

ESTUDO DE MEMBRANA BIOLÓGICA EM RATOS NA PREVENÇÃO DE FIBROSE PÓS LAMINECTOMIA

Marco Antonio Herculano¹, Oswaldo Ignácio de Tella Jr²,
Mirto Nelso Prandini³, Maria Teresa de Seixas Alves⁴

RESUMO - Os autores investigaram a aplicação de uma membrana biológica, constituída de cortical óssea bovina descalcificada, em cirurgias de coluna vertebral de ratos, com o intuito de tratar o defeito ósseo minimizando ou impedindo a herniação do tecido muscular para dentro do canal raquidiano pós laminectomia, inibindo a formação de fibrose pós-operatória e avaliando a biocompatibilidade do material. O estudo foi feito utilizando-se de ratos Wistar-EPM, que após intervalos de 8, 16 e 24 semanas, foram sacrificados, sendo removidas as peças cirúrgicas para análise anatomopatológica. A membrana biológica evitou a herniação do tecido muscular para o canal raquidiano, sendo totalmente reabsorvida em todas as peças analisadas, demonstrando sua biocompatibilidade e favorecendo a neoformação óssea e evitando aderências.

PALAVRAS-CHAVES: membrana biológica, laminectomia, cortical óssea bovina, fibrose.

Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using biological sheet in rat model

ABSTRACT - The prevention of fibrosis after lumbar and thoracic laminectomies by avoiding herniation of muscular tissue was studied using Wistar-EPM rats with a biological membrane made of decalcified bone of bovine material. The rats were sacrificed after eight, sixteen and twenty four weeks and the material was sent to anatomopathological study. This membrane proved to be biocompatible and its efficacy was seen by allowing formation of bone and preventing muscular tissue invasion of the epidural space and avoiding adhesences.

KEY WORDS: biological membrane, laminectomy, bovine cortical bone, fibrosis.

A idéia de prevenção de futuras complicações no ato cirúrgico com uso de materiais exógenos esteve sempre presente no consciente do cirurgião; no entanto, somente a evolução tecnológica e o controle da resposta imunológica permitiram, na década de 60, o início de tais objetivos. A utilização de material inibidor de fibrose, em pacientes submetidos a cirurgia de hérnia do disco lombar, vem sendo pesquisada com o intuito de diminuir a dor e promover uma menor cicatriz no local, tendo sido utilizados métodos diversos, como enxertos de gordura, barreira biodegradável e barreira de gel¹⁻⁸.

Com a técnica de regeneração tecidual guiada, muitas membranas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas para serem utilizadas como barreira física. Essa evolução caminhou para o desenvolvimento de membranas biorreabsorvíveis, como a de colágeno I bovino, de ácido polilático, de ácido poliglático e vá-

rias outras, utilizadas com resultados satisfatórios em diversos tipos de defeitos ósseos e de tratamentos cirúrgicos⁹⁻¹⁴.

O presente estudo tem o propósito de investigar a aplicação de uma membrana biológica, constituída de cortical óssea bovina descalcificada, em cirurgias de coluna vertebral de ratos, com o intuito de tratar o defeito ósseo, minimizando ou impedindo a herniação do tecido muscular para dentro do canal raquidiano, inibindo a formação de fibrose pós-operatória, e avaliar a biocompatibilidade do material.

MÉTODO

Sessenta peças originárias das regiões torácica e lombar, de 30 ratos (*Rattus americanus albinus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem EPM - Wistar, machos, adultos, com peso entre 230 e 500 mg, média 393,66 mg, foram analisadas por meio de estudo anatomopatológico para determinar o grau das alterações presentes no ensaio.

Disciplina de Neurocirurgia e Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo SP, Brasil (EPM-UNIFESP): ¹Professor Adjunto da Disciplina de Neurocirurgia da Faculdade de Medicina de Jundiaí; ²Professor Adjunto Livre Docente da Disciplina de Neurocirurgia da EPM-UNIFESP; ³Professor Adjunto da Disciplina de Neurocirurgia da EPM-UNIFESP; ⁴Professora Adjunta do Departamento de Patologia da EPM-UNIFESP.

Recebido 25 Agosto 2005. Aceito 9 Novembro 2005.

Dr. Marco Antonio Herculano - Rua Escolástica de Toledo Pontes 51 - 13209-290 Jundiaí SP - Brasil. E-mail: herculano.ncir@proxy.com.br

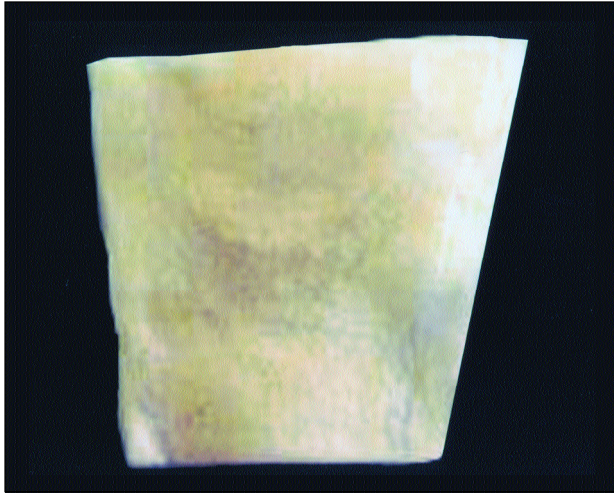


Fig 1. Fotografia mostrando a membrana biológica de cortical óssea bovina descalcificada, média, Genius® - Gen-derm®.

Os animais foram submetidos a duas laminectomias, uma lombar e outra torácica, simultaneamente, com a utilização de técnica microcirúrgica. O agente anestésico utilizado foi o Zoletil® 50, de uso veterinário, na dosagem de 50 mg/kg, média 0,80 mg por animal. Quando se fez necessário o espécime foi submetido a complementação com 1/3 a 1/2 da dose inicial.

Quinze animais receberam um implante de membrana biológica constituída de cortical óssea bovina descalcificada, média na laminectomia lombar (50%) e os outros 15 receberam o implante na laminectomia torácica (Figs 1 e 2). Como os animais foram submetidos a laminectomias lombar e torácica, cada qual foi seu próprio controle.

Nenhum animal recebeu substâncias antiinflamatórias para que não houvesse interferência no processo fibrocicatricial e ou na formação da fibrose local pós-operatória, sendo alimentados com ração sem antibióticos e ofertada água, *ad libitum*.

Dez animais foram sacrificados ao final de oito semanas, sendo retirados os segmentos com os procedimentos cirúr-

gicos, os quais, devidamente identificados, e submetidos a estudo anatomopatológico, com coloração específica a fim de evidenciar a integração do biomaterial e presença de fibrose local. Desses, cinco tinham o implante na região lombar e cinco na região torácica.

Outros dez animais foram sacrificados ao final de 16 semanas, sendo submetidos ao mesmo procedimento anteriormente descrito. Também nesse grupo cinco animais tinham o implante na região lombar e cinco na região torácica.

Após período de 24 semanas de pós-operatório um novo lote de dez animais foi sacrificado utilizando-se o mesmo protocolo. Nesses também cinco tinham o implante na região lombar e cinco na torácica.

A análise morfológica foi feita utilizando-se a técnica convencional da hematoxilina-eosina (HE), para a identificação do tecido fibrocicatricial e reconstituição do tecido ósseo. A análise morfométrica e histológica das peças foi submetida a documentação fotográfica em fotomicroscópio Olympus modelo BX51, com ocular fotométrica WH10X-H/22.

Para calcular a extensão do defeito ósseo, nas peças com falha de reconstituição, com e sem biomaterial, foram considerados os dados obtidos através da maior medida, em extensão, com aumento de 400 vezes, utilizando-se o programa de informática UTHSCSA Image Tool for Windows, versão 2.02, desenvolvido pela Universidade do Texas, nos EUA.

As peças obtidas dos animais foram divididas em cinco subgrupos para análises comparativas dos resultados e verificação da possível relação entre os mesmos.

O primeiro grupo foi composto por cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, todas sem presença de biomaterial, e cinco peças provenientes da região lombar e cinco da torácica, todas com a presença de biomaterial, dos animais sacrificados com 24 semanas.

O segundo grupo foi composto por cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, todas sem presença de biomaterial e cinco peças provenientes da região lombar e cinco da torácica, todas com a presença de biomaterial, dos animais sacrificados com 16 semanas.

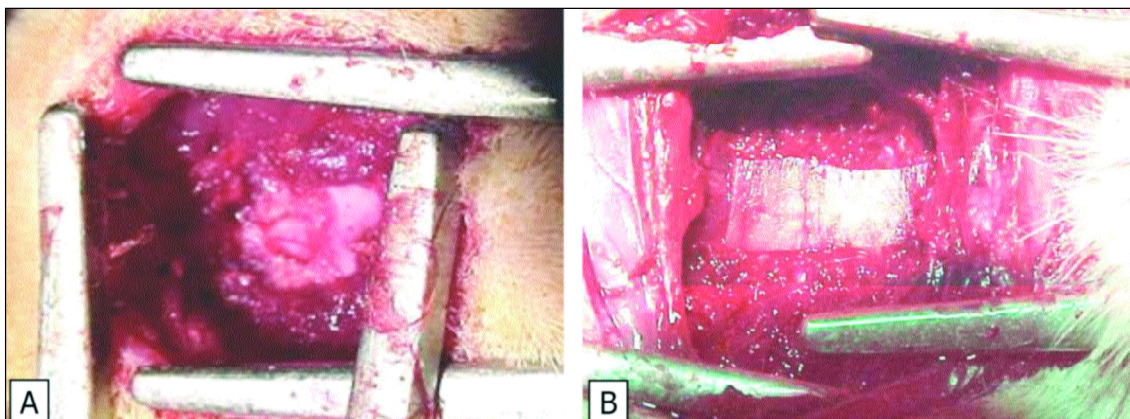


Fig 2. Fotografia mostrando, em A, o leito cirúrgico na região torácica pronto para receber o implante e, em B, a membrana liofilizada bovina, Gen-Derm® sobre a área da laminectomia.

O terceiro grupo foi composto por cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, todas sem presença de biomaterial, e cinco peças provenientes da região lombar e cinco da torácica, todas com a presença de biomaterial, dos animais sacrificados com oito semanas.

O quarto grupo foi composto por cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, dos animais sacrificados com oito semanas; cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, dos animais sacrificados com 16 semanas; cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, dos animais sacrificados com 24 semanas, todas sem presença de biomaterial.

O quinto grupo foi composto por cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, dos animais sacrificados com oito semanas; cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, dos animais sacrificados com 16 semanas; cinco peças provenientes da região lombar e cinco da região torácica, dos animais sacrificados com 24 semanas, todas com presença de biomaterial.

Para analisar possíveis diferenças entre os grupos com implante e sem implante, quanto à presença ou ausência de falhas, usamos o teste do qui-quadrado (χ^2) para tabelas de associação, obedecendo-se às restrições de Cochran e quando estas presentes, o teste foi substituído pelo teste exato de Fisher, técnica não-paramétrica, extremamente útil para analisar dados discretos (nominais ou ordinais), quando o tamanho das amostras independentes é pequeno. O teste do qui-quadrado foi utilizado, pois apesar de o animal ser o mesmo, considerou-se, para efeito de estudo, o fato de usarmos ou não o implante e, portanto, grupos independentes. O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual do que 0,05 (5%).

RESULTADOS

O resultado da análise microscópica de nosso material, submetido a HE, mostrou que os três grupos obtidos a partir do tempo de sacrifício, com e sem a utilização da membrana, apresentavam reconstituição

da falha óssea total ou parcial, sendo que em nenhum animal foi encontrada evidência de restos de membrana e quando a reconstituição da falha óssea era completa não havia fibrose (Fig 3).

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística, inicialmente, fixando-se a região submetida ao procedimento cirúrgico e relacionando presença ou ausência de implante com reconstituição total ou parcial do tecido, nos três períodos de sacrifício; e, fixada a presença ou ausência de implante, relacionou-se região lombar e torácica com reconstituição total ou parcial do tecido, nos três períodos de sacrifício.

Nos 10 animais sacrificados com 24 semanas, 5 receberam o implante na região lombar, sendo que 3 apresentaram reconstituição óssea completa e 2 não apresentaram reconstituição; 5 não receberam o implante na região lombar, sendo que 2 apresentaram reconstituição óssea completa e 3 não apresentaram reconstituição ($p=0,50000$ e $p=1,0000$) (N.S.); 5 receberam o implante na região torácica, sendo que 3 apresentaram reconstituição óssea completa e 2 não apresentaram reconstituição; 5 animais não receberam o implante na região torácica, sendo que 4 apresentaram reconstituição óssea completa e 1 não apresentou reconstituição ($p=0,5000$ e $p=1,0000$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 16 semanas, 5 receberam o implante na região lombar, sendo que 2 apresentaram reconstituição óssea completa e 3 não apresentaram reconstituição; 5 não receberam o implante na região lombar, sendo que 3 apresentaram reconstituição óssea completa e 2 não apresentaram reconstituição ($p=0,5000$ e $p=1,0000$) (N.S.); 5 receberam o implante na região torácica, sendo que

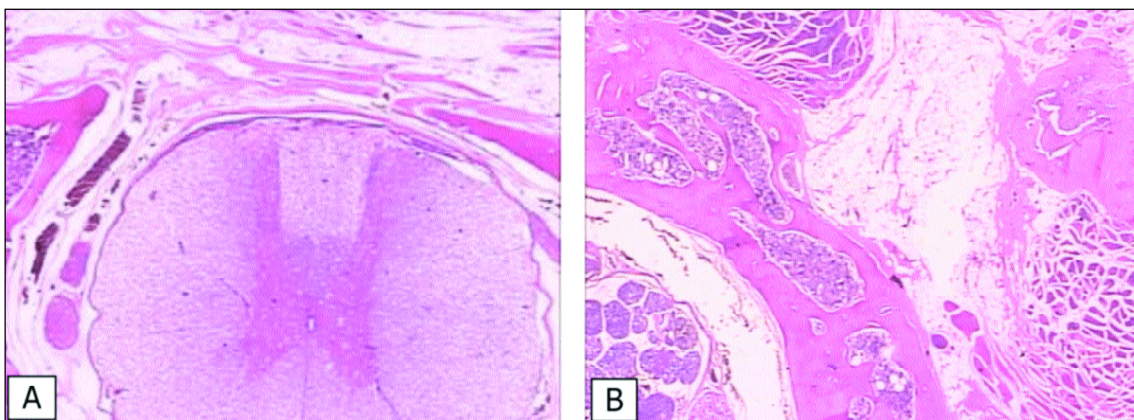


Fig 3. Microfotografias das peças PO2-339, da região torácica do Rato 1, corada pela HE, mostrando falha óssea 1991,09 micras (A) e PO2-340, da região lombar do Rato 1, mostrando reconstituição óssea completa no local da laminectomia (A 20X e B 40X).

3 apresentaram reconstituição óssea completa e 2 não apresentaram reconstituição; 5 animais não receberam o implante na região torácica, sendo que 3 apresentaram reconstituição óssea completa e 2 não apresentaram reconstituição ($p=0,7380$ e $p=1,0000$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 8 semanas, 5 receberam o implante na região lombar, sendo que 1 apresentou reconstituição óssea completa e 4 não apresentaram reconstituição; 5 não receberam o implante na região lombar, sendo que 4 apresentaram reconstituição óssea completa e 1 não apresentou reconstituição ($p=0,1031$ e $p=0,2063$) (N.S.); 5 receberam o implante na região torácica, sendo que 4 apresentaram reconstituição óssea completa e 1 não apresentou reconstituição; 5 animais não receberam o implante na região torácica, sendo que 3 apresentaram reconstituição óssea completa e 2 não apresentaram reconstituição ($p=0,5000$ e $p=1,0$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 24 semanas, com implante, 5 receberam na região lombar, sendo que 3 apresentavam reconstituição óssea completa e 2 não apresentavam; 5 receberam na região torácica, sendo que 3 apresentavam reconstituição óssea completa e 2 não apresentavam ($p=0,7380$ e $p=1,0000$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 16 semanas, com implante, 5 receberam na região lombar, sendo que 3 apresentavam reconstituição óssea completa e 2 não apresentavam; 5 receberam na região torácica, sendo que 2 apresentavam reconstituição óssea completa e 3 não apresentavam ($p=0,5000$ e $p=1,0000$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 8 semanas, com implante, 5 receberam na região lombar, sendo que 4 apresentavam reconstituição óssea completa e 1 não apresentava; 5 receberam na região torácica, sendo que 4 apresentavam reconstituição óssea completa e 1 não apresentava ($p=0,7777$ e $p=1,0000$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 24 semanas e sem implante, na região lombar 2 apresentavam reconstituição óssea completa e 3 não apresentavam; na região torácica 1 apresentava reconstituição óssea completa e 4 não apresentavam ($p=0,5000$ e $p=1,0000$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 16 semanas e sem implante, na região lombar 3 apresentavam reconstituição óssea completa e 2 não apresentavam; na região torácica 3 apresentavam reconstituição óssea completa e 2 não apresentavam ($p=0,7380$ e $p=1,0000$) (N.S.).

Nos 10 animais sacrificados com 8 semanas e sem implante, na região lombar 5 apresentavam reconstituição óssea completa e na região torácica 2 apresentavam reconstituição óssea completa e 3 não apresentavam ($p=0,0833$ e $p=0,1666$) (N.S.).

Nos 30 animais, independente do tempo de sacrifício e com implante na região lombar: 9 apresentavam reconstituição óssea completa e 6 não apresentavam; na região torácica 5 apresentavam reconstituição óssea completa e 10 não apresentavam ($p=0,0600$ e $p=1,8400$) (N.S.).

Nos 30 animais, independente do tempo de sacrifício e sem implante na região lombar: 5 apresentavam reconstituição óssea completa e 10 não apresentavam; na região torácica 9 apresentavam reconstituição óssea completa e 6 não apresentavam ($p=0,5400$ e $p=17,2600$) (N.S.).

Em todos os ensaios com presença do implante, o mesmo funcionou como barreira mecânica, evitando a aderência do tecido fibroso no tecido nervoso. Nos ensaios sem implante e com reconstituição óssea também não houve aderências.

DISCUSSÃO

O termo fibrose peridural, ou epidural, refere-se à deposição de tecido fibroso no espaço epidural. Esse processo é, usualmente, causado pela manipulação prévia desse espaço por meio da colocação de cateteres epidurais, ou, mais frequentemente, por cirurgias de coluna que envolvam a exploração do espaço epidural. Geisler¹⁵ afirma que a discectomia é um procedimento comum, com índices de sucesso de 85% a 95% no alívio da dor ciática. Entretanto, 40% dos pacientes apresentam limitações funcionais persistentes. Segundo o autor, a fibrose epidural é consequência natural da cirurgia de hérnia discal, podendo apresentar sintomatologia devido a aderência da raiz nervosa. Muitos trabalhos têm sido elaborados procurando relacionar a presença de extensas fibroses pós-operatórias com dor lombar persistente. Ainda que a fibrose epidural ocorra em graus variáveis, em resposta à manipulação do espaço, inúmeros pacientes não desenvolvem sintomas relacionados à formação da cicatriz.

Gill et al.¹⁶, estudando 107 cães submetidos a laminectomias, afirmam que o enxerto de gordura livre oferece melhor proteção na prevenção de cicatrizes peridurais que outros implantes, tais como: plástico, polietileno, esponja e filme de gel, mas acham que o enxerto pediculado de gordura fornece uma proteção mais completa. Em estudo feito com 32 cães, divididos em um grupo experimental (16) e outro

controle (16), submetidos a laminectomia L5 ou L6 com interposição de material biodegradável, esponja de ácido polilático (PLA), sacrificados em intervalo variando de 2 a 52 semanas, os autores concluem que a membrana de PLA é superior aos outros materiais utilizados, sendo completamente biocompatível e lentamente biodegradável¹⁷.

Em nosso ensaio, pudemos observar um comportamento semelhante ao obtido por Lee e Alexander em seu estudo¹⁷, sendo que a membrana liofilizada bovina também se mostrou totalmente biocompatível, porém foi totalmente absorvida em menor prazo de tempo, não estando presente em nenhuma peça do estudo.

Assim como no estudo de DiFazio et al.³, que utilizaram onze cadelas adultas da raça "cross-bred hounds" submetidas a laminectomias em múltiplos níveis para comparar enxerto de gordura, membrana elástica e de politetrafluoretileno expandido¹⁸⁻³³, com espaços sem implante e concluindo que a membrana de politetrafluoretileno expandido é biocompatível, mantendo sua integridade estrutural não permitindo crescimento fibroso por meio dela, sendo um material capaz de prevenir a fibrose epidural pós-laminectomia, também podemos deduzir em nosso estudo que a membrana liofilizada bovina apresenta comportamento semelhante com a vantagem de ser totalmente biorreabsorvível.

Em conclusão, a membrana liofilizada bovina foi totalmente absorvida em todas peças e demonstrou sua biocompatibilidade no ensaio cirúrgico. Permitiu a neoformação óssea sem aderências, sendo efetiva na prevenção da hérnia de tecido muscular para dentro do canal, porém não interferindo de forma significativa no processo de fibrose pós-operatória.

REFERÊNCIAS

1. Pospiech J, Kalff R, Pajonk F, Stolke D, Reinhardt V. The scar tissue protective effect of free autologous fatty tissue transplants: an animal experiment on spinal surgery. *Langenbecks Arch Chir* 1994;379:137-144.
2. Abitbol JJ, Lincoln TL, Lind BI, Amiel D, Akeson WH, Garfin SR. Preventing postlaminectomy adhesion: a new experimental model. *Spine* 1994;19:1809-1814.
3. DiFazio FA, Nichols JB, Pope MH, Frymoyer JW. The use of expanded polytetrafluoroethylene as an interpositional membrane after lumbar laminectomy. *Spine* 1995;20:986-991.
4. Ross JS, Robertson JT, Frederickson RC, et al. Association between peridural scar and recurrent radicular pain after lumbar discectomy: magnetic resonance evaluation. *Neurosurgery* 1996;38:855-861.
5. Petrie JL, Ross JS. Use of ADCON-L to inhibit postoperative peridural fibrosis and related symptoms following lumbar disc surgery: a preliminary report. *Eur Spine J* 1996;5(Suppl 1):S10-S17.
6. de Tribolet N, Porchet F, Lutz TW, et al. Clinical assessment of a novel antiadhesion barrier gel: prospective, randomized, multicenter, clinical trial of ADCON-L to inhibit postoperative peridural fibrosis and related symptoms after lumbar discectomy. *Am J Orthop* 1998;27:111-120.
7. BenDebba M, Augustus van Alphen H, Long DM. Association between peridural scar and activity-related pain after lumbar discectomy. *Neurol Res* 1999;21(Suppl 1):S37-S42.
8. Ross JS, Obuchowski N, Modic MT. MR evaluation of epidural fibrosis: proposed grading system with intra- and inter-observer variability. *Neurol Res* 1999;21(Suppl 1):S23-S26.
9. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty: an experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg* 1991;74:487-491.
10. Dahlin C. Scientific background of guided bone regeneration. In Buser D, Dahlin C, Schenk RK (eds). *Guided bone regeneration: in implant dentistry*. Chicago: Quintessence, 1994:31-48.
11. Matzen M, Kostopoulos L, Karring T. Healing of osseous submucous cleft palate with guided bone regeneration. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 1996;30:161-167.
12. Mooney MP, Mundell RD, Stetzer K, et al. The effects of guided tissue regeneration and fixation technique on osseous wound healing in rabbit zygomatic arch osteotomies. *J Craniofac Surg* 1996;7:46-53.
13. Aaboe M, Pinholt EM, Schou S, Hjorting-Hansen E. Incomplete bone regeneration of rabbit calvarial defects using different membranes. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:313-320.
14. Lekovic V, Klokkevold PR, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M, Weinlaender M. Histologic evaluation of guided tissue regeneration using 4 barrier membranes: a comparative furcation study in dogs. *J Periodontol* 1998;69:54-61.
15. Geisler FH. Prevention of peridural fibrosis: current methodologies. *Neurol Res* 1999;21(Suppl 1):S9-S22.
16. Gill GG, Sakovich L, Thompson E. Pedicle fat grafts for prevention of scar formation after laminectomy: an experimental study in dogs. *Spine* 1979;4:176-186.
17. Lee CK, Alexander H. Prevention of postlaminectomy scar formation. *Spine* 1984;9:305-312.
18. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:672-676.
19. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989;4:19-25.
20. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique: an experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1990;24:13-19.
21. Becker W, Becker BE, Handlesman M, et al. Bone formation at dehiscenced dental implant sites treated with implant augmentation material: a pilot study in dogs. *Int J Periodont Rest Dent* 1990;10:92-101.
22. Becker W, Becker BE, Handlesman M, Ochsenbein C, Albrektsson T. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets: a study in dogs. *J Periodontol* 1991;62:703-709.
23. Caudill RF, Meffert RM. Histologic analysis of the osseointegration of endosseous implants in simulated extraction sockets with and without e-PTFE barriers. *J Period Rest Dentistry* 1991;11:207-215.
24. Dahlin C. Osteopromotion: regeneration of bone by a membrane technique [Thesis]. Gothenburg, Sweden, 1993.
25. Melloning JT, Triplett RG. Guided tissue regeneration and endosseous dental implants. *J Period Rest Dent* 1993;13:109-111.
26. Fritz ME, Malmquist J, Koth D, et al. The use of guided bone regeneration to fill large mandibular defects in monkeys: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implant* 1994;9:644-652.
27. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:13-29.
28. Hammerle CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1995;53:167-174.
29. Pecora G, Kim S, Celletti R, Davarpanah M. The guided tissue regeneration principle in endodontic surgery: one-year postoperative results of large periapical lesions. *Int Endodontic J* 1995;28:41-46.
30. Piette E, Alberius P, Samman N, Linde A. Experience with e-PTFE membrane application to bone grafting of cleft maxilla. *Int J Maxillofac Surg* 1995;24:327-332.
31. Gordan M, Alberius P, Johnell O, Lindberg L, Linde A. Osteopromotive membranes enhance onlay integration and maintenance in the adult rat skull. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:67-73.
32. Ito K, Nanba K, Murai S. Effects of bioabsorbable and non-resorbable barrier membranes on bone augmentation in rabbit calvaria. *J Periodontol* 1998;69:1229-1237.
33. Kohal RJ, Mellas P, Horzeler MB, Trejo PM, Morrison E, Caffesse RG. The effects of guided bone regeneration and grafting on implants placed into immediate extraction sockets. An experimental study in dogs. *J Periodontol* 1998;69:927-937.