

Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos

“Evaluation of the biocompatibility of an acellular bovine pericardium membrane and its potential as an osteoblast scaffold”

Kellen Cristina da Silva GASQUE

Rodrigo Cardoso de OLIVEIRA

Daniela CEOLIN

Tânia Mary CESTARI

Rumio TAGA

Eulázio M. TAGA

Alysson CORRÊA

Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – USP – Bauru – SP – Brasil

Katiúcia Batista PAIVA

Departamento de Bioquímica – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas – Campinas – SP – Brasil

Christina Maeda TAKYIA

Departamento de Histologia – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – RJ – Brasil

José Mauro GRANJEIRO

Departamento de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biologia – Universidade Federal Fluminense – Niterói – Brasil

RESUMO

A biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino foi avaliada em tecido subcutâneo de camundongos 3, 7, 15, 30 e 60 dias após a implantação. Os componentes celulares da resposta inflamatória, a degradação da membrana e as características do colágeno foram analisadas em cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e Picro-Sírius, respectivamente. Para verificar seu potencial como carreador celular, osteoblastos humanos (hFOB1.19, ATCC) foram semeados sobre a membrana e mantidos em DMEM/F12 por 7 dias. Os resultados *in vitro* mostraram que os osteoblastos proliferaram em monocamada na superfície da membrana, mas sem penetrar em seu interior. A análise dos cortes histológicos demonstrou 3 dias após a implantação apenas a formação da rede de fibrina. Aos 7 dias, o material implantado estava circundado por células inflamatórias mononucleares, com pouca penetração celular no seu interior. Após 15 dias foi observado um intenso infiltrado inflamatório em contato e dentro do material, bem como sinais de degradação interna e externa. No período de 30 dias, o material, em processo bastante avançado de absorção, estava totalmente tomado por fibroblastos e macrófagos. Aos 60 dias pós-implantação, o material não foi mais detectado em quaisquer dos animais e o tecido subcutâneo apresentava-se normal. Os cortes corados com Picro-Sírius e observados sob luz polarizada mostraram o remodelamento tecidual. Em conclusão, a membrana de pericárdio é bioabsorvível e biocompatível, porém, *in vitro*, não proporciona uma adequada matriz tridimensional para osteoblastos.

UNITERMOS

Colágeno; pericárdio; teste de materiais; tela subcutânea.

INTRODUÇÃO

A escolha de um biomaterial adequado impõe o conhecimento de suas propriedades físico-químicas e mecânica²⁰, bem como de suas características biológicas, antes que possam ser usados em humanos^{13,20}, devendo ser seguro e eficaz²³. Assim, testes de biocompatibilidade são realizados^{19,21}, para determinar a interação hospedeiro-material implantado¹³, sendo a implantação em subcutâneo de roedores como camundongos ou ratos um dos exames iniciais, por ser um procedimento de fácil realização e por fornecer dados preliminares da resposta tecidual gerada pelo biomaterial²².

O colágeno é o biomaterial de origem natural mais amplamente utilizado^{3,24,26} devido a algumas características bem conhecidas como a biocompatibilidade¹⁸, quimiotaxia para fibroblastos^{3,11,15}, ativação e atração de neutrófilos e ampla disponibilidade³. São diversas as aplicações clínicas do colágeno, como por exemplo: no sistema para liberação controlada de drogas (*drug delivery system*)⁷, como matrizes carreadoras na Engenharia de Tecidos²⁵, como materiais de preenchimento no reparo ósseo, como agente hemostático, na confecção de enxertos para as mais diversas especialidades médicas como, por exemplo,

no tratamento de queimaduras²⁷, como barreira física na regeneração tecidual guiada³.

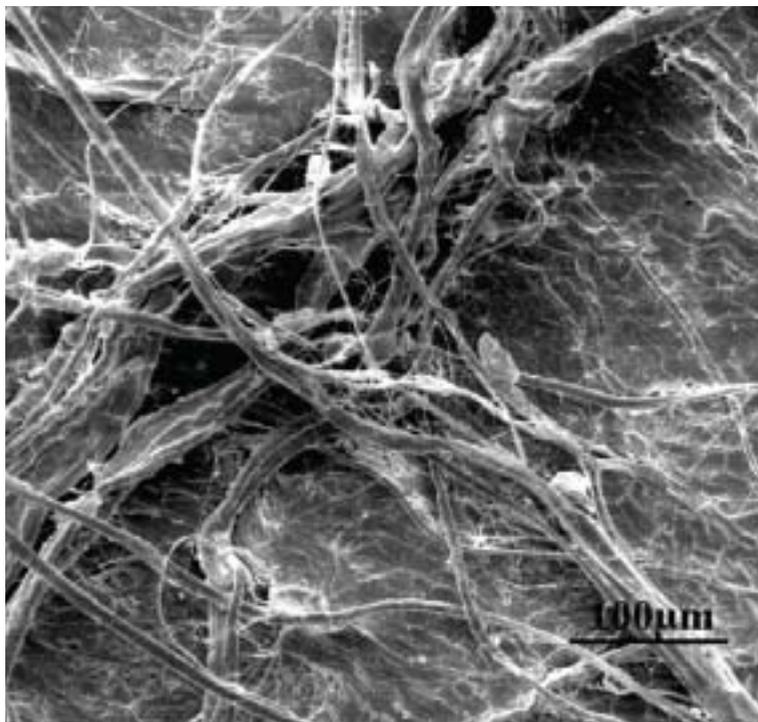
O pericárdio bovino é uma das fontes que há três décadas vem sendo utilizado na confecção de biomateriais^{1,2,4,6,7,14,17,27}. Entretanto, até o momento, poucas informações estão disponíveis quanto ao seu potencial como carreador de células na engenharia de tecidos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino processado e seu potencial como carreador de osteoblastos para a engenharia de tecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O pericárdio bovino foi obtido em um frigorífico local e foi submetido à limpeza mecânica e química para a remoção de material potencialmente imunogênico e de células. O tratamento químico envolveu o uso de peróxidos e solventes orgânicos, sem a promoção de ligações cruzadas. As membranas (Figura 1) foram liofilizadas, cortadas, embaladas e encaminhadas para esterilização por radiação gama (25 kGy, EMBRAD S.A., Sorocaba, SP).

Figura 1 – Fotomicrografia eletrônica de varredura do pericárdio bovino após o processamento mecânico e químico. A barra equivale a 100 µm.



AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE

Animais e procedimentos cirúrgicos

Cinquenta camundongos machos adultos jovens, da linhagem *Swiss*, pesando aproximadamente 30g, divididos em 2 grupos, Controle e Experimental, foram utilizados.

Os animais do grupo experimental foram pré-medicados com Atropina (diluída 100 vezes) na concentração de 4mL/kg do animal. Em seguida, também por via intramuscular, foi aplicada a solução anestésica contendo Quetamina (Dopalen®, da Agribrands do Brasil LTDA., Paulínia, SP) e Cloridrato de Xilazina (Rompun® da Bayer do Brasil S.A., São Paulo, SP), como relaxante muscular, e água, obedecendo à proporção de 2:1:1 (3mL/kg do animal). Realizou-se a tricotomia da região dorsal do animal com auxílio de lâmina de barbear e assepsia vigorosa com álcool iodado. Com bisturi nº. 15 foi realizada uma incisão de 1,5cm no tegumento do dorso, expondo o tecido subcutâneo, que foi imediatamente divulsionado com uma tesoura de ponta romba. Uma membrana de 1cm², previamente embebida em soro fisiológico, foi implantada, mantendo-se uma distância de aproximadamente 5 mm das margens da incisão. Vários pontos simples e descontínuos foram dados com fio de seda Ethicon número 4.0 (Johnson & Johnson®, São Paulo, Brasil). O grupo controle foi submetido apenas aos procedimentos cirúrgicos. Os animais foram mantidos durante todo o período experimental, em caixas plásticas forradas com maravalha (trocaadas três vezes por semana) e foram alimentados com ração comercial para camundongos (PURINA®, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Esse estudo seguiu as disposições do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Instituição.

PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO E ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os animais foram submetidos à eutanásia decorridos os períodos de 3, 7, 15, 30 e 60 dias após a implantação da membrana. O tecido reacional de cada animal foi removido, fixado por 48 horas em formol a 10% tamponado, processado segundo a técnica histológica convencional para inclusão em parafina. Cortes histológicos com espessura de 5 µm foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina (HE). Cortes adicionais foram corados pelo tricrômico de Masson

e utilizados para a análise da degradação do material ao longo do tempo, assim como do grau de absorção do material, e pelo Picro-Sírius para identificar, sob luz polarizada, as formas jovem e madura do colágeno na membrana e nos tecidos circunjacentes.

A resposta tecidual à membrana foi analisada em função das alterações inflamatórias (presença de edema, alterações vasculares e infiltrado inflamatório) e dos processos reparatórios (grau de fibrosamento, proliferação angioblástica e fibroblástica) nos tecidos reacionais juntos aos materiais implantados. Para cada parâmetro avaliado foram atribuídos os escores zero (ausente), um (leve), dois (moderado) ou três (intenso), sem que o examinador soubesse previamente o período avaliado.

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL CARREADOR

Osteoblastos humanos da linhagem hFOB 1.19 (ATTC) foram cultivados segundo descrito por HARRIS et al. (1995)³², utilizando-se meio de Eagle modificado por Dubelcco com meio de Ham F12 (DMEM/F12 – proporção 1:1), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). O meio de cultura era trocado a cada três dias. Quando subconfluentes, as células eram removidas dos frascos de cultura por meio de Tripsina 0,25% (Gibco), contadas utilizando um hemocítmetro 6, 7, 8. Todos os experimentos foram realizados entre a 5ª e a 7ª passagem.

Membranas de pericárdio bovino (1cm²) foram colocadas em placas com 6 poços, hidratadas em DMEM/F12 por 24 horas, quando o meio foi removido e as células (1,5 x 10⁵/cm²) foram semeadas sobre a membrana em DEMEM/F12 e incubadas durante 7 dias a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ e 95% ar. Ao final deste período as membranas de pericárdio bovino contendo as células foram removidas, fixadas em formol 10% tamponado por 20 minutos e submetida ao processamento histotécnico convencional para inclusão em parafina e coloração em HE.

RESULTADOS

Análise da biocompatibilidade

Aos 3 dias, a membrana apresentava-se íntegra sem sinais evidentes de degradação (Figuras 2A,B), o infiltrado inflamatório moderado, predominantemente constituído de polimorfonucleares, limitava-se ao tecido circunjacente ao material sem, contudo, penetrá-lo. No grupo controle evidenciou na área de

incisão infiltrado inflamatório leve, compatível com o trauma dos procedimentos operatórios.

Aos 7 dias após a implantação foram observados os primeiros sinais de degradação da membrana (Figuras 2C,D), com aumento dos seus espaços interfibrilares e um intenso infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos já permeando o seu interior, ainda que levemente. Observou-se ainda uma moderada proliferação fibroblástica e uma discreta angiogênese. No controle, o infiltrado inflamatório era agudo e de intensidade moderada com predominância de polimorfonucleares e células mononucleares compatíveis com macrófagos.

Aos 15 dias já era evidente a degradação do material (Figuras 2E,F) com a invasão do infiltrado inflamatório mononuclear circunjacente, predominantemente macrofágico, sem a presença de células gigantes, paralelamente a uma angiogênese (Tabela 1) e proliferação fibroblástica moderadas (Figura 4B). No grupo controle um leve infiltrado inflamatório, com discreta presença de macrófagos e polimorfonucleares, estavam presentes.

No período de 30 dias observou-se uma intensa degradação, as membranas estavam reduzidas em mais da metade do seu tamanho inicial (Figuras 2G, H), em alguns casos, apenas resquícios da membrana estavam presentes. A proliferação fibroblástica era intensa, assim como a formação de tecido conjuntivo em substituição ao material. No grupo controle já havia ausência de infiltrado inflamatório em quase todos os animais e intensa proliferação fibroblástica, com formação de novo tecido conjuntivo.

No período final de 60 dias pós-implantação (Figuras 2I, J), a membrana havia sido completamente absorvida e o tecido conjuntivo formado em substituição já apresentava aspectos de normalidade local em todos os animais, sendo semelhantes aos dos animais do controle.

A análise dos cortes corados pelo tricrômico de Masson permitiu confirmar a degradação crescente do biomaterial ao longo do tempo, assim como o perfil de sua absorção, bem como as características do infiltrado inflamatório já observadas na coloração pela HE (Figuras 3A, C, E, G, I). Nos cortes corados pelo Picro Sirius (Figura 3), sob luz polarizada, a intensa coloração em vermelho das fibras colágenas da derme (Figura 3B), em particular da membrana de pericárdio (Figura 3D), pode ser observada. A evolução temporal da coloração, particularmente a polarizada para o vermelho, indicou o remodelamento do tecido com absorção de fibras espessas (Figura 3F) e substituição

por novas fibras finas vermelhas, amarelo-laranjas e verdes, esta últimas, mais esparsas (Figuras 3H-J).

ANÁLISE DO POTENCIAL CARREADOR

A membrana de pericárdio não apresentou indícios de citotoxicidade, permitindo a adesão e proliferação dos osteoblastos sobre sua superfície, recobrando-a uniformemente, sem penetrar no material (Figura 4).

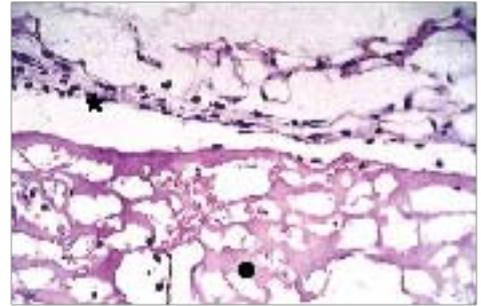
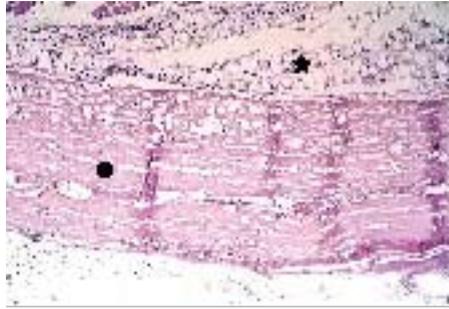
DISCUSSÃO

Uma das principais fontes do colágeno utilizado para a produção de biomateriais são os tecidos de bovinos⁸, dos quais o Brasil é um país com considerável rebanho e bom controle sanitário sem histórico de doenças como a encefalopatia espongiforme bovina. O uso dessa fonte abundante associada ao processamento adequado destes tecidos pode representar uma fonte importante de novos materiais, passíveis de serem utilizados na engenharia de tecidos ou em técnicas regenerativas, sem os vieses relativos à dependência de matéria prima e elevado custo, como ocorre com os polímeros, bioreabsorvíveis.

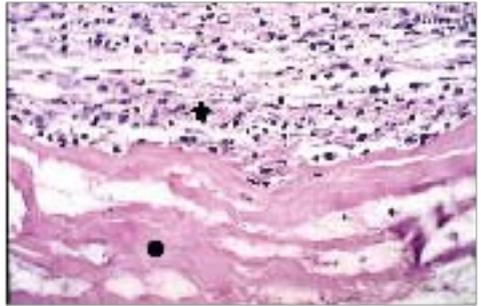
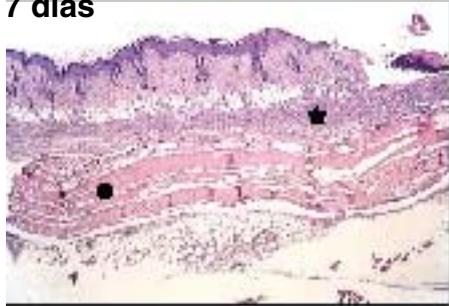
O pericárdio avaliado apresentou alta taxa de degradação, provavelmente devido à falta de tratamento para adição de ligações cruzadas, responsáveis pelo aumento da resistência do colágeno à degradação biológica^{9,24}, e do sítio de implantação. A este respeito, sabe-se que o colágeno na forma de gel implantado em subcutâneo de camundongos é totalmente absorvido após 4 semanas em um processo mediado por células mononucleares realizando fagocitose²¹. Convém salientar que o colágeno na forma de gel é muito frágil e, devido à sua hidrofiliabilidade, é muito fluido para manter o formato original sob a ação de forças de compressão no tecido. Assim, o material a base de colágeno deve apresentar maior consistência, mantendo o formato inicial e com possibilidade de ser moldada, a semelhança da membrana colagênica aqui testada.

Diferentemente das membranas não-absorvíveis de ePTFE que são inertes e não absorvíveis¹⁹, as membranas colagênicas são passíveis de degradação enzimática decorrente do processo de reparo⁹, o qual é desejado e esperado¹⁰. No presente estudo, o processo de degradação da membrana de pericárdio bovino no tecido subcutâneo de camundongos foi guiado por células mononucleares semelhantes a macrófagos e fibroblastos, sem a participação de células gigantes, como observado em biopróteses bovinas⁵.

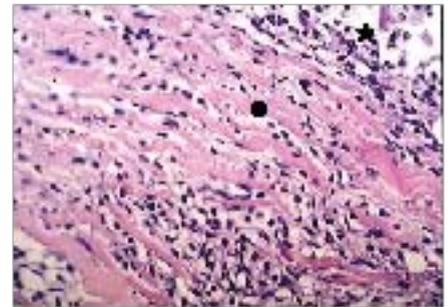
3 dias



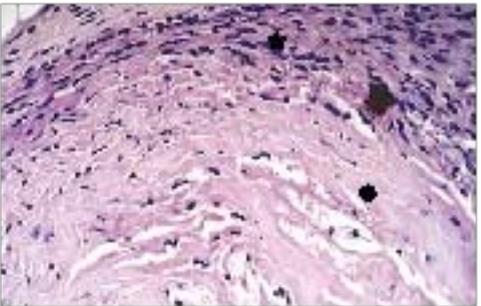
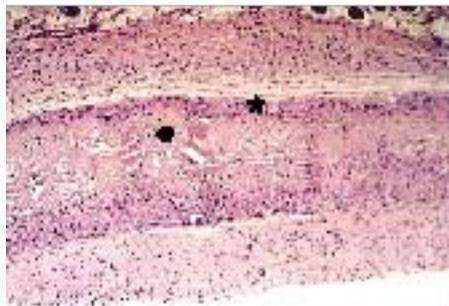
7 dias



3 dias



15 dias



60 dias

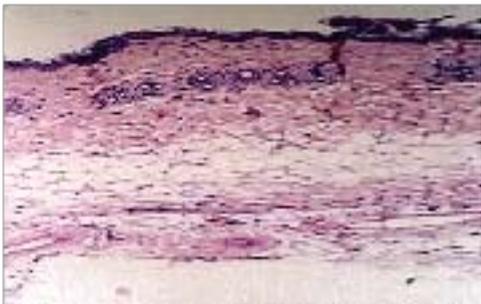


Figura 2 - Fotomicrografias em HE da resposta tecidual à membrana de pericárdio nos diferentes períodos experimentais. 3 dias: presença de infiltrado inflamatório (★) ao redor da membrana (●, A, 40x) e no interior das fibras de colágeno (seta, B, 100x). 7 dias (C, 400x; D, 400x): aspecto geral da membrana (●) envolta pelo cinturão do infiltrado inflamatório (★). 15 dias (E, 40x; F, 400x): infiltrado inflamatório ao redor e no interior da membrana (★), com presença de vasos (seta) e sinais de degradação da membrana infiltrada por células inflamatórias mononucleares (F). 30 dias (G, 40x; H, 400x): plano geral da membrana envolta por intenso infiltrado inflamatório (★) ao redor e no interior da membrana (●). 60 dias (I, 40x; J, 100x): ausência da membrana substituída pelo tecido conjuntivo.

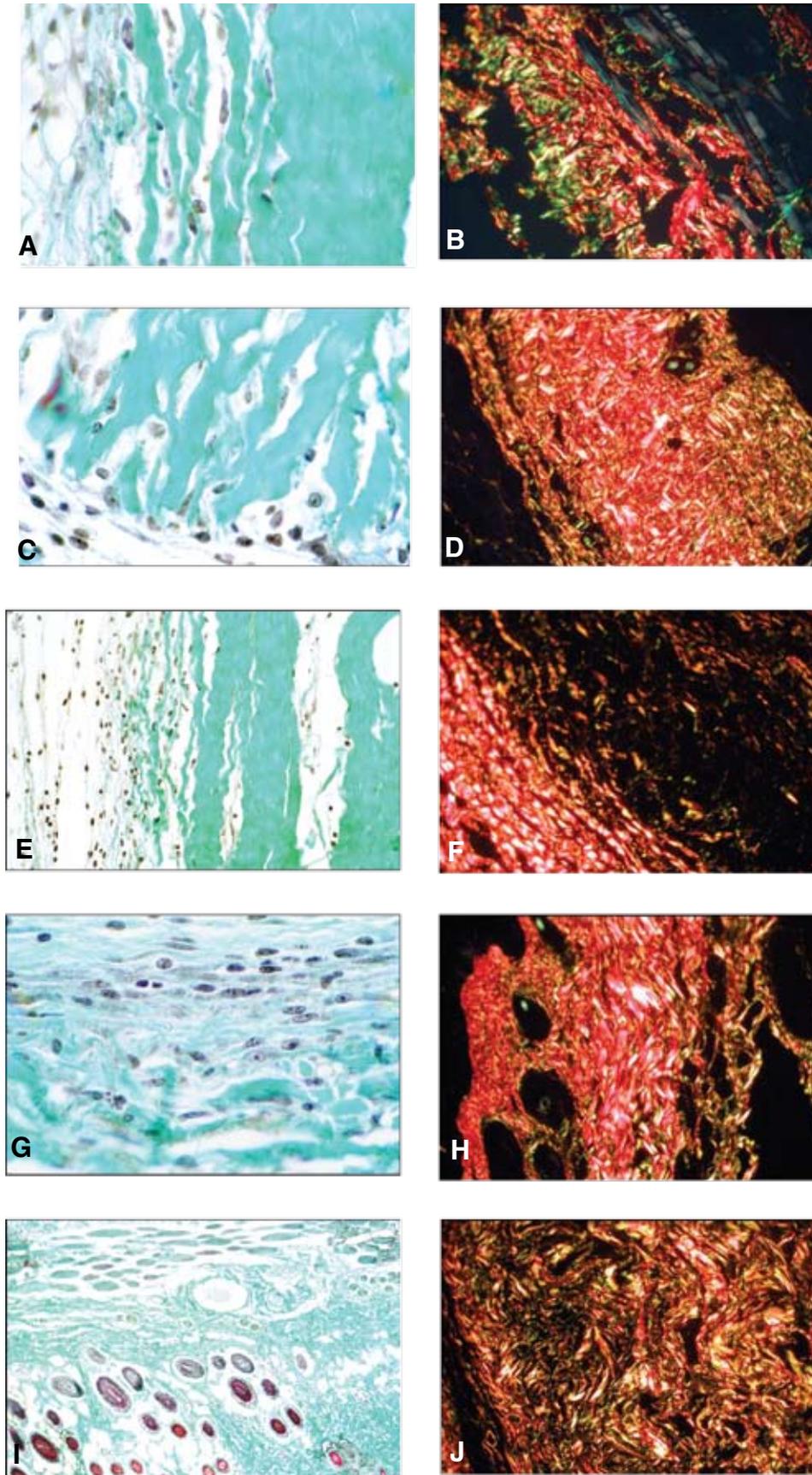


Figura 3 - Fotomicrografia da evolução da degradação da membrana (Tricrômico de Masson) e remodelamento do tecido subcutâneo (Picro Sirius, luz polarizada). Presença de infiltrado inflamatório no período de 3 dias (A, 400x) onde se nota a densidade de fibras no local da implantação da membrana, em vermelho intenso, contra a esparsa coloração no conjuntivo (B, 40x) que se intensifica nos períodos de 7 (C, 400x; D, 40x) e 15 dias (E, 100x; F, 40X), com franca reabsorção da membrana aos 30 dias (G, 400x; H, 40x). Aos 60 dias não se observa sinais da membrana e o tecido denota aspectos de normalidade (I, 40x), onde se observa a diminuição significativa da fibra corada em vermelho intenso, apresentando fibras verdes esparças (J, 40x).

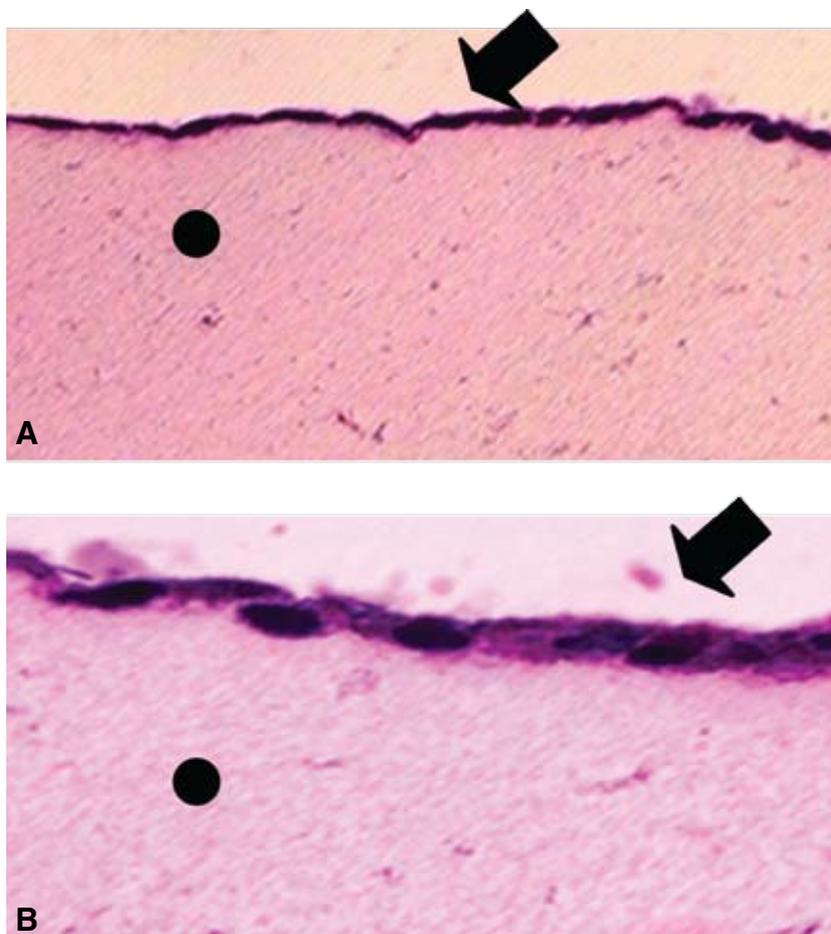


Figura 4 – Fotomicrografia corada em HE da membrana de pericárdio bovino utilizada como substrato para o cultivo de osteoblastos h.Fob 1.19 (ATCC). A membrana apresentou uma estrutura densa de fibras colágenas (●) que propiciou a proliferação celular, mas não permitiu a penetração dos osteoblastos (A, 100x; B, 400x).

O fato da região subcutânea para implantação e teste de biomateriais promoverem um influxo celular intenso para o interior do material implantado, talvez tenha favorecido a diminuição no tempo de degradação, como foi observado no presente estudo. Em substituição ao material absorvido, houve o povoamento da região por fibroblastos, que modelaram um novo tecido conjuntivo, normal do local, sugerindo que o colágeno implantado possa ter exercido uma quimiotaxia para essas células⁹.

Nesse sentido é sabido que nas fases iniciais do processo inflamatório, os macrófagos mobilizados são as principais células secretoras de collagenases, dentre outras proteases, para a degradação inicial das principais fibrilas colágenas. Posteriormente com a ocorrência da migração fibroblástica, os fibroblastos também participam mais ativamente deste evento, concomitantemente com a formação de novas fibrilas colágenas, como observado na presente pesquisa, resultando no aspecto de normalidade encontrado no período de 60 dias após a implantação da membrana de pericárdio¹².

A compatibilidade biológica da membrana de pericárdio bovino foi confirmada, ainda, no ensaio *in vitro*, uma vez que possibilitou a adesão, proliferação e migração de osteoblastos sobre a sua superfície, sem exercer efeito citotóxico aparente. Entretanto, no período estudado, estas células não conseguiram penetrar no interior do material, possivelmente devido à densa trama das fibras colágenas no pericárdio. O tratamento do pericárdio com álcalis poderia promover a hidrólise dos grupos carboxâmidos da asparagina e glutamina, proporcionando uma estrutura semelhante à esponja e aumentando os espaços interfibrilares, facilitando a penetração celular¹⁶.

Além da avaliação da biocompatibilidade de biomateriais, o tecido subcutâneo também permite investigar a ocorrência de calcificação destes dispositivos, evento indesejável em alguns casos⁵. Em nosso estudo, a membrana de pericárdio bovino não sofreu calcificação após implantada no tecido ou mesmo durante sua absorção.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados aqui obtidos podemos concluir que a membrana de pericárdio bovino é biocompatível e bioabsorvível quando implantada

em tecido subcutâneo de camundongos. *In vitro*, osteoblastos não foram capazes de invadir o arcabouço tridimensional do pericárdio, sugerindo que, no formato avaliado, este material não é um bom carreador de células para a engenharia tecidual.

ABSTRACT

The biocompatibility of a pericardium membrane was evaluated in the subcutaneous tissue of mouse killed 3, 7, 15, 30 and 60 days post implantation. The cellular components of inflammatory infiltrate, the membrane degradation, and the collagen characteristic were analyzed in histological sections stained with hematoxylin and eosin, Tricromic of Masson and Sirius Red, respectively. The potential features as a tissue engineering scaffold was tested *in vitro* using human osteoblasts (h.Fob 1.19, ATCC) seeded over the membrane and maintained for 7 days in DMEM/F12. We observed *in vitro* the monolayer proliferation of osteoblasts, but without penetrating in the membrane. The histological sections showed after 3 days of implantation only the presence of a fibrin net. At the 7-day period, mononuclear inflammatory cells were observed around the implant, but a few one were observed inside the membrane. After 15 days the inflammatory infiltrate was more intense than in the previous period and the cells were inside and in close contact to the material showing evident signs of internal and external degradation. The implant degradation was intense after 30 days and the residual material was fulfilled of fibroblasts and macrophages. No signs of membrane were observed after 60 days in any animals and the subcutaneous tissue presented normal aspect. Sirius Red staining at polarized light had evidenced the tissue remodeling throughout the experimental periods. In conclusion, the pericardium membrane is bioabsorbable and biocompatible, but, *in vitro*, do not fulfill the requirements as a tridimensional scaffold to osteoblast.

UNITERMS

Collagen; pericardium; materials testing; subcutaneous tissue.

Tabela 1 – Escores médios atribuídos às variáveis analisadas durante o exame microscópico do grupo experimental nos diferentes períodos cirúrgicos.

Variável	Períodos (dias)				
	3	7	15	30	60
Infiltrado inflamatório	2,08	2,67	2,2	1,6	0,67
Macrófagos	0,67	2,5	2,4	1,7	0,92
Linfócitos	0,83	1,25	1,3	0,9	0,17
Plasmócitos	0,25	1,25	1,3	0,9	0,17
Células gigantes	0	0,08	0,3	0	0

REFERÊNCIAS

1. Braile DM, Leal JCF, Godoy MF, Lemos MA, Zaiantchick M. Reconstrução da geometria do ventrículo esquerdo com prótese semi-rígida de pericárdio bovino: experiência de 11 anos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1999 Abr; 14(2): 71-4.
2. Braile DM, Soares MJF, Souza DRS, Ramires VA, Suzigan S, Lourenço MF. Expectativa funcional de biopróteses valvulares. 1. Testes físicos e histopatológicos para aproveitamento de regiões de pericárdio bovino. *Arq Bras Cardiol*. 1992 Set; 59:169-75.
3. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001 Fev; 72(2): 215-29.
4. Chanda J. Prevention of calcification of heart valve bioprostheses: an experimental study in rat. *Ann Thorac Surg*. 1995 Ago; 60(2 Suppl): S339-S342.
5. Chandy T, Mohanty M, John A, Rao SB, Sivakumar R, Sharma CP, et al. Structural studies on bovine bioprosthetic tissues and their in vivo calcification: prevention via drug delivery. *Biomaterials*. 1996 Mar; 17(6):577-85.
6. Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*. 1996 Mar; 17(5): 471-84.
7. Lee WK, Park KD, Han DK, Suh H, Park JC, Kim YH. Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis. *Biomaterials*. 2000 Nov; 21(22):2323-30.
8. Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg*. 2003 Set; 27(5):354-66.
9. Liang HC, Chang Y, Hsu CK, Lee MH, Sung HW. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials* 2004 Ago; 25(17): 3541-52.
10. Nesh-Meyer MJ, Pack AR, McMillan MD. A comparison of 2 polytetrafluoroethylene membranes in guided tissue regeneration in sheep. *J Periodontal Res*. 1997 Jan; 32(1 Pt 1): 20-30.
11. Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent*. 2001 Jun; 10(1):49-58.
12. Palma PCR, Marques PC, Vidal BC, Riccetto CLZ, Dambros M, Netto JR. NR. Histopathological alterations resulting from subcutaneous implant of collagen and autologous aponeurotic fascia: a comparative study in dogs. *Braz J Urol*. 2001 Jun; 27: 171-7.
13. Pieper JS, van Wachem PB, van Luyn MJA, Brouwer LA, Hafmans T, Veerkamp JH et al. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats. *Biomaterials*. 2000 Ago; 21(16):1689-99.
14. Pires AC, Saporito WF, Leao LEV, Forte V, Cardoso SH, Ramciotti O. Pericárdio bovino utilizado como remendo no sistema cardiovascular. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1997 Jun; 12(2):176-87
15. Robert PM, Frank RM. Periodontal guided tissue regeneration with a new resorbable polylactic acid membrane. *J Periodontol*. 1994 Mai; 65(5):414-22.
16. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*. 2002 Jan.; 23(2): 449-56.
17. Salazar E, Espinola N, Roman L, Casanova JM. Effect of pregnancy on the duration of bovine pericardial bioprostheses. *Am Heart J*. 1999 Abr; 137(4 Pt 1):714-20.
18. Santarelli G, Parodi R, Carusi G. The use of a slowly resorbable collagen barrier in the regeneration of bone in deep wide defects: a case report. *Int J Periodontics Restor Dent*. 1996 Fev.; 16(1):68-77.
19. Scantlebury TV. 1982-1992: a decade of technology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol*. 1993 Nov; 64(11 Suppl):1129-37.
20. Silver FH, Christiansen DL. *Biomaterials Science and Biocompatibility*. New York: Springer-Verlag;1999. 342p.
21. Taira M, Araki Y, Nakao H, Takahashi J, Hyon SH, Tsutsumi S. Cellular reactions to polylactide-based sponge and collagen gel in subcutaneous tissue. *J Oral Rehabil* 2003 Jan.; 30(1): 106-9.
22. Takata T, Wang HL, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodontal Res*. 2001 Out; 36(5): 322-7.
23. Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjo UM. Devices for periodontal regeneration. *Periodontol*. 2000 1999 Fev; 19:59-73.
24. Trasciatti S, Podesta A, Bonaretti S, Mazzoncini V, Rosini S. In vitro effects of different formulations of bovine collagen on cultured human skin. *Biomaterials*. 1998 Mai; 19(10): 897-903.
25. van Wachem PB, Brouwer LA, van Luyn MJ. Absence of muscle regeneration after implantation of a collagen matrix seeded with myoblasts. *Biomaterials*. 1999 Mar; 20(5):419-26.
26. Wissink MJ, Beernink R, Pieper JS, Poot AA, Engbers GH, Beugeling T, et al. Binding and release of basic fibroblast growth factor from heparinized collagen matrices. *Biomaterials*. 2001 Ago; 22(16):2291-9.
27. Yoshioka SA, Goissis G, Araujo RB, Ramirez VDA, Godoy MF, Braile DM. Performance hidrodinâmica de biopróteses valvulares cardíacas de pericárdio bovino tratado com acetais de glutaraldeído. *Rev Bras Eng Biomed*. 1999 Jan; 15(1-2):5-10.

Recebido em 10/10/06
Aprovado em 16/10/07

Correspondências:
José Mauro Granjeiro
Outeiro de São João Batista s/n, Centro, Niteroi, RJ, Brasil,
CEP 24020-150
E-mail: jmgranjeiro@vm.uff.br