

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/11/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

PAULO MATHEUS HONDA TAVARES

**Osteopromoção com uso de membranas de látex
incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas
micrométrica e nanométrica em defeitos críticos em
calvária de coelhos**

**Araçatuba
2023**

PAULO MATHEUS HONDA TAVARES

**Osteopromoção com uso de membranas de látex
incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas
micrométrica e nanométrica em defeitos críticos em
calvária de coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de concentração de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Associado Francisley Ávila Souza

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T231o Tavares, Paulo Matheus Honda.
Osteopromoção com uso de membranas de látex incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas micrométrica e nanométrica em defeitos críticos em calvária de coelhos / Paulo Matheus Honda Tavares. - Araçatuba, 2023
48 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza

1. Regeneração óssea 2. Materiais biocompatíveis
3. Hevea 4. Membranas 5. Látex I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas; e a meus pais, Luiz Carlos Tavares e Marlene Nunes Honda Tavares, obrigado por todo amor, carinho e suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por todas as oportunidades que tive até hoje, pelas bênçãos concedidas, pela Graça, pelos livramentos, por guiar-me pelos caminhos do amor e da verdade, por ser meu porto seguro, por segurar em minha mão e por ser fiel. Obrigado meu Deus, pois declaradamente, sei que tudo o que faço, tudo que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser, vem de Ti e é graças a Ti, Senhor.

A minha mãe, Marlene Nunes Honda Tavares, meu maior presente nessa terra. Que privilégio em te ter como mãe. Minha referência, meu Norte, meu porto seguro em forma de pessoa, minha conselheira, minha intercessora e meu alicerce. Minha conquista, é sua conquista.

Ao meu pai, Luiz Carlos Tavares obrigado por todo apoio, amor, incentivo, atenção e confiança que depositou durante esses anos, por investir e acreditar sempre em mim.

As minhas irmãs, Letícia Honda Tavares e Heloisa Batista Tavares por todo amor, carinho e suporte.

A meu orientador, professor Prof. Francisley Ávila Souza, pelos ensinamentos, pela orientação, pelo auxílio, pelas instruções, pela confiança em mim depositada, pelo suporte, pela empatia e por toda ajuda durante esta etapa.

Aos meus amigos, Kim Henderson e Tiburtino, que me receberam de braços abertos em Araçatuba, e desde o início foram solícitos e parceiros, instruíram-me, abriram portas, proporcionaram boas oportunidades e me agraciaram com sua amizade.

Ao meu Grupo de Pesquisa que me ajudou do início ao fim da pesquisa, sem vocês essa pesquisa não seria possível: Maria Eduarda, Maísa, Laís Kawamata, Ana Flávia, Harrison, Nelson, Henrique Haddad e aos alunos da Iniciação Científica: Letícia Gabriella, Luís Fernando, Kézia Mendes, Lilian Maria Paulino e Julia Pietro Bão.

Aos amigos que fiz na Pós e que sempre me ajudaram durante toda essa etapa: Natália Sanchez, Izabella Sol, Luana, Carol, João Matheus, Ana Maira, Stéfani Ferriolli, Anderson Maikon, Diones e Mateus Pavelski.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e seus representantes, senhor diretor Prof. Tit. Glauco

Issamu Miyahara, do senhor vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do Prof. Tit. Wirley Gonçalves Assunção, como coordenador do programa de pós-graduação em Odontologia. Por tornarem possível toda a pesquisa e o meu desenvolvimento no mestrado, por toda a infraestrutura e todos os recursos necessários que me permitiram uma ótima pós-graduação.

Ao meu orientador, Francisley Ávila Souza como Docente e a todos os professores da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), que contribuíram para minha formação:

Prof.^a Ana Paula Farnezi Bassi, obrigado pela disponibilidade, paciência e por todos os ensinamentos acadêmicos, clínicos e hospitalares.

Prof. Leonardo Perez Faverani, obrigado pela amizade, por ser sempre solícito, por toda ajuda e por todo conhecimento transmitido.

Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior, obrigado por todas oportunidades e ensinamentos.

Prof. Osvaldo Magro Filho, obrigado por todas as oportunidades e ensinamentos durante as cirurgias.

Prof. André Fabris, Prof.^a Alessandra Marcondes Aranega, Prof.^a Daniela Ponzoni e Prof.^a Roberta Okamoto, obrigado pelas oportunidades e convivência.

Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – FOA/UNESP e aos servidores Marco Aurélio de Oliveira Ianner e Paulo Roberto Gratão, Renato Gomes de Oliveira, por todo suporte e instrução para a realização dessa pesquisa.

Ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, e ao meu grande parceiro e funcionário, João Batista, responsável pelo suporte e apoio no desenvolvimento dessa pesquisa.

As demais sessões da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Biblioteca, Pós-Graduação, Esterilização, Limpeza entre outras, e seus servidores que sempre prestaram um atendimento importante.

“Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá o seu fruto no seu tempo; as suas folhas não cairão, e tudo quanto fizer prosperará.”

Salmos 1:3

TAVARES, P. M. H. **Osteopromoção com uso de membranas de látex incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas micrométrica e nanométrica em defeitos críticos em calvária de coelhos**. 2023. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A incorporação de beta-tricálcio fosfato (β -TCP) à membrana de látex representa um avanço no desenvolvimento de biomateriais que podem ser empregados na regeneração óssea guiada. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos tratados com membrana de látex e membrana de látex incorporada com β -TCP nas escalas micrométricas e nanométricas. Foram utilizados trinta e seis coelhos (*Nova Zelândia*) e criou-se 4 defeitos críticos de 8 mm de diâmetro na calvária de cada animal que foram separados em 4 grupos de acordo com a terapêutica empregada: coágulo sanguíneo (GC), membrana de látex (ML), membrana de látex + β -TCP micropartículas (ML+Micro), membrana de látex + β -TCP nanopartículas (ML+Nano). A eutanásia ocorreu em 2, 4 e 8 semanas pós-cirurgia. No estudo dos tecidos mineralizados, realizou-se análise microtomográfica e histométrica, e nos tecidos desmineralizados, realizou-se análise histológica qualitativa e quantitativa. Na análise microtomográfica, a porcentagem de volume ósseo (BV/TV) em 4 semanas foi maior para ML+micro (7,02%) e ML+nano (5,77%) em comparação a GC (2,83%) ($p < 0,001$; $p = 0,018$) e ML (4,29%) ($p = 0,032$), e em 8 semanas, GC (2,25%) apresentou menor valor de BV/TV quando comparado a ML, ML+micro e ML+nano (6,68, 6,79, 7,01%) ($p < 0,001$). Nos tecidos desmineralizados, o Grupo ML+Nano evidenciou maior percentual de área de osso neoformado nos 3 períodos de avaliação (14,8%) (15,5%) (21,8%), com diferença estatística entre ML+Nano ($14,8 \pm 5,64$) e GC ($4,3 \pm 1,36$) ($p=0,002$), ML+Nano ($14,8 \pm 5,64$) e ML ($6,8 \pm 3,59$) ($p=0,029$) em 2 semanas, ML+Nano ($15,5 \pm 4,79$) e GC ($8,1 \pm 2,08$) ($p=0,049$) em 4 semanas, e ML+Nano ($21,8 \pm 5,89$) e ML+Micro ($14,2 \pm 2,44$) ($p=0,044$) em 8 semanas. A incorporação de β -TCP nas escalas micro e nanométrica às membranas de látex proporcionou maiores níveis de neoformação óssea na periferia dos defeitos.

Palavras-chave: Regeneração Óssea. Materiais Biocompatíveis. Hevea. Membranas. Látex.

TAVARES, P. M. H. **Osteopromotion using latex membranes incorporated with beta-tricalcium phosphate at micrometric and nanometric scales in critical defects in rabbit calvaria.** 2023. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The incorporation of beta-tricalcium phosphate (β -TCP) to the latex membrane represents an advance in the development of biomaterials that can be used in guided bone regeneration. The aim of this study was to evaluate the bone repair process in critical defects treated with latex membrane and latex membrane incorporated with β -TCP in the micrometric and nanometric scales. Thirty-six rabbits (New Zealand) were used and 4 critical defects of 8 mm in diameter were created in the calvaria of each animal and separated into 4 groups according to the therapy used: blood clot (GC), latex membrane (ML), latex membrane + β -TCP microparticles (ML+Micro), latex membrane + β -TCP nanoparticles (ML+Nano). Euthanasia occurred at 2, 4, and 8 weeks post-surgery. In the study of mineralized tissues, a microtomographic and histometric analysis was performed, and in the demineralized tissues, a qualitative and quantitative histological analysis was performed. In the microtomographic analysis, the percentage of bone volume (BV/TV) at 4 weeks was higher for ML+micro (7.02%) and ML+nano (5.77%) compared to GC (2.83%) ($p < 0.001$; $p = 0.018$) and ML (4.29%) ($p = 0.032$), and at 8 weeks, GC (2.25%) had a lower BV/TV value when compared to ML, ML+micro and ML+ nano (6.68, 6.79, 7.01%) ($p < 0.001$). In demineralized tissues, the ML+Nano Group showed a higher percentage of neoformed bone area in the 3 evaluation periods (14.8%) (15.5%) (21.8%), with a statistical difference between ML+Nano (14.8 ± 5.64) and GC (4.3 ± 1.36) ($p=0.002$), ML+Nano (14.8 ± 5.64) and ML (6.8 ± 3.59) ($p= 0.029$) at 2 weeks, ML+Nano (15.5 ± 4.79) and GC (8.1 ± 2.08) ($p=0.049$) at 4 weeks, and ML+Nano (21.8 ± 5.89) and ML+Micro (14.2 ± 2.44) ($p=0.044$) at 8 weeks. The incorporation of β -TCP in the micro and nanometric scales to the latex membranes provided higher levels of bone neoformation in the periphery of the defects.

Keywords: Bone Regeneration. Biocompatible Materials. Hevea. Membranes. Latex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da síntese para a obtenção do fosfato de cálcio	24
Figura 2 - Fluxograma da confecção das membranas de LN e incorporação do β -TCP	25
Figura 3 - Cirurgia Experimental. A: Aspecto inicial pré-cirúrgico. B: Dergemação com Iodopovidona. C: Anestesia local infiltrativa para hemostasia local. D: Incisão dermoperiosteal de espessura. E: Descolamento e exposição da área cirúrgica. F: Calvária. G: Confecção dos defeitos cirúrgicos com broca trefina de 8mm. H: Aspecto clínico dos defeitos. I: Defeitos e seus respectivos tratamentos executados. J: Sutura e aspecto final.	28
Figura 4 - Seleção do volume de interesse (VOI) pelo software DataViewer. ..	29
Figura 5 - No software CTan, após seleção do número de cortes padronizados (101), a região de interesse foi delimitada com a ferramenta Round.	30
Figura 6 - No software CTan, o thresholds foi padronizado com intervalo de 40-180, para posterior análise tridimensional e quantificação do osso neoformado	31
Figura 7 - Preparação das peças e Montagem das lâminas com as amostras para análise de tecidos calcificados. A: Montagem da base em resina fotopolimerizável, B: posicionamento no recipiente para inclusão em resina TechnoVit ®; C: Resina após polimerização com as peças incluídas, D e E: Individualização das amostras e montagem em lâmina para corte na serra do sistema Exakt.	32
Figura 8 – F: Lâminas montadas para corte na região central do defeito utilizando a serra do Exakt. G: Prensa adesiva à vácuo (sanduicheira) em funcionamento para preparação da lâmina de estudo. H: Serra do sistema Exakt em funcionamento. I: Checagem da espessura das amostras após desgaste e polimento no sistema Exakt.	33
Figura 9 - Delimitação da área total a ser analisada usando a ferramenta de polígono no software ImageJ.	35
Figura 10 - Área representativa da contagem da área óssea presente na área de um coto ósseo.	35
Figura 11 - MEV das membranas evidenciando a efetividade da incorporação do β -TCP a membrana (escala nanométrica). A: aumento de 2.000x (escala de	

10µm); B: aumento de 10.000x (escala de 1µm); C: aumento de 50.000x (escala de 100nm); D: Espectro de EDS da membrana incorporada com β-TCP.....	36
Figura 12 – Aspecto em secção sagital da Membrana de Látex com incorporação de β-TCP na escala nanométrica. A: aumento de 100x, evidenciando espessura da membrana de 381µm; B e C: aumento de 50.000x evidenciando deposição de β-TCP por toda espessura da membrana; D: Espectro de EDS da membrana incorporada com β-TCP.....	37
Figura 13 - MEV da membrana com incorporação de β-TCP na escala micrométrica, evidenciando a presença do biomaterial as membranas. A: aumento de 2.000x (escala 10µm); B: aumento de 10.000x (escala de 1µm); C: aumento de 50.000x (escala de 100nm); D: Espectro de EDS da membrana incorporada com β-TCP.....	38
Figura 14 – Aspecto em secção sagital da membrana - MEV das membranas evidenciando a presença da incorporação do biomaterial na secção transversal das membranas (Micro). A: aumento de 150x, espessura da membrana de 442 µm; B: aumento de 25.000x (escala de 1µm), evidenciando a partícula do biomaterial; C: aumento de 50.000x (escala de 100 nm); D: Espectro de EDS da membrana incorporada com β-TCP.....	39
Figura 15 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro BV na análise por MicroCT. (*) representa que houve diferença estatística entre os grupos.....	40
Figura 16 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas na microCT no parâmetro de Percentual de Volume Ósseo. Quando presentes, as diferenças estatísticas intergrupos estão representadas por *.	41
Figura 17 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas na microCT no parâmetro de Espessura Trabecular (Tb.Th).	42
Figura 18 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas na microCT no parâmetro de Separação Trabecular (Tb.Sp).....	42
Figura 19 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas na microCT no parâmetro de Número de Trabéculas (Tb.N). Quando presentes, as diferenças estatísticas intergrupos estão representadas por *.	43
Figura 20 - Ao centro: Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo dos grupos GC nos 3 períodos de eutanásia (2,	

4 e 8 semanas) em aumentativa de 4x. coradas em azul de Stevenel e Alizarina. Escala 5 µm. Foi evidenciado nas laterais, as fotomicrografias representativas dos cotos de acordo com cada grupo, no aumento de 4x + magnificação da câmera acoplada ao microscópio. (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado).....	44
Figura 21 - Ao centro: Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo dos grupos ML nos 3 períodos de eutanásia (2, 4 e 8 semanas) em aumentativa de 4x. coradas em azul de Stevenel e Alizarina. Escala 5 µm. Foi evidenciado nas laterais, as fotomicrografias representativas dos cotos de acordo com cada grupo, no aumento de 4x + magnificação da câmera acoplada ao microscópio. (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado).....	45
Figura 22 - Ao centro: Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo dos grupos ML+Micro nos 3 períodos de eutanásia (2, 4 e 8 semanas) em aumentativa de 4x. coradas em azul de Stevenel e Alizarina. Escala 5 µm. Foi evidenciado nas laterais, as fotomicrografias representativas dos cotos de acordo com cada grupo, no aumento de 4x + magnificação da câmera acoplada ao microscópio. (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado).....	46
Figura 23 - Ao centro: Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo dos grupos ML+Nano nos 3 períodos de eutanásia (2, 4 e 8 semanas) em aumentativa de 4x. coradas em azul de Stevenel e Alizarina. Escala 5 µm. Foi evidenciado nas laterais, as fotomicrografias representativas dos cotos de acordo com cada grupo, no aumento de 4x + magnificação da câmera acoplada ao microscópio. (azul – tecido conjuntivo; rosa – tecido mineralizado).....	47
Figura 24 - Gráfico comparativo dos valores encontrados na análise do osso neoformado nos tempos de 2, 4 e 8 semanas nos grupos GC, ML, ML+Micro e ML+Nano.	48
Figura 25 - Gráfico comparativo dos valores encontrados na análise do Tecido Conjuntivo nos tempos de 2, 4 e 8 semanas nos grupos GC, ML, ML+Micro e ML+Nano.	49

Figura 26 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo do grupo GC nos tempos de análise de 14d (2 semanas), 28d (4 semanas) e 56d (8 semanas) em aumentativa de 25x e coloração de Hematoxilina e Eosina.	50
Figura 27 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo do grupo ML nos tempos de análise de 14d (2 semanas), 28d (4 semanas) e 56d (8 semanas) em aumentativa de 25x e coloração de Hematoxilina e Eosina.	51
Figura 28 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo do grupo ML+Micro nos tempos de análise de 14d (2 semanas), 28d (4 semanas) e 56d (8 semanas) em aumentativa de 25x e coloração de Hematoxilina e Eosina.....	52
Figura 29 - Reconstruções panorâmicas das fotomicrografias mostrando processo de reparo do grupo ML+Nano nos tempos de análise de 14d (2 semanas), 28d (4 semanas) e 56d (8 semanas) em aumentativa de 25x e coloração de Hematoxilina e Eosina.....	53
Figura 30 - Gráfico comparativo dos valores encontrados na análise de osso neoformado nos tempos de 2, 4 e 8 semanas nos grupos GC, ML, ML+Micro e ML+Nano.	54
Figura 31 - Gráfico demonstrativo da média dos valores aferidos de tecido conjuntivo presente nos defeitos nos tempos de 2, 4 e 8 semanas nos grupos GC, ML, ML+Micro e ML+Nano.	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 (Figura 15) - Parâmetro BV	40
Gráfico 2 (Figura 16) - Parâmetro BV/TV	41
Gráfico 3 (Figura 17) - Parâmetro Tb.Th	42
Gráfico 4 (Figura 18) - Parâmetro Tb.Sp	42
Gráfico 5 (Figura 19) - Parâmetro Tb.N	43
Gráfico 6 (Figura 24) - Gráfico dos valores da Área de Osso Neoformado nos tecidos mineralizados	48
Gráfico 7 (Figura 25) - Gráfico dos valores de Tecido Conjuntivo nos tecidos mineralizados	49
Gráfico 8 (Figura 30) - Gráfico dos valores da Área de Osso Neoformado nos tecidos desmineralizados	54
Gráfico 9 (Figura 31) - Gráfico dos valores de Tecido Conjuntivo nos tecidos desmineralizados	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Figura 15) - Parâmetro BV - Média e Desvio Padrão	40
Tabela 2 (Figura 16) - Parâmetro BV/TV - Média e Desvio Padrão	41
Tabela 3 (Figura 17) - Parâmetro Tb.Th - Média e Desvio Padrão	42
Tabela 4 (Figura 18) - Parâmetro Tb.Sp - Média e Desvio Padrão	42
Tabela 5 (Figura 19) - Parâmetro Tb.N - Média e Desvio Padrão	43

LISTA DE SIGLAS

BV	Volume Ósseo
BV.TV	Percentual de Volume Ósseo
CaP	Fosfato de Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EDS	Energia Dispersiva de Raios X
GC	Coágulo Sanguíneo
LN	Látex Natural
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg/Kg	Miligrama por quilo
Mg/kg/dia	Miligrama kilo dia
MicroCt	Microtomografia Computadorizada
ML	Membrana Látex
ML+Micro	Membrana de látex + β -TCP micropartículas
ML+Nano	Membrana de látex + β -TCP nanopartículas
SBF	Solução de Fluido Corpóreo
ROG	Regeneração Óssea Guiada
ROI	Região de Interesse
Tb.N	Número de Trabéculas
Tb.sp	Separação Trabecular
Tb.Th	Espessura Trabecular
β -TCP	Beta-tricálcio fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Obtenção das Membranas Experimentais	23
3.1.1 Síntese do β -TCP pelo método de secagem do sol-gel	23
3.1.3 Incorporação das fases de fosfato de cálcio em membranas de LN	24
3.1.4 Animais e Grupos Experimentais	25
3.1.5 Procedimento Cirúrgico	26
3.1.7 Eutanásia e Coleta das Amostras	28
3.2 Métodos de análises	29
3.2.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)	29
3.2.2 Preparação do Material para Análise Histológica Tecidos Mineralizados	31
3.2.3 Análise Histológica Tecidos Desmineralizados	33
Análise Histológica Qualitativa	34
Análise Histométrica	34
Área de Osso Neoformado	34
3.3 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Caracterização Topográfica e Estrutural	36
4.1.1 Membrana de Látex com incorporação de β -TCP na escala Nanométrica	36
4.1.2 Membrana de Látex com Incorporação de β -TCP na Escala Micrométrica	37
4.2 Análise dos Tecidos Mineralizados	39
4.2.1 Microtomografia Computadorizada (Micro-Ct)	39
4.2.2 Análise Histológica Qualitativa de Tecidos Mineralizados	43
4.2.3 Análise Histológica Quantitativa de Tecidos Mineralizados	47
4.3 Análise Histológica em Tecidos Desmineralizados	49
4.3.1 Análise Histológica Qualitativa dos Tecidos Desmineralizados	49
4.3.2 Análise Histológica Quantitativa dos Tecidos Desmineralizados	53
Área de Osso Neoformado	53
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

O reparo de defeitos ósseos representa um grande desafio cirúrgico para os profissionais da área da saúde, especialmente em casos de grandes falhas, onde sua capacidade regenerativa fisiológica é excedida (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; BURG; PORTER; KELLAM, 2000; CARLISLE *et al.*, 2019; GÖTZ; WARNKE; KOLK, 2015; PORTO *et al.*, 2012; VAJGEL *et al.*, 2014). O desenvolvimento de biomateriais capazes de auxiliar na recuperação dos tecidos humanos lesados tem sido alvo de muitos estudos no âmbito das cirurgias reconstrutivas (RODRIGUEZ-CHANFRAU, 2020; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2020).

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo que tem um alto potencial para reparar sua estrutura lesada, entretanto, depende diretamente de uma adequada vascularização, estabilidade mecânica e competição com tecidos de alta atividade proliferativa (LI *et al.*, 2015; SCHENK *et al.*, 1994). Em alguns casos os danos no tecido ósseo podem levar um tempo maior para concluir o reparo ou até mesmo não serem reparados normalmente pelo organismo, havendo a necessidade de se utilizar diversas técnicas cirúrgicas na tentativa de otimizar o reparo da falha óssea, como nos casos de defeitos ósseos extensos, os quais não tem a capacidade de se repararem espontaneamente, podendo causar uma sequela temporária ou definitiva para o paciente (LI *et al.*, 2015; PORTO *et al.*, 2012).

O termo “defeito de tamanho crítico” foi originalmente definido como “a ferida intraóssea de menor tamanho em um determinado osso e espécie de animal que não cicatrizará espontaneamente durante a vida do animal” (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). A tentativa de reparo desse defeito resulta na formação de tecido conjuntivo fibroso em vez de osso. No entanto, como a maioria dos estudos tem duração limitada e não se estendem por toda a vida do animal, novos estudos estabeleceram que “o defeito de tamanho crítico na pesquisa animal refere-se ao tamanho de um defeito que não cicatrizará ao longo da duração do estudo” (GOSAIN *et al.*, 2000).

O defeito de tamanho crítico tem sido usado como um modelo experimental para avaliar a eficácia de biomateriais recentemente desenvolvidos (CARLISLE *et al.*, 2019; COOPER *et al.*, 2010; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; SOHN *et al.*, 2010). Existem vários modelos de defeitos ósseos utilizados para pesquisas sobre regeneração óssea em diferentes regiões anatômicas, incluindo os da tíbia, rádio,

mandíbula e crânio de animais (DELGADO-RUIZ; CALVO-GUIRADO; ROMANOS, 2015; SOHN *et al.*, 2010; VAJGEL *et al.*, 2014). Uma série de modelos de teste animal, como rato, camundongo, coelho, cachorro, ovelha, cabra e porco, foram desenvolvidos para simular o ambiente humano *in vivo* e avaliar a dinâmica de reparo com uso de biomateriais após a indução de uma lesão (LIU *et al.*, 2020). Defeitos cranianos são amplamente utilizados em estudos com biomateriais, e o coelho é comumente usado em experimentos com animais nas pesquisas das áreas da saúde. Algumas de suas vantagens são que ele é facilmente manuseado, tem alta taxa de renovação óssea e está alcança a idade adulta em 6 meses. Além disso, o coelho possui um crânio maior que o do rato, o que possibilita a criação de múltiplos defeitos em um crânio, o que reduz o tempo de operação, o custo e os erros de observação entre os indivíduos. A cicatrização do defeito de tamanho crítico deve ser avaliada correlacionando o tamanho da falha com o período de reparo, assim como a quantidade e qualidade do tecido em cicatrização. E, mais recentemente, tem sido utilizado para estudos *in vivo* embriões de peixes e larvas (CACCHIOLI *et al.*, 2006; DELGADO-RUIZ; CALVO-GUIRADO; MIRANDA *et al.*, 2022; ROMANOS, 2015; LI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2020; SOHN *et al.*, 2010).

A reconstrução de lesões amplas em tecidos duros sempre foi uma situação difícil para os cirurgiões, tendo sido sugeridos uma variedade de enxertos ósseos para auxiliar no reparo desses defeitos, como o autógeno, homogêneo, liofilizado, desmineralizado, e materiais artificiais ou sintéticos (SAULACIC *et al.*, 2021). Dentre essas opções, o osso autógeno tem sido considerado o “padrão ouro” devido às suas características osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas. No entanto, a obtenção de tecido ósseo suficiente da área doadora para preencher o defeito em sua totalidade, se torna um desafio em algumas condições clínicas complexas que requerem maior quantidade do substituto e seu uso está associado a morbidade significativa do local doador (PORTO *et al.*, 2012; SAULACIC *et al.*, 2021).

O avanço na área das cirurgias reconstrutivas impulsionou a busca por biomateriais que potencializem o reparo ósseo, substituam o osso autógeno, sejam eficientes, economicamente acessíveis e com as vantagens de fornecimento ilimitado sem necessidade de área doadora, o que reduziria as morbidades ao paciente (LI *et al.*, 2015).

A seringueira *Hevea brasiliensis* é uma árvore nativa da bacia do rio Amazonas, e o látex extraído dessa seringueira tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas (FERREIRA *et al.*, 2009; ZIMMERMANN *et al.*, 2018). Membranas feitas de Látex Natural (LN) têm sido usadas como próteses e enxertos médicos devido a suas características de biocompatibilidade e estímulo natural a angiogênese (ERENO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2009; MIRANDA *et al.*, 2022; MRUÉ; COUTINHO; CENEVIVA, 2004). O látex é um cicatrizante, uma defesa natural da planta e pode ser aplicado a tecidos biológicos sem causar reações de hipersensibilidade, se processado corretamente (BORGES *et al.*, 2017; FRADE *et al.*, 2001; MRUÉ; COUTINHO; CENEVIVA, 2004).

Estudos em animais comprovaram a possibilidade de selecionar células de determinados tecidos e impedir que células de outros tecidos repopulassem uma ferida por meio do uso de membranas, este processo foi denominado regeneração tecidual guiada. Posteriormente, estes estudos foram direcionados para o tecido ósseo com o uso de membranas, utilizando-se da osteopromoção como princípio biológico, sendo o processo denominado regeneração óssea guiada (ROG) (DAHLIN; ALBERIUS; LINDE, 1991; DAHLIN *et al.*, 1994; LINDE *et al.*, 1993; MOURA *et al.*, 2014). Nos ossos, as membranas de látex atuam seguindo este princípio, atuando como barreira protetora no local da lesão, impedindo a invasão de células não osteogênicas no defeito que se deseja reparar, protegendo o coágulo sanguíneo e promovendo a proliferação local de células osteoprogenitoras, permitindo que a neoformação óssea seja otimizada nos estágios iniciais após a lesão. Além disso, podem também ser utilizadas para liberação de compostos biológicos e medicamentos (DIMITRIOU *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2017; ZANCANELA *et al.*, 2019). Tendo em vista sua utilização na ROG, a incorporação de um fosfato de cálcio deve potencializar os resultados promovidos pela membrana (BORGES *et al.*, 2015; DANIELETTO-ZANNA *et al.*, 2020; HERCULANO *et al.*, 2009, 2010, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2014; RETZEPI; DONOS, 2010; SCHENK *et al.*, 1994).

Cerâmicas de fosfato de cálcio são os biomateriais sintéticos mais similares a tecidos ósseos do corpo humano, sendo o biomaterial mais biocompatível conhecido para aplicações ósseas (LEE *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-CHANFRAU, 2020; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2020; UTARA; KLINKAEWNARONG, 2015). O Beta-tricálcio fosfato (β -TCP) é uma fase do fosfato de cálcio que apresenta alta

biocompatibilidade, boa solubilidade, fácil absorção pela matriz óssea e atividades de osteoindução e osteocondução (COSTA *et al.*, 2016; RODRIGUEZ-CHANFRAU, 2020; RODRIGUEZ-CHANFRAU *et al.*, 2020). É o mais utilizado na regeneração óssea e amplamente estudado para aplicações biomédicas, pois apresenta estrutura química mais estável e maior taxa de degradação quando comparado a outra fase do fosfato de cálcio. A possibilidade de se incorporar β -TCP às membranas de látex é uma nova alternativa para auxiliar o reparo ósseo, pois dessa forma é possível associar as propriedades osteopromotoras do látex às osteocondutivas e possíveis osteoindutivas do CaP (COSTA-RODRIGUES *et al.*, 2014; EFTEKHARI; FARAHPOUR; MIRANDA *et al.*, 2022; RABIEE, 2015; HOLLISTER, 2005; LOU *et al.*, 2015; ZOU *et al.*, 2005).

A utilização de β -TCP no processo de reparo de defeitos ósseos associado à utilização de membranas na ROG tem sido proposta como método auxiliar na regeneração óssea, com resultados promissores. Porém poucos são os estudos para incorporar o β -TCP às membranas, como método de liberação sustentada do material nos defeitos ósseos. Sendo assim, o presente estudo tem o objetivo de avaliar o processo de reparo em defeitos ósseos críticos tratados com membrana de látex, membrana de látex incorporada com β -TCP, nas escalas micrométrica e nanométricas.

6 CONCLUSÃO

A membrana de látex mostrou-se biocompatível, permitindo neoformação óssea na periferia dos defeitos críticos. A incorporação de β -TCP nas escalas micro e nanométrica às membranas de látex potencializou sua propriedade biológica de osteopromoção permitindo maiores níveis de neoformação óssea.

REFERÊNCIAS

Andrade TA, Iyer A, Das PK, Foss NT, Garcia SB, Coutinho-Netto J, Jordão AA Jr, Frade MA. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2011 Oct;44(10):1036-47.

André SB, Tavares PMH, Silva MP, Jesus LK, Haddad H, Bizelli VF, Ponzoni D, Bassi APF, Souza FA, Carvalho PSP. Microscopic analysis of the repair of critical bone defects in rabbits calvaria after the use of particulated autogenous bone or particulate autogenous bone associated with inorganic biomaterial. *Res Soc Dev.* 2022;11(5):e55211526709.

Borges FA, de Barros NR, Garms BC, Miranda MCR, Gemeinder JLP, Paes JTR, Silva RF, Toledo KA, Herculano, DR. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. *J Appl Polym Sci.* 2017;134:45321.

Borges FA, Filho EA, Miranda MC, Dos Santos ML, Herculano RD, Guastaldi AC. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. *J Biomater Sci Polym.* 2015;26(17):1256-68.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg.* 1998;9:310-6.

Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2000;21:2347–59.

Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C. The critical bone defect: morphological study of bone healing. *Ann Fac Medic Vet di Parma.* 2006;26:97-110.

Carlisle PL, Guda T, Silliman DT, Hale RG, Brown Baer PR. Are critical size bone notch defects possible in the rabbit mandible? *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2019;45(2):97-107.

Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(6):1685-92.

Costa NM, Yassuda DH, Sader MS, Fernandes GV, Soares GD, Granjeiro JM. Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;61:63-71.

Costa-Rodrigues J, Silva A, Santos C, Almeida MM, Costa ME, Fernandes MH. Complex effect of hydroxyapatite nanoparticles on the differentiation and functional activity of human pre-osteoclastic cells. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(12):3590-600.

Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg*, 1991;74:487-91.

Dahlin C, Sandberg E, Alberius P, Linde A. Restoration of mandibular nonunion bone defects. An experimental study in rats using an osteopromotive membrane method. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1994;23(4):237-42.

Danieletto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, Carvalho PSP, Bassi APF. Osteopromotion capacity of bovine cortical membranes in critical defects of rat calvaria: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Biomater*. 2020;2020:6426702.

Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(8):915-30.

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):2-17.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med*. 2012;10:81.

Dos Santos ML, Riccardi CS, Noronha AL, De Olyveira GM, Filho EA, Guastaldi AC. The influence of the heat treatment temperatures in calcium phosphate synthesis. *J Biomater Tissue Eng*. 2014;4(9):744-8.

Eftekhari H, Farahpour MR, Rabiee SM. Histopathological evaluation of potential impact of β -tricalcium phosphate (HA+ β -TCP) granules on healing of segmental femur bone defect. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116(1):30-4.

Ereno C, Guimarães SA, Pasetto S, Herculano RD, Silva CP, Graeff CF, Tavano O, Baffa O, Kinoshita A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(3):932-9.

Ferreira M, Mendonça RJ, Coutinho-Netto J, Mulato M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Braz J Phys*. 2009;39:564–9.

Frade MAC, Valverde RV, Assis RVC, Coutinho-Neto J, Foss NT. Chronic phlepathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal. *Intern J Derm*. 2001;40:237-40.

Garms BC. Caracterização física, química e biológica de membranas de látex natural incorporadas com moxifloxacina para tratamento de feridas cutâneas [dissertação]. Araraquara: Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2017.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(2):360-71.

Götz C, Warnke PH, Kolk A. Current and future options of regeneration methods and reconstructive surgery of the facial skeleton. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120(3):315-23.

Herculano RD, Guimarães SAC, Belmonte GC, Duarte MAH, Oliveira Junior ON, Kinoshita A, Graeff CFO. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. *Mat Res*. 2010;13(1):57-61.

Herculano RD, Queiroz AAA, Kinoshita A, Oliveira ON, Graeff CF. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. *Mater Sci Eng C*. 2011;31(2):272-5.

- Herculano RD, Silva CP, Ereno C, Guimaraes SAC, Kinoshita A, Graeff CFO. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). *Mat Res.* 2009;12(2):253-6.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990;1(1):60-8.
- Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater.* 2005;4(7):518-24.
- Hong I, Khalid AW, Pae HC, Song YW, Cha JK, Lee JS, Paik JW, Choi SH. Diverse patterns of bone regeneration in rabbit calvarial defects depending on the type of collagen membrane. *J Periodontal Implant Sci.* 2021;51(1):40-52.
- Jung RE, Schmoekel HG, Zwahlen R, Kokovic V, Hammerle CH, Weber FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(6):676-82.
- Lee HR, Kim HJ, Ko JS, Choi YS, Ahn MW, Kim S, Do SH. Comparative characteristics of porous bioceramics for an osteogenic response in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013;8(12):e84272.
- Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat.* 2015;3(3):95-104.
- Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurström K, Sundin Y. Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol.* 1993;64(11):1116-28.
- Liu W, Du B, Tan S, Wang Q, Li Y, Zhou L. Vertical guided bone regeneration in the rabbit calvarium using porous nanohydroxyapatite block grafts coated with rhVEGF165 and cortical perforation. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:10059-73.
- Lou T, Wang X, Song G, Gu Z, Yang Z. Structure and properties of PLLA/ β -TCP nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26(1):5366.
- Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol.* 2011;56(10):984-90.

Miranda, M.C.R., Borges, F.A., Barros, N.R. et al. In vitro and alternative animal models to evaluate the biocompatibility of natural latex-calcium phosphate-based polymer. *J Polym Environ* 30, 3368–3378 (2022)

Miranda MCR, Prezotti FG, Borges FA, Barros NR, Cury BSF, Herculano RD, Cilli EM. Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017;28(18):2117-30.

Moura JM, Ferreira JF, Marques L, Holgado L, Graeff CF, Kinoshita A. Comparison of the performance of natural latex membranes prepared with different procedures and PTFE membrane in guided bone regeneration (GBR) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(9):2111-20.

Mrué F, Coutinho JN, Ceneviva R. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mater Res.* 2004;7(2):277-83.

Nascimento RM, Faita FL, Agostini DL, Job AE, Guimarães FE, Bechtold IH. Production and characterization of natural rubber-Ca/P blends for biomedical purposes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;39:29-34.

Pegorin GS, Leite MN, Antoniassi M, Chagas ALD, Santana LA, Garms BC, Marcelino MY, Herculano RD, Cipriani Frade MA. Physico-chemical characterization and tissue healing changes by *Hancornia speciosa* Gomes latex biomembrane. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021;109(7):938-48.

Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 2020a;18(7):e3000411.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020b;18(7):e3000410.

Porto GG, Vasconcelos BC, Andrade ES, Carneiro SC, Frota MS. Is a 5 mm rat calvarium defect really critical?. *Acta Cir Bras*. 2012;27(11):757-60.

Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt*. 2015a;20(3):038003.

Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015b;44(6):798-805.

Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin. Oral Impl. Res*. 2010; 21(6): 567-76.

Rodriguez-Chanfrau JE, Tolaba AG, Pelizaro TAG, Veranes'Pantoja Y, Guastaldi AC. Evaluation of the behavior in water of a biomaterial composed of different phases of calcium phosphate. *Lett Appl NanoBioScience*. 2020;9(4):1513-20.

Rodríguez-Chanfrau JE. Evaluation of the influence of microwaves radiation on a biomaterial composed of three phases of calcium phosphates. *Biointerface Res Appl Chem*. 2020;10(2):5141-4.

Saulacic N, Fujioka-Kobayashi M, Kimura Y, Bracher AI, Zihlmann C, Lang NP. The effect of synthetic bone graft substitutes on bone formation in rabbit calvarial defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(1):14.

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(1):13-29.

Schmidt LE, Hadad H, Vasconcelos IR, Colombo LT, da Silva RC, Santos AFP, Cervantes LCC, Poli PP, Signorino F, Maiorana C, Carvalho PSP, Souza FÁ. Critical defect healing assessment in rat calvaria filled with injectable calcium phosphate cement. *J Funct Biomater*. 2019;10(2):21. 1.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(205):299-308.

Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, Choi SH. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci.* 2010;40(4):180-7.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879-93.

Zancanela DC, Funari CS, Herculano RD, Mello VM, Rodrigues CM, Borges FA, de Barros NR, Marcos CM, Almeida AMF, Guastaldi AC. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: physical-chemistry and antimicrobial behaviours. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;97:576-82.

Zimmermann M, Mendes FF, Rodrigues DF, Faleiro MR, Campos GS, Araújo EG. Membrana de látex natural de *Hevea brasiliensis* auxilia no processo de reparação tecidual em bovinos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2018;70(3):741-8.

Zou C, Weng W, Deng X, Cheng K, Liu X, Du P, Shen G, Han G. Preparation and characterization of porous beta-tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure. *Biomaterials.* 2005;26(26):5276-84.