

HELOÍSA HELENA NIMIA

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE
RATOS RECOBERTOS POR MEMBRANAS DE LATEX INCORPORADAS COM
BETA-TRICÁLCIO FOSFATO NAS ESCALAS MICROMÉTRICA E
NANOMÉTRICA**

**Araçatuba – SP
2025**

HELOÍSA HELENA NIMIA

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE
RATOS RECOBERTOS POR MEMBRANAS DE LATEX INCORPORADAS COM
BETA-TRICÁLCIO FOSFATO NAS ESCALAS MICROMÉTRICA E
NANOMÉTRICA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biomateriais

Orientadora: Profa. Dra. Debora de Barros Barbosa

**Araçatuba – SP
2025**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

N713a	Nimia, Heloisa Helena. Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos recobertos por membranas de latex incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas micrométrica e manométrica / Heloisa Helena Nimia. – Araçatuba, 2025 59 f. : il. ; tab. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba Orientadora: Profa. Débora de Barros Barbosa 1. Regeneração óssea 2. Materiais biocompatíveis 3. Látex I. T. Black D15 CDD 617.695
-------	--

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **Deus**, por guiar o meu caminho, dando-me força, coragem e persistência para alcançar mais esta realização profissional.

A minha amada mãe **Maria José de Campos Nimia** (in memoriam), pessoa sem a qual não consigo imaginar concluir todo esse processo. Sempre me inspirou e esteve ao meu lado para conquistar os meus sonhos, me ensinou a ter fé em Deus e me fez forte e esperançosa e, em virtude disto, hoje me encontro onde estou. Muito obrigado por seu amor e dedicação a todos nós. É muito difícil sua ausência em uma etapa tão importante, mas tenho a certeza que continua intercedendo por nós.

Ao meu pai amado **Milton Nimia**, por todo amor, cuidado, paciência, ajuda e incentivo. Com você, aprendi valores importantes que alicerçam a minha vida.

Ao meu esposo, companheiro, amigo e professor, **Francisley Ávila Souza**, por compartilhar da vida comigo, acreditar no meu potencial, ser um grande incentivador e apoiador das minhas conquistas profissionais. Seu apoio é fundamental para o nosso crescimento. O seu amor e cuidado com a nossa família foram fundamentais para a concretização deste sonho.

Aos meus filhos queridos **Marina Nimia Ávila Souza** e **Eduardo Nimia Ávila Souza**, por serem a razão do meu viver e por tornarem a minha vida mais leve e cheia de sentido. Agradeço a compreensão das minhas ausências nesses anos de curso.

A minha irmã **Fernanda Cristina Nimia**, que está sempre ao meu lado. Quero agradecer por ser a luz que ilumina sempre meu caminho.

Ao meu irmão **Luís Gustavo Nimia**, pelo carinho e constante retaguarda oferecida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, **Profa. Dra. DEBORA DE BARROS BARBOSA**, pelo carinho, sabedoria, dedicação e paciência que teve comigo. Obrigada pela acolhida e transmissão de conhecimentos precisos durante todo meu desenvolvimento no curso de doutorado. Receba meu profundo respeito e admiração pelo profissionalismo e dedicação com que realiza suas atribuições.

Ao **Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI**, referência em biomateriais, obrigada por permitir eu trabalhar na pesquisa de seu Auxílio Regular a Pesquisa FAPESP como nossa pesquisa de Doutorado. Receba os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade oferecida.

Ao **Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO**, obrigada por ceder sua propriedade intelectual, as membranas de látex, e permitir a mudança no estudo experimental, naquele momento em que o experimento piloto da nossa pesquisa inicial não foi bem sucedida, com o uso da membrana de látex em animais submetidos a queimadura de segundo grau.

A BANCA EXAMINADORA desta Defesa de Tese composta pela Profa. Dra. DÉBORA DE BARROS BARBOSA, Prof. Dr. IDELMO RANGEL GARCIA JÚNIOR, Profa. Dra. ROBERTA OKAMOTO, Prof. Dr. ALBANIR GABRIEL BORRASCA e Profa. Dra. VIVIAN CRISTINA NORONHA NOVAES. Obrigado por deixarem seus afazeres a fim de julgar e avaliar esta tese de doutorado. O nosso agradecimento e reconhecimento é de coração e acataremos todas as considerações realizadas. Nossa tese está mais bem redigida do ponto de vista científico após realizada as considerações dos Senhores e Senhoras Professores.

Ao **Prof. Dr. RODOLFO DEBONE PIAZA** obrigada por ter viabilizado esta pesquisa científica através da incorporação do beta-tricálcio fosfato nas membranas.

A **Profa. Dra. ROBERTA OKAMOTO** por mostrar-me que experiência, habilidade e simplicidade ajudam no conhecimento. A minha sincera gratidão pelos valiosos ensinamentos, pelo carinho e pelo exemplo de dedicação e competência.

Aos **PROFESSORES do DEPARTAMENTO DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS E PROTESE**, NA PESSOA DE SEU CHEFE Professor Titular Eduardo Piza Pellizer pela formação em pesquisa oferecida e por permitirem que esta pesquisa fosse realizada em suas dependências.

Aos **PROFESSORES do DEPARTAMENTO DE DIAGNÓSTICO E CIRURGIA**, NA PESSOA DE SUA CHEFE Profa. Dra. Daniela Atilé de Weert Brandini, por terem aberto as portas do Departamento para realização deste estudo e pela formação acadêmica proporcionada.

Aos **PROFESSORES da DISCIPLINA DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL E IMPLANTADONTIA**, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, Profa. Dra. Alessandra Aranega, Profa. Dra. Daniela Ponzoni, Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, obrigada pelo carinho que sempre me receberam no Departamento e Disciplina, bem como todo apoio, vocês são exemplos de dedicação e competência.

AO GRUPO DE PESQUISA Henrique Hadad, Ana Flávia Piquera Santos, Laís Kawamata de Jesus, Maisa Pereira da Silva, Paulo Matheus Honda, Maria Eduarda de Freitas Santana Oliveira, Harrisson Lucho Mamani Valeriano, Letícia Gabriella Rodrigues de Souza, Mateus Torres Silva, Nelson Padilha Silva, e Giovanini Sacilotto por sempre estarem presentes e terem me ajudado em cada etapa da pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

ÀS ALUNAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA Lilian Matos, Júlia Pietro Bão, Maria Fernanda Bessi, Anna Luisa Perri, Ana Laura Galvão e Brittnie Johnson, pela ajuda e compromisso com as pesquisas do grupo. Obrigada.

AS MINHAS AMIGAS PESSOAIS e COLEGAS DE TRABALHO, Profa. TERESA CRISTINA ALVISE, Profa. ISABELA BACELAR, Profa. LUCIANA JERONIMO E Profa. ELAINE CRISTINA FARIA com quem sempre pude contar nos momentos de alegrias e tristezas, onde sempre me apoiaram e por diversas vezes me ajudaram no trabalho diário.

Aos **SERVIDORES TÉCNICO-ADMINISTRATIVOS DO LABORATÓRIO DO DEPARTAMENTO DE DIAGNÓSTICO E CIRURGIA (LABORATÓRIO “PROFESSOR EMÉRITO TETUO OKAMOTO”)**: MARCO AURÉLIO DE OLIVEIRA IANNER, RENATO GOMES DE OLIVEIRA E PAULO ROBERTO GRATÃO, o meu agradecimento pelo feliz convívio e ajuda fornecida durante esses anos de pós-graduação. Meus agradecimentos por sempre me ajudarem nos trabalhos laboratoriais. Recebam minha profunda admiração.

Ao **AMIGO E INTERCESSOR PADRE ORIVALDO** que em todos os momentos da minha vida e da minha família está conosco. Obrigada padre, por seu constante apoio, orientação e palavras de sabedoria. Que o senhor continue sendo luz em nossos caminhos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa de seus representantes, Senhor Diretor Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem e do Senhor Vice-Diretor Prof. Associado Luciano Tavares Ângelo Cintra, pela oportunidade de ser aluno desta tão renomada Instituição, onde cada um que faz parte tem consciência e faz jus ao legado que carrega.

A Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, campus Poços de Caldas – PUC-MINAS, na pessoa de seus representantes, Senhor Pró-Reitor, Prof. Dr. Iran Calixto Abraão e do Senhor Diretor Acadêmico, Prof. Dr. Márcio Leandro Gonçalves, por incentivar a realização deste Doutorado e permitir que este curso de Pós-graduação, Nível Doutorado fosse realizado com total apoio, seja intelectual, laboral e financeiro, proporcionando o Programa Permanente de Capacitação Docente (PPCD).

Ao Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa do Senhor Coordenador Prof. Associado Juliano Pelim Pessan, que proporcionou a oportunidade deste Doutorado e participou de minha formação na vida acadêmica e no eixo PESQUISA.

Ao Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa do Senhor Coordenador Prof. Titular Wirley Gonçalves Assunção, por permitir o intercâmbio de ideias e pesquisas, como a realizada neste Doutorado. Destaco também e agradeço pela participação na minha formação na vida acadêmica e no eixo PESQUISA.

Ao Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IO/UNESP) em nome do Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica em nome do Pós Doutorando Rodolfo e do Grupo de Biomateriais sob coordenação do Professor Titular Antônio Carlos Guastaldi.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho em nome do Prof. Dr. Élcio Marcantonio Júnior, das Técnicas de Laboratório Sra. Suleima Ferreira e Sra. Amanda Menezes Leite, ambas do Laboratório Multiusuário de Imagens da FOAr-UNESP, por meio

do equipamento Sistema EXAKT de cortes não-descalcificados; e em nome da Dra. Paula Aboud Barbugli do equipamento Microscópio de Fluorescência Multifocal.

Ao **Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** – FOA/UNESP, e ao Sr. João Batista Alves Correa, responsável pelo suporte, apoio e amizade no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao **Laboratório Multiusuário da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** - Sala de Microtomografia Computadorizada (FINEP/CT INFRA 01.12.0530.00) na pessoa da Senhora Natália Yoshie Ikegami pela realização da análise microtomográfica.

**Busquem, pois, em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça,
e todas essas coisas lhes serão acrescentadas.**

Mateus 6,33

RESUMO

Nimia HH. Avaliação do reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos recobertos por membranas de látex incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas micrométrica e nanométrica [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2025.

A funcionalização de membranas por meio da incorporação de cerâmicas de fosfato de cálcio com intuito de potencializar as propriedades biológicas no processo de reparo ósseo por meio do princípio de osteopromoção tem sido foco de novos estudos para o desenvolvimento de biomateriais. O objetivo deste trabalho foi determinar o nível de biocompatibilidade, bem como avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos tratados com membrana de látex incorporada ou não com beta-tricálcio fosfato (β -TCP) nas escalas micrométricas e nanométricas. Foi realizada a análise da viabilidade celular em fibroblastos dérmicos humanos primários. Para o estudo pré-clínico experimental foram utilizados 96 ratos *wistar* e em cada animal foi criado um defeito crítico de 6 mm em sua calvária. Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com a terapêutica a ser empregada para o defeito crítico: apenas coágulo sanguíneo (GC), membrana de látex (ML), membrana de látex + β -TCP micropartículas (Micro), membrana de látex + β -TCP nano partículas (Nano). Os animais foram eutanasiados após 15, 30 e 60 dias. As peças foram submetidas à análise microtomográfica, avaliando os parâmetros volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) e separação (Tb.Sp) e número (Tb.N) de trabéculas, seguidas do processamento para inclusão em resina fotopolimerizável Technovit® e posterior análise confocal a laser, no intuito de mensurar a taxa de aposição mineral. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5%. As membranas apresentaram viabilidade celular, com exceção de ML em altas concentrações que apresentou resultados inferiores ao controle negativo e a incorporação do beta-tricálcio fosfato nas escalas micro ou nanométricas modulou favoravelmente a resposta celular ao longo do tempo. Para os parâmetros BV e BV/TV foi observado diferença estatística entre Micro e ML vs GC nos períodos de 30 e 60 dias, enquanto no parâmetro separação trabecular houve diferenças entre Nano vs GC no período de 15 dias. A taxa de aposição mineral dos grupos micro e nano foram estatisticamente superiores a GC em 15 dias e ao grupo ML em 15 e 30 dias. Diante dos resultados obtidos conclui-se que as membranas de látex com ou sem incorporação de beta-tricálcio fosfato nas escalas nano ou micrométricas

foram biocompatíveis e favoreceram a deposição e aposição mineral ósseas nos defeitos críticos em calvária de ratos.

Palavras-chave: regeneração óssea; materiais biocompatíveis; membrana; látex.

ABSTRACT

Nimia HH. Evaluation of bone healing of critical defects in the calvary of rats coated by latex membranes incorporated with beta-tricalcium phosphate at the micrometric and nanometric scale [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia; 2025.

The functionalization of membranes through the incorporation of calcium phosphate ceramics in order to enhance the biological properties in the bone repair process through the principle of osteopromotion has been the focus of new studies for the development of biomaterials. The objective of this study was determine the level of biocompatibility, as well as evaluate the bone repair process in critical defects treated with a latex membrane incorporated or not with beta-tricalcium phosphate (β -TCP) at the micrometric and nanometric scales. The cell viability analysis was performed in primary human dermal fibroblasts. For the experimental preclinical study, 96 Wistar rats were used and a critical defect of 6 mm was created in each animal's calvaria. The animals were divided into 4 groups according to the therapy to be used for the critical defect: blood clot only (GC), latex membrane (ML), latex membrane + β -TCP microparticles (Micro), latex membrane + β -TCP nanoparticles (Nano). The animals were euthanized after 15, 30 and 60 days. The specimens were subjected to microtomographic analysis, evaluating the parameters bone volume (BV), percentage of bone volume (BV/TV), trabecular bone thickness (Tb.Th) and separation (Tb.Sp) and number (Tb.N) of trabeculae, followed by processing for inclusion in Technovit® photopolymerizable resin and subsequent confocal laser analysis, in order to measure the mineral apposition rate. The data obtained were subjected to statistical analysis with a significance level of 5%. The membranes showed cell viability, except for ML at high concentrations, which presented results inferior to the negative control, and the incorporation of beta-tricalcium phosphate at micro or nanometric scales favorably modulated the cellular response over time. For the BV and BV/TV parameters, a statistical difference was observed between Micro and ML vs GC in the periods of 30 and 60 days, while in the trabecular separation parameter there were differences between Nano vs GC in the period of 15 days. The mineral apposition rate of the micro and nano groups was statistically higher than GC in 15 days and then the ML group in 15 and 30 days. Given the results obtained, it is concluded that the latex membranes with or without incorporation of beta-tricalcium phosphate in the nano or micrometric scales were biocompatible and favored bone mineral deposition and apposition in critical defects in rat calvaria.

Keywords: bone regeneration; biocompatible materials; membrane; latex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da síntese para a obtenção do fosfato de cálcio	24
Figura 2 - A) Ilustração do planejamento de estimulação; B) Ilustração da interpretação da análise de viabilidade celular	27
Figura 3 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas: látex natural (ML), látex com Beta-tricálcio fosfato microestruturado (Micro) e látex com Beta-tricálcio fosfato nanoestruturado (Nano), nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C)	34
Figura 4 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro BV na análise por MicroCT. ‡ representa diferença estatística entre os grupos	41
Figura 5 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro BV/TV na análise por MicroCT. ‡ representa diferença estatística entre os grupos	42
Figura 6 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.sp na análise por MicroCT. ‡ representa diferença estatística entre os grupos	43
Figura 7 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.th na análise por MicroCT	44
Figura 8 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.n na análise por MicroCT	45
Figura 9 - Imagens representativas da reconstrução em 3D dos diferentes grupos nos períodos de 15, 30 e 60 dias	46
Figura 10 - Gráfico representativo das médias de mineralização óssea/dia de acordo com os grupos e períodos avaliados nesse estudo. ($p < 0,0001$)	47
Figura 11 - Imagens do defeito crítico da calota com a presença de coágulo e membranas obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. Imagens evidenciando área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde) e com fluorocromo alizarina (vermelho)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 24 h	35
Tabela 2 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 48 h	37
Tabela 3 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 72 h	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
ANOVA	Análise de variância
BIC	Extensão linear de contato osso-dispositivo (Bone implant contact)
BV	Volume Ósseo
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
C	Carbono
Ca	Cálcio
CO ₂	Gás Carbônico
cm	Centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Ctan	Ct-analyser
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
MAR	Taxa de aposição mineral
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/Kg	Miligrama por quilo
mg/kg/dia	Miligrama-kilo dia
mg/L	Miligrama por Litro
Micro-CT	Micro tomografia computadorizada
ml	Mililitros
ml/Kg	Mililitro por quilo
mm	Milímetro
Mol.L-1	Mol Litro
N	Nitrogênio
N.cm	Newton por centímetro
Na	Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NBA	Área de osso neoformado (Newly bone formation)
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância

P	Fósforo
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
ph	Potencial hidrogeniônico
PLA	Ácido Poliláctico
PLLA	Poli-L-Lactídeo
PDLA	Poli-D-Lactídeo
PLDLLA	Poli (L-lactide-co-D,L-lactide)
PGA	Ácido Poli-Glicólico
PDS	Poli dioxanona
PVP-I	Polivinilpirrolidona - Iodo
ROI	Área ao redor do implante
Rpm	Rotações por minuto
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular do osso
TC	Tomografia computadorizada
Ti	Titânio
μm	Micrômetro
μA	Micro ampere

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivo Específico	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Síntese do β -TCP pelo método de secagem do sol-gel	23
3.2 Extração e preparação do látex natural (LN)	24
3.3 Incorporação do β -TCP nas membranas pelo método Biomimético	25
3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X (EDS)	25
3.5 Análise de viabilidade celular	26
3.6 Animais e Grupos Experimentais	27
3.7 Procedimento Cirúrgico	28
3.8 Eutanásia e Coleta das Amostras	29
3.9 Microtomografia Computadorizada (micro-CT)	29
3.10 Preparação do Material para Análise Confocal a Laser	30
3.11 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Viabilidade Celular	32
4.2 Análise Microtomográfica	41
4.2.1 Volume Ósseo (BV)	41
4.2.2 Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV)	42
4.2.3 Separação trabecular	43
4.2.4 Espessura trabecular	44
4.2.5 Número de trabéculas	45
4.2.6 Análise Qualitativa	45
4.3 Microscopia confocal a laser	47
4.3.1 Taxa de aposição mineral (MAR)	47
4.3.2 Análise qualitativa	48
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A regeneração óssea guiada (ROG) surgiu como uma abordagem terapêutica destinada a estimular o crescimento ósseo, utilizando membranas como barreiras físicas [1]. Estudos experimentais indicaram, de forma significativa, que a formação de osso é substancialmente favorecida quando a penetração de tecidos moles no local do defeito ósseo é impedida por meios mecânicos [2,3].

As membranas atuam na proteção do coágulo sanguíneo, elemento essencial para o processo de regeneração óssea. Elas também contribuem para a diminuição da atividade de células osteoclásticas, provenientes da vascularização dos tecidos moles adjacentes, favorecendo, assim, a formação óssea nos estágios iniciais da cicatrização [4]. Evidências adicionais sugerem que a ação das membranas vai além de sua função como barreira física; elas podem também estimular diretamente a regeneração óssea no defeito subjacente. Essa atividade biológica pode estar relacionada ao recrutamento celular, à indução da angiogênese e à remodelação óssea, resultando na substituição do defeito por tecido ósseo maduro [5].

A eficácia clínica do uso isolado da membrana como barreira já foi comprovada, sendo observada uma maior formação óssea em áreas de fenestração óssea ao redor de implantes de titânio tratadas com membranas, quando comparadas a locais controle, nos quais as fenestrações foram deixadas apenas sob o periósteo, sem a utilização de membrana [6].

Diversos materiais, tanto sintéticos quanto de origem natural, absorvíveis ou não, têm sido empregados clinicamente como membranas na ROG [7-10]. Para além das funções oclusivas e bioestimuladoras, a biocompatibilidade representa um requisito fundamental, a fim de assegurar que os eventos biológicos envolvidos na reparação tecidual ocorram de forma adequada, sem interferência negativa da composição do material. O biomaterial utilizado deve induzir uma resposta tecidual apropriada, de modo que sua interação com os tecidos não comprometa a cicatrização, a integridade das estruturas adjacentes ou a segurança do paciente [11].

Nesse cenário, o látex se destaca por possuir propriedades compatíveis com as exigências biológicas do processo de reparação tecidual. Derivado da árvore *Hevea brasiliensis*, esse material tem se mostrado biocompatível e promissor em diversas aplicações biomédicas [12-15], combinando alta resistência mecânica com baixo custo, o que favorece sua utilização na área da saúde. Um estudo anterior [16] evidenciou que as membranas de látex são capazes de modular sua porosidade mediante a incorporação de diferentes volumes

de água, estabelecendo uma correlação entre a porosidade ajustada e a liberação controlada de fármacos. Ressalta-se que esse controle na fabricação é fundamental para assegurar que o material apresente características ideais para aplicação *in vivo*, favorecendo a liberação eficiente de substâncias incorporadas, ao mesmo tempo em que a pesquisa se alinha aos princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição) no uso de animais de laboratório. Embora a porosidade específica não seja um requisito indispensável para sua aplicação em regeneração óssea guiada, essa característica pode contribuir para a melhoria dos resultados regenerativos [5].

Um estudo anterior [17], utilizando um modelo *in vivo* de defeitos críticos na calvária de coelhos, observou uma formação óssea mais expressiva nos grupos tratados com membranas de látex em comparação aos grupos controle (sem membrana), sugerindo o potencial do uso isolado dessas membranas, sem a associação com enxertos ou substitutos ósseos em procedimentos de ROG. Buscando não apenas explorar a função oclusiva da membrana, mas também potencializar seus efeitos biológicos recentemente identificados, como o recrutamento celular, a indução da angiogênese e a interação direta com os processos de formação e remodelação óssea, diferentes substâncias bioativas têm sido incorporadas às membranas [18–22]. Essas substâncias apresentam efeitos pleiotrópicos, propriedades antimicrobianas ou ações específicas na promoção da reparação óssea.

Os fosfatos de cálcio (Ca-P) despontam como promissores biomateriais para o futuro, devido à sua segurança, abundância natural no organismo, boa integração com os tecidos e possibilidade de produção em larga escala com baixo custo [23]. Dentre esses compostos, o beta-tricálcico fosfato (β -TCP) apresenta características particulares em relação aos demais fosfatos de cálcio [24], destacando-se por suas propriedades osteocondutivas e osteoindutivas [25,26]. Nos últimos anos, o β -TCP tem ganhado relevância como um dos substitutos ósseos mais promissores, graças à sua síntese laboratorial controlada e à combinação de osteocondução, osteoindução e reabsorção celular [27].

A propriedade osteocondutiva do β -TCP foi investigada em estudo anterior [28], que mostrou uma energia de ligação óssea significativamente maior para o β -TCP em comparação à hidroxiapatita após 10 semanas de implantação. Além disso, é importante destacar que parte dos íons de cálcio liberados durante a reabsorção do β -TCP participa ativamente na formação do novo tecido ósseo [29]. A estrutura do material, fundamental para a regeneração tecidual, é amplamente avaliada na engenharia de tecidos, podendo influenciar diretamente o desempenho dos biomateriais aplicados na regeneração óssea. Sua conformação microporosa

contribui para a sobrevivência celular ao oferecer suporte às necessidades de transporte de massa essenciais para a nutrição, adesão e migração das células [30], enquanto poros com diâmetro superior a 300 μm favorecem a neovascularização [31,32].

Por outro lado, a utilização de materiais em escala nanométrica pode potencializar as propriedades regenerativas dos scaffolds, promovendo maior osteoindução e melhor estabilidade mecânica [33]. A fabricação de nanocompósitos de poli-L-ácido láctico (PLLA) incorporando nanopartículas de β -TCP como elementos estruturais mostraram efeitos positivos sobre a porosidade, o módulo de compressão, o perfil de adsorção de proteínas e a adesão de osteoblastos [34]. Diante da significativa demanda e dos desafios envolvidos na regeneração óssea de defeitos extensos, tanto na odontologia quanto na medicina, a otimização do processo de formação e reparo ósseo com materiais acessíveis, de fácil manuseio e alta eficácia é crucial para o sucesso das terapias de reabilitação [35]. Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo determinar primariamente o nível de biocompatibilidade das membranas, bem como avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos tratados com membrana de látex incorporada ou não com beta-tricálcio fosfato (β -TCP) nas escalas micrométricas e nanométricas. A hipótese nula testada foi de que a funcionalização da membrana de látex com beta-tricálcio fosfato nas escalas micro e nanométricas não promove melhorias na deposição mineral em defeitos críticos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Determinar primariamente o nível de biocompatibilidade das membranas, bem como avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos críticos tratados com membrana de látex incorporada ou não com beta-tricálcio fosfato (β -TCP) nas escalas micrométricas e nanométricas.

2.2 Objetivo Específico

Determinar nível de biocompatibilidade das membranas incorporada ou não com beta-tricálcio fosfato (β -TCP) nas escalas micrométricas e manométricas por meio da análise de viabilidade celular em fibroblastos primários humanos HDFn.

Avaliar os parâmetros microtomográficos de volume ósseo, porcentagem do volume ósseo, espessura do trabeculado ósseo e separação e número de trabéculas, durante o processo de reparo ósseo em defeitos críticos criados em calvária de ratos tratados com membrana de látex incorporada ou não com β -TCP nas escalas micrométrica e manométrica.

Determinar a taxa de aposição mineral no decorrer do processo de reparo ósseo em defeitos críticos criados em calvária de ratos tratados com membrana de látex incorporada ou não com β -TCP nas escalas micrométrica e manométrica, empregando a análise de microscopia confocal a laser.

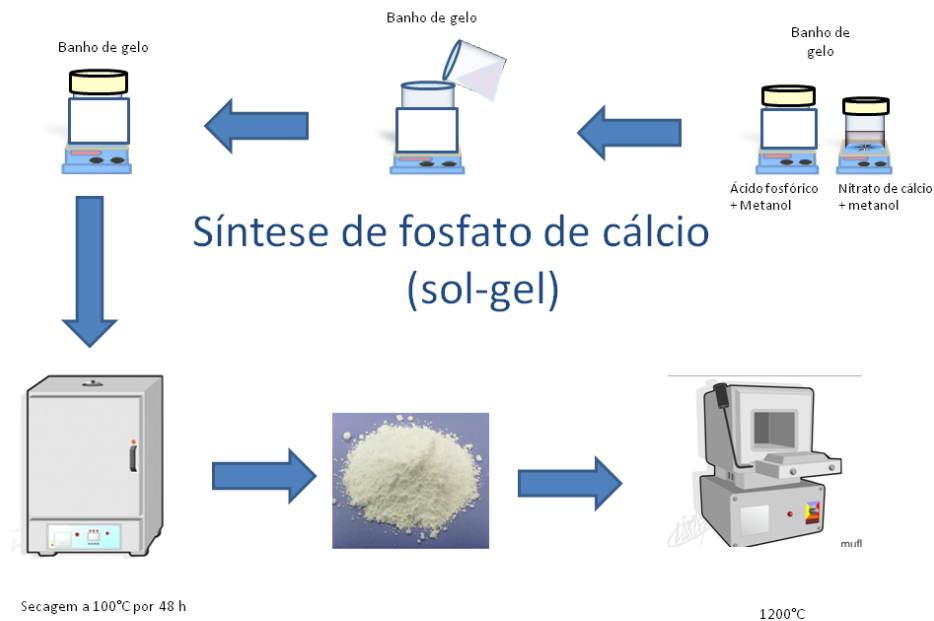
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese do β -TCP pelo método de secagem do sol-gel

Esta metodologia foi realizada de acordo com trabalho prévio publicado [36]. Os materiais para a síntese do fosfato de cálcio (β -TCP) foram os reagentes de qualidade analítica: nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PA-ACS) (Synth, Acessórios, Equipamentos e Reagentes para Laboratórios, São Paulo, Brasil) e ácido fosfórico H_3PO_4 85% (Merk Milipore, São Paulo, Brasil), resfriado em banho de gelo, que foram dissolvidos separadamente em álcool metílico CH_3OH (PA-ACS) (Synth, Acessórios, Equipamentos e Reagentes para Laboratórios, São Paulo, Brasil) sob agitação. A solução de ácido fosfórico foi adicionada à solução de nitrato de cálcio em banho de gelo permanecendo sob agitação (Figura 1). As concentrações dos reagentes foram escolhidas de modo a obter as razões molares Ca/P de 1,00; 1,65 e 1,50.

A solução obtida foi seca a 100°C até a evaporação do solvente, e o pó obtido foi fracionado e tratado a temperatura de 1200°C com uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ para a obtenção da fase β do tricálcio fosfato (β -TCP). A identidade da fase foi confirmada através das fichas cristalográficas padrões da base de dados software Search Match®.

Figura 1 - Fluxograma da síntese para a obtenção do fosfato de cálcio



Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.2 Extração e preparação do látex natural (LN)

O látex natural utilizado nesta pesquisa foi adquirido da BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA (Guarantã – SP) e a manufatura da membrana foi realizada de acordo com trabalhos prévios publicados [12-17]. Este látex foi obtido da mistura de dois clones: RRIM 600 e PB 235 (Lote: 01703/13). Depois da extração, o látex foi mantido em fase líquida através da adição de hidróxido de amônio corrigindo a acidez e estabilizando o meio ao pH igual a 10,2. Posteriormente, o polímero foi submetido à centrifugação de 8000 g por 2 h, com o objetivo de diminuir a quantidade de proteínas de alto peso molecular, responsáveis por reações de hipersensibilidade. Após obtenção das membranas, estas foram cortadas, empregando um vazador manual de aço-carbono de 8 mm de diâmetro (LiTH Ferramentas, São Paulo, Brasil), no intuito de potencializar a incorporação da beta-tricálcio fosfato nas membranas e padronizar o tamanho da mesma, quando empregada no procedimento cirúrgico.

3.3 Incorporação do β -TCP nas membranas pelo método Biomimético

A membrana de látex modificada foi imersa em solução padrão de fluido corpóreo +(SBF), empregando o método biomimético. O fluido corporal simulado (1,5 SBF) foi preparado, usando reagentes de grau analítico em água desmineralizada e tamponada a 37°C e pH 7,4 por 7 dias, seguindo protocolo descrito na literatura científica [13]. Após o período de imersão, os substratos foram retirados das soluções, lavados com água desmineralizada e a membrana de látex revestida/funcionalizada foi seca em temperatura ambiente. A composição da solução de SBF foi modificada para permitir diferentes revestimentos de fosfato de cálcio na superfície e interior da membrana de látex.

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Energia Dispersiva de raios X (EDS)

As análises das microscopias foram realizadas para estudar as morfologias (micrométrica e nanométrica) das partículas de β -TCP, na superfície e no interior das membranas, e para realizar uma análise qualitativa por EDS para confirmar a presença dos elementos químicos Ca e P. Na preparação do β -TCP na forma de pó, o mesmo foi disperso em 50 mL de álcool isopropílico (Quimis; 99,5%), onde a solução foi agitada por dois minutos com o auxílio de uma ponta ultrasônica (Unique, modelo DES 500W), com o intuito de desaglomerar o material presente na solução. Em seguida, algumas gotas do material sobrenadante foram depositadas sobre substratos de silício condutor e seco em temperatura ambiente [36]. A preparação das membranas para a microscopia foi realizada de duas maneiras. Na primeira as membranas foram cortadas e posicionadas no porta amostra do equipamento para a análise da superfície. Na segunda, as membranas foram submersas em nitrogênio líquido por 2 min e fraturadas e posicionadas no suporte com o lado da fratura para cima, com o objetivo de analisar a presença do β -TCP no interior das membranas. Após estas preparações, as amostras foram recobertas com ouro durante 20 s, para obtenção das fotomicrografias. As micrografias e as análises EDS foram obtidas em microscópio eletrônico FEG-MEV; JEOL modelo 7500F localizado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UNESP – Araraquara, utilizando uma tensão de 10-25kV.

3.5 Análise de viabilidade celular

Esta metodologia foi realizada de acordo com trabalho prévio publicado [37], de modo que fibroblastos dérmicos humanos primários (HDFn; neonatal, normal; ATCC® PCS-201-010™) foram cultivados em atmosfera umidificada a 37 °C com 5% de CO₂ em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S; Sigma-Aldrich). Previamente ao tratamento, as membranas à base de látex foram esterilizadas com luz UV por 1 hora e incubadas em DMEM com 10% de SFB a 37 °C por 24 horas, em tubos Falcon (P15), com volume final de 2,6 mL (0,2 g/mL). Os eluatos obtidos foram posteriormente filtrados em filtro com poro de 0,2 µm. As células HDFn foram tripsinizadas, contadas e semeadas em placas de 96 poços, à densidade de 104 células/poço (n = 3 por grupo), conforme as diretrizes da norma ISO 10993–5:2009. Após 24 horas de adesão celular, o meio de cultura foi removido e substituído por 100 µL dos eluatos correspondentes aos seguintes grupos experimentais: (1) Controle negativo (DMEM 10% SFB), (2) Controle positivo (DMSO 50% em DMEM 10% SFB), (3) Membrana de látex (ML) nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%, (4) Membrana de látex com Beta- tricalcio fosfato de cálcio microestruturado (Micro) nas mesmas concentrações e (5) Membrana de látex com beta-tricálcio fosfato nanoestruturado (Nano) nas mesmas concentrações (Figura 1A).

Após 24, 48 e 72 horas de incubação com os respectivos grupos experimentais, o meio de cultura foi cuidadosamente removido, e os poços foram lavados uma vez com 100 µL de PBS estéril. Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução de resazurina (10% em DMEM 1X; concentração final de 25 µg/mL) a cada poço. As placas foram incubadas por 4 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ (Figura 1B). A fluorescência resultante, proporcional à atividade metabólica das células viáveis, foi medida utilizando um leitor de microplacas com filtros de excitação/emissão de 560/590 nm. Este método baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas de reduzir o corante azul não fluorescente resazurina em resorufina, um composto rosa fluorescente. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes. Este ensaio é amplamente utilizado, devido à sua sensibilidade, simplicidade e capacidade de fornecer resultados quantitativos sobre a viabilidade celular.

Figura 2 - A) Ilustração do planejamento de estimulação; B) Ilustração da interpretação da análise de viabilidade celular



Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.6 Animais e Grupos Experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi iniciado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. O projeto foi delineado de acordo com as diretrizes da ARRIVE guidelines [38,39].

Foram utilizados 96 ratos *wistar* machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com peso corporal entre 400 e 500g. Os animais serão pareados no começo do estudo para diminuir o desvio padrão. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP e foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, alimentados com ração sólida padrão e água “ad libitum” durante todo o experimento, exceto no período de 12h antecedentes ao procedimento cirúrgico.

Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), poder de teste de 80%, sendo definido alpha como 0,05; definiu-se que 8 ratos por grupo de análise microtomográfica seriam necessários para comparar os diferentes grupos. Foi criado um defeito crítico de 6 mm na calvária de cada animal e cada defeito foi tratado de acordo com a terapêutica proposta para cada grupo experimental:

Grupo GC (Grupo Coágulo) - O defeito foi preenchido apenas por coágulo sanguíneo sem recobrimento de nenhuma membrana;

Grupo ML – (Grupo Membrana Látex) - O defeito foi recoberto com Membrana de látex;

Grupo Micro – (Grupo Membrana de Látex + β -TCP Micro) - O defeito foi recoberto com Membrana de látex incorporada com β -TCP na escala micrométrica;

Grupo Nano – (Grupo Membrana de Látex + β -TCP Nano) - O defeito foi recoberto com Membrana de látex incorporada com β -TCP na escala nanométrica.

Os animais foram divididos em três períodos de avaliação correspondente ao tempo de eutanásia: 15, 30 e 60 dias, cada período foi composto por 8 animais que foram empregados na análise microtomográfica.

3.7 Procedimento Cirúrgico

Todos os animais permaneceram em jejum por 12 horas antes do procedimento cirúrgico. Os animais foram sedados pela administração intraperitoneal de 90 mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil). Após a sedação realizou-se a tricotomia na região fronto-parietal do animal seguido do seu posicionamento em decúbito ventral. Posteriormente foi realizada a anti-sepsia do local cirúrgico com PVPI degermante e tópico (PVPI 10%, Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil) e aposição de campos estéreis. Para complementação anestésica e melhora da hemostasia durante o procedimento, os animais receberam infiltração local de cloridrato de mepivacaína 0.3 ml/Kg (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França).

Para o acesso cirúrgico, foi realizado um incisão em U de 2 cm de cada lado com um lâmina de bisturi 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japan) montada em um cabo número 3 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA) na calvaria do animal, seguido por descolamento mucoperiosteal do retalho e exposição da calota craniana. Uma broca trefina (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brazil) de 5 mm de diâmetro interno, montada em um contra-ângulo de redução de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brazil) conectado a uma peça de mão (BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brazil) com velocidade de 800 rpm foi utilizada para osteotomia bicortical de 6 mm de diâmetro na região central da calvaria, abrangendo os dois ossos parietais. O osso parietal osteotomizado foi removido cuidadosamente para preservar a

integridade da dura-máter [30,34] e o defeito tratado de acordo com os grupos anteriormente citados, ou seja, coágulo sanguíneo ou as membranas de latex com ou sem beta-tricálcio fosfato nas escalas micro e nanométricas. As membranas em seus respectivos grupos, apresentando diâmetro de 8 mm foram acomodadas passivamente sobre o defeito ósseo e fixadas em suas extremidades com emprego do cianocrilato de metila (PeriAcryl 90, Wilcos, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil). O retalho mucoperiosteal foi reposicionado e suturado com fio reabsorvível de poliglactina 910 espessura 4.0 (Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) nos pontos internos e com nylon 5-0 (ETHILON®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brazil) com pontos simples nos pontos externos. No pós-operatório imediato os animais receberam administração intramuscular de Pentabiótico (0,1 ml/Kg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) em dose única e de Dipirona Sódica 50 mg/kg/dia, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil) (ANEXO B).

3.8 Eutanásia e Coleta das Amostras

A eutanásia foi realizada nos períodos de 15, 30 e 60 dias pós-cirúrgicos, sendo 8 animais para cada grupo experimental. Os animais foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de anestésico, tiopental sódico (150mg/kg) e lidocaína 2% (10 mg/kg). Após eutanásia, as calvarias foram cuidadosamente removidas em bloco, o tecido mole excedente eliminado, uma osteotomia para coleta da peça com uma margem de 2 cm do defeito foi realizada, e a amostra fixada em solução de formol neutro tamponado a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, São Paulo, Brasil) durante um período de 48h, seguidos de banho em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças foram armazenadas em álcool 70%.

3.9 Microtomografia Computadorizada (micro-CT)

As peças (8 espécimes por grupo experimental em cada período de eutanásia) foram removidas da solução de álcool 70% e colocadas em papel absorvente, imediatamente antes de serem colocadas no suporte de fixação, no intuito de evitar micromovimentação, durante realização da tomografia microtomográfica. Após o suporte de fixação, contendo as peças foi colocado no interior do microtomógrafo, de acordo com metodologia descrita em estudo

prévio publicado [36]. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo computadorizado Skyscan 1272 (Bruker, Kontich, BeMLium). Os parâmetros utilizados foram: tamanho do pixel 11,87 μm , 50 kVp, filtro de 0,5mm de alumínio, rotação 0.6° e rotação do arco de 180°. Após o escaneamento, as imagens tridimensionais foram reconstruídas, utilizando um software de reconstrução NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0) para a reconstrução tridimensional (3D) das calvárias na escala de cinza, na qual as linhas vermelhas delimitaram a área a ser reconstruída e a linha verde o centro da região de interesse. Após a obtenção das imagens em 3D, o Software DataViewer (SkyScan, Versão 1.4.4) as imagens foram reconstruídas para serem observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital) e foi determinado o volume de interesse (VOI), que foi padronizado e salvo para todas as imagens em uma vista coronal.

Em seguida, as mensurações volumétricas em 3D foram realizadas, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0), no qual foi determinada a região de interesse (ROI), utilizando a ferramenta “Round” devido a morfologia arredondada dos defeitos, sendo essa também padronizada para todas as reconstruções e uma escala de cinza (*thresholds*) de 40 a 181 em um intervalo de 100 camadas. Logo após, foram avaliados e mensurados os valores 3D de volume ósseo (BV), porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.th), número de trabéculas ósseas (Tb.N) e separação do trabeculado (Tb.Sp) do ROI selecionado. Por fim foi realizada a reconstrução de imagem em 3D pelo software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

3.10 Preparação do Material para Análise Confocal a Laser

Esta metodologia foi realizada de acordo com trabalhos prévios publicados [31,33-35]. Após análise microtomográfica, as calvárias foram novamente colocadas em formalina neutra tamponada a 10% por um período de 72h. Em seguida passaram pela etapa de desidratação em concentrações crescentes de alcoóis etanol 60, 70, 80, 90 e 100% gradativamente, com troca de solução a cada 7 dias. Ao término da desidratação, as peças foram incluídas em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Kultzer Heraeus GmbH&Co, Wehrheim, Alemanha) e submetidas ao protocolo para processamento para corte e desgaste de peças em cortes mineralizados. Deste modo, os blocos contendo a calvaria foram cortados em um ponto central, empregando-se um micrótomo com sistema de corte e desgaste (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha). As peças obtidas foram no plano sagital, coincidindo com a sutura

sagital mediana, com secção de aproximadamente 150 μ m de espessura.

Para realização da análise microscópica, as lâminas foram capturadas pelo microscópio a laser confocal Stellaris 5 Leica DM 5 com FLIM, STED, DLS, CRS (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva de 10X (original aumentar 100) no Laboratório Multiusuário da FOA-UNESP – Araçatuba (FINEP 01.12.0530.00-Proinfra-01/2011). Foram obtidas assim, imagens dos fluorocromos calceína e vermelho de alizarina separadamente (osso velho/osso novo) e por fim, estas imagens foram reconstruídas, fornecendo a sobreposição dos fluorocromos utilizados para avaliação do turnover ósseo pela taxa de aposição mineral (MAR). As imagens foram transportadas para o programa computacional analisador de imagens Image J (Software de Processamento e Análise de Imagem, Ontario, ON, Canadá). Após calibração da régua, e através da ferramenta “Straight Line or freehands”, a área de precipitação dos fluorocromos (calceína/alizarina) foi mensurada. Na análise da aposição óssea mineral, a partir da ferramenta Straight Line or freehands foram traçadas 10 medidas dentro do canal medular, estendendo-se da margem externa da calceína em direção a margem externa da alizarina, sendo o valor obtido, dividido por 10, que representa o intervalo de dias entre as injeções dos dois fluorocromos analisados (figura 6), de acordo com metodologia prévia publicada [40]. O resultado representou o valor da taxa de aposição mineral (MAR) em micrômetros [31].

3.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, California, USA). Os dados da viabilidade celular (cultura de células em fibroblastos) foram tabulados, usando análise descritiva, e submetido a análise one-way ANOVA, seguido do post-test de Bonferroni. Os dados dos parâmetros tomográficos (análise Micro-CT) e da taxa de aposição mineral (microscopia confocal a Laser) foram tabulados e após avaliados em relação à sua normalidade, empregando o teste de Shapiro Wilk. Depois os dados foram submetidos ao teste de ANOVA two way, seguido do teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos e períodos. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Viabilidade Celular

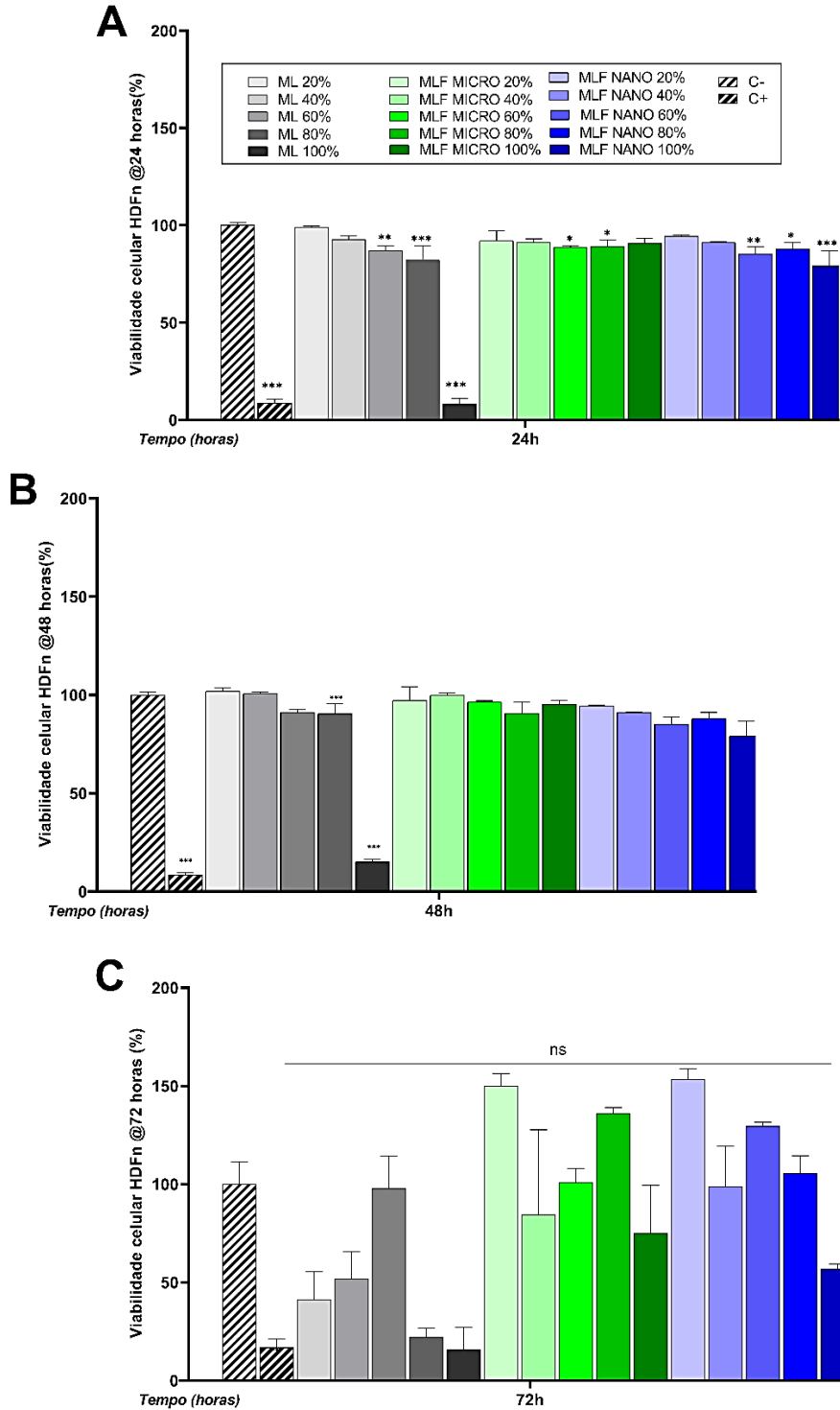
No intuito de compreender o impacto da composição e concentração das membranas na viabilidade celular, avaliou-se a atividade metabólica de células HDFn expostas por 24, 48 e 72 horas às membranas de látex (ML), membranas de látex com fosfato de cálcio microestruturado (Micro) e com fosfato de cálcio nanoestruturado (Nano), nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. Às 24 horas os resultados demonstraram que as membranas Micro e Nano, especialmente nas concentrações mais elevadas (100% e 80%), mantiveram a viabilidade celular em níveis comparáveis ao controle negativo, indicando baixa citotoxicidade e boa biocompatibilidade com fibroblastos dérmicos humanos. Em contrapartida, o controle positivo promoveu uma acentuada redução na viabilidade, confirmando a sensibilidade do ensaio. De forma geral, a adição do Beta-tricálcio fosfato micro ou nanoestruturado à matriz de látex pareceu favorecer a citocompatibilidade das membranas, sugerindo seu potencial uso em aplicações biomédicas que requerem integridade e viabilidade de fibroblastos (Figura 2A; Tabela 1).

No período de 48 h, os efeitos sobre a viabilidade celular tornaram-se mais pronunciados. Todas as concentrações dos grupos ML, Micro e Nano apresentaram viabilidade significativamente superior ao C+ ($p < 0,05$), com exceção do grupo Nano 20%, que não diferiu estatisticamente do C- ($p > 0,05$), sugerindo manutenção da citocompatibilidade. Os grupos ML e Micro (100%, 80% e 60%) apresentaram viabilidade significativamente superior ao C- ($p < 0,01$), o que pode indicar um efeito bioestimulador sobre os fibroblastos. O grupo Micro demonstrou padrão de resposta celular estável até 40%, enquanto o grupo nano manteve esse perfil até 60%, apresentando queda progressiva nas menores concentrações. Tais resultados reforçam o potencial da adição do Beta-tricálcio fosfato, especialmente na forma microestruturada em aperfeiçoar a interação celular com a matriz polimérica, promovendo maior viabilidade em tempos prolongados de exposição (Figura 2B; Tabela 2).

No período de 72 h, observou-se uma tendência de redução da viabilidade celular nas concentrações mais elevadas dos grupos ML, Micro e Nano, quando comparadas aos tempos anteriores, indicando uma possível resposta celular relacionada ao tempo prolongado de exposição. No entanto, mesmo após 72 horas, concentrações intermediárias (60% e 40%) dos grupos Micro e Nano mantiveram viabilidade estatisticamente superior ao controle positivo (p

< 0,05), sugerindo preservação parcial da citocompatibilidade. Especificamente, o grupo Micro 60% e 40% destacaram-se com as maiores médias de viabilidade celular, superiores inclusive ao controle negativo ($p < 0,01$), evidenciando um possível efeito bioestimulador prolongado. Em contraste, o grupo ML 100% apresentou viabilidade significativamente inferior ao controle negativo ($p < 0,05$), o que pode indicar citotoxicidade em altas concentrações e tempos prolongados de exposição. Esse padrão reforça a hipótese de que a adição do Beta-tricálcio fosfato à matriz de látex, sobretudo na forma microestruturada, modula favoravelmente a resposta celular ao longo do tempo (Figura 2C; Tabela 3).

Figura 3 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas: látex natural (ML), látex com Beta-tricálcio fosfato microestruturado (Micro) e látex com Beta-tricálcio fosfato nanoestruturado (Nano), nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C)



A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução da resazurina e expressa como porcentagem relativa ao controle negativo (c-).

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey.

Os níveis de significância estatística estão indicados por símbolos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 1 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 24 h

(continua)

Grupo Comparados	Nível de Significância	Valor de p
C- vs. C+	***	<0.001
C- vs. ML 60%	**	0.007
C- vs. ML 80%	***	<0.001
C- vs. ML 100%	***	<0.001
C- vs. ML MICRO 60%	*	0.035
C- vs. ML MICRO 80%	*	0.047
C- vs. ML NANO 60%	**	0.001
C- vs. ML NANO 80%	*	0.017
C- vs. ML NANO 100%	***	<0.001
C+ vs. ML 20%	***	<0.001
C+ vs. ML 40%	***	<0.001
C+ vs. ML 60%	***	<0.001
C+ vs. ML 80%	***	<0.001
C+ vs. MLF MICRO 20%	***	<0.001
C+ vs. MLF MICRO 40%	***	<0.001
C+ vs. MLF MICRO 60%	***	<0.001
C+ vs. MLF MICRO 80%	***	<0.001
C+ vs. MLF MICRO 100%	***	<0.001
C+ vs. MLF NANO 20%	***	<0.001
C+ vs. MLF NANO 40%	***	<0.001
C+ vs. MLF NANO 60%	***	<0.001
C+ vs. MLF NANO 80%	***	<0.001
C+ vs. MLF NANO 100%	***	<0.001
ML 20% vs. ML 60%	*	0.020
ML 20% vs. ML 80%	***	<0.001
ML 20% vs. ML 100%	***	<0.001
ML 20% vs. MLF NANO 60%	**	0.004

Tabela 1 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 24 h

(conclusão)

Grupo Comparados	Nível de Significância	Valor de p
ML 20% vs. MLF NANO 80%	*	0.048
ML 20% vs. MLF NANO 100%	***	<0.001
ML 40% vs. ML 100%	***	<0.001
ML 40% vs. MLF NANO 100%	**	0.004
ML 60% vs. MLF 100%	***	<0.001
ML 80% vs. MLF 100%	***	<0.001
ML 80% vs. MLF NANO 20%	*	0.013
ML 100% vs. MLF MICRO 20%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF MICRO 40%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF MICRO 60%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF MICRO 80%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF MICRO 100%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF NANO 20%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF NANO 40%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF NANO 60%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF NANO 80%	***	<0.001
ML 100% vs. MLF NANO 100%	***	<0.001
MLF MICRO 20% vs. MLF NANO 100%	**	0.008
MLF MICRO 40% vs. MLF NANO 100%	*	0.013

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução da resazurina e expressa como porcentagem relativa ao controle negativo (c-).

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey.

Os níveis de significância estatística estão indicados por símbolos (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001) e os valores de p estão indicados para cada comparação.

Tempo de estimulação 24 horas

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 2 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 48 h

(continua)

Grupos Comparados	Nível de Significância	Valor de p
C- vs. C+	***	<,001
C- vs. ML 100%	***	<,001
C- vs. MLF NANO 80%	***	<,001
C- vs. MLF NANO 100%	***	<,001
C+ vs. ML 20%	***	<,001
C+ vs. ML 40%	***	<,001
C+ vs. ML 60%	***	<,001
C+ vs. ML 80%	***	<,001
C+ vs. MLF MICRO 20%	***	<,001
C+ vs. MLF MICRO 40%	***	<,001
C+ vs. MLF MICRO 60%	***	<,001
C+ vs. MLF MICRO 80%	***	<,001
C+ vs. MLF MICRO 100%	***	<,001
C+ vs. MLF NANO 20%	***	<,001
C+ vs. MLF NANO 40%	***	<,001
C+ vs. MLF NANO 60%	***	<,001
C+ vs. MLF NANO 80%	***	<,001
C+ vs. MLF NANO 100%	***	<,001
ML 20% vs. ML 100%	***	<,001
ML 20% vs. MLF NANO 80%	***	<,001
ML 20% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
ML 40% vs. ML 100%	***	<,001
ML 40% vs. MLF NANO 80%	***	<,001
ML 40% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
ML 60% vs. ML 100%	***	<,001
ML 60% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
ML 80% vs. ML 100%	***	<,001

Tabela 2 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 48 h

(continuação)

Grupos Comparados	Nível de Significância	Valor de p
ML 80% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
ML 100% vs. MLF MICRO 20%	***	<,001
ML 100% vs. MLF MICRO 40%	***	<,001
ML 100% vs. MLF MICRO 60%	***	<,001
ML 100% vs. MLF MICRO 80%	***	<,001
ML 100% vs. MLF MICRO 100%	***	<,001
ML 100% vs. MLF NANO 20%	***	<,001
ML 100% vs. MLF NANO 40%	***	<,001
ML 100% vs. MLF NANO 60%	***	<,001
ML 100% vs. MLF NANO 80%	***	<,001
ML 100% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
MLF MICRO 20% vs. MLF NANO 80%	**	,001
MLF MICRO 20% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
MLF MICRO 60% vs. MLF NANO 80%	**	,002
MLF MICRO 60% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
MLF MICRO 80% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
MLF MICRO 100% vs. MLF NANO 80%	**	,006
MLF MICRO 100% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
MLF NANO 20% vs. MLF NANO 80%	***	<,001

Tabela 2 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 48 h

(conclusão)

Grupos Comparados	Nível de Significância	Valor de p
MLF NANO 20% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
MLF NANO 40% vs. MLF NANO 80%	***	<,001
MLF NANO 40% vs. MLF NANO 100%	***	<,001
MLF NANO 60% vs. MLF NANO 80%	**	,002
MLF NANO 60% vs. MLF NANO 100%	***	<,001

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução da resazurina e expressa como porcentagem relativa ao controle negativo (c-).

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey.

Os níveis de significância estatística estão indicados por símbolos (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001) e os valores de p estão indicados para cada comparação.

Tempo de estimulação 48 horas

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tabela 3 - Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos humanos (HDFn) expostos aos eluatos das membranas ML, Micro e Nano nas concentrações de 100%, 80%, 60%, 40% e 20%. As células foram incubadas em meio livre de soro por 72 h

Grupos Comparados	Nível de Significância	Valor de p
C+ vs. ML NANO 20%	*	0,029
ML 100% vs. ML NANO 20%	*	0,043

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução da resazurina e expressa como porcentagem relativa ao controle negativo (c-).

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey.

Os níveis de significância estatística estão indicados por símbolos (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001) e os valores de p estão indicados para cada comparação.

Tempo de estimulação 72 horas

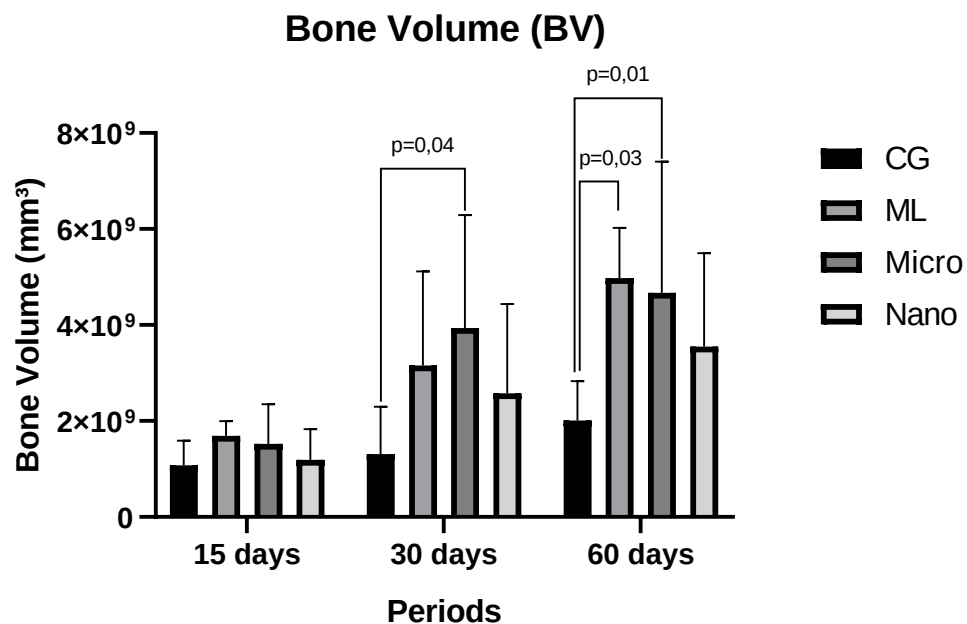
Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.2 Análise Microtomográfica

4.2.1 Volume Ósseo (BV)

No parâmetro volume ósseo (Figura 2), Micro nos períodos de 30 ($3,93 \cdot 10^9 \pm 2,35 \cdot 10^9$) e 60 dias ($4,66 \cdot 10^9 \pm 2,73 \cdot 10^9$) apresentou maior deposição mineral, levando a maior presença de volume ósseo, sendo superior quando comparado ao GC em 30 ($1,31 \cdot 10^9 \pm 9,84 \cdot 10^9$) e 60 dias ($2,00 \cdot 10^9 \pm 8,19 \cdot 10^9$), ($p=0,04$ e $p=0,01$, respectivamente em 30 e 60 dias). Em 60 dias, pode-se observar diferença estatística de ML ($4,977 \cdot 10^9 \pm 1,046 \cdot 10^9$) comparado a GC ($2,00 \cdot 10^9 \pm 8,19 \cdot 10^9$) ($p=0,03$).

Figura 4 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro BV na análise por MicroCT. ‖ representa diferença estatística entre os grupos

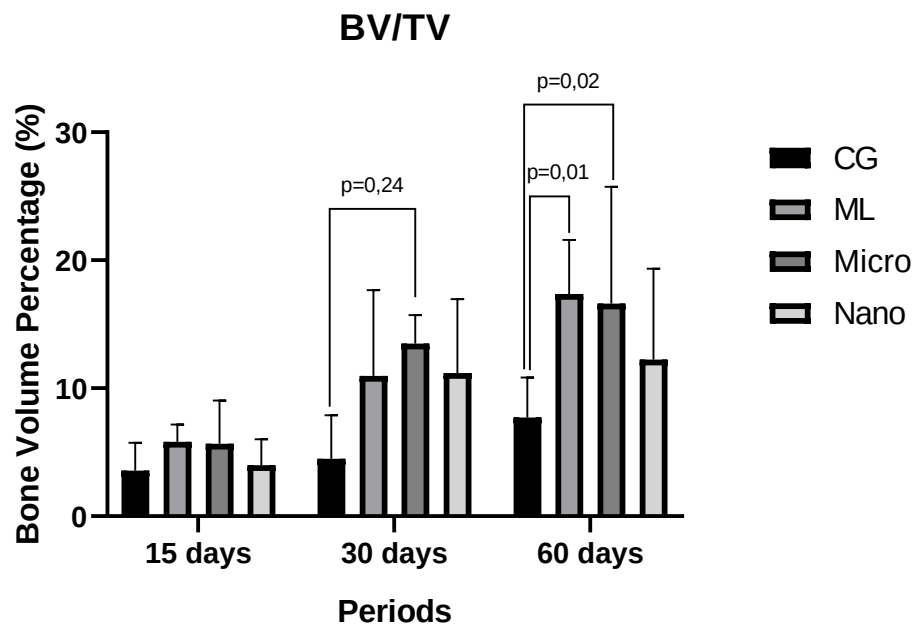


Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.2.2 Porcentagem de Volume Ósseo (BV/TV)

No parâmetro de porcentagem de volume ósseo (BV/TV) (Figura 3), diferenças estatísticas foram encontradas, com resultados muito semelhantes à BV. Os grupos ML em 60 dias (17,35 $\pm$ 4,22) e Micro (16,60 $\pm$ 9,13) apresentaram médias superiores ao grupo GC (7,70 $\pm$ 3,11), apresentando diferença estatística ($p=0,01$ e $p=0,02$, respectivamente). No período de 30 dias, Micro (13,49 $\pm$ 2,21) apresentou valores superiores, quando comparado a CG, ($p=0,24$).

Figura 5 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro BV/TV na análise por MicroCT. ‖ representa diferença estatística entre os grupos

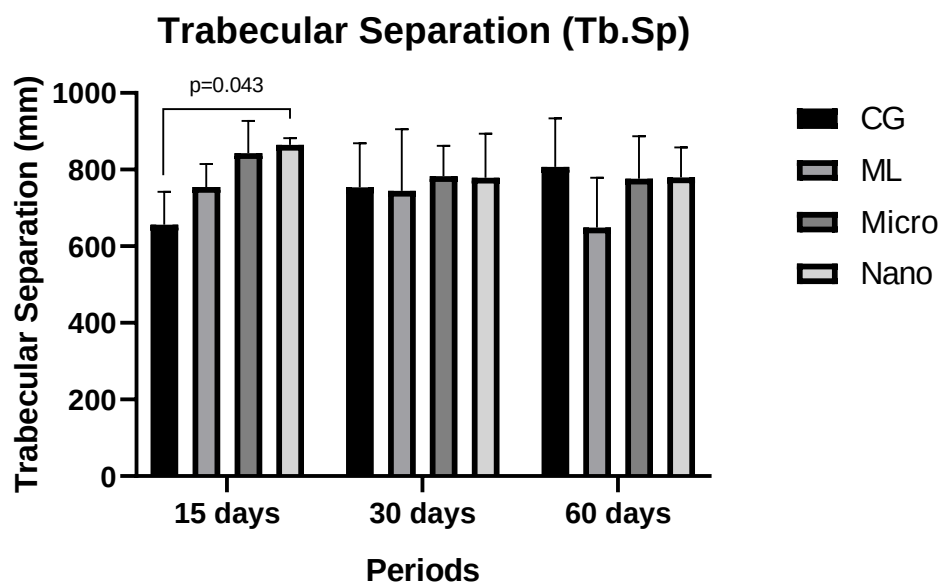


Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.2.3 Separação trabecular

No parâmetro separação trabecular houve diferença estatística, no período de 15 dias, entre CG (656,5+-85,34) e Nano (864,4+-17,93), com valor de $p=0,043$. Entre os demais grupos e períodos não houve diferença estatística.

Figura 6 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.sp na análise por MicroCT. ‖ representa diferença estatística entre os grupos

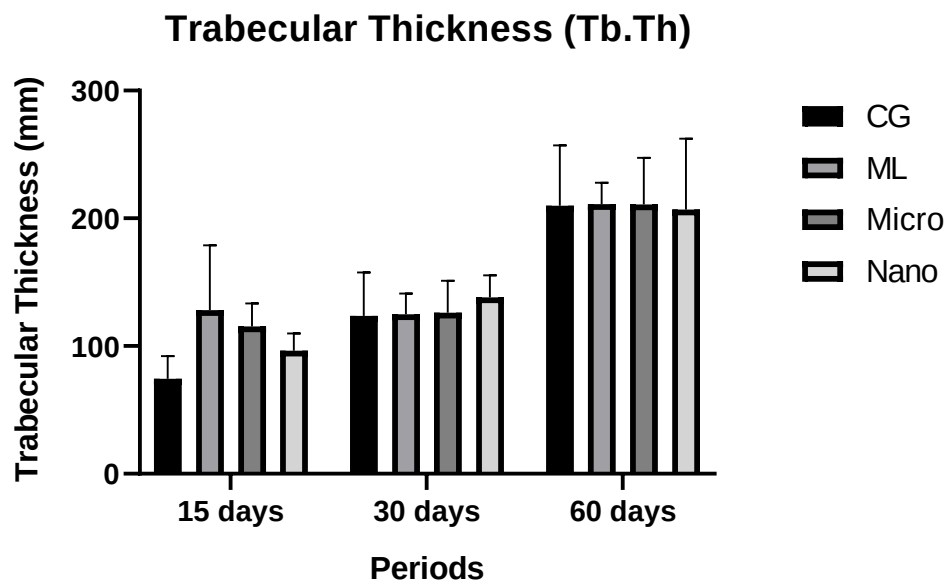


Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.2.4 Espessura trabecular

No parâmetro espessura trabecular não houve diferença estatística entre grupos nos diferentes períodos.

Figura 7 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.th na análise por MicroCT

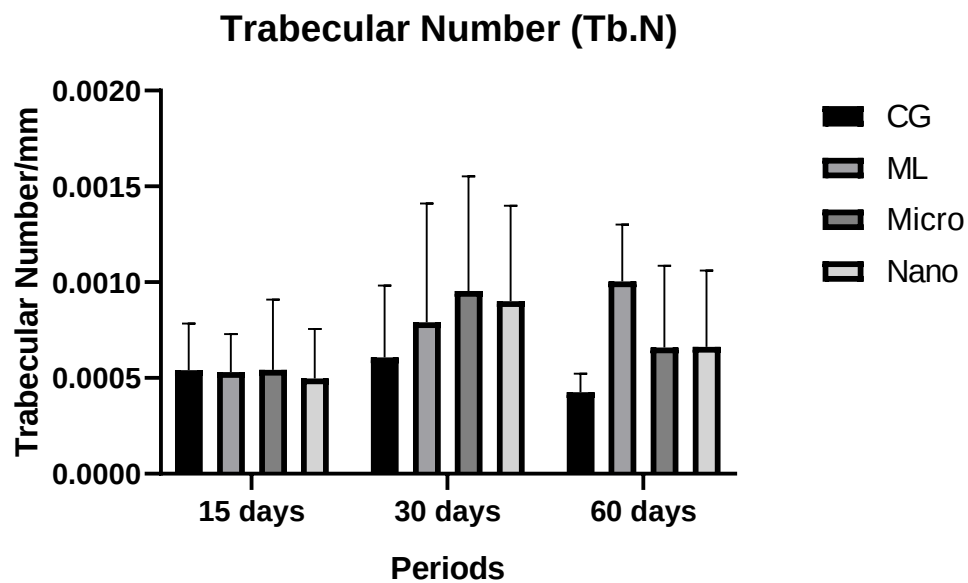


Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.2.5 Número de trabéculas

No parâmetro número de trabéculas não houve diferença estatística entre os grupos nos diferentes períodos.

Figura 8 - Gráfico comparativo das médias e desvio padrão observadas no Parâmetro tb.n na análise por MicroCT

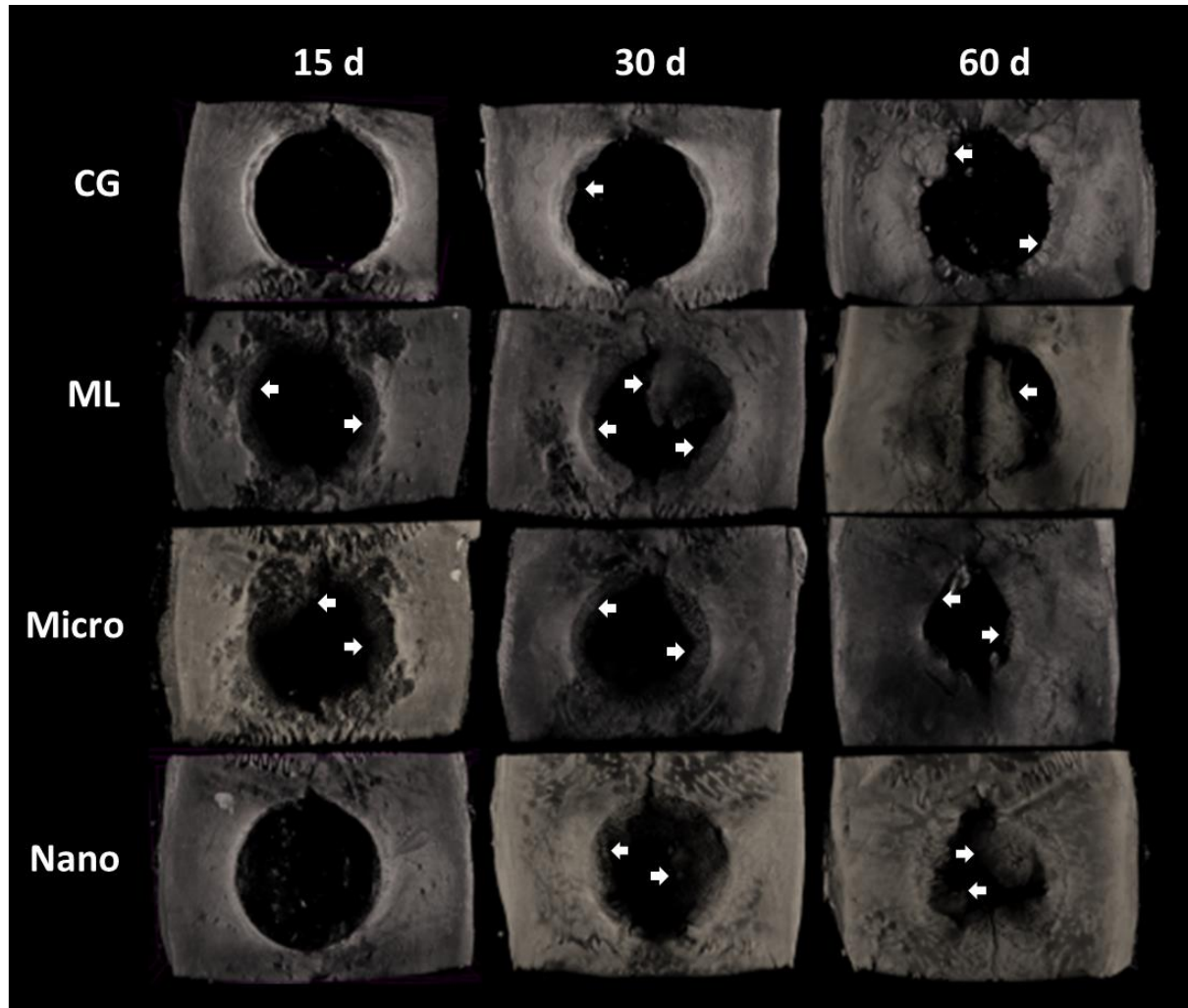


Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.2.6 Análise Qualitativa

Na avaliação qualitativa dos defeitos ósseos, observou-se que os grupos Nano e Micro apresentaram uma deposição mineral mais homogênea, iniciando da periferia em direção ao centro do defeito crítico. Durante os 15 primeiros dias, os grupos com membranas contendo beta-tricálcico fosfato exibiram um estímulo inicial para uma maior deposição mineral, sendo esse efeito mais evidente nas avaliações de 30 e 60 dias. O grupo Micro exibiu uma deposição mineral gradual, progressiva e centrípeta, porém não houve deposição mineral por completo, permitindo o fechamento total do defeito em nenhum dos grupos e períodos analisados.

Figura 9 - Imagens representativas da reconstrução em 3D dos grupos GC, ML, Micro e Nano nos períodos de 15, 30 e 60 dias a partir da microtomografia computadorizada. Setas brancas representam a área de deposição mineral óssea nas margens dos defeitos.



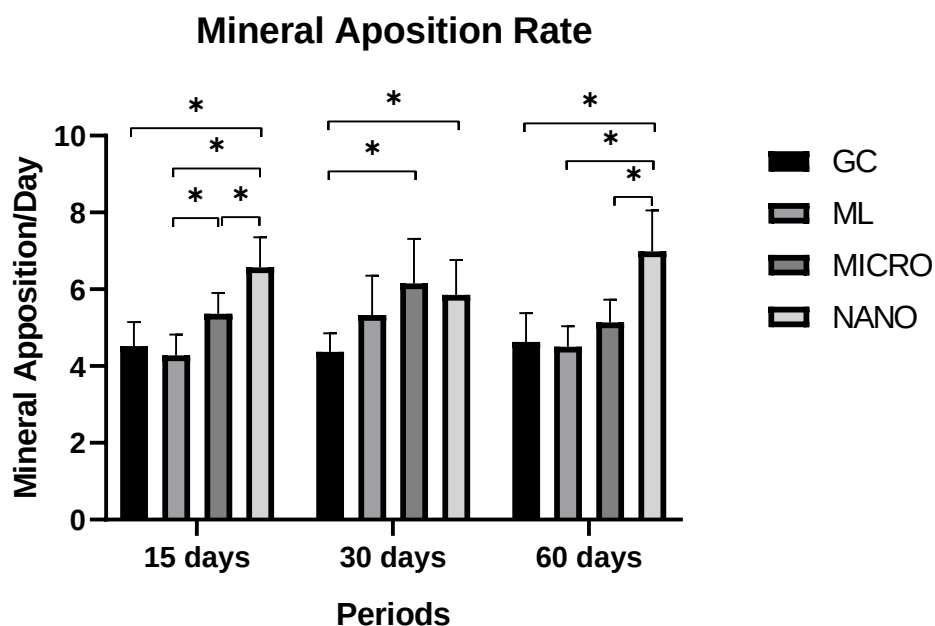
Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.3 Microscopia confocal a laser

4.3.1 Taxa de aposição mineral (MAR)

A análise da Taxa de Aposição Mineral Diária (MAR) revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais ao longo dos diferentes períodos avaliados (15, 30 e 60 dias). O grupo Nano apresentou a maior MAR tanto aos 15 dias ($6,57 \pm 0,78$ mm/dia) quanto aos 60 dias ($6,98 \pm 1,06$ mm/dia), com significância estatística ($p < 0,0001$). Aos 15 dias, as membranas do grupo Micro ($5,32 \pm 0,54$ mm/dia) e Nano foram estatisticamente superiores ao grupo ML ($4,27 \pm 0,54$ mm/dia), com diferenças significativas ($p = 0,0413$ para Micro e $p < 0,0001$ para Nano). Aos 30 dias, os grupos Micro ($6,15 \pm 1,15$ mm/dia) e Nano ($5,85 \pm 0,90$ mm/dia) também apresentaram MAR significativamente maior em comparação ao grupo controle GC ($4,36 \pm 0,48$ mm/dia), com $p < 0,0001$ e $p = 0,0005$, respectivamente. Comparando diretamente as membranas contendo beta-tricalcio fosfato, a forma Nanoestruturada demonstrou MAR superior à forma Microestruturada aos 15 dias ($p = 0,0120$), diferença evidenciada também aos 60 dias, do grupo Nano ($6,98 \pm 1,06$ mm/dia) superando significativamente o grupo Micro ($5,13 \pm 0,59$ mm/dia; $p < 0,0001$).

Figura 10 - Gráfico representativo das médias de mineralização óssea/dia de acordo com os grupos e períodos avaliados nesse estudo. ($p < 0,0001$)

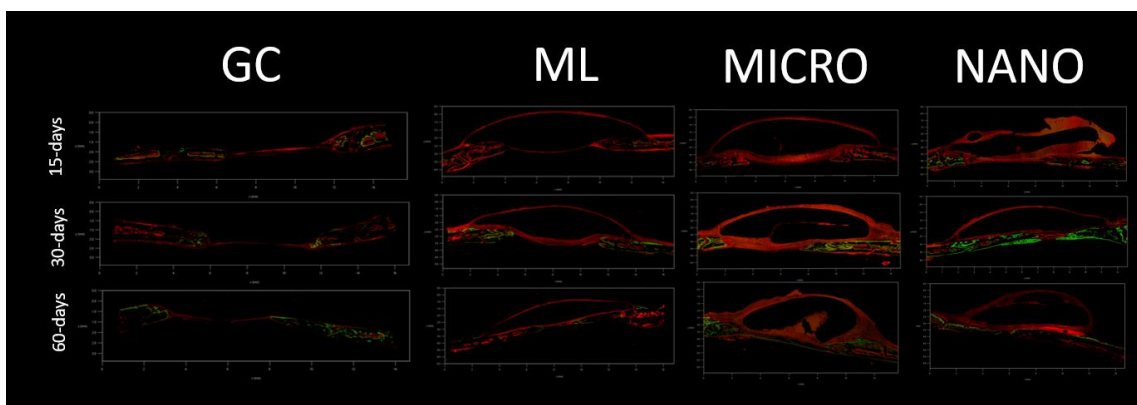


Fonte: Elaborado pela própria autora.

4.3.2 Análise qualitativa

A avaliação qualitativa, realizada por meio de marcação com calceína e alizarina, evidenciou a precipitação de cálcio na matriz orgânica na forma de linhas fluorescentes, indicando atividade de mineralização. Nas regiões correspondentes ao defeito crítico na calvária, foi possível observar a presença da membrana nos grupos tratados (ML, Micro e Nano), confirmando sua permanência no local, durante todo o período experimental avaliado. Quanto ao processo de reparo ósseo, os grupos Nano e Micro apresentaram maior aposição mineral óssea, com fechamento quase completo do defeito aos 30 e 60 dias. Em 60 dias, o grupo ML também demonstrou avanço na aposição mineral, embora de forma menos pronunciada, quando comparado aos grupos Nano e Micro. Por outro lado, o grupo GC apresentou escassa aposição mineral na região do defeito, principalmente no centro do defeito, evidenciando a falha óssea, sugerindo baixa atividade reparadora neste grupo e caracterizando assim o tamanho do defeito como crítico.

Figura 11 - Imagens do defeito crítico da calota com a presença de coágulo e membranas, em seus respectivos grupos, obtidas através da análise de microscopia confocal a laser. Imagens evidenciando área óssea mineral corada com fluorocromo calceína (verde) e com fluorocromo alizarina (vermelho)



Fonte: Elaborado pela própria autora.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, a hipótese nula foi refutada, uma vez que as membranas de látex com ou sem incorporação de beta-tricálcio fosfato se mostraram biocompatíveis e proporcionaram deposição mineral e permitiram maiores taxas de aposição mineral, quando comparado ao reparo ósseo espontâneo de defeitos críticos em calvária de ratos. Neste sentido e considerando que o período inflamatório agudo, crucial para o processo de reparação tecidual, compreende as primeiras 72 horas pós-lesão ou trauma cirúrgico, a manutenção da viabilidade celular nesse intervalo é essencial para a regeneração tecidual. A literatura tem apontado que o látex natural possui propriedades bioativas que estimulam a angiogênese e a proliferação celular, porém, em concentrações elevadas e por períodos prolongados, pode induzir resposta inflamatória exacerbada e ou citotoxicidade, devido à presença de proteínas alergênicas e outras impurezas [36,37]. Neste trabalho, pela análise de viabilidade celular, os resultados mostraram que incorporação do beta-tricálcio fosfato à membrana de látex, especialmente na forma microestruturada, pareceu mitigar esses efeitos negativos, promovendo uma interface mais favorável à adesão e proliferação dos fibroblastos dérmicos humanos. Esses achados *in vitro* sugerem que além de serem biocompatíveis, as membranas micro e nano apresentaram potencial terapêutico como biomateriais para curativos ou dispositivos implantáveis durante a fase inflamatória da raparação, com destaque para concentrações entre 40% e 60%, que mostraram melhor equilíbrio entre bioatividade e segurança celular.

O defeito de tamanho crítico tem sido amplamente utilizado como um modelo experimental pré-clínico, altamente eficaz para avaliar biomateriais em desenvolvimento, incluindo membranas e barreiras usadas na regeneração óssea guiada. Nesse sentido, esses defeitos podem ser criados em diferentes modelos animais, sendo o “*Rattus norvegicus Wistar*” um dos mais comumente utilizados para extrapolar os resultados para humanos, desde que seja respeitada a equivalência nos níveis de remodelação óssea. A reparação do defeito de tamanho crítico deve ser avaliada correlacionando o tamanho do defeito com o período de reparo, bem como a quantidade e qualidade do tecido ósseo reparado.

O uso de membranas e barreiras baseia-se em sua propriedade biológica de osteopromoção. A regeneração óssea guiada (ROG) tem sido uma técnica bem estabelecida na prática cirúrgica para correção de defeitos ósseos. A seletividade obtida com o uso de membranas ou barreiras biológicas permite que a área do defeito seja predominantemente povoada por células osteogênicas, promovendo, assim, uma melhor reparação óssea [41-44].

Neste estudo, a osteopromoção com o uso exclusivo da membrana resultou em uma deposição mineral óssea parcial ao redor dos defeitos críticos, bem como aposição mineral óssea durante o processo de reparo. Esses defeitos críticos são mais comumente empregados em estudos experimentais pré-clínicos com uso de membranas e preenchimento do defeito por substitutos ósseos particulados [45] ou em forma de pasta [46] para obter o fechamento do defeito por completo. Assim, nesta pesquisa quando se optou por um defeito crítico maior, o objetivo não foi desafiar a propriedade de osteopromoção da membrana, mas sim avaliar de uma forma mais eficaz a funcionalização da membrana de látex pela deposição do beta-tricálcio fosfato nas escalas nano ou micrométricas.

Na literatura científica, as membranas de látex foram recentemente introduzidas para promover a reparação óssea [17,47]. Elas possuem a característica física de liberação de fármacos e atuam como uma barreira biológica, razão pela qual foram inicialmente utilizadas na reparação tecidual de feridas cutâneas diabéticas e na neovascularização da retina [24,44]. O principal motivo para estimular o uso de membranas de látex na reparação óssea foi sua propriedade angiogênica [56]. A angiogênese constitui-se uma das etapas fundamentais na fase proliferativa da cicatrização de feridas e reparação óssea. Os novos vasos sanguíneos participam da formação do tecido de granulação e do fornecimento de nutrientes e oxigênio ao tecido em crescimento [44,48-51]. Nesse sentido, este fato poderia levar a um aumento da proliferação tecidual, migração celular, maior presença de vasos sanguíneos e permitir a migração de macrófagos e células imunes para modular o processo de deposição mineral e aposição mineral óssea, durante as fases do reparo, principalmente nas fases iniciais. No entanto, neste estudo, a membrana de látex sem incorporação de β -fosfato tricálcico (β -TCP) funcionou apenas como uma barreira e apresentou deposição mineral moderada na periferia em direção ao centro dos defeitos críticos, como pode ser observado na análise quantitativa da microtomografia computadorizada (figura 9), bem como pela aposição mineral na análise de microscopia confocal a laser (figura 11).

A funcionalização das membranas por meio da incorporação de biomateriais tornou-se um método amplamente utilizado para aprimorar e modular remotamente o processo de neoformação óssea. Neste estudo, beta-tricálcio fosfato foi incorporado às membranas em escalas nano e micrométrica. O β -TCP é uma fase do fosfato de cálcio que apresenta alta biocompatibilidade, boa solubilidade, fácil absorção pela matriz óssea e propriedades osteoindutivas e osteocondutivas [27]. A possibilidade de incorporação de beta-tricálcio fosfato em membranas de látex representa uma nova alternativa para auxiliar na reparação

óssea, pois combina as propriedades osteopromotoras do látex com as propriedades osteocondutivas e potencialmente osteoindutivas do fosfato de cálcio [46]. O beta-tricálcio fosfato, como biomaterial, é altamente biocompatível e possivelmente osteoindutivo, sendo adequado para preenchimento de cavidades ósseas. Ao combinar as características de barreira física das membranas de látex e seu potencial indutor de angiogênese, associado com partículas de beta-tricálcio fosfato, o processo de reparação pode ser aprimorado, funcionando como uma membrana funcionalizada, fato evidenciado na análise de microscopia confocal a laser que evidenciou uma taxa de aposição mineral maior quando a membrana estava com a incorporação do beta-tricálcio fosfato, principalmente na escala nanoestruturada. Estes achados são justificados, uma vez que materiais depositados em escala nanométrica apresentam maior disponibilidade por área [36] e pode-se sugerir que o tecido ósseo interage melhor com biomateriais nesta escala, principalmente durante as fases iniciais do processo reparacional [13].

Por fim, a análise microtomográfica qualitativa em 3D, bem como a análise qualitativa de microscopia confocal a laser mostraram que as membranas de látex funcionalizadas por beta-tricálcio fosfato apresentaram uma maior deposição mineral em comparação às membranas de látex sem funcionalização ou ao grupo coágulo. Porém quando avaliado os parâmetros BV e BV/TV esta maior deposição foi evidenciada apenas nas membranas funcionalizadas por beta-tricálcio fosfato na escala micrométrica nos períodos de 30 e 60 dias, quando comparado ao grupo coágulo. Por outro lado, achados complementares da microscopia confocal a laser evidenciaram maior taxa de aposição mineral dos grupos Nano e Micro aos 15 dias quando comparados a GC e aos 15 e 30 dias quando comparado a ML. Por este fato análises complementares tornar-se-ão necessárias para confirmar ou ajustar os achados microtomográficos e da microscopia confocal a laser, como a análise histométrica em tecidos mineralizados, PCR em tempo real e análises em tecidos desmineralizados, como a análise imunohistoquímica [30,34,52].

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a incorporação do β -TCP nas escalas micrométrica e nanométrica na membrana de látex melhorou o equilíbrio entre bioatividade e segurança celular e permitiu maiores níveis de deposição mineral e aposição mineral óssea durante o processo de reparo de defeitos críticos em calvária de ratos e quando a incorporação foi na escala nanométrica a aposição mineral foi potencializada.

REFERÊNCIAS

1. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988 May;81(5):672-6. doi: 10.1097/00006534-198805000-00004.
2. Melcher AH. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Arch Oral Biol.* 1969 Sep;14(9):1101-9. doi: 10.1016/0003-9969(69)90079-x.
3. Kahnberg KE. Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon mantle leaf. *Int J Oral Surg.* 1979 Dec;8(6):449-56. doi: 10.1016/s0300-9785(79)80084-8.
4. Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P. Barrier membranes: more than the barrier effect? *J Clin Periodontol.* 2019 Jun;46 Suppl 21(Suppl 21):103-23. doi: 10.1111/jcpe.13068.
5. Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol.* 2019 Jun;46 Suppl 21:82-91. doi: 10.1111/jcpe.13123..
6. Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res.* 1991 Oct-Dec;2(4):159-65. doi: 10.1034/j.1600-0501.1991.020401.x.
7. Jardim MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):666-73. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.03.020.
8. Ahn YS, Kim SG, Kim CS, Oh JS, Lim SC. Effect of guided bone regeneration with or without pericardium bioabsorbable membrane on bone formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Nov;114(5 Suppl):S126-31. doi: 10.1016/j.oooo.2011.08.008.
9. Jung UW, Lee JS, Lee G, Lee IK, Hwang JW, Kim MS, et al. Role of collagen membrane in lateral onlay grafting with bovine hydroxyapatite incorporated with collagen matrix in dogs. *J Periodontal Implant Sci.* 2013 Apr;43(2):64-71. doi: 10.5051/jpis.2013.43.2.64.
10. Ramalingam S, Al-Rasheed A, ArRejaie A, Nooh N, Al-Kindi M, Al-Hezaimi K. Guided bone regeneration in standardized calvarial defects using beta-tricalcium phosphate

and collagen membrane: a real-time in vivo micro-computed tomographic experiment in rats. *Odontology*. 2016 May;104(2):199-210. doi: 10.1007/s10266-015-0211-8.

11. Williams DF. Biocompatibility pathways: biomaterials-induced sterile inflammation, mechanotransduction, and principles of biocompatibility control. *ACS Biomater Sci Eng*. 2017 Jan;3(1):2-35. doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00607.

12. Herculano RD, Silva CP, Ereno C, Guimaraes SAC, Kinoshita A, Graeff CFDO. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). *Mater Res*. 2009 Apr;12(2):253-6. doi: 10.1590/S1516-14392009000200023.

13. Borges FA, Almeida Filho E, Miranda MC, Santos ML, Herculano RD, Guastaldi AC. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2015;26(17):1256-68. doi: 10.1080/09205063.2015.1086945.

14. Zancanela DC, Funari CS, Herculano RD, Mello VM, Rodrigues CM, Borges FA, et al. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: physical-chemistry and antimicrobial behaviours. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Apr;97:576-82. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.042.

15. Carlos BL, Yamanaka JS, Yanagihara GR, Macedo AP, Watanabe PCA, Issa JPM, et al. Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2019 Oct;30(14):1291-307. doi: 10.1080/09205063.2019.1627653.

16. Miranda M, Prezotti FG, Borges FA, Barros NR, Cury B, Herculano RD, et al. Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. *J Biomater Sci Polymer Ed*. 2017;28(18):2117-130. doi: 10.1080/09205063.2017.1377024.

17. Ereno C, Guimarães SA, Pasetto S, Herculano RD, Silva CP, Graeff CF, et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Dec;95(3):932-9. doi: 10.1002/jbm.a.32919.

18. Park YJ, Lee YM, Park SN, Lee JY, Ku Y, Chung CP, et al. Enhanced guided bone regeneration by controlled tetracycline release from poly(L-lactide) barrier membranes. *J Biomed Mater Res*. 2000 Sep;51(3):391-7. doi: 10.1002/1097-4636(20000905)51:3<391::aid-jbm13>3.0.co;2-9.

19. Piao ZG, Kim JS, Son JS, Lee SY, Fang XH, Oh JS, et al. Osteogenic evaluation of collagen membrane containing drug-loaded polymeric microparticles in a rat calvarial defect model. *Tissue Eng Part A*. 2014 Dec;20(23-24):3322-31. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0717..
20. Shim JH, Yoon MC, Jeong CM, Jang J, Jeong SI, Cho DW, et al. Efficacy of rhBMP-2 loaded PCL/PLGA/ β -TCP guided bone regeneration membrane fabricated by 3D printing technology for reconstruction of calvaria defects in rabbit. *Biomed Mater*. 2014 Nov;9(6):065006. doi: 10.1088/1748-6041/9/6/065006..
21. Jo JY, Jeong SI, Shin YM, Kang SS, Kim SE, Jeong CM, et al. Sequential delivery of BMP-2 and BMP-7 for bone regeneration using a heparinized collagen membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jul;44(7):921-8. doi: 10.1016/j.ijom.2015.02.015.
22. Kütan E, Duygu-Çapar G, Özçakır-Tomruk C, Dilek OC, Özen F, Erdoğan Ö, et al. Efficacy of doxycycline release collagen membrane on surgically created and contaminated defects in rat tibiae: a histopathological and microbiological study. *Arch Oral Biol*. 2016 Mar;63:15-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.001.
23. Habraken W, Habibovic P, Epple M, Böhner M. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? *Mater. Today*. 2016 Mar;19(2):69–87. doi: 10.1016/j.mattod.2015.10.008.
24. Gao P, Zhang H, Liu Y, Fan B, Li X, Xiao X, et al. Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. *Sci. Rep*. 2016;6:23367. doi: 10.1038/srep23367.
25. Samavedi S, Whittington AR, Goldstein AS. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater*. 2013 Sep;9(9):8037-45. doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.014.
26. Baheiraei N, Nourani MR, Mortazavi SMJ, Movahedin M, Eyni H, Bagheri F, et al. Development of a bioactive porous collagen/ β -tricalcium phosphate bone graft assisting rapid vascularization for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 2018 Jan;106(1):73-85. doi: 10.1002/jbm.a.36207.
27. Böhner M, Santoni BLG, Döbelin N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater*. 2020 Sep;113:23-41. doi: 10.1016/j.actbio.2020.06.022.

28. Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Kokubo T, Takeuchi H. Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials*. 1993 Feb;14(3):216-24. doi: 10.1016/0142-9612(93)90026-x.
29. Le Huec JC, Clément D, Brouillaud B, Barthe N, Dupuy B, Foliguet B, et al. Evolution of the local calcium content around irradiated beta-tricalcium phosphate ceramic implants: in vivo study in the rabbit. *Biomaterials*. 1998 Apr-May;19(7-9):733-8. doi: 10.1016/s0142-9612(97)00189-0.
30. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005 Jul;4(7):518-24. doi: 10.1038/nmat1421.
31. de Wild M, Amacher F, Bradbury CR, Molenberg A. Investigation of structural resorption behavior of biphasic bioceramics with help of gravimetry, μ CT, SEM, and XRD. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Apr;104(3):546-53. doi: 10.1002/jbm.b.33419
32. Kapat K, Srivas PK, Rameshbabu AP, Maity PP, Jana S, Dutta J, et al. Influence of porosity and pore-size distribution in $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ Foam on physicommechanical properties, osteogenesis, and quantitative validation of bone ingrowth by micro-computed tomography. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Nov;9(45):39235-48. doi: 10.1021/acsami.7b13960.
33. Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *Int J Oral Sci*. 2020 Feb;12(1):6. doi: 10.1038/s41368-020-0073-y.
34. 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 Jan;26(1):5366. doi: 10.1007/s10856-014-5366-2.
35. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7. doi: 10.1016/j.injury.2005.07.029.
36. Piazza DB, Pinto GC, VM, Herculano RD, Santos LS, Primo FL, Fernandes MA, et al. Size-controlled hydroxyapatite particle nucleation in natural rubber latex membranes. *Mater Chem Phys*. 2025 Jun;337:130606, doi: 10.1016/j.matchemphys.2025.130606.
37. Herculano RD, Mussagy CU, Guerra NB, Brasil GSP, Floriano JF, Burd BS, et al. Recent advances and perspectives on natural latex serum and its fractions for biomedical applications. *Biomater Adv*. 2024 Feb;157:213739. doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213739.

38. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
39. 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 Dec;10(12):3590-600. doi: 10.1166/jbn.2014.1873.
40. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. 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. doi: 10.1002/jbmr.1805.
41. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991 Mar;74(3):487-91. doi: 10.3171/jns.1991.74.3.0487.
42. 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 Nov;64(11 Suppl):1116-28. doi: 10.1902/jop.1993.64.11s.1116.
43. 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 Aug;23(4):237-42. doi: 10.1016/s0901-5027(05)80378-9.
44. 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 Sep;25(9):2111-20. doi: 10.1007/s10856-014-5241-1.
45. Puttini IO, Poli PP, Maiorana C, Vasconcelos IR, Schmidt LE, Colombo LT, et al. Evaluation of osteoconduction of biphasic calcium phosphate ceramic in the calvaria of rats: microscopic and histometric analysis. *J Funct Biomater.* 2019 Jan;10(1):7. doi: 10.3390/jfb10010007.
46. Schmidt LE, Hadad H, Vasconcelos IR, Colombo LT, Silva RC, Santos AFP, et al. Critical defect healing assessment in rat calvaria filled with injectable calcium phosphate cement. *J Funct Biomater.* 2019;10(2):21. doi: 10.3390/jfb10020021.

47. 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 Jul;10:81. doi: 10.1186/1741-7015-10-81.
48. Ferreira M, Mendonça RJ, Coutinho-Netto J, Mulato M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Braz J Phys.* 2009 Sep;39(3):564-9. doi: 10.1590/S0103-97332009000500010.
49. Mrue F, Coutinho Netto J, Ceneviva R, Lachat JJ, Thomazini JA, Tambelini H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. *Mat Res.* 2004 Apr;7(2):277–83. doi: 10.1590/S1516-14392004000200010.
50. Pegorin GS, Leite MN, Antoniassi M, Chagas ALD, Santana LA, Garms BC, et al. Physico-chemical characterization and tissue healing changes by *Hancornia speciosa* Gomes latex biomembrane. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021 Jul;109(7):938-48. doi: 10.1002/jbm.b.34758.
51. Nascimento RM, Fata 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 Jun;39:29-34. doi: 10.1016/j.msec.2014.02.019
52. Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jun;21(6):567-76. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação da microarquitetura óssea de defeitos críticos em calvária de ratos recobertos por membranas de latex incorporadas com beta-tricálcio fosfato nas escalas micrométrica e nanométrica"**, Processo FOA nº 184-2025, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 22 de Maio de 2025.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 13 de Maio de 2027.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 13 de Junho de 2027.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the bone microarchitecture of critical defects in the calvary of rats coated by latex membranes incorporated with beta-tricalcium phosphate at the micrometric and nanometric scale"**, Protocol FOA nº 184-2025, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 22, 2025.

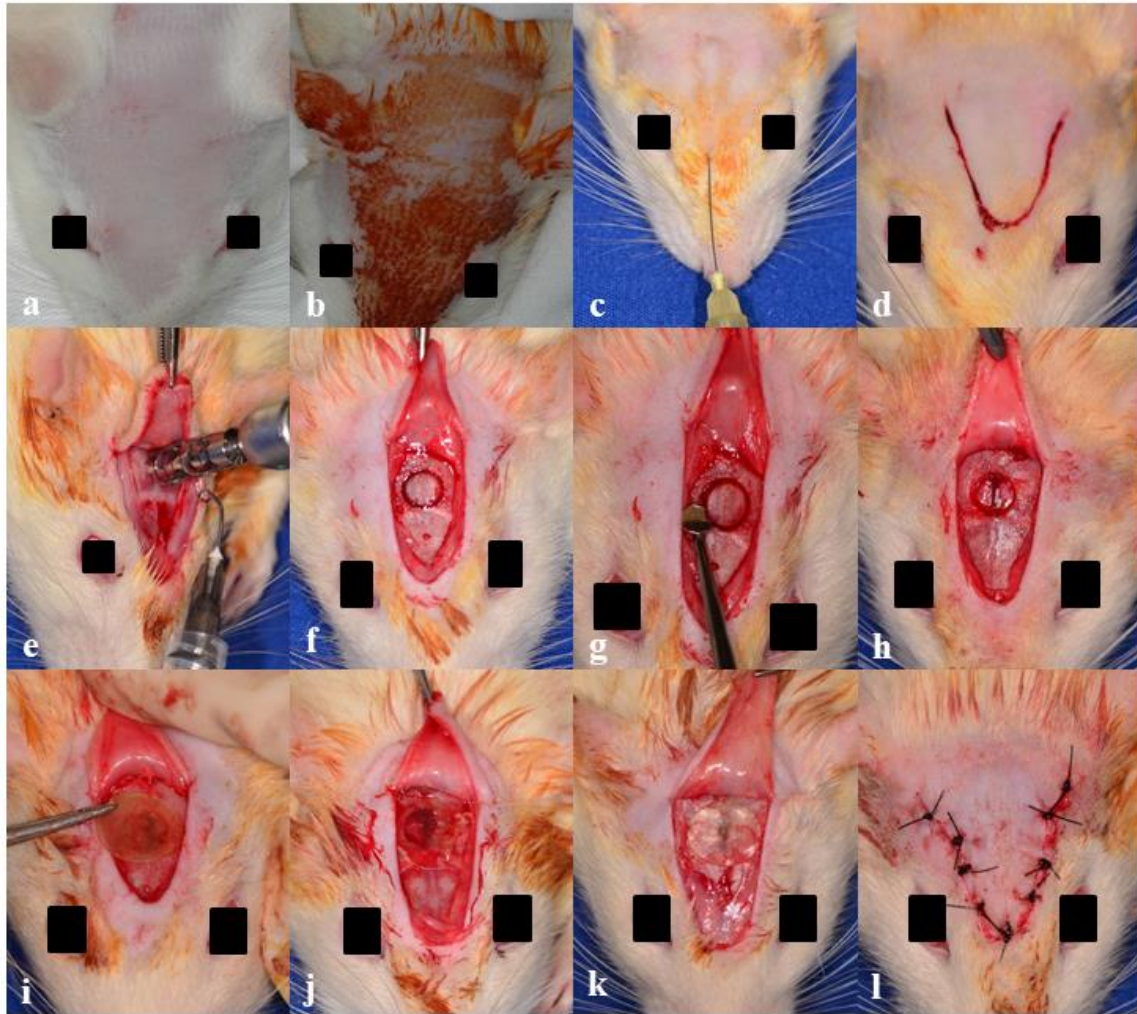
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 13, 2027.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 13, 2027.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3232 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B – Procedimento Cirúrgico



Anexo B - Cirurgia experimental. a) Tricotomia; b) Degermação com PVPI; c) Infiltração de anestésico local; d) Incisão em forma de U; e) Osteotomia; f) Delimitação da osteotomia; g) Descolamento dos tecidos aponeuróticos e pericrânio; h) Grupo Controle (GC); i) Grupo Micro; j) Grupo ML; k) Grupo Nano; l) Sutura.