que deve ser levado em

consideração na utilização deste modelo experimental refere-se ao tamanho crítico do defeito. É denominado desta forma quando, ao longo de toda a vida do animal, o reparo ósseo espontâneo não é capaz de preencher todo o defeito com tecido neoformado. O tamanho crítico do defeito ósseo em calvária de ratos é de 5.0mm de diâmetro, conforme estabelecido em uma revisão sistemática que analisou 61 artigos científicos, reportando que apenas 1,6% dos defeitos dessa dimensão repararam completamente com osso neoformado, caracterizando- os mesmos como defeitos de tamanho crítico<sup>33</sup>.

Dessa forma o objetivo do presente estudo foi determinar o impacto da ROG realizada por meio do uso de membrana com propriedade bioativa composta por polímeros PLA, PLC e PEG associada aos bioativos sintéticos  $\beta$ -TCF, HA e nano-HA, no reparo ósseo em defeitos de calvária de tamanho crítico em ratos por meio de avaliações histológicas e histométricas.

## 2 CONCLUSÃO

Podemos concluir, nos limites deste estudo, que o uso da membrana com propriedade bioativa, composta por polímeros ácido polilático (PLA), policaprolactona (PCL) e polietileno glicol (PEG), associada à incorporação de bioativos sintéticos [beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCF), hidroxiapatita (HA) e nano-HA] não proporcionou regeneração óssea dos defeitos críticos em calvária de ratos nem apresentou as características necessárias para a regeneração até o período final de acompanhamento do estudo.



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Aghaloo TL, Moy PK. Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;49.
2. Altiparmak N, Akdeniz SS, Akcay EY, Bayram B, Araz K. Effect of Induced Membrane on Guided Bone Regeneration in a Experimental Calvarial Model. *J Craniofac Surg*. 2020 May/Jun;31(3):879-83.
3. Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ghiraldini B, Duarte PM, Ribeiro FV. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jul;43(7):900-6
4. Brignardello-Petersen R. Membrane exposure may decrease the benefits of guided bone regeneration on bone levels in the short term. *J Am Dent Assoc*. 2018 Aug;149(8):e119
5. Carbonell JM, Martin IS, Santos A, Pujol A, Sanzmoliner JD, Nart J. High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: a literature review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43:75–84.
6. Chang YY, Lee JS, Kim MS, Choi SH, Chai JK, Jung UW. Comparison of collagen membrane and bone substitute as a carrier for rh BMP-2 in lateral onlay graft. *Clin Oral Implants Research*. 2015;26(1):e13-9.
7. Nociti FH Jr, Caffesse RG, Sallum EA, Machado MA, Stefani CM, Sallum AW. Evaluation of guided bone regeneration and/or bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects: a morphometric study in dogs. *J Oral Implantol*. 2000;26(4):244-9.
8. Shim JH, Yoon MC, Jeong CM, Jang J, Jeong SI, Cho DW, et al. Efficacy of rhBMP-2 loaded PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP guided bone regeneration membrane fabricated by 3D printing technology for reconstruction of calvaria defects in rabbit. *Biomedical materials*. 2014;9(6):065006.
9. Teng SH, Lee EJ, Wang P, Shin DS, Kim HE. Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;87:132–8
10. Ribeiro FV, Suaid FF, Ruiz KG, Rodrigues TL, Carvalho MD, Nociti FH Jr, et al. Effect of autologous bone marrow-derived cells associated with guided bone regeneration or not in the treatment of peri-implant defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan;41(1):121-7.
11. Ji W, Yang F, Ma J, Bouma MJ, Boerman OC, Chen Z, et al. Incorporation of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  in PCL/gelatin electrospun membranes for guided bone regeneration. *Biomaterials*. 2013;34(3):735-45.

12. Cirano FR, Pimentel SP, Casati MZ, Correa MG, Pino DS, Messori MR, et al. Effect of curcumin on bone tissue in the diabetic rat: repair of peri-implant and critical-sized defects. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2018;1495-503.
13. Garagiola U, Grigolato, R., Soldo, R, Bacchini M, Bassi, G., Roncucci R, et al. Computer-aided design/computer-aided manufacturing of hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction in jawbone atrophy: a systematic review and case report. 2018;38(1):1-9.
14. Dahlin, C. Optimal implant placement in the esthetic zone by the use of Guided Bone Regeneration. *Oral and maxillofacial surgery*. 2010;357-66.
15. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciar-Delli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J*. 2011;6:1187–97.
16. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*. 2017 Oct;125(5):315-37.
17. Khojasteh A, Kheiri L, Motamedian SR, Khoshkam V. Guided Bone Regeneration for the Reconstruction of Alveolar Bone Defects. *Ann Maxillofac Surg*. 2017;7(2):263-77.
18. Martinez EF, Rodrigues AEA, Teixeira LN, Esposito AR, Cabrera WIR, Demais APD, et al. Histological Evaluation of a New Beta-Tricalcium Phosphate/ Hydroxyapatite/Poly (1-Lactide- Co - Caprolactone) Composite Biomaterial in the Inflammatory Process and Repair of Critical Bone Defects. *Symmetry*. 2019 Nov;11(11):1356.
19. Garcia J, Dodge A, Luepke P, Wang HL, Kapila Y, Lin GH. Effect of membrane exposure on guided bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2018 Mar;29(3):328-38.
20. Hao J, Acharya A, Chen K, Chou J, Kasugai S, Lang NP. Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(1):1-7.
21. Horowitz R, Holtzclaw D, Rosen PS. A review on alveolar ridge preservation following tooth extraction. *J Evid Based Dent Pract*. 2012 Sep;12(3 Suppl):149-60.
22. Teotia AK, Raina DB, Singh C, Sinha N, Isaksson H, Tagil M, et al. Nano-hydroxyapatite bone substitute functionalized with bone active molecules for enhanced cranial bone regeneration. *ACS Appl. Mater*. 2017 Mar;9(8):6816–28.
23. Jo JY, Jeong SI, Shin YM, Kang SS, Kim SE, Jeong CM, et al. Sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 for bone regeneration using a heparinized collagen membrane. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2015;44(7):921-8.
24. Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, Caffesse RG, Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol*. 2002 Jul;73(7):789-96.

25. Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen, P. Barrier membranes: More than the barrier effect?. *Journal of clinical periodontology*. 2019; 46,103-23.
26. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini m, Aldini NN , Giardino, Marchetti C . Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2019; 67(2),265-72.
27. Tsuchiya S, Ohmori M, Hara K, Fujio M, Ikeno M Hibi, H Ueda M . An Experimental Study on Guided Bone Regeneration Using a Polylactide-co-glycolide Membrane-Immobilized Conditioned Medium. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2015;30(5).
28. Lee SH, Lee KG, Hwang JH, Cho YS, Lee KS, Jeong HJ, et al, Evaluation of mechanical strength and bone regeneration ability of 3D printed kagome-structure scaffold using rabbit calvarial defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 May;98:949-59.
29. Liao HT, Chen CT, Chen CH, Chen JP, Tsai JC. Combination of guided osteogenesis with autologous platelet-rich fibrin glue and mesenchymal stem cell for mandibular reconstruction. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*.2011;70(1):228-37.
30. Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, et al. Osteoinduction with highly purified beta-tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials*. 2006;27(25):4419-27.
31. Shim JH, Yoon MC , Jeong CM, Jang J, Jeong SI, Cho, DW, Huh JB. Efficacy of rhBMP-2 loaded PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP guided bone regeneration membrane fabricated by 3D printing technology for reconstruction of calvaria defects in rabbit. *Biomedical materials*. 2014;9(6),065006.
32. Gomes, PS Fernandes, MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*. 2011;45:14-24
33. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N . A systematic review on the critical size defect model. *Clinical oral implants research*. 2014;25(8):879-93.
34. Schofer MD, Roessler, PP Schaefer J, Theisen C, Schlimme, S Heverhagen JT, Voelker, M Dersch, R Agarwal, S Fuchs-Winkelmann, S aletta, JR Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. 2011;25462.