

POTENCIAL DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA NA ODONTOLOGIA

Alves PCS, Sant'Anna LB

Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911 – São José dos Campos, SP, Brasil, 12244-000.

E-mail: paulaalves.odontologia@gmail.com; lucianabsa@gmail.com

Resumo – A membrana amniótica (MA) humana tem sido utilizada como biomaterial para reconstruções cirúrgicas há quase 100 anos, e mais recentemente, para o tratamento de doenças inflamatórias e degenerativas, em diversas áreas incluindo dermatologia, cirurgia, e oftalmologia. Considerando o sucesso de sua aplicação nestas áreas e as propriedades pró-regenerativas da MA, acredita-se que ela tenha potencial terapêutico, também na odontologia. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi realizar uma revisão integrativa da literatura sobre, a estrutura e propriedades da membrana amniótica, formas de uso e suas aplicações terapêuticas na odontologia. Observou-se que graças às propriedades anti-inflamatória, antifibrótica, antimicrobiana, de reepitelização, biocompatibilidade, permeabilidade e flexibilidade, a MA, especificamente na forma intacta e criopreservada, tem sido utilizada em reconstruções periodontais, envolvendo defeitos de furca e recessões gengivais, em vestibuloplastias, e correção de defeitos da mucosa oral, causados por lesões pré-cancerígenas e recessões tumorais.

Palavras-chave: membrana amniótica, odontologia, propriedades, estrutura, preservação.

Área do Conhecimento: Odontologia

Introdução

Há muitos anos, a membrana amniótica (MA) vem sendo estudada e aplicada como tratamento medicinal alternativo. A primeira descrição sobre este material ocorreu em 1910, por Davis. Após três anos, utilizou-a em tratamentos de queimaduras químicas e térmicas na pele e, em 1940, em terapias da superfície ocular. Porém, o sucesso foi parcial. Assim, por quase 5 décadas seu uso foi esquecido, até que em 1995, Kim e Tseng começaram a ter sucesso no reparo de defeitos da córnea, conjuntiva e do limbo.

A membrana amniótica humana é a camada mais interna das membranas fetais que juntamente com a placenta é descartada após o parto. Durante a gestação, a função dessa membrana é absorver nutrientes, por meio da difusão, e reduzir as infecções, protegendo o feto e separando-o do tecido endometrial (PAROLINI et al., 2008), porém, após o parto, será descartada como resíduo de saúde, portanto, não apresentando demais funções para o desenvolvimento do feto.

Atualmente a membrana está emergindo como fonte de células e tecido para medicina regenerativa, área focada em estratégias de reparo, substituição ou regeneração de tecidos e órgãos, visando restaurar a função comprometida por traumas, defeitos congênitos, senescência, doenças inflamatórias e degenerativas (MASON; DUNNILL, 2008). Tem sido utilizada em diversas aplicações terapêuticas, incluindo fibrose (MANUELPILLAI et al., 2011), queimaduras e úlceras de pele (ULLAH et al., 2015), defeitos ósseos (STARECKI; SCHWARTZ; GRANDE, 2014), defeitos de córnea (DUA et al., 2004) e como *scaffold*, arcabouços, sintéticos ou naturais, desenvolvido para suportar e sustentar as células do hospedeiro durante a engenharia de tecidos, promovendo proliferação e diferenciação celular (NIKNEJAD et al., 2008).

Considerando as propriedades pró-regenerativas da MA e o sucesso da sua aplicação na dermatologia, oftalmologia e cirurgia geral, acredita-se que esta membrana tenha potencial terapêutico, também na odontologia. Assim, este trabalho tem o objetivo de realizar uma revisão integrativa da literatura sobre, a estrutura e propriedades da membrana amniótica, formas de uso e suas aplicações terapêuticas na Odontologia.

Metodologia

Os dados foram coletados, por meio de uma revisão integrativa da literatura, incluindo artigos do período 2004 a 2016 nas bases *Pubmed*, *Scielo* e *Google Scholar*, utilizando os descritores: *amniotic*

membrane, amniotic membrane properties, amniotic membrane structure, amniotic membrane in Odontology, amniotic membrane preservation.

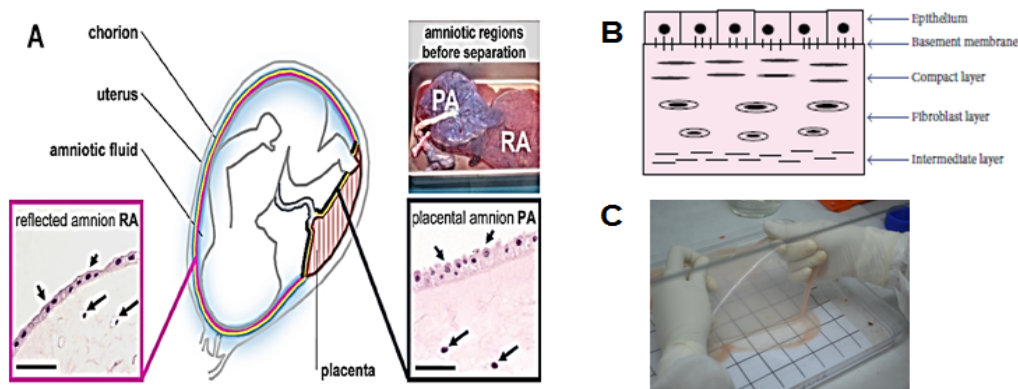
Resultados

As membranas placentárias se originam dos tecidos extraembrionários, e são compostas por um componente fetal e outro materno. Na porção fetal encontra-se a membrana amniótica e o córion, responsável por separar o feto do tecido do endométrio, e na porção maternal observa-se as partes decíduas (GUPTA; KEDIGE; JAIN, 2015). A estrutura da membrana amniótica consiste nas camadas epitelial, membrana basal e estroma avascular. A primeira camada é um epitélio simples cuboidal ou colunar disposto sobre uma espessa membrana basal, composta por colágenos dos tipos III, IV e V, assim como laminina e fibronectina. O estroma se divide em: camada compacta, camada fibroblástica, e esponjosa. A camada compacta, matriz adjacente à membrana basal, é densa, quase totalmente desprovida de células e consistindo principalmente em uma rede reticular complexa, composta por colágenos I, III e fibronectina. De acordo com Niknejad et al. (2008) a camada compacta forma o principal esqueleto fibroso da MA, sendo os colágenos tipo I e III predominantes na forma de feixes paralelos, os quais, mantêm a integridade mecânica da membrana. Na camada fibroblástica se encontram células mesenquimais, responsáveis pela secreção dos diferentes tipos de colágeno, e com potencial de células tronco pluripotentes (CHOPRA; THOMAS, 2013; PAROLINI et al., 2008). A última camada é conhecida como intermediária ou esponjosa constituída por colágeno do tipo III, proteoglicanas e glicoproteínas, sendo responsável pela aparência esponjosa nos preparados histológicos. Graças à branda junção com o córion, a camada esponjosa e consequentemente a MA, é facilmente separada do córion, por meio de dissecação (CHOPRA; THOMAS, 2013; GUPTA et al., 2015; NIKNEJAD et al., 2008) (Figura 1: B e C). Além disso, esse biomaterial apresenta grande reservatório de células mesenquimais com padrão pluripotente (CHOPRA; THOMAS, 2013) com capacidade de diferenciação de células maduras, incluindo, adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos, cardiomiócitos, hepatócitos, neurócitos e células endoteliais vasculares (KAR et al., 2014). Embora, a MA seja descrita como uma estrutura simples e contínua, anatomicamente é dividida em três regiões: amnion placentário (amnion sobre o disco coriônico), amnion refletido (amnion da membrana fetal extraplacentária) e amnion umbilical (amnion que reveste a superfície do cordão umbilical) (Figura 1: A). Esta divisão está relacionada com diferenças na morfologia da camada epitelial, na expressão gênica das células e mais recentemente diferenças na atividade funcional mitocondrial. Os autores especularam que estas diferenças podem estar relacionadas com diferentes potenciais na regeneração de diferentes tipos de tecidos, sendo assim crucial para aplicação clínica (BANERJEE et al., 2015).

Propriedades específicas e excelentes para engenharia de tecidos são encontradas na MA, sendo elas, a redução da inflamação e formação de cicatrizes, capacidade de proliferação e diferenciação celular, presença de fatores de crescimento, colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanas em sua matriz extracelular e melhorias na cicatrização (HSIAO et al., 2011). Além do mais, a MA apresenta transporte de água e materiais solúveis, produção de peptídeos bioativos e citocinas, promoção da epitelização, inibidor de angiogênese, propriedades antimicrobiana e antiviral, redução da dor, aumento da deposição de matriz extracelular e da vascularização e revascularização (GUPTA et al., 2014), baixa imunogenicidade, o que faz com que ela não seja rejeitada, quando transplantada, demonstrando sua biocompatibilidade (SILINI et al., 2013; CHOPRA; THOMAS, 2013). Para mais, a MA apresenta propriedades mecânicas, como: permeabilidade, estabilidade, flexibilidade, plasticidade (CHOPRA; THOMAS, 2013), resistência e elasticidade (GUPTA et al., 2014).

Na odontologia, as aplicações terapêuticas da MA estão ligadas principalmente com as áreas que necessitam de maior reparação tecidual como, a periodontia e a cirurgia oral. Estudos mostram a importância e a eficácia do transplante da MA para determinadas injúrias. Segundo Shetty, Chatterjee e Bose (2014), regenerações periodontais envolvendo recessão gengival Classe I de Miller, em região de pré-molares, apresentaram sucesso após o transplante da MA intacta e contato direto com a raiz desnuda dos dentes em questão.

Figura 1: (A) Esquema ilustrativo da estrutura da placenta; (B) Ilustração sobre as camadas da MA; (C) Ilustração da MA



Fonte: A) Banerjee et al. (2015); B) Gupta et al. (2015); C) Sant'Anna et al. (2011).

Já, em defeitos ósseos periodontais, incluindo lesões de furca e defeitos intra-ósseos de duas paredes, é comumente utilizado a MA na forma desnuda e criopreservada (WU et al., 2016) e em defeitos após a ressecção tumoral, na forma intacta e criopreservada, justaposta sobre o defeito (KHADEMI et al., 2013). Na vestibuloplastia, de acordo com Kothari et al. (2012) e Keerthi, Vaibhav e Raut (2015), a MA pode ser utilizada como *scaffold*, após o ato cirúrgico, uma vez que, esse material é citado para prevenção da contração secundária no pós-operatório, preservando a conformação do vestibulo e mantendo a ferida saudável com baixo índice bacteriano, diminuindo a perda de proteínas, eletrólitos, fluidos e energia, reduzindo risco de infecções, evitando curativos volumosos, minimizando a dor e acelerando a regeneração, a ponto de diminuir o período crítico pós-cirúrgico. Além disso, bons resultados são alcançados, quando se utiliza a MA desnuda, como *scaffold*, resfriada (4°C) por 24 horas.

Estudos em ratos demonstram, segundo Lima et al. (2015), que em casos de mucosites, a MA intacta e criopreservada associado à pomada orabase em contato direto com o leito proporciona um excelente tratamento. Nesse estudo, de 3 a 21 dias observou-se quatro fases principais: inflamação, proliferação celular, organização do tecido e reparação tecidual. Isso foi possível devido à proteção que a MA ofereceu à injúria, mantendo a arquitetura do leito livre de toxinas. A fístula oronasal é uma complicação na formação e união dos processos palatinos. Kesting et al. (2010) utilizaram MA na forma intacta e criopreservada para tratar fístula oronasal em 6 porcos machos de seis meses de idade. Para isto foi interposto diversas camadas da MA entre a mucosa oral e nasal, atravessando a fístula palatina, e posteriormente foram suturadas na mucosa palatina. Como resultado, todos os porcos apresentaram melhora no quadro, onde após 40 dias restou de 0 a 6 mm de diâmetro da fístula. Para a morfogênese das glândulas salivares, a aplicabilidade da MA como *scaffold* apresentou resultados significativos. Hsiao et al. (2011) utilizou MA na forma desnuda e desidratada, como *scaffold* para o cultivo de células da glândula submandibular de murinos, verificando o estímulo a diferenciação de células maduras glandulares e organização da glândula salivar. Um item essencial no uso da MA na odontologia é a fácil e completa adaptação que o material proporciona sobre o leito, ao passo que, facilita o tratamento, diminuindo o tempo cirúrgico. Isso ocorre, devido a sua espessura fina (CHOPRA; THOMAS, 2013).

Discussão

Embora a membrana amniótica já seja utilizada como biomaterial em cirurgia geral, por um longo período de tempo, o primeiro relato na área odontológica data de 1985, onde ela foi usada como *scaffold*, após remoção de lesões da mucosa intraoral. E em 1995, foi aplicada em tratamentos de fibrose da submucosa. Desde então, a MA vem sendo analisada, testada e utilizada em diversas áreas terapêuticas (revisado em GUPTA et al., 2015), mas principalmente em cirurgias orais e periodontais (CHOPRA; THOMAS, 2013). Nos últimos anos, a MA ganhou uma importância especial devido a apresentar propriedades biológicas importantes para estimular a regeneração tecidual, incluindo antiinflamatórias, antifibróticas, de reepitelização, antiangiogênica, antihemorrágica e baixa imunogenicidade a qual é devida a baixa expressão de antígenos MHC classe I e ausência de MHC

classe II (TODA et al., 2007). Também apresentam propriedades mecânicas razoáveis, incluindo permeabilidade, flexibilidade, elasticidade, estabilidade, e taxa de reabsorção compatível com a formação do tecido, permitindo o uso como *scaffold* na engenharia dos tecidos (CHOPRA; THOMAS, 2013). Estudos recentes têm demonstrado o mecanismo mais aceito da ação da MA na terapia regenerativa, é a difusão dos fatores solúveis produzidos pelas células e que ficam armazenados no estroma da membrana (SILINI et al., 2013). Os fatores solúveis estão relacionados com as funções anti-inflamatórias, antifibróticas e estimuladores de proliferação do tecido, como as citocinas IL10 e TGFbeta, Prostaglandina E2, VEGF, HGF metaloproteinasas e seus inibidores (MMPs e TIMPs), os quais regulam a deposição e degradação de matriz extracelular, e o ácido hialurônico (SILINI et al., 2013; KOPACZKA et al., 2016). Outros são insolúveis, e estão mais relacionados à função de migração, adesão e suporte estrutural para as células (Colágenos I, III, V, VI, proteoglicanas, fibronectina e laminina). A topografia da membrana é outro item importante no seu desempenho, uma vez que, estudos como o de Hsiao et al. (2011), comprovam que a porção do estroma promove maior adesão celular comparada à camada epitelial. Com isso, pode-se dizer que, de acordo, com a camada da MA exposta sobre o tecido a se regenerar, tem-se diferentes respostas celulares, interligando a este fato, as propriedades mecânicas e biológicas, que também apresentarão diferentes tipos de estímulos e respostas frente a diferentes tipos de tecido.

Apesar dos benefícios da MA, ela é um material biológico de origem humana, e consequentemente um possível veículo de doenças infecto-contagiosas. Assim, todo o processo, desde a seleção da doadora até o armazenamento e preservação da membrana, deve seguir a normatização das agências federais (HILL, 2008). Para reduzir ao grau mínimo o risco de transmissão de doenças, é rotineiramente realizada a triagem das doadoras seguindo-se protocolos internacionalmente reconhecidos, incluindo a colheita de placenta apenas por parto cesárea, a investigação de fatores de risco, determinados por meio do histórico médico-social, e a realização de testes sorológicos que afastem o risco de HIV, hepatites B e C, HTLV, sífilis (DUA et al., 2004; PAROLINI et al., 2008) e, no Brasil, doença de Chagas. Mesmo os testes sorológicos sendo negativos, ainda existe a possibilidade de a doadora estar na “janela” imunológica de infecção. Assim, estes testes deverão ser repetidos após 6 meses do parto (RIAU et al., 2010).

Outro importante aspecto a ser considerado antes da aplicação clínica da MA é a forma de uso e um bom método processamento, esterilização e armazenamento, que garanta a qualidade e preservação das propriedades da MA. Esta membrana pode utilizada na forma intacta (com epitélio amniótico) ou na forma desnuda (sem epitélio amniótico). Na forma desnuda, a camada epitelial é removida, mantendo-se os componentes estruturais, como a membrana basal intacta. Já a forma intacta, apresenta níveis mais elevados dos fatores de crescimento EGF, KGF, HGF e FGF beta, quando comparada à forma desnuda, uma vez que, com a remoção da camada epitelial, quase todos os fatores de crescimento são eliminados (BRANSKI et al., 2007; NIKNEJAD et al., 2008; CHOPRA; THOMAS, 2013). Os métodos de preservação existentes incluem: MA fresca, hipotermicamente preservada (4°C), liofilização, vitrificação, criopreservação (-80°C), desidratada, estabilizada, desidratada resfriada e irradiada (GUPTA et al., 2015). Cada um destes métodos induzem diferentes efeitos sobre a viabilidade celular e integridade estrutural da membrana, assim como a função (HENNERBICHLER et al., 2007; RIAU et al., 2010). Segundo Adds, Hunt e Dart (2001), quando a MA é destinada à aplicação clínica frequentemente se usa a criopreservação, ao invés da MA fresca, uma vez que, aquela permite o armazenamento por longos períodos antes da sua utilização, possibilitando repetir os testes sorológicos, ditos anteriormente com o intuito de eliminar janelas de risco biológico evitando, assim a contaminação do receptor pela membrana. Na odontologia, as formas de preservação mais utilizadas na clínica são as membranas desidratadas e criopreservadas. Embora estas formas apresentem um custo maior, quando comparado às outras formas de preservação, a MA criopreservada é um biomaterial de custo mais acessível em relação às outras alternativas de tratamento (GUPTA et al., 2015). Adicionalmente, a MA tem a vantagem de ser um material descartado, de fácil obtenção, disponível em grande quantidade, se considerado a área da MA (área de 1600 cm²) e a quantidade de partos, e sua coleta não requer procedimentos invasivos, como é o caso da remoção de células tronco da medula óssea, além de não provocar conflitos éticos ou religiosos como ocorre com o uso das células embrionárias (TODA et al., 2007; HENNERBICHLER et al., 2007; NIKNEJAD et al., 2008). Por outro lado, segundo Gupta et al. (2015) existem algumas limitações na utilização da MA, tais como, a falta de experiência no manuseio da membrana, a possibilidade de transmissão de infecção no manuseio, a fragilidade, a falta de conhecimento técnico cirúrgico e da biologia dos tecidos orais e periodontais (GUPTA et al., 2015). Entretanto, essas limitações podem ser superadas pelo treinamento do processamento, manuseio e técnica cirúrgica

para sua transplantação, assim como, a observância dos critérios rigorosos durante todas as etapas, incluindo a seleção das doadoras, o processamento da MA, sua preservação, armazenagem e esterilização (DUA et al., 2004).

Conclusão

A ação da MA e seus fatores na regeneração tecidual é profundamente influenciada pelo microambiente onde ela se encontra. Essa ação varia de acordo com a área do organismo para a qual a MA é transplantada e o tipo de lesão que se deseja reparar, incluindo o tipo celular e o tipo de tecido que ficará em contato com a MA. Quanto às regiões anatômicas da MA (PA e RA), ainda não se conhece o verdadeiro potencial dessas diferentes regiões na regeneração tecidual. Com relação às formas de preservação e armazenamento da MA, na área odontológica, as mais utilizadas são as criopreservadas e as desidratadas.

As propriedades biológicas e mecânicas que consagraram o uso da MA em áreas como a oftalmologia e cirurgia geral, estão sendo agora estudadas mais profundamente, e fazendo com que a MA, especificamente na forma criopreservada, possa exercer seu potencial, também na área da odontologia, em procedimentos que envolvam a estimulação do reparo dos tecidos periodontais, como os defeitos de furca, intra-ósseos, recessões gengivais, reepitelização de mucosa oral, mucosites, assim como o reparo das estruturas oro-maxilofaciais. Destes usos clínicos, a membrana apresenta alto potencial para regeneração da mucosa oral, dado que, a mesma apresenta grande quantidade de colágeno e estrutura muito semelhante à gengiva.

Referências

ADDS, P. J.; HUNT, C. J.; DART, J. K. Amniotic membrane grafts, fresh or frozen? A clinical and in vitro comparison. **British journal of ophthalmology**, v. 85, n. 8, p. 905-907, 2001.

BANERJEE, A. et al. Different metabolic activity in placental and reflected regions of the human amniotic membrane. **Placenta**, v. 36, n. 11, p. 1329-1332, 2015.

BRANSKI, L. et al. P270: Amniotic membrane as wound coverage: the effects of irradiation and different processing methods on growth factor content. **Journal of surgical research**, v. 137, n. 2, p. 339, 2007.

CHOPRA, A.; THOMAS, B. S. Amniotic membrane: a novel material for regeneration and repair. **Journal of biomimetics, biomaterials & tissue engineering**, v. 18, n. 106, p. 2, 2013.

LIMA, G. MG. et al. Amniotic membrane as a biological dressing for 5-fluoruracil-induced oral mucositis in rats. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 44, n. 7, p. 845-851, 2015.

DUA, H. S. et al. The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey of ophthalmology**, v. 49, n. 1, p. 51-77, 2004.

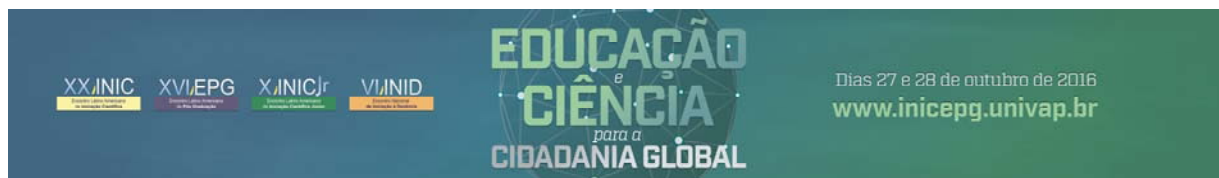
GUPTA, A.; KEDIGE, S. D.; JAIN, K. Amnion and chorion membranes: potential stem cell reservoir with wide applications in periodontics. **International journal of biomaterials**, v. 2015, 2015.

GUPTA, I. et al. Placental tissues: fixing smiles. **International journal of innovation and scientific research**, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2014.

HENNERBICHLER, S. et al. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. **Cell and tissue banking**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007.

HILL, S. J. Placental amniotic membrane: the pathway to ocular transplantation. **Association of perioperative registered nurses journal**, v. 88, n. 5, p. 731-746, 2008.

HSIAO, Y. C. et al. The impact of compositional topography of amniotic membrane scaffold on tissue morphogenesis of salivary gland. **Biomaterials**, v. 32, n. 19, p. 4424-4432, 2011.



KAR, I. et al. Repair of oral mucosal defects with cryopreserved human amniotic membrane grafts: prospective clinical study. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 43, n. 11, p. 1339-1344, 2014.

KEERTHI, R.; VAIBHAV, N.; RAUT, R. Amniotic membrane as a biological scaffold after vestibuloplasty. **Journal of maxillofacial and oral surgery**, v. 14, n. 1, p. 383-387, 2015.

KESTING, M. R. et al. Repair of oronasal fistulas with human amniotic membrane in minipigs. **British journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 48, n. 2, p. 131-135, 2010.

KHADEMI, B. et al. Clinical application of amniotic membrane as a biologic dressing in oral cavity and pharyngeal defects after tumor resection. **Archives of Iranian medicine**, v. 16, n. 9, p. 503, 2013.

KOPACZKA, K. et al. The relationship between amniotic epithelial cells and their microenvironment. **Journal of applied biomedicine**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2016.

KOTHARI, C. R. et al. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: a clinical study. **British journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 50, n. 6, p. 545-549, 2012.

MANUELPIILLAI, U. et al. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis?. **Placenta**, v. 32, p. S320-S325, 2011.

MASON, C.; DUNNILL, P. A brief definition of regenerative medicine. **Regenerative medicine**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2008.

NIKNEJAD, H. et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur cells mater**, v. 15, p. 88-99, 2008.

PAROLINI, O. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

RIAU, A. K. et al. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 216-225, 2010.

SANT'ANNA, L. B. et al. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. **Cell transplantation**, v. 20, n. 3, p. 441-453, 2011.

SHETTY, S. S.; CHATTERJEE, A.; BOSE, S. Bilateral multiple recession coverage with platelet-rich fibrin in comparison with amniotic membrane. **Journal of Indian society of periodontology**, v. 18, n. 1, p. 102, 2014.

SILINI, A. et al. Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies. **Current stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2013.

STARECKI, M.; SCHWARTZ, J. A.; GRANDE, D. A. Evaluation of amniotic-derived membrane biomaterial as an adjunct for repair of critical sized bone defects. **Advances in orthopedic surgery**, v. 2014, 2014.

TODA, A. et al. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **Journal of pharmacological sciences**, v. 105, n. 3, p. 215-228, 2007.

ULLAH, M. S. et al. Amnion membrane graft dressing in superficial partial thickness burn in pediatric patients. **Chattagram Maa-O-Shishu hospital medical college journal**, v. 14, n. 1, p. 22-25, 2015.

WU, P. H. et al. Amniotic membrane and adipose-derived stem cell co-culture system enhances bone regeneration in a rat periodontal defect model. **Journal of the formosan medical association**, v. 115, n. 3, p. 186-194, 2016.