



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARCO ANTONIO TRIDAPALLI MAFRA

INFLUÊNCIA DA *Hancornia speciosa* (Gomes) E HIDROXIAPATITA EM FILMES DE
ÁCIDO HIALURÔNICO E ALGINATO DE SÓDIO NA REPARAÇÃO DO TECIDO
ÓSSEO EM CALVÁRIA DE RATOS

PIRACICABA

2024

MARCO ANTONIO TRIDAPALLI MAFRA

INFLUÊNCIA DA *Hancornia speciosa* (Gomes) E HIDROXIAPATITA EM FILMES DE
ÁCIDO HIALURÔNICO E ALGINATO DE SÓDIO NA REPARAÇÃO DO TECIDO
ÓSSEO EM CALVÁRIA DE RATOS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO Marco
Antonio Tridapalli Mafra E ORIENTADA
PELO Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

PIRACICABA

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

M269i Mafrá, Marco Antonio Tridapalli, 1967-
Influência da *Hancornia speciosa* (Gomes) e hidroxiapatita em filmes de ácido hialurônico e alginato de sódio na reparação do tecido ósseo em calvária de ratos / Marco Antonio Tridapalli Mafrá. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Regeneração óssea. 2. Apocináceas. 3. Hidroxiapatita. 4. Modelos animais. I. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Influence of *Hancornia speciosa* (Gomes) and hydroxyapatite in hyaluronic acid and sodium alginate films on bone tissue repair in rat calvaria

Palavras-chave em inglês:

Bone regeneration

Apocynaceae

Hidroxyapatite

Models, animal

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Francisco Carlos Groppo [Orientador]

Luiz Eduardo Nunes Ferreira

Camila Batista da Silva de Araujo Candido

Data de defesa: 22-08-2024

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7125-1163>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5641129693976976>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 22 de agosto de 2024, considerou o candidato MARCO ANTONIO TRIDAPALLI MAFRA aprovado.

PROF. DR. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

PROF. DR. LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA

PROF^a. DR^a. CAMILA BATISTA DA SILVA DE ARAUJO CANDIDO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Reinaldo de Oliveira Mafra e Cleide Maria Tridapalli Mafra, in memoriam, os quais sempre me estimularam a estudar e crescer como ser humano.

À minha esposa, Sandra Braghini e aos meus filhos, Guilherme, Eduardo e Maria Luiza, que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada, me apoiando incontestavelmente.

Ao meu tio Clayton Oswaldo Tridapalli, que nos momentos difíceis, sempre estendeu a mão para me ajudar.

Aos meus amigos Daniel Felipe Fernandes Paiva e Victor Augusto Benedicto dos Santos, que me auxiliaram nesta etapa do meu mestrado.

A todos os amigos e demais familiares, que jamais me deixaram sozinho nessa jornada rumo à docência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, pela orientação deste trabalho e pelos conselhos a respeito de minha formação.

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do seu magnífico reitor Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu digníssimo Diretor, Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar.

Ao Prof. Dr. Antonio Pedro Ricomini Filho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP.

Ao Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo e ao Prof. Dr. Klinger de Souza Amorim pelo apoio na execução deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Bucodental da FOP, os quais foram responsáveis por essa etapa importante da minha formação.

A todos os colegas de Pós-Graduação, por cada momento de aprendizado que vivenciamos em conjunto.

RESUMO

Diante das desvantagens apresentadas por enxertos ósseos tradicionais, a busca por novos biomateriais para substituí-los tem sido explorada na literatura. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da *Hancornia speciosa* Gomes (HS) e da hidroxiapatita (Hap) complexados com o filme de ácido hialurônico/alginato de sódio (AH/ALG) na cicatrização de defeitos ósseos críticos induzidos na calvária de ratos. Para tanto, dois defeitos ósseos críticos na calvária de 36 ratos, um no lado esquerdo e outro no lado direito, foram obtidos com trefina óssea de 5 mm de diâmetro externo. Os animais foram divididos em dois grupos. Foram confeccionados dois filmes com a mistura de ácido hialurônico (HA) e alginato de sódio (ALG). O filme 1 (HA/ALG/Hap) recebeu somente Hap e ao filme 2 (HA/ALG/Hap/HS) adicionou-se HS. O osso bovino liofilizado (Bio Oss) foi utilizado como controle positivo e o coágulo sanguíneo, como controle negativo. No grupo 1, os defeitos ósseos foram preenchidos com o filme 1 no lado direito e com o coágulo no lado esquerdo. No grupo 2, no lado direito, os defeitos foram preenchidos com o filme 2 e com Bio-Oss no lado esquerdo. Os animais foram mortos após 30, 60 e 90 dias da cirurgia (6 animais por grupo, por tempo). As cabeças foram submetidas à microtomografia (micro-CT) e, posteriormente, à análise histológica de rotina (HE). Por micro-CT foram medidos o volume de tecido ósseo, volume tecidual total, densidade volumétrica óssea, espessura média das trabéculas ósseas, separação entre as trabéculas ósseas e o número de trabéculas ósseas. Para a comparação quantitativa das medidas dos orifícios obtidas com a tomografia e com o micro-CT foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%. Os resultados histológicos foram descritos de modo qualitativo. Não houve diferenças estatisticamente significantes para volume tecidual total entre os 3 tempos analisados para Bio-Oss ($p=0,28$), coágulo ($p=0,58$), filme 1 ($p=0,67$) e filme 2 ($p=0,28$), nem para volume ósseo neoformado, Bio Oss ($p=0,85$), coágulo ($p=0,50$), filme 1 ($p=0,12$) e filme 2 ($p=0,59$). Entretanto, aos 30 dias, o comportamento do grupo Bio-Oss mostrou melhores resultados que coágulo ($p=0,0450$) e filme 2 ($p=0,0002$). A análise histológica demonstrou que o grupo preenchido por filme 2 exibiu angiogênese em todos os 3 períodos (30, 60 e 90 dias), enquanto o grupo coágulo, mostrou uma grande área fibrosa nos 3 períodos. O grupo Bio-Oss apresentou boa neoformação óssea logo aos 60 dias, com a presença de partículas ósseas em meio ao osso neoformado. Concluímos que a presença de HS na composição do filme 2, estimulou a angiogênese e possui um potencial biológico que pode ser explorado em novos estudos, como por exemplo, confecção de membranas e como material para preenchimento de defeitos ósseos.

Palavras-Chave: Regeneração óssea; Apocináceas; Hidroxiapatita; Modelos animais

ABSTRACT

In view of some disadvantages presented by traditional bone grafts, the search for new biomaterials to replace them has been widely explored in the literature. The aim of the present study is to evaluate the effect of *Hancornia speciosa* (Gomes) (HS) and hydroxyapatite (Hap) complexed with hyaluronic acid/sodium alginate (HA/ALG) film on the healing of critical bone defects induced in the calvarium of rats. For this purpose, two critical bone defects in the calvarium of 36 rats, one on the left side and the other on the right side, were obtained with bone trephine of 5 mm external diameter. The animals were divided into two groups, 1 and 2. Two films were made with a mixture of hyaluronic acid (HA) and sodium alginate (ALG). Film 1 (HA/ALG/Hap) received only Hap and to film 2 (HA/ALG/Hap/HS), HS was added. Lyophilized bovine bone (Bio Oss) was used as a positive control and blood clot as a negative control. In group 1, bone defects were filled with film 1 on the right side and with clot on the left side. In group 2, on the right side, the defects were filled with film 2 and with Bio Oss on the left side. The animals were then killed after 30, 60 and 90 days of surgery (6 animals per group, per time). The heads were submitted to microtomography (micro-CT) and, subsequently, to routine histological analysis (HE). Micro-CT scans measured bone tissue volume, total tissue volume, bone volumetric density, mean bone trabecular thickness, separation between bone trabeculae, and number of bone trabeculae. For the quantitative comparison of the orifice measurements obtained with tomography and micro-CT, the Kruskal-Wallis test was used, with a significance level of 5%. The histological results were described qualitatively. Results: There were no statistically significant differences for total tissue volume between the 3 time points analyzed for Bio-Oss ($p=0.28$), clot ($p=0.58$), film 1 ($p=0.67$) and film 2 ($p=0.28$), nor for neoformed bone volume, Bio Oss ($p=0.85$), clot ($p=0.50$), film 1 ($p=0.12$) and film 2 ($p=0.59$). However, at 30 days, the behavior of the Bio Oss group showed better results than clot ($p=0.0450$) and film 2 ($p=0.0002$). Histological analysis showed that the group filled with film 2 exhibited angiogenesis in all 3 periods (30, 60 and 90 days), while the clot group showed a large fibrous area in the 3 periods. The Bio Oss group showed good bone neoformation as early as 60 days, with the presence of bone particles in the middle of the newly formed bone. We concluded that the presence of HS in the composition of film 2 stimulated angiogenesis and has a biological potential that can be explored in new studies, such as the manufacture of membranes and as a material for filling bone defects.

Key words: Bone regeneration; Apocynaceae; Hydroxyapatite; Models, animal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
3 PROPOSIÇÃO	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Aspectos éticos e legais	21
4.2 Amostra	21
4.3 Materiais utilizados	22
4.4 Confeção das formulações	23
4.5 Preparo cirúrgico na calvária de ratos	24
4.6 Microtomografia computadorizada	26
4.7 Processamento histológico	27
4.8 Morfometria	27
4.9 Forma de Análise dos Resultados	27
5 RESULTADOS	29
5.1 Acompanhamento dos Animais	29
5.2 Análise da Microtomografia Computadorizada	29
5.3 Análise histológica qualitativa	33
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	58
ANEXO 2 - Relatório de similaridade	59

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo tem uma notável capacidade regenerativa inerente, essencial para o reparo, desenvolvimento do esqueleto e remodelamento ao longo da vida adulta (Dimitriou et al., 2011). Todavia, em alguns casos, a regeneração óssea pode ser insuficiente, especialmente em grandes defeitos resultantes de trauma, infecções ou condições como necrose avascular e osteoporose (Florencio-Silva et al., 2015).

Dentre as principais formas de se combater tais desafios, o desenvolvimento e busca de novos biomateriais para enxertia óssea tem sido alvo de estudo (Groppo et al., 2017; Carvalho Formiga et al., 2019; Papi et al., 2020). Os biomateriais desempenham um papel crucial, sendo definidos como materiais que, em contato direto com o sistema biológico, podem tratar, substituir ou melhorar tecidos, órgãos ou funções orgânicas (Pires et al., 2015).

As necessidades específicas para enxertia óssea fazem com que os biomateriais utilizados tenham requisitos cada vez mais específicos, de forma a não somente mimetizar o osso, como também possuir a capacidade de liberação de substâncias que acelerem o processo de cicatrização. Dessa forma, polímeros podem ser pensados para suprir tais necessidades (Tiwari et al., 2012).

Atualmente, a alternativa mais comum para sanar desafios de grandes perdas ósseas é o uso de osso bovino liofilizado, cuja principal marca comercial é o Bio-Oss®. Sendo um substituto ósseo xenógeno bovino e biocompatível com estrutura semelhante ao osso medular humano, seu uso confere adequada osseocondutividade após processos industriais para adequá-lo no uso em humanos (Jensen et al., 2012; Uribe et al., 2022). Todavia, esse processo faz com que o custo do material seja elevado, tornando o mesmo inacessível para uma significativa parcela populacional.

Nesse contexto, a *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente conhecida como mangabeira (HS) e seu látex têm despertado interesse devido ao potencial osteogênico, anti-inflamatório e angiogênico, tornando-se uma alternativa promissora na produção de biomembranas para aplicações biomédicas (Almeida et al., 2014). Estudos demonstraram a capacidade do látex de estimular a proliferação celular e neoformação óssea in vivo (Neves et al., 2016).

O látex da mangabeira, além de suas propriedades farmacológicas, se apresenta como um polímero natural com potencial para produção de biomembranas. Sua ação anti-inflamatória e angiogênica, combinada com a biocompatibilidade, destaca-se como uma opção de baixo custo para feridas cutâneas (Pegorin et al., 2021; Costa et al., 2021). Em virtude de suas propriedades cicatrizantes, seu uso para enxertia óssea apresenta-se como uma possibilidade promissora.

Apesar dos efeitos promissores, outros compostos também devem ser pensados para potencializar os efeitos da HS. O ácido hialurônico (AH) e o alginato de sódio, polímeros naturais, têm sido estudados por suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e de estímulo à proliferação celular (Chen et al., 2018; Ibrahim et al., 2020). A combinação destes polímeros, juntamente com o látex da mangabeira, pode representar uma abordagem inovadora para a produção de biomateriais visando a regeneração óssea.

Outrossim, a enxertia óssea deve sempre buscar mimetizar componentes naturais que foram perdidos em seus defeitos. Dessa forma, a adição de componentes cerâmicos a base de hidroxiapatita, principal cristal constituinte da matriz inorgânica do osso, tem efeito osseocondutor e proporcionam similaridade a estrutura natural, sendo também um retentor de fosfato e cálcio, componentes necessários para o processo regenerativo ósseo (Vasconcelos et al., 2020).

Embora estudos tenham mostrado promissoras propriedades dos biomateriais mencionados, há uma lacuna no entendimento das interações desses compostos e a cicatrização óssea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O tecido ósseo apresenta como uma de suas características a intrínseca capacidade de regenerativa como parte do processo de reparo em resposta à injúria, bem como durante o desenvolvimento do esqueleto ou do remodelamento contínuo, pela vida adulta (Dimitriou et al., 2011). De acordo com Florencio-Silva et al. (2015), dependendo da dimensão dos defeitos ósseos, sua resolução pode não ser espontânea.

Adicionalmente, existem outras condições em cirurgia ortopédica, em cirurgias orais ou maxilo-faciais, nas quais a regeneração óssea é requisitada em grande volume (além do potencial normal de autógeno), tais como reconstruções esqueléticas em grandes defeitos criados por trauma, infecções, ressecções tumorais, anomalias esqueléticas, ou casos em que o processo de regeneração acaba sendo lesado, como nos casos de necrose avascular e osteoporose (Dimitriou et al., 2011).

Segundo Haugen et al. (2018), os defeitos ósseos criados por trauma, doenças, cirurgias ou malformações constituem um significativo problema de saúde pública. O tecido ósseo é, além disso, o segundo tecido mais transplantado após o sangue. Muitos países têm passado pela experiência de um aumento na demanda de enxertos ósseos e de soluções em engenharia tecidual óssea. Nos EUA e Europa, mais de meio milhão de pacientes por ano recebem reparos em defeitos ósseos com custo estimado em três bilhões de dólares, número que tende a aumentar, devido a fatores como aumento da expectativa de vida, facilidade de acesso aos serviços de assistência à saúde, particularmente nos países em crescimento.

A reparação óssea é um processo de alta complexidade, no qual o osso velho é substituído por osso novo, num ciclo de três fases distintas: (a) osteoclastos iniciando a reabsorção, (b) a transição (ou período reverso) da reabsorção para a neoformação óssea e (c) a formação óssea pelos osteoblastos. Em casos nos quais o tecido não apresenta regeneração completa, devido ao tamanho do defeito, por exemplo, temos a formação de um defeito ósseo crítico (Spicer et al., 2012).

Os defeitos ósseos críticos podem ser tratados por enxertos ósseos, via enxertos autógenos, autólogos, substitutos ósseos xenógenos e fatores de crescimento ósseo (Giannoudis et al., 2005; Nauth et al., 2010). Assim, existem algumas propriedades que expressam o sucesso nos processos de enxertia: osteogênese, osteoindução e osteocondução.

Em 2015, Fillingham e Jacobs definiram osteocondução como a habilidade de promover um ambiente com capacidade de abrigar células mesenquimatosas indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos, um processo pelo qual o enxerto funciona como uma estrutura passiva que abriga as células citadas.

O conceito de osteoindução foi descrito primeiramente por Urist (1965) quando da descoberta das proteínas ósseas morfogenéticas. Tem sido definida como o processo de recrutamento, proliferação e diferenciação de células mesenquimatosas indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos.

Para que um enxerto possua osteogênese, deve estar na posse de células mesenquimatosas indiferenciadas viáveis, osteoblastos e osteócitos. Possui, além dos elementos celulares, fatores de crescimento e de estrutura (arcabouço ósseo)

Os arcabouços de biosilicato possuem uma estrutura macroporosa especialmente projetada para promover o crescimento do tecido ósseo em seu interior, permitindo que sua regeneração ocorra de maneira mais rápida, evitando as complicações associadas ao uso do enxerto autógeno necessários à formação do novo osso.

O enxerto autógeno possui todas as três características acima mencionadas, osteocondutividade, osteoindutividade e osteogenicidade além da total histocompatibilidade, por ser coletado de um segundo sítio cirúrgico do próprio indivíduo (Fillingham et al., 2012). Apesar de ser considerado o padrão ouro para a enxertia óssea, sua limitação em volume, bem como as altas taxas de morbidade criadas pelo acesso da área doadora, deformidades e cicatrizes, tornam essa modalidade de tratamento menos desejada (Haugen et al., 2018).

Os enxertos autólogos podem incluir tecidos doados tanto por doadores vivos como por cadáveres e representam a segunda técnica mais utilizada em

regeneração óssea segundo Amini et al. (2012). Correspondem aos enxertos ósseos coletados de um indivíduo e transplantados em outro indivíduo geneticamente diferente, embora da mesma espécie. Quando comparados aos enxertos autógenos, possuem risco de reações imunológicas e transmissão de infecções, além de numerosos recordes de falhas.

Por serem desvitalizados, frequentemente por descalcificação, desproteinização, irradiação e/ou secagem-congelamento, possuem baixa osteoindução. Na Europa, após a *European Tissue and Cells Directive* em 2004 os enxertos alógenos têm sido abandonados na prática clínica. Assim, a busca por novos materiais como substitutivos ósseos tem aumentado (Mortimer, 2004).

O uso de biomateriais é bastante difundido nas técnicas de reconstrução óssea. Podem ser naturais, sintéticos, degradáveis ou então, não degradáveis. Os sintéticos mais usados em reconstruções são, segundo Tian et al. (2012) a policaprolactona (PCL), o ácido polilático (PLA) ou poli (lático-co-glicólico) ácido (PLGA), por exemplo, todos biodegradáveis.

Biomateriais podem ser definidos como materiais que em contato direto com o sistema biológico possa interagir com os tecidos fisiológicos de modo a não trazer nenhum prejuízo as funções do organismo (Pires et al., 2015). De acordo com o *Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration*, um biomaterial ideal para ser empregado como enxerto ósseo deve possuir requisitos específicos como:

1. Biocompatibilidade
2. Porosidade
3. Osteocondutividade
4. Osteoindução
5. Propriedades de superfície
6. Biodegradação
7. Propriedades mecânicas
8. Angiogenicidade

9. Facilidade de manipulação

10. Ser compatível com processos de manufatura

Visando tal cenário, a pesquisa para aprimorar o processo de cicatrização e formação óssea tem ganhado destaque na ciência biomédica, principalmente em relação a validação e desenvolvimento de novos biomateriais com a finalidade de servirem como arcabouço regenerativo (Groppo et al., 2017; Carvalho Formiga et al., 2019; Papi et al., 2020).

Sob essa perspectiva, Fernandes et al. (2022) ressalta que biomateriais de origem xenógena exibem um adequado potencial osteocondutor, oferecendo estabilidade ao coágulo durante os estágios iniciais da cicatrização óssea, promovendo assim, suporte para o reparo ósseo em fases tardias, apresentando características químicas e mecânicas similares ao osso humano. Por motivos de segurança biológica, os materiais xenógenos de origem bovina, muito utilizados nas práticas odontomédicas, necessitam de uma completa desproteinização via tratamentos térmicos e químicos, para que se elimine possíveis riscos de transmissão de bactérias, vírus ou partículas de príons, o que acaba por aumentar o custo de aquisição do material.

De acordo com Bae et al. (2019), atualmente, a matriz óssea desproteinizada de origem xenógena tem sido utilizada nos processos de regeneração óssea alveolares, bem como nas cirurgias de seio maxilar. Nesse sentido, o principal foco de estudo, tanto em testes pré-clínicos como em ensaios laboratoriais tem sido o osso bovino liofilizado (Bio-Oss) e osso liofilizado com 10% de colágeno (Bio-Oss Collagen) que possuem grânulos com microporosidades similares ao osso humano, demonstrando alta biocompatibilidade com os tecidos orais, além de excelente osseocondutividade.

Este biomaterial, em sua manufatura, passa por um tratamento em soluções alcalinas e altas temperaturas (300°C) visando a completa eliminação de seus componentes orgânicos. Entretanto, quando se faz uso de enxertos xenógenos, o receio por transmissão de Encefalopatia Espongiforme Bovina acaba sendo inerente à técnica por se tratar de uma doença neurodegenerativa que pode ser transmitida aos seres humanos.

Diante desse cenário os enxertos alógenos podem ser substitutos para uso clínico. Adicionalmente, tais materiais ainda podem possuir a capacidade de liberação de fármacos, prolongando e otimizando o controle na administração dessas substâncias, mantendo a concentração das mesmas no sítio tratado por uma unidade de tempo necessária à sua eficácia, utilizando-se de uma única dosagem (Tiwari et al., 2012), sendo os polímeros, normalmente empregados nesta situação.

Associado a essa temática, a busca de princípios farmacológicos nas diversas espécies vegetais tem sido bastante considerada pela indústria farmacêutica. No Brasil, com a riqueza de nossa flora, esse campo da farmacologia mostra-se muito promissor (Reis et al., 2022; Almeida et al., 2014; da Silva et al., 2011; Moraes et al., 2008).

Diante disso, a *Hancornia speciosa* é uma árvore que possui uma seiva de aparência leitosa, tendo sido explorado no passado para a produção de borracha e outras aplicações na medicina popular como coadjuvante no tratamento de várias patologias (Souza et al., 2016).

A *Hancornia speciosa* é uma árvore frutífera brasileira (Apocynaceae), encontrada em boa parte do território nacional, com maior abundância nas regiões de planícies costeiras e planaltos do Nordeste e Centro-Oeste (Pott et al., 2004). Seu fruto, a mangaba, tem origem indígena e significa “coisa boa de comer”. Possui elevado teor de ácido ascórbico, o que a classifica como fruta rica em vitamina C, sendo também consumida em cremes e sorvetes, por exemplo (Janick & Paull, 2018; Silva Jr., 2004). No entanto, pode ser usada também com finalidade terapêutica, como no tratamento de doenças fúngicas, tuberculose, gastrite e fraturas ósseas (Ferreira et al., 2007; Moraes et al., 2008; Silva et al., 2011).

O látex proveniente da *Hancornia speciosa* pode ser uma alternativa interessante no processo de produção de biomembranas para aplicação na área de saúde (Almeida et al., 2014). A significativa ação anti-inflamatória pela inibição do óxido nítrico, prostaglandina E2 (PGE2) e produção de citocinas confirmam o uso popular desta planta (Marinho et al., 2011), sendo biocompatível e não apresentando citotoxicidade ou genotoxicidade (Almeida et al., 2014). Além disso, seu potencial osteogênico também passou a ser alvo de estudo (dos Santos Neves et al., 2016).

Ainda com relação a seu potencial cicatrizante, o extrato etanólico de folhas de *Hancornia speciosa* foi testado de forma isolada e em conjunto com ácido quínico e bornesitol foram empregados para se avaliar a cicatrização de feridas. Observou-se uma diminuição da liberação de TNF- α , migração celular e proliferação de fibroblastos (Geller et al., 2015).

No contexto da regeneração óssea, Neves et al. (2016), testando uma formulação em gel, a base de *Hancornia speciosa* aplicado topicamente em defeitos na calvária de ratos, observou padrões de cicatrização nos períodos de 15 e 30 dias; em regiões sem defeitos, houve aumento da camada de periósteo após 5 e 11 dias. Contudo, apesar de resultados promissores, doses superiores a 0,6 mg/ml acabaram por limitar a viabilidade celular nos testes in vitro.

Felipetti et al. (2019) conduziram avaliação dos componentes da *Hancornia speciosa* quanto à regeneração óssea sistemicamente. Com modelo animal, ingestão via gavagem diariamente, e avaliação aos 15 e 30 dias, testou-se o seu potencial regenerativo na cicatrização de defeito crítico no osso parietal dos animais. Não se observou quaisquer melhoras no processo de reparação óssea.

Já Felipetti et al. (2022) observaram sistemicamente o potencial indutor e de neoformação óssea em defeitos parietais com 2 mm e em regeneração alveolar. Em tal estudo, observou-se a presença de cálcio e fósforo na composição do osso neoformado do alvéolo, sem efeitos positivos no entanto, quando se tratava da reparação da calvária dos animais.

O potencial angiogênico do látex da *Hancornia speciosa* foi avaliado por D'Abadia et al. (2020). O ácido clorogênico foi então associado à remodelação da matriz extracelular, além de estar diretamente associado ao processo de angiogênese.

A avaliação e caracterização das biomembranas a base do látex da *Hancornia speciosa* em relação ao seu potencial de auxílio no processo de cicatrização tecidual foram os objetivos de Pegorin et al. (2021). Demonstrou-se que tais biomembranas apresentavam resistência próxima à da pele humana, estimulavam células inflamatórias, processo de angiogenese e colagenese, além de melhorar a qualidade da cicatrização. Assim, por demonstrar-se sua

biocompatibilidade, revelou-se um potencial cicatrizante de baixo custo para feridas cutâneas.

Costa et al. (2021) avaliou o potencial alergênico da fração sérica do látex da *Hancornia speciosa*, concluindo que seu uso era seguro, principalmente pela baixa concentração de proteínas presentes, quando em comparação com outras formulações de látex já comercializados, expondo assim sua segurança e seu potencial biomédico na reparação de feridas cutâneas.

Nesse contexto, a manipulação e processo de manufatura de polímeros com as propriedades mencionadas deve ser cogitado antes de seu uso. Assim, algumas técnicas como a “solvente casting, podem ser usadas na sua produção de biomembranas a base de polímeros, segundo Ibrahim et al. (2020). O alginato de sódio e o ácido hialurônico podem ser utilizados para este fim, devido às boas propriedades que estes polímeros apresentam.

A mistura do ácido hialurônico ao alginato de sódio, tem sido utilizada na forma de gel em outros ensaios observados na literatura, particularmente para aplicação oral (Baus et al., 2019). O ácido hialurônico (ou hialuranatos) e o alginato são biopolímeros muito estudados, pois demonstram efeito antibacteriano, anti-inflamatório e de estimulação da proliferação celular. Muitos biopolímeros já demonstraram algum papel no processo de cura e alguns desses apresentaram propriedades interessantes como possíveis substitutos da pele humana (Sahana & Rekha, 2018).

O ácido hialurônico é composto de dois dissacarídeos (N-acetil-d-glucosamina e ácido betaglucorônico) que se repetem (Son et al., 2013), ele ainda participa da proliferação celular, da morfogênese, da inflamação e do reparo de feridas (Chen et al., 2018). Suas vantagens sobre outros polímeros, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de imunogenicidade e viscoelasticidade, são muito conhecidas e já testadas (Son et al., 2013).

Para melhorar suas propriedades, o ácido hialurônico tem sido complexado com outras substâncias. A mistura do ácido hialurônico com o alginato não é nova na literatura; estruturas a base de alginato e ácido hialurônico têm sido utilizadas como arcabouço para crescimento e proliferação celular, demonstrando grande potencial devido às propriedades já descritas. O polímero composto por ácido hialurônico e alginato foi apontado como um arcabouço promissor para o

reparo de defeitos subcondrais (Chen et al., 2018). A utilização dessas substâncias para *drug delivery* (Zhang et al., 2019), incluindo aplicação para cavidade oral (Baus et al., 2019), vem sendo descrita na literatura. Algumas aplicações visam a sua utilização como potencial terapêutico para engenharia de tecidos (Ansari et al., 2017; Jung et al., 2019). Sendo assim, polímeros como o alginato, o ácido hialurônico e o látex da *Hancornia speciosa* reúnem características importantes para serem consideradas na produção de um biofilme ideal na aplicação em reparo de defeitos ósseos.

Apesar dessas promissoras características, no caso dos enxertos alógenos, reações imunológicas (rejeição), risco de transmissão de doenças e infecções ainda são problemas não resolvidos. Para se superar tais problemas, vários tipos de substitutos ósseos como cerâmica a base de fosfato de cálcio, colágeno, vidros bioativos e polímeros biodegradáveis vem sendo usados clinicamente e em estudos. Dentre tais materiais, a hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tem sido utilizada na reconstrução de tecido ósseo perdido, tanto na Medicina, como na Odontologia. Embora demonstre boa biocompatibilidade e osteocondutividade, ela não é reabsorvida nas fases tardias de cicatrização óssea, permanecendo no sítio tratado. Além disso, pode oferecer riscos a infecções secundárias, de acordo com Fujisawa et al. (2018).

Diante das desvantagens apresentadas pelos enxertos ósseos, a busca por novos biomateriais que contemplem as características ideais propostas por Jones (2001), e dos resultados promissores com relação às terapias regenerativas apresentados pelos polímeros anteriormente citados, este estudo propõe avaliar um novo biomaterial que apresente biocompatibilidade, baixo custo e fácil reprodutibilidade e que possibilite o tratamento regenerativo ou reparador de defeitos ósseos.

O filme contendo *Hancornia speciosa* com ácido hialurônico e alginato reúne algumas características consideradas ideais em um biomaterial. Além disso, pode ainda, atuar como um sistema de liberação de fármaco para a hidroxiapatita, a qual possui excelentes propriedades osteoindutivas e osteocondutivas (Groppo et al., 2017; Kubasiewicz-Ross et al., 2017). Apesar dos estudos promissores a respeito da ação desses biomateriais na reparação óssea, pouco ainda se conhece sobre as interações de todos esses compostos juntos na cicatrização óssea.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito reparador da adição da seiva de *Hancornia speciosa* (HS) e da hidroxiapatita (Hap) ao filme de ácido hialurônico/alginato de sódio na cicatrização de defeitos ósseos críticos induzidos na calvária de ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Aspectos éticos e legais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e registrado sob número 5747-1/2021 (ANEXO 1).

4.2 Amostra

Para o delineamento amostral levou-se em consideração: valor do grau de confiança de 95% (para 1,96); desvio máximo de 20% ($s=0,20$). Erro padrão mínimo (d) que se deseja encontrar de $\pm 5\%$ da média (50%); e nível de significância de 5%, de acordo com o seguinte cálculo:

$$n = 1 + [2C \times (s/d)^2] \quad n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2236/0,5)^2] \quad n = 1 + [21,02 \times (0,4472)^2] \quad n = 1 + [21,02 \times 0,2] \quad n = 1 + 4,204 \quad n = 5,204$$

Sendo o n um valor fracionado, o mesmo deve ser arredondado para o próximo número inteiro, ou seja, seis animais por grupo. O presente trabalho teve três grupos experimentais avaliados em três períodos diferentes, totalizando 36 animais. A distribuição dos animais foi descrita na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos animais por grupo.

Período (dias)	Grupo 1		Grupo 2	
	Lado D	Lado E	Lado D	Lado E
30 (n=6)	HA/ALG/Hap	coágulo	HA/ALG/Hap/HS	Bio Oss®
60 (n=6)	HA/ALG/Hap	coágulo	HA/ALG/Hap/HS	Bio Oss®
90 (n=6)	HA/ALG/Hap	coágulo	HA/ALG/Hap/HS	Bio Oss®

HA: ácido hialurônico, ALG: alginato de Sódio, Hap: hidroxiapatita, HS: Hancornia *speciosa* Gomes (látex), Bio Oss: matriz mineral óssea xenógena.

Foram empregados 36 ratos (Ratos Heterogênicos HanUnib: WH Wistar, *Specific Pathogen Free*), todos adultos, do sexo masculino, com peso variando entre 400 e 450 gramas (idade de 10 a 12 semanas), provenientes do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas e, após o transporte, receberam uma semana de adaptação ao ambiente antes do início do experimento. Eles foram mantidos em condições controladas de iluminação, com

fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, considerando o período de luz das 7h às 19h. A temperatura ambiente foi mantida a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com umidade controlada, alimentação balanceada e água disponível *ad libitum*. Além disso, foram inseridos dois túneis (canos de PVC de 10") em cada gaiola, como forma de enriquecimento ambiental. A ocorrência e intensidade dos efeitos colaterais nos animais foram monitorados diariamente, por meio da escala de faces ou caretas (Sotocinal *et al.*, 2011).

4.3 Materiais utilizados

Para a preparação dos materiais, empregou-se látex de *Hancornia speciosa* (Gomes) a 50% (Rei da Mangaba® – Serro, Minas Gerais). Para manipulação e dosagem dos líquidos, foram utilizadas pipetas P200 e P1000 (Gilson – Middleton, Wisconsin – EUA).

O Bio Oss utilizado foi o “small”, com partículas cujo tamanho variava entre 0,25-1,0 mm (Geistlich, Wolhussen, Suíça).

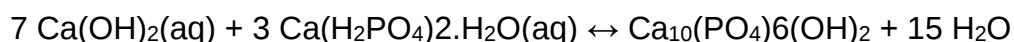
Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de quetamina (Dopalen injetável, laboratórios Vetbrands) e cloridrato de xilazina (Anasedan injetável, laboratórios Vetbrands). As cirurgias foram conduzidas utilizando uma trefina óssea (diâmetro de 5 mm - Dentoflex - São Paulo-SP, Brasil) e fio de Nylon 5.0 (Techsuture, Bauru, SP, Brasil).

Após as cirurgias e a dissecação, as amostras foram examinadas utilizando micro-CT SkyScan 1174 (Sky-Scan N.V., Bélgica), e as imagens foram reconstruídas e analisadas utilizando os softwares NRecon (SkyScan N.V.), DataViewer (SkyScan N.V.) e SkyScan CT Analyser. Os dados foram coletados e organizados em tabelas no software Excel® (Microsoft Corporation©) e analisados no GraphPad Prism 8.0® (Dotmatics, Boston – EUA).

Posteriormente à análise por micro-CT, os crânios foram descalcificados e submetidos a processamento histológico. Foram realizados cortes semisseriados em um micrótomo manual (Leica, RM 2145) com espessura de 7 micrômetros. Para a captura de imagens das lâminas histológicas, foi empregada uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio (Carl Zeiss – Axiolab), com aumento de 5 e 10 vezes.

4.4 Confeção das formulações

A síntese da Hap foi realizada no laboratório de Farmacologia da FOP-UNICAMP. O ensaio foi realizado em condições ambientais (temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para a obtenção de 10 g de Hap, de acordo com a técnica previamente descrita por Santos et al. (2004) e modificada por Groppo et al. (2017). A obtenção se baseou na seguinte equação:



Em 5,16g de hidróxido de cálcio foram adicionados 250 mL de água destilada e deionizada sob agitação magnética. Obteve-se assim a suspensão de fosfato de cálcio monobásico usando 7,53g de fosfato de cálcio monobásico e 250mL de água destilada e deionizada, também sob agitação magnética. As suspensões foram misturadas sob agitação magnética e a suspensão resultante foi mantida em repouso por 24 horas. Descartou-se o sobrenadante e a suspensão final foi filtrada a vácuo. A pasta retida foi então lavada, com a finalidade de se remover íons não reagidos, e seca em estufa à 110°C por 24 horas. O material resultante foi moído até a obtenção de um pó fino, que foi utilizado no experimento.

Foram confeccionados dois filmes com a mistura de ácido hialurônico (HA) e alginato de sódio (ALG), segundo técnica descrita por Amorim, K. (2021). Um dos filmes recebeu somente Hap, sendo denominado filme 1 (HA/ALG/Hap) e outro, denominado de filme 2 (HA/ALG/Hap/HS), continha *Hancornia speciosa* Gomes (HS). Todos os filmes foram preparados pela técnica “solvent casting”. Para o preparo do filme 2, a dispersão dos polímeros isolados (AH e ALG) foi preparada dissolvendo-os diretamente na solução de HS a 50%, a partir do extrato do fruto da planta adquirido comercialmente, mediante agitação magnética. Para cada dispersão foram utilizados 225mg dos polímeros AH e ALG, além de 15ml de HS. A Hap foi adicionada à blenda, juntamente com glicerina usada como plastificante, ambas na concentração final de 5%, durante a dispersão de ALG. Essa suspensão foi usada nos filmes 1 e 2. As dispersões foram mantidas em agitação magnética até que se houvesse atingido completa homogeneização. Após isso, foram misturadas em iguais proporções de HA:ALG (1:1), mantendo-se a agitação constante por 30 minutos, para permitir a interação dos compostos. Tais concentrações e proporções dos reagentes basearam-se em estudo de Amorin K.(2021).

Além dos filmes 1 e 2, utilizou-se a matriz mineral xenógena de origem bovina (Bio Oss, granulação entre 0,25 e 1mm) como controle positivo e o coágulo, como controle negativo.

4.5 Preparo cirúrgico na calvária de ratos

Os defeitos ósseos críticos da calvária dos 36 animais foram confeccionados de acordo a uma técnica modificada, descrita por Escoda-Francolí et al. (2018). Os animais foram anestesiados por uma injeção de xilazina a 2% (10 mg/kg) e 10% de cetamina (90 mg/kg) por via intraperitoneal.

Realizou-se a tricotomia e antissepsia da região craniana utilizando uma solução de PVP-I a 10%. Uma lâmina 15c foi firmemente pressionada contra a pele até o periósteo para realizar incisão mediana em direção anteroposterior de 2 cm de comprimento. Promoveu-se a divulsão do tecido subcutâneo e os ossos parietais foram expostos.

Com a calvária exposta e as margens do retalho devidamente afastadas, uma trefina óssea (diâmetro externo de 5 mm – Helmut-Zepf, Seitingen-Oberflacht, Germany) foi usada para cortar e remover cuidadosamente as corticais externa e interna da região parietal bilateral da calvária do rato (Figura 1), sob 600 rpm e irrigação abundante com solução de NaCl a 0,9%. Assim, um orifício de aproximadamente 5 mm foi criado em cada lâmina do osso parietal, totalizando dois orifícios, lados direito e esquerdo, observando o animal da cabeça para a cauda. O cirurgião responsável pela confecção dos defeitos e pelo preenchimento dos mesmos e sua sutura, com treinamento específico, trabalhando com auxílio de magnificação.



Figura 1: Exposição dos defeitos críticos na calvária do animal.

Cada animal recebeu dois tratamentos, os quais foram avaliados post-mortem por microtomografia computadorizada e por histologia.

No grupo 1, o defeito ósseo de 18 animais foi preenchido somente com o coágulo sanguíneo (controle negativo) no lado direito e com o filme 1 (HA/ALG/Hap) no lado esquerdo. No grupo 2 com 18 animais, o defeito foi preenchido com o enxerto bovino Bio Oss, levemente umidificado com solução salina, no lado esquerdo (controle positivo) e com o filme 2 (HA/ALG/Hap/HS) no lado direito, descritos na tabela 1. Os materiais foram inseridos com auxílio de cureta alveolar de Molt (Helmut-Zepf, Seitingen-Oberflacht, Germany), sem compressão excessiva.

Os tecidos foram reposicionados e suturados (5 a 6 pontos) com fio de Nylon 5.0 (Techsuture, Bauru, SP, Brasil). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais.

Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas individuais e tiveram analgesia, no período pós-operatório imediato, com a administração de cetoprofeno na dose de 5mg/kg do animal, por via subcutânea associado ao tramadol na dose de 5mg/kg do animal, também por via subcutânea.

Uma vez que O procedimento cirúrgico na calvaria dos animais enquadrar-se no protocolo G3, os animais tiveram acompanhamento diário a dor e sofrimento utilizando a Escala de Grimace. Os animais também foram avaliados semanalmente com relação ao seu peso para a observar o consumo de água e comida (Sotocinal et al., 2011).

Os animais foram mortos após 30, 60 e 90 dias da cirurgia (6 animais por grupo por tempo), por sobredose do anestésico geral utilizado previamente. A cabeça foi desarticulada do corpo e dissecada para retirada em bloco e fixada em solução de formol a 10% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), durante 24 horas a 40°C. As cabeças foram então submetidas à microtomografia (item 4.6) e posteriormente ao processamento histológico (item 4.7).

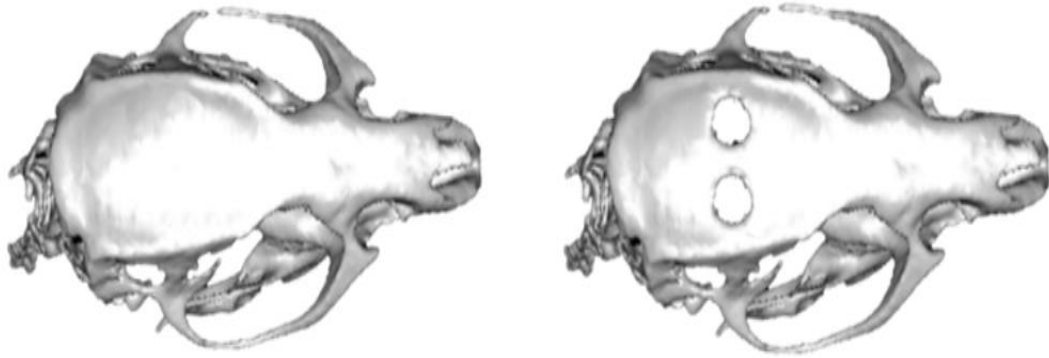


Figura 2. Aspecto da tomografia da cabeça do animal com e sem a trefinagem.

4.6 Microtomografia computadorizada

A análise por micro-CT foi conduzida seguindo a técnica previamente descrita por Weigert (2016). As seis cabeças, obtidas em cada grupo e em cada tempo, foram escaneadas no micro-CT SkyScan 1174 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica). A digitalização foi conduzida em rotação de 360°, com etapas de rotação de 0.30, utilizando um filtro de alumínio de 0.5 mm de espessura, potência de 70 kV, corrente de 114 mA, tamanho de 14.8 mm pixel e resolução de 21.39 μ m. As amostras foram estabilizadas em cera utilidade, sobre um adaptador fornecido pelo fabricante do aparelho, a fim de se evitar movimentos durante o exame.

As imagens foram analisadas por meio do software CTAn (MicroCT Bruker). O software NRecon (Bruker microCT) foi utilizado para a reconstrução das imagens. A qualidade e a microarquitetura óssea foram avaliadas, analisando:

- 1) Volume de tecidual total;
- 2) Volume ósseo;
- 3) Espessura trabecular
- 4) Número de trabéculas/mm;
- 5) Separação entre as trabéculas ósseas.

Após a obtenção, as imagens de cada amostra foram reconstruídas por meio do software NRecon. Após a aquisição, as imagens foram visualizadas e reorientadas em cada um dos planos tridimensionais manualmente no software DataViewer para tornar paralelos os planos transaxiais e minimizar erros de análise.

4.7 Processamento histológico

As cabeças foram submetidas inicialmente à descalcificação em solução de EDTA a 7% e formol a 5% até verificação de completa descalcificação (± 30 dias). A peça foi então diminuída, usando-se lâminas de bisturi. As peças foram lavadas em água destilada, desidratadas em etanol a 70%, 95% e 100%, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafilme (Paraplast®) a 65°C, em sentido longitudinal. Nos blocos obtidos foram feitos cortes semisseriados, em micrótomo manual (Leica, RM 2145) com 7 micrômetros de espessura. Estes foram então corados com hematoxilina e eosina (HE), por método de rotina.

Para a aquisição de imagens das lâminas histológicas, utilizamos uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio (Carl Zeiss – Axiolab). As imagens foram capturadas num aumento de 5 e 10x.

As imagens foram submetidas à análise qualitativa considerando as características histológicas do processo de cicatrização óssea

4.8 Morfometria

Para a aquisição das imagens das respectivas lâminas histológicas, foram feitas fotos em micrografias dos cortes histológicos via fotomicroscópio (Eclipse E800, Nikon) e sistema fotográfico Nikon (FDX-35), empregando-se objetivas de 2,5x e 10x em iluminação convencional mensurados através do Image-Pro Software Plus 26 4.5 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, EUA). As imagens foram gravadas com uma câmera fotográfica (CoolSNAP-Pro Color - Roper Scientific Photometrics) adaptada ao microscópio, utilizando objetivas de 2,5X e 10X.

4.9 Forma de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos através da análise de microtomografia computadorizada foram inseridos em tabelas do software Excel 2010® (Microsoft Corporation©). Eles foram categorizados em tratamentos 1, 2, 3 e 4, e organizados em colunas, representando os três períodos de análise. Cada desfecho foi inicialmente submetido a análises individuais, utilizando os testes de Bartlett (para

homoscedasticidade) e Shapiro-Wilk (para normalidade). Em seguida, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste linear em dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli (pós-teste). O nível de significância de 5% foi adotado, utilizando o software GraphPad Prism 8.0.

Quanto aos achados histológicos, estes foram descritos qualitativamente por dois avaliadores independentes, os quais descreveram suas observações. As análises dos dois avaliadores foram então consolidadas e apresentadas conjuntamente.

5 RESULTADOS

5.1 Acompanhamento dos Animais

Após a etapa cirúrgica, todos os 36 animais foram acompanhados regularmente para avaliação de sinais de dor e de sofrimento. Aos 60 dias, um animal do grupo 1 morreu, alguns minutos após a anestesia, durante a etapa cirúrgica de preparação dos defeitos críticos, o que representou uma perda amostral de um espécime ($n=1$), o que fez a amostra contemplar 35 animais ($n=35$).

5.2 Análise da Microtomografia Computadorizada

A Figura 3 mostra os volumes tecidual e ósseo em função dos grupos e tempos observados.

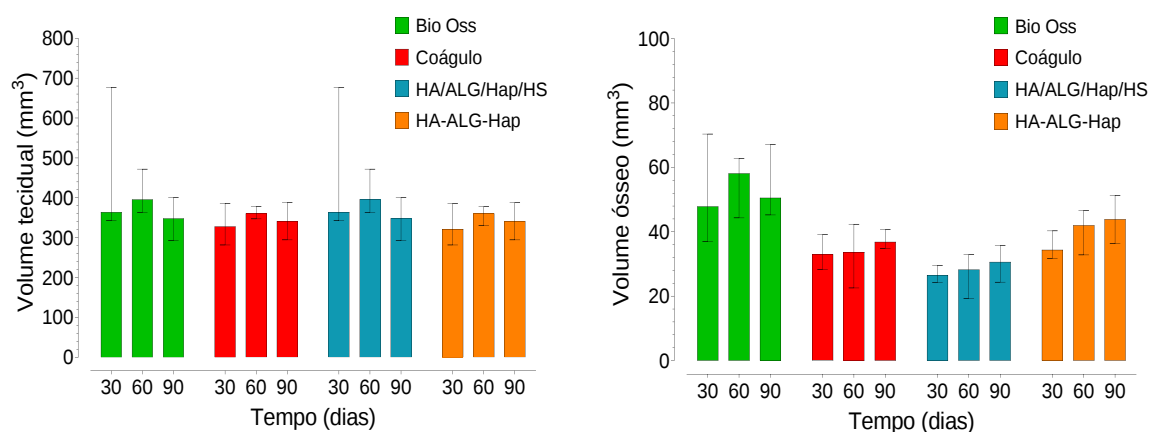


Figura 3. Volumes (mediana e desvio interquartilico) tecidual e ósseo em função dos grupos e tempos.

A análise dos dados mostrou que, para o volume tecidual, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 3 tempos estudados para os grupos Bio Oss ($p=0.28$), Coágulo ($p=0.58$), HA/ALG/Hap/HS ($p=0.28$) e HA/ALG/Hap ($p=0.67$). Também não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 4 grupos tanto para o tempo 30 dias ($p=0.18$), 60 dias ($p=0.10$) e 90 dias ($p=0.99$).

Considerando o volume ósseo (mediana; desvio interquartilico), não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 3 tempos estudados para os grupos Bio Oss ($p=0.85$; 30 dias = 47.8;33.5, 60 dias = 58.1;18.5, 90 dias = 50.5;21.9) Coágulo ($p=0.50$; 30 dias = 33.0;10.8, 60 dias = 34.0;20.0, 90 dias = 36.8;5.8), HA/ALG/Hap/HS ($p=0.59$; 30 dias = 26.5;5.32, 60 dias = 28.2;13.5, 90 dias = 30.6;11.3) e HA/ALG/Hap ($p=0.12$; 30 dias = 34.3;8.5, 60 dias = 42.0;13.8, 90 dias = 44.0;15.0).

= 43.9;15.0). Entretanto, para o tempo 30 dias, o grupo Bio Oss mostrou maior volume ósseo do que os grupos Coágulo ($p=0.0450$) e HA/ALG/Hap/HS ($p=0.0002$), sendo que o HA/ALG/Hap/HS mostrou menor volume que o HA/ALG/Hap ($p=0.0222$).

Nesse tempo, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos.

No tempo de 60 dias, o Bio Oss mostrou maior volume ósseo que os grupos coágulo ($p=0.0080$) e HA/ALG/Hap/HS ($p=0.0004$), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos. Após 90 dias, o grupo Bio Oss mostrou maior volume do que os grupos Coágulo ($p=0.0160$) e HA/ALG/Hap/HS ($p=0.0002$), sendo que este último também apresentou menores valores que o grupo HA/ALG/Hap ($p=0.0101$), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os demais.

A espessura, o número e a separação entre as trabéculas ósseas são representadas na Figura 4.

A Figura 4 mostra que, nos tempos de 30 e 90 dias, o Bio-Oss mostrou menor espessura trabecular que os demais grupos ($p<0.05$), não havendo diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos. Já no período de 60 dias, o Bio Oss apresentou menor espessura trabecular que os grupos Coágulo ($p=0.0072$) e HA-ALG-Hap ($p=0.0053$), mas não apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p=0.45$) com HA/ALG/Hap/HS, o qual apresentou menor espessura ($p=0.0386$) do que o HA-ALG-Hap.

A mesma Figura mostra que houve maior ($p=0.0092$) espessura de trabéculas aos 90 dias para o grupo Bio Oss em relação aos 30 e 60 dias, sendo que estes dois tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si. Também não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tempos 30, 60 e 90 dias para os demais grupos. O número de trabéculas também não sofreu influência ($p>0.05$) dos tempos em estudo, mas apenas dos tratamentos em pouca extensão. O Bio Oss induziu mais trabéculas do que o HA/ALG/Hap/HS nos tempos de 60 ($p=0.0179$) e 90 ($p=0.0170$) dias, sendo que o HA/ALG/Hap também mostrou mais trabéculas que o HA/ALG/Hap/HS nos tempos de 30 ($p=0.0269$) e 90 ($p=0.0349$) dias.

A separação trabecular não sofreu influência significativa ($p>0.05$) nem dos tratamentos e nem dos tempos em estudo.

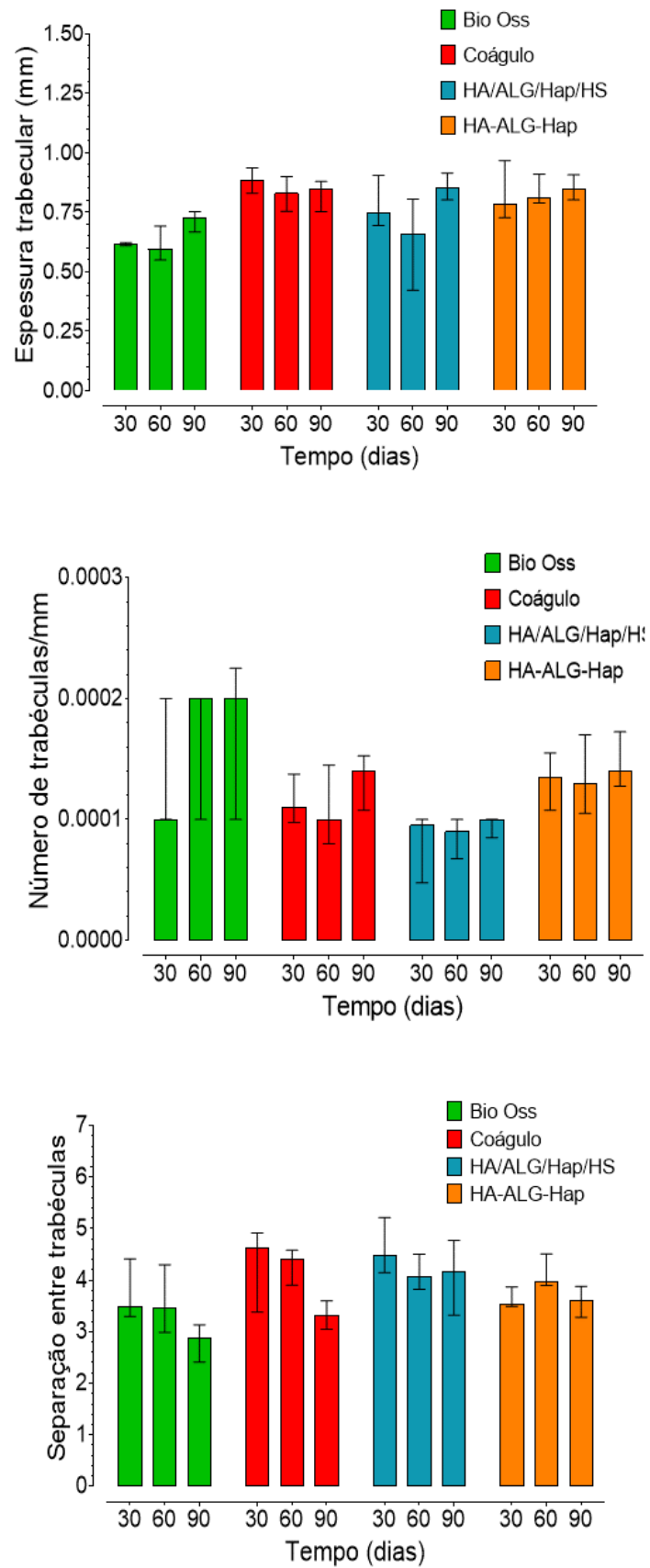


Figura 4. Espessura, número e separação entre as trabéculas ósseas (mediana e desvio interquartilico) em função dos grupos e tempos.

5.3 Análise histológica qualitativa

A Figura 5 mostra o aspecto histológico obtido em função dos grupos e tempos em estudo.

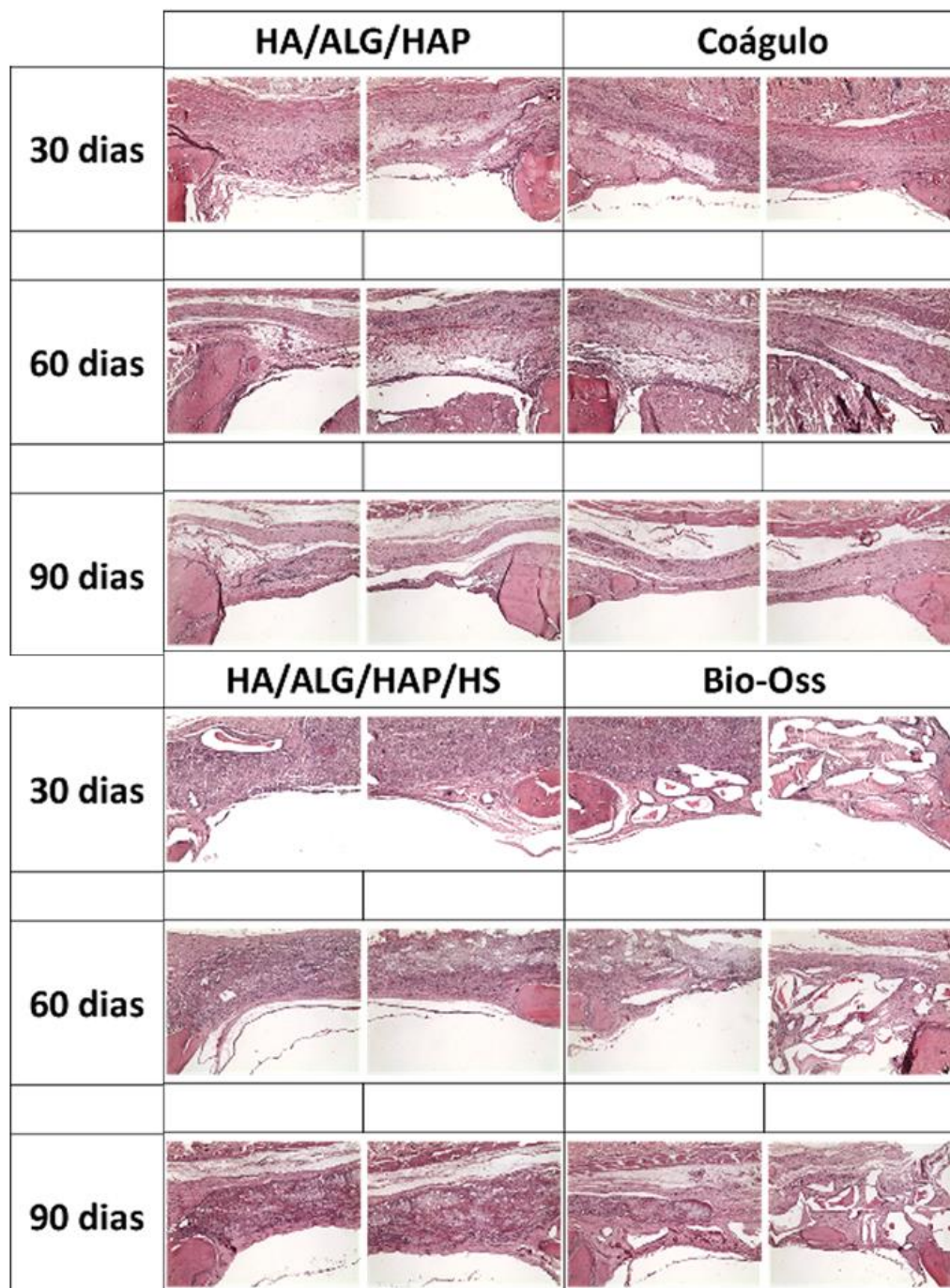


Figura 5. Aspecto histológico (5 × magnificação) em função dos grupos e tempos.

Na sequência do preparo e da coloração, as amostras histológicas foram coloridas com hematoxilina e eosina, analisadas por dois avaliadores em relação aos achados ósseos.

O aspecto histológico aos 30 dias do grupo coágulo revelou que havia presença de tecido conjuntivo, com pouca ou nenhuma formação óssea, particularmente na região central da lesão. Foi possível notar uma intensa rede de fibras colágenas logo acima da camada muscular mais interna e a borda externa da ferida apresentava formação epitelial. A Figura 6 mostra o aspecto histológico obtido em função dos grupos, com 10x magnificação, evidenciando a formação celular ao longo do tempo.

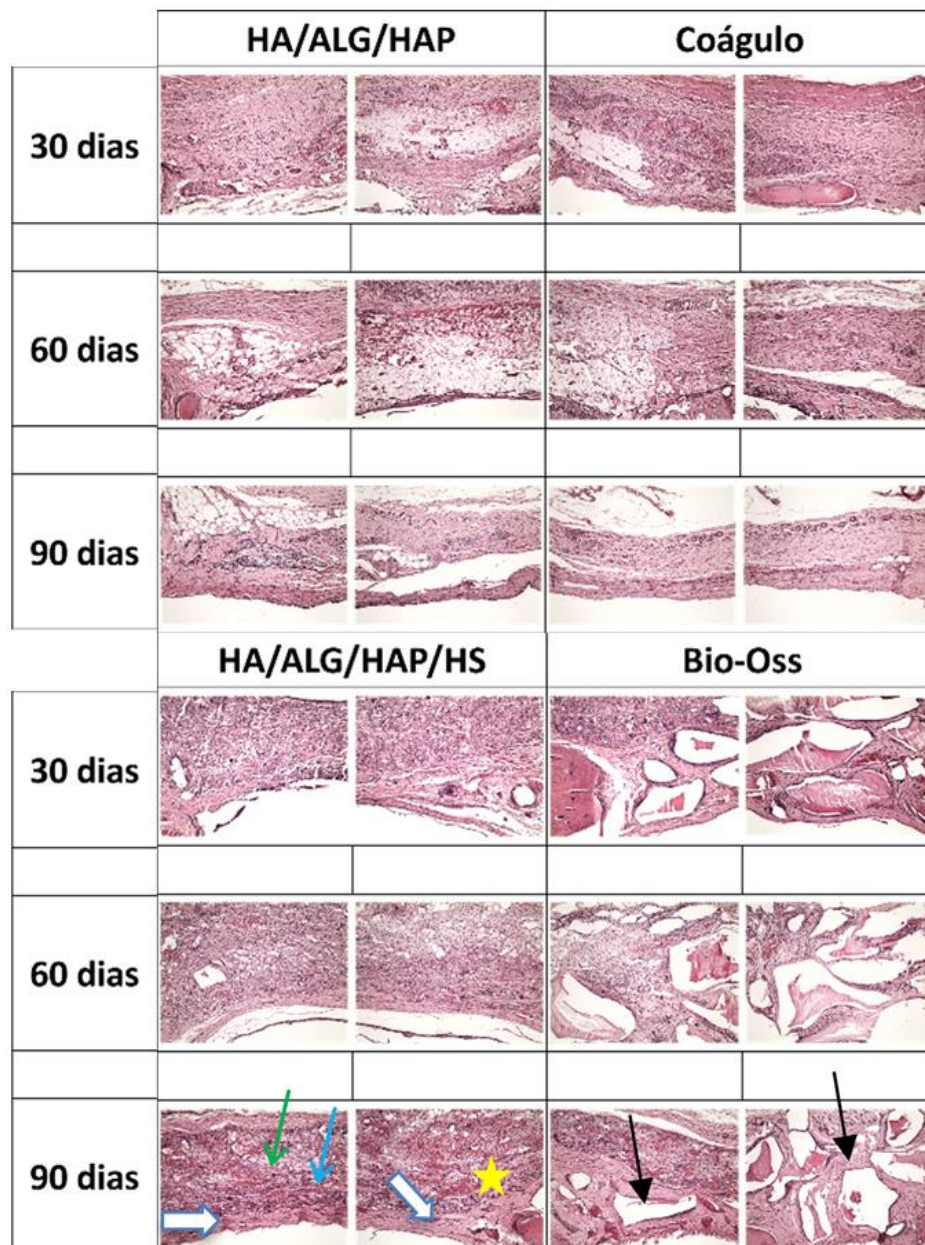


Figura 6. Aspecto histológico (10 × magnificação) em função dos grupos e tempos. Setas brancas: osso neoformado (imaturo) na base do defeito preenchido por AH/ALG/Hap/HS aos 90 dias; seta verde: camada de tecido conjuntivo logo acima do osso imaturo; seta preta: osso neoformado

aprisionando grânulos de biomaterial xenógeno, intenso angiogênese. Na estrela amarela, podemos evidenciar camada de tecido conjuntivo frouxo, rica em angiogênese.

A formação de uma fina camada de tecido osteóide na base das figuras é visível em todos os grupos, com maior expressão aos 90 dias, principalmente para as imagens do grupo HA/ALG/Hap/HS (setas brancas), onde percebe-se uma fina camada de osso neoformado logo abaixo de uma camada extensa de tecido conjuntivo frouxo (seta verde), com rica angiogênese (setas azuis), ensaio HA/ALG/Hap/HS, 90 dias.

No grupo tratado com Bio Oss, 90 dias, observou-se o aprisionamento dos grânulos do biomaterial em meio ao osso neoformado (setas pretas). Logo acima, identificamos a presença de uma camada de tecido conjuntivo frouxo, rico em células e com rica angiogênese (estrela amarela). Nos experimentos com HA/ALG/Hap/HS e Bio Oss, 90 dias, observamos na base da figura uma camada de tecido ósseo neoformado bem definida, em toda a extensão do defeito, coberta por uma espessa camada de tecido conjuntivo frouxo, bastante rica em células e com intensa angiogênese, quando comparada às imagens dos experimentos tratados por HA/ALG/Hap e Coágulo, no mesmo período de 90 dias, por exemplo.

No tratamento HA/ALG/Hap, 30 dias (figura 7), podemos notar novos vasos na região do preenchimento com o filme (setas verdes), além de uma camada de tecido conjuntivo frouxo com a imagem sugerindo a presença de grânulos de HAp (seta azul).

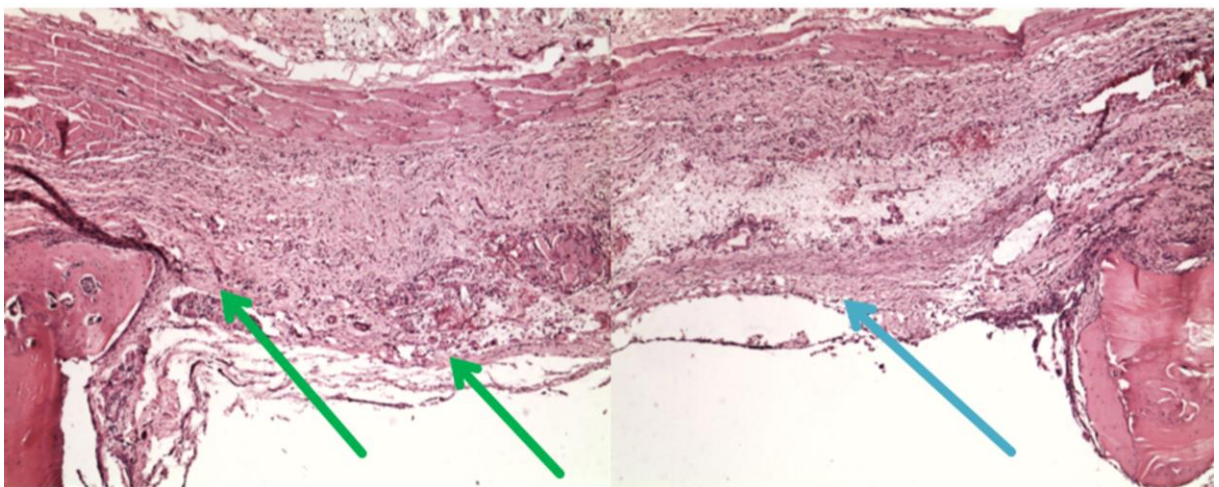


Figura 7. Grupo tratado com HA/ALG/Hap, período 30 dias. Setas verdes: novos vasos; seta azul: grânulos de hidroxapatita. (aumento 10x).

No grupo tratado com coágulo, 30 dias (figura 8) podemos observar claramente a presença de coágulo na região central do defeito (seta verde), além de uma invaginação do tecido epitelial sobre a área do defeito (setas brancas), diferente do que podemos observar em todos os outros 3 ensaios, no mesmo período.

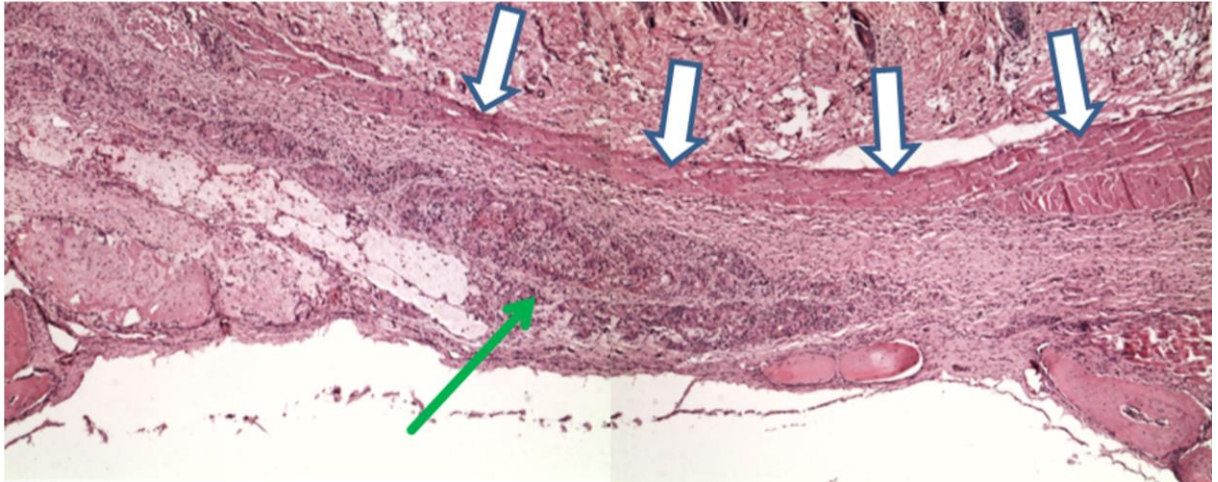


Figura 8. grupo tratado com HA/ALG/Hap, período 30 dias. Seta verde: presença de coágulo ao centro do defeito; setas brancas: invaginação das camadas superiores do tecido sobre a região do defeito. (aumento 10x).

Para os animais tratados com HA/ALG/Hap/HS, em 30 dias (figura 9), notamos a presença de uma camada espessa de tecido conjuntivo frouxo central ao defeito, rica em células e com um padrão sugerindo grande angiogênese (seta azul), com imagem sugerindo neoformação óssea junto às margens do defeito (setas vermelhas).

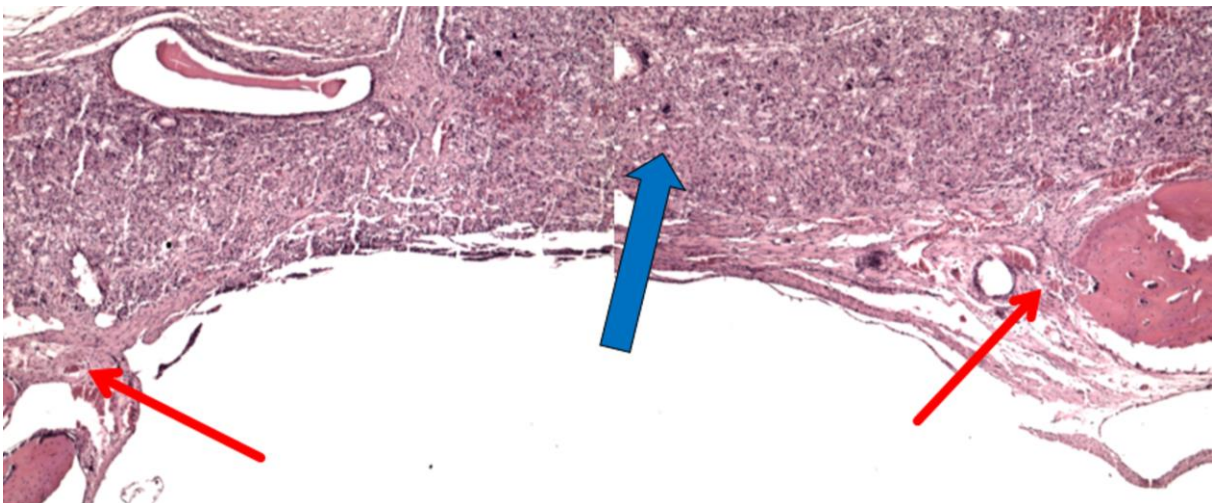


Figura 9. grupo tratado com HA/ALG/Hap/HS, período 30 dias. Seta azul: presença de tecido conjuntivo ao centro do defeito; setas vermelhas: neoformação óssea próxima às margens do defeito. (aumento 10x).

Aos 30 dias, animais tratados com Bio Oss (figura 10) exibem defeito preenchido ao centro por faixa de tecido conjuntivo (seta azul), grânulos de biomaterial bem definidos e envoltos por um tecido ósseo imaturo, unindo margem direita à margem esquerda do defeito (setas amarelas).

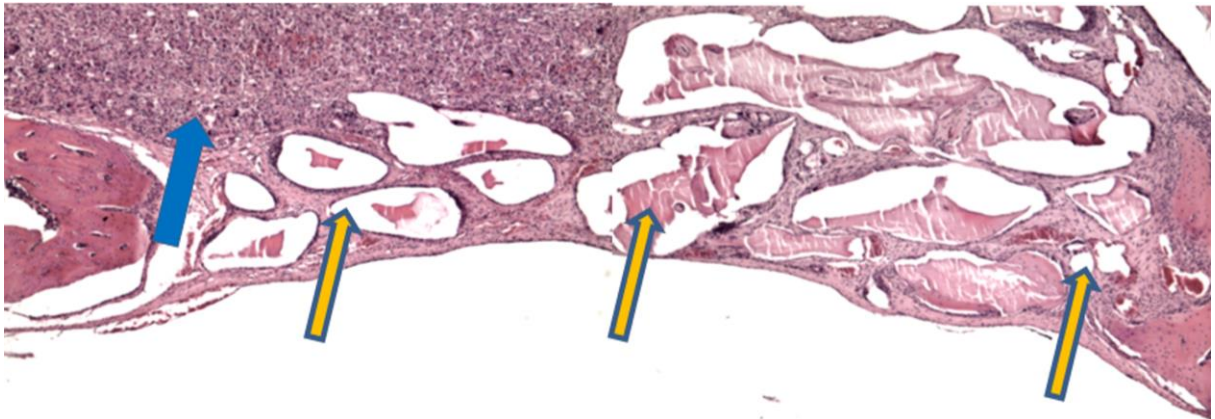


Figura 10. grupo tratado com Bio Oss, 30 dias. Seta azul: tecido conjuntivo frouxo; setas amarelas: grânulos de biomaterial. (aumento 10x).

Aos 60 dias, o grupo que recebeu como tratamento HA/ALG/Hap exibiu uma área de osteocondução bem ao centro do defeito (seta azul, figura 11), com angiogênese e tecido conjuntivo (seta branca) bastante presente logo abaixo da camada muscular, diferente dos animais tratados por coágulo, que no período, ainda apresentavam um tecido conjuntivo desorganizado preenchendo o defeito.

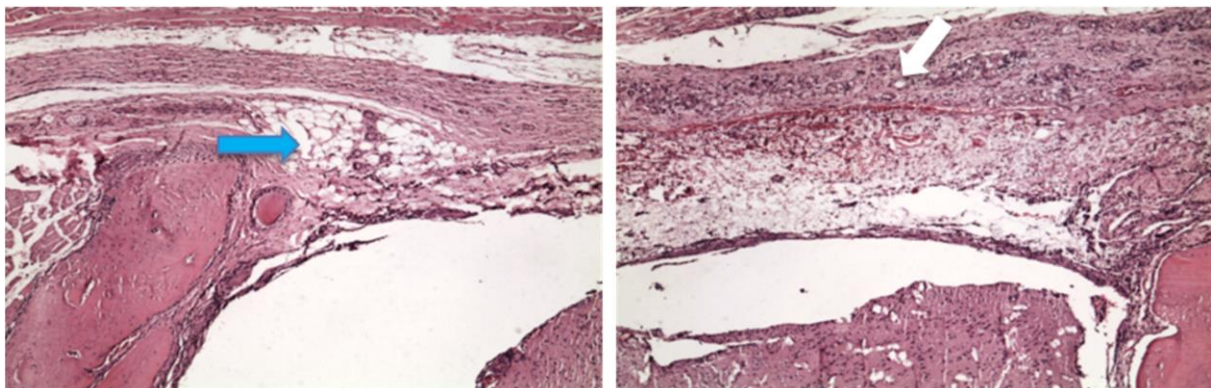


Figura 11. grupo tratado com HA/ALG/HAp, período 60 dias (10x magnificação). Seta azul: grânulos de Hidroxiapatita promovendo osseocondução; seta branca: tecido conjuntivo.

Os animais tratados com HA/ALG/Hap/HS aos 30 dias, possuíam uma fina camada de tecido ósseo neoformado, unindo as extremidades do defeito, com tecido conjuntivo e intensa angiogênese, além de áreas com concentração de nanopartículas de Hap residuais (figura 12).

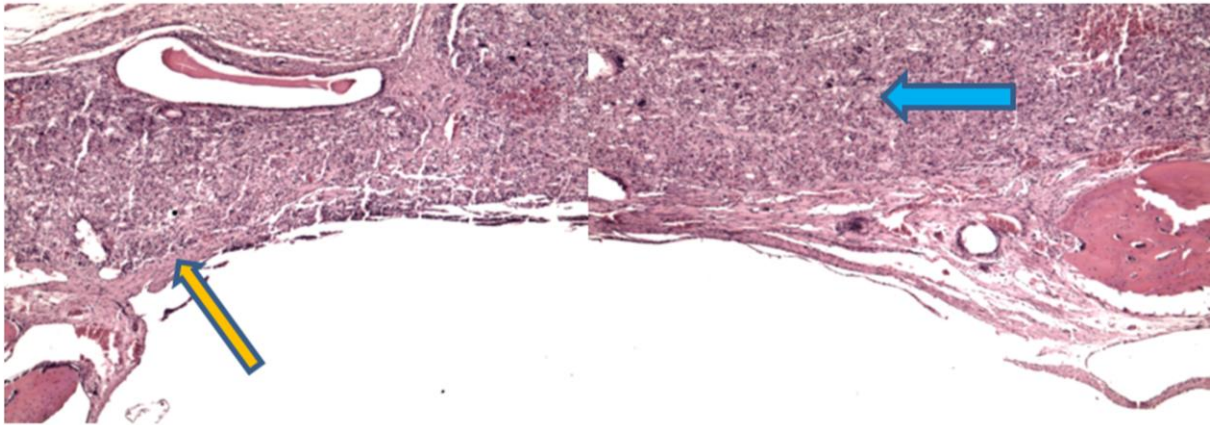


Figura 12. HA/ALG/Hap/HS, período de 30 dias (10x magnificação). Seta amarela: osso neoformado (tecido osteóide) junto à margem do defeito. Seta azul: tecido conjuntivo frouxo.

As imagens no tempo de 90 dias (figura 13), mostram um tecido osteóide logo abaixo de nanopartículas não reabsorvidas do biomaterial Hap, para os animais do grupo tratado por HA/ALG/Hap (seta amarela) e a presença de tecido conjuntivo frouxo (seta azul), diferente dos animais tratados por coágulo, que exibem um tecido osteóide bem delgado e uma camada mais espessa de tecido conjuntivo frouxo logo acima.

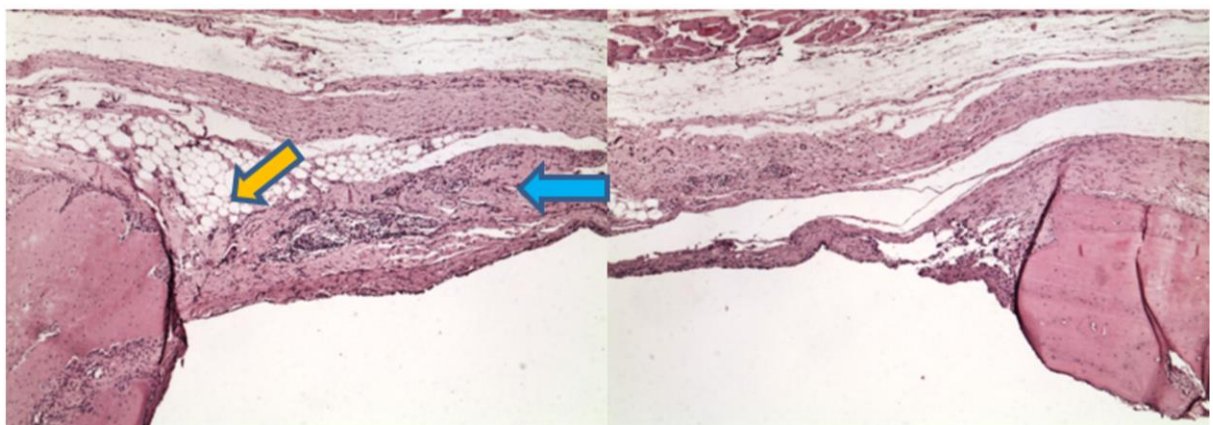


Figura 13. HA/ALG/HAp, 90 dias, aumento 10x. Seta amarela: HAp não reabsorvida; Seta azul: tecido conjuntivo.

A camada de tecido ósseo neoformado (seta amarela) no grupo tratado por Bio Oss aos 90 dias, além de mais espessa, estava coberta por um tecido

conjuntivo bastante celularizado (seta azul) e com maior espessura quando comparado ao grupo HA/ALG/Hap/HS no mesmo período como mostra a figura 14, abaixo.

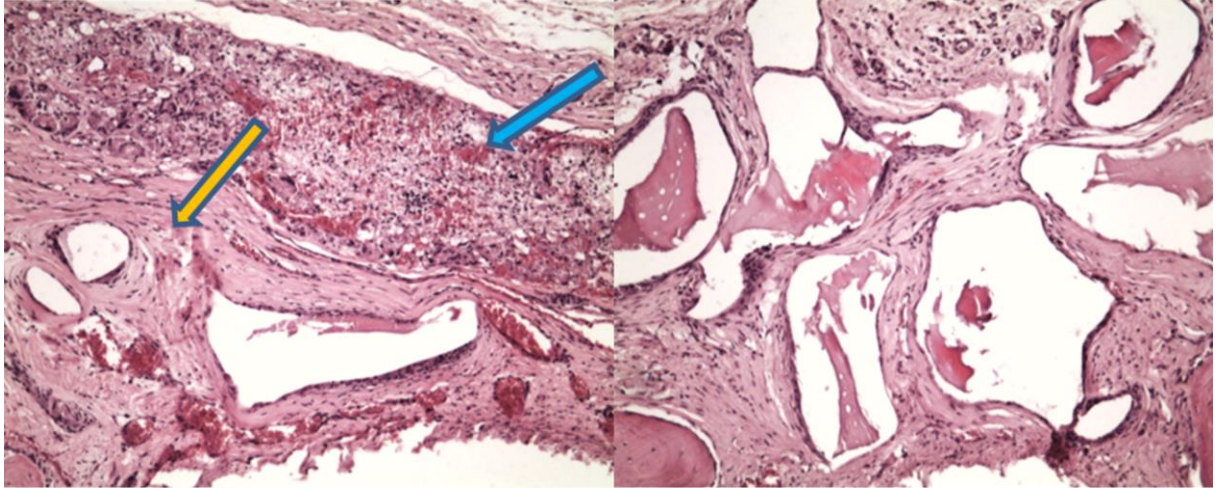


Figura 14. Grupo tratado com Bio Oss, período 90 dias (10x magnificação). Seta amarela: tecido ósseo neoformado, desse a margem direita, até a margem esquerda do defeito. Seta azul: tecido conjuntivo.

6 DISCUSSÃO

A regeneração de defeitos ósseos representa desafio considerável. Para a Odontologia, os defeitos ósseos podem ter várias etiologias, tais como trauma dentário, sequelas de doenças periodontais, falhas em tratamentos endodônticos, além de cistos e tumores que causam reabsorção óssea (Vasconcelos et al., 2020). No contexto do presente estudo, foi proposto o aprimoramento do processo de regeneração óssea intramembranoso utilizando dois tratamentos distintos por aloenxertos.

Nesse sentido, o modelo de defeito ósseo na calvária de ratos oferece vantagens significativas devido à sua proximidade aos principais mecanismos de reparo ósseo nas estruturas cranianas, resultantes do processo de formação intramembranosa. Essa característica torna os defeitos nessa região particularmente valiosos para a compreensão dos aspectos biológicos da enxertia óssea. Esse método se estabeleceu como uma ferramenta essencial nas fases pré-clínicas do desenvolvimento de novos biomateriais (Cooper et al., 2010; Fernandes et al., 2022).

Na pesquisa sobre defeitos ósseos é fundamental compreender o conceito do tamanho crítico, o qual se refere ao menor tamanho que impossibilita a cicatrização completa durante o período de reparo ao longo da vida do animal. Algumas perspectivas na literatura sugerem que o termo "não-cicatrizante" seria uma designação mais apropriada em substituição ao termo "tamanho crítico", conforme proposto por Einhorn (1999), Cooper et al. (2010) e Spicer et al. (2012).

Essa consideração destaca a importância de uma terminologia precisa e alinhada com os processos biológicos subjacentes, promovendo uma compreensão mais clara e uniforme no campo da pesquisa em regeneração óssea. A escolha de defeitos de menor tamanho não apenas minimiza o impacto na motricidade do animal, mas também oferece a vantagem de permitir um maior número de intervenções em um mesmo espécime, resultando na redução do número de animais nos grupos experimentais. Dessa forma, defeitos bicorticais de 5mm, utilizados no presente estudo, podem ser classificados como críticos, não cicatrizando naturalmente no período e permitindo realizar mais de um procedimento no mesmo animal, em conformidade com os estudos de Mohan et al. (2022), Fernandes et al. (2022) e Uribe et al. (2022).

Esses defeitos demonstraram consistentemente bons resultados comparativos, o que justifica sua frequente utilização. Além de proporcionarem um ambiente propício para a avaliação de biomateriais, defeitos de tamanho padronizado facilitam a interpretação e comparação dos resultados, contribuindo para a robustez e confiabilidade dos dados obtidos. A seleção criteriosa do tamanho e localização dos defeitos ósseos, planejada no presente estudo, é essencial para garantir a relevância e validade experimental (Fernandes et al., 2022).

A escolha do modelo de enxertia deve levar em consideração a região alvo a ser trabalhada, dessa forma, o processo de ossificação intramembranosa, observada no presente estudo a partir do modelo em calota craniana, é de especial interesse para a odontologia, em virtude de ser a forma de desenvolvimento ósseo mais comum na formação de diversos ossos cranianos, incluindo o frontal, parietal, partes do occipital, do temporal e os ossos maxilares superior e inferior. O reparo dessas estruturas ósseas é notavelmente complexo, iniciando-se com um processo inflamatório inicial, seguido pela formação de um coágulo, sua diferenciação e organização em osso primário imaturo, culminando na transformação em tecido ósseo neoformado, além de envolver uma fase de remodelação constante. Durante essas diversas etapas, as células mesenquimais indiferenciadas desempenham um papel ativo, realizando migração, proliferação e diferenciação celular (Egawa et al., 2014; Carvalho Vasconcelos et al., 2020). O presente trabalho evidenciou as etapas da cicatrização óssea no decorrer do tempo de experimento, confirmando o elucidado pela literatura.

Apesar das etapas cicatriciais terem sido visualizadas, a evolução celular observada não se traduziu em aumento de volume ósseo ao longo do tempo. A ausência de diferenças significativas nesse parâmetro, particularmente entre os períodos mais tardios (60 e 90 dias) nos permite inferir que, mesmo com uso do BO ou com filme acrescido de hidroxiapatita, sua aplicação nas condições do estudo não foram suficientes para permitir a formação de um arcabouço celular suficiente para reconstrução do defeito, de modo controverso ao relatado por Carvalho Vasconcelos et al. (2020).

As características de um biomaterial para formação de arcabouço ósseo necessitam, além de cumprir com os preceitos de biocompatibilidade, serem semelhantes as características do tecido ósseo natural do hospedeiro. Nesse

sentido, a propriedade polímero-elastomérica das membranas desenvolvidas pode ter atuado como corpo estranho, retardando o processo cicatricial. Tal fator se assemelha aos resultados de Groppo et al. (2017) e Paiva (2023) que utilizaram compostos baseados em substâncias plásticas. Resultado divergente do de Vasconcelos que obteve resultados satisfatórios ao utilizar elementos cerâmicos de estrutura cristalina com maior proximidade ao osso.

Usualmente o coágulo sanguíneo resulta em um preenchimento com matriz mineralizada pequeno, entre 5 e 15%, mas a ausência do coágulo sanguíneo resulta na formação de um tecido fibroso fino dentro do defeito, sem a presença de osso visível, como previamente descrito por Spicer et al. (2012). Nesse sentido, os achados do grupo coágulo, tanto histológicos quanto microtomográficos foram compatíveis com o esperado, tendo um processo de mineralização sutil.

Os resultados obtidos pela análise em microtomografia computadorizada entraram em contraste com os achados histológicos. Enquanto a técnica histológica mostrou a formação de tecido osteoide (BO) e intensa angiogênese (HA/ALG/HAp), a microtomografia não mostrou esses achados refletidos em maior volume ósseo. Embora Borges (2020) argumente que a microtomografia e a histologia oferecem informações complementares entre si, a primeira com resultados tridimensionais e a segunda com bidimensionais, a microtomografia mostra basicamente a calcificação tecidual e não é capaz de fornecer informações detalhadas sobre a estrutura celular tecidual.

Uma vez que, para o processo de cicatrização óssea é exigido um arcabouço confiável para o tecido mineralizado, Resende et al., (2019) relatou que o BO apresentava maior superfície mineralizada, ressaltando as boas propriedades osteocondutoras desse material. Esse enxerto apresentava seu material particulado em processo de reabsorção e uma intensa proliferação celular que não era vista nas imagens de microtomografia computadorizada. Resultados similares foram encontrados no presente estudo, pois embora não tenha sido observado o aumento progressivo da massa óssea nas imagens tomográficas, as imagens histológicas mostraram o preenchimento parcial do defeito por uma faixa de tecido conjuntivo permeada por grânulos do biomaterial bem definidos e envoltos por um tecido ósseo imaturo, os quais uniam a margem direita à margem esquerda do defeito.

O Bio Oss é um substituto ósseo xenógeno de origem bovina, considerado uma matriz inorgânica óssea com estrutura microporosa semelhante ao osso medular humano, o que lhe confere adequada osseocondutividade, além de um período de reabsorção lenta (Jensen et al., 2012). Esses enxertos ósseos bovinos são biocompatíveis e frequentemente utilizados em cirurgias orais regenerativas. A desidratação, liofilização e esterilização são tratamentos realizados nestes biomateriais para que sejam posteriormente usados em seres humanos (Uribe et al., 2022).

Os resultados observados com o enxerto Bio Oss foram compatíveis com os resultados de Fürst et al. (2003), os quais mostraram após 30 e 60 dias da implantação que partículas do biomaterial próximas às bordas do defeito eram incorporadas em meio ao osso neoformado. Já as partículas ao centro da região estavam imersas em matriz tecido conjuntivo, tal qual observado no presente estudo.

A presença de grânulos de Bio Oss, ainda aos 90 dias, foi previamente descrita por Fujisawa et al. (2018). Embora a evolução do volume ósseo não tenha sido evidente, houve maior formação de tecido ósseo nesses grupos em estudo, corroborando com os resultados de Uribe et al. (2022) que utilizou metodologia semelhante à desenvolvida nesse trabalho.

Uma vez que um dos princípios precursores da osteointegração de implantes seja sua correta fixação, é possível que os resultados de menor intensidade de formação óssea verificados com os biomateriais empregados no presente estudo tenham sido influenciados pela falta de um material ou membrana que protegesse os biomateriais em teste. Orsini et al. (2007), Nooh et al. (2016) e Fernandes et al. (2022) utilizaram de membranas de colágeno separando o tecido mole da área preenchida e obtiveram resultados mais consistentes e numericamente mais expressivos. No presente estudo, a opção de não usar a cobertura por membranas foi visando desafiar os biomateriais de forma mais intensa e verificar seu potencial de formação óssea independentemente de outros fatores.

Em alguns espécimes examinados, observou-se que apenas a sutura não foi suficiente para garantir a fixação adequada do enxerto, comprometendo assim o processo de cicatrização. Nesse sentido, a utilização de membranas, similares às empregadas na periodontia, poderia ser considerada alternativa promissora (Angelis et al., 2022; Messina et al., 2022).

As boas propriedades do Bio Oss são, pelo menos em parte, atribuídas à presença de hidroxiapatita, um biomaterial com reconhecida osteocondutividade, permitindo assim uma adequada estrutura tridimensional como arcabouço para a rede de fibrina (Pires et al., 2021). Vasconcelos et al. (2020) e Gianulis et al. (2022) ressaltam que a biodisponibilidade de cálcio e fosfato, juntamente com uma circulação sanguínea adequada no local do reparo, são características cruciais que podem influenciar positivamente todo o processo de regeneração óssea.

Felipetti et al. (2022) observaram um aumento significativo na concentração de cálcio após a administração do látex de *Hancornia speciosa* por gavagem, em solução aquosa a 50% e sugeriram que o látex da HS poderia desempenhar um papel benéfico no estímulo da concentração de cálcio, contribuindo, assim, para um ambiente propício ao processo de reparo ósseo. Essa abordagem destaca a importância da investigação de substâncias naturais que possam potencialmente otimizar os resultados nos processos de regeneração óssea, proporcionando insights valiosos para futuras pesquisas e aplicações clínicas.

Embora os aloenxertos testados aqui tenham demonstrado ser menos eficientes no processo de reparo ósseo em comparação com o BO, ambos mostraram potencial biológico para a indução da diferenciação de células mesenquimais em linhagens ósseas e desencadearam formação vascular importante.

Essa formação vascular promoveria a nutrição tecidual proporcionada pela circulação sanguínea na região da fratura e, juntamente com a biodisponibilidade de cálcio e fósforo, poderia desempenhar algum papel no processo (Vasconcelos et al., 2020; Gianulis et al., 2022). Essas considerações ressaltam a complexidade do processo de regeneração óssea e a importância de estratégias multidisciplinares para otimizar os resultados nos procedimentos de enxertia.

A hidroxiapatita foi incorporada a uma das propostas de biomaterial, pois apresenta osteocondutividade e biocompatibilidade. Entretanto, sua taxa de reabsorção é pequena e poderia ser associada ao risco aumentado de infecções secundárias (Fujisawa et al., 2018). Embora incorporada nos dois biomateriais propostos, foi na associação com a HS que houve menor formação de volume ósseo, além de características histológicas mais desfavoráveis. Tais elementos

indicam que a associação entre hidroxiapatita com a *Hancornia speciosa* não apresenta elementos favoráveis a osteoregeneração.

Os resultados do presente estudo mostraram baixa presença de processos inflamatórios ao longo dos períodos de observação, particularmente no biomaterial contendo o látex da *Hancornia speciosa*, como observou-se no trabalho de Costa et al., (2021). Dessa forma, os materiais desenvolvidos apresentam propriedades osteoindutivas limitadas, porém são biocompatíveis.

A não utilização de uma barreira de separação de meios (tecido mole/tecido duro) como utilizada por Fernandes et al. (2022), pode ter influenciado negativamente nos resultados, pois observou-se a invaginação do tecido mole sobre os tratamentos empregados, o que contrastou com o trabalho de Nooh et al., (2016). Além disso, na análise histológica foram considerados somente a descrição qualitativa, inibindo a comparação matemática com os resultados obtidos por microtomografia.

A falta de esterilização dos materiais empregados (AH/ALG/HAp e AH/ALG/HAp/HS) também seria um viés, por limitar as propriedades reparadoras do tecido ósseo, embora não se tenha observado reação inflamatória nos períodos observados, provando-se inclusive a biocompatibilidade dos ensaios em questão.

Ademais, os cortes histológicos e sua posterior análise não foram feitos de maneira cega, o que poderia permitir outro viés durante a análise dos dados obtidos.

A notável angiogênese, percebida na avaliação histológica do grupo tratado com hidroxiapatita, pronunciada próxima à fina camada de osso neoformado, é similar ao observado por de Almeida et al. (2014) e D'Abadia et al. (2020). Entretanto, a análise quantitativa de volume ósseo sugere limitação de sua associação com o látex de *Hancornia speciosa*.

De uma forma geral, os resultados obtidos com os dois biomateriais propostos foram interessantes e inspiram novos estudos quando as lâminas histológicas são consideradas, mas não são animadores pela visão estrita da microtomografia.

7 CONCLUSÃO

Levando em consideração as limitações metodológicas do presente estudo, podemos concluir que os biomateriais empregados demonstraram biocompatibilidade, ressaltada pela ausência de reações inflamatórias nas amostras analisadas. O Bio Oss apresentou melhor formação óssea e o biomaterial composto por ácido hialurônico, alginato de sódio e hidroxiapatita apresentou propriedades que auxiliam no processo de reparo de defeitos ósseos de maneira semelhante ao Bio Oss. Ademais, a adição do látex da *Hancornia speciosa* Gomes estimula a angiogênese, mas parece não melhorar o processo de formação de tecido mineralizado.

REFERÊNCIAS*

Almeida LM, Floriano JF, Ribeiro TP, Magno LN, da Mota LS, Peixoto N, Mrué F, Melo-Reis P, Lino Junior Rde S, Graeff CF, Gonçalves PJ. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. J Mater Sci Mater Med. 2014 Sep;25(9):2153-62. doi: 10.1007/s10856-014-5255-8. Epub 2014 Jun 29. PMID: 24973907.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. Crit Rev Biomed Eng. 2012. 40(5):363-408.

Ansari S, Diniz IM, Chen C, Aghaloo T, Wu BM, Shi S, et al. Alginate/hyaluronic acid hydrogel delivery system characteristics regulate the differentiation of periodontal ligament stem cells toward chondrogenic lineage. J Mater Sci Mater Med. 2017 Oct. 1528(10):162.

Amorim, Klinger de Souza. Avaliação da toxicidade, do perfil de permeação in vitro e eficácia anestésica in vivo da mistura lidocaína/prilocaína associada a filmes de ácido hialurônico/alginato de sódio. Piracicaba, SP:[s. n.], 2021.

Bae EB, Kim HJ, Ahn JJ, Bae HY, Kim HJ, Huh JB. Comparison of bone regeneration between porcine-derived and bovine-derived xenografts in rat calvarial defects: A non-inferiority study. Materials (Basel). 2019 Oct. 1812(20):3412.

Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res. 1999 Nov. 14(11):1805-15.

Baus RA, Zahir-Jouzdani F, Dünnhaupt S, Atyabi F, Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery: In vitro-in vivo correlation study. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2019.142:498–505.

*De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Borges JS, Costa VC, Irie MS, de Rezende Barbosa GL, Spin-Neto R, Soares PBF. Definition of the Region of Interest for the Assessment of Alveolar Bone Repair Using Micro-computed Tomography. J Digit Imaging. 2023 Feb. 36(1):356-364.

Carvalho-Formiga M, De Dayube URC, Chiapetti CK, Rossi-Figueiredo D, De Shibli JA. Socket preservation using a (dense) ptfe barrier with or without xenograft material: A randomized clinical trial. Materials. 2019. 12(18):2902.

Carvalho Vasconcelos R, Ferreira C, de Araújo EM, Motta F, Bomio M, de Araújo Júnior RF, Paiva DFF, Pirih FQ, da Silva JSP, Chan AB, Cruz LJ, Ishii M, de Medeiros CACX, Coelho Bernardo Guerra G, de Araújo AA. Zirconia/hydroxyapatite (80/20) scaffold repair in critical size calvarial defect increased FGF-2, osteocalcin and OPG immunostaining and IL-10 levels. Am J Transl Res. 2020 Jun. 15;12(6):2439-2450.

Chen P, Xia C, Mo J, Mei S, Lin X, Fan S. Interpenetrating polymer network scaffold of sodium hyaluronate and sodium alginate combined with berberine for osteochondral defect regeneration. Materials Science and Engineering: C. 2018. 91:190–200.

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 Jun. 125(6):1685-1692.

Costa AF, Gonçalves KC, Bailão EFLC, Caramori SS, Valadares MC, Gonçalves PJ, Almeida LM. *Hancornia speciosa* serum latex fraction: a non-allergenic biomaterial. Braz J Biol. 2021 Oct. 1183:e251075.

D'Abadia PL, Bailão EFLC, Lino Júnior RS, Oliveira MG, Silva VB, Oliveira LAR, Conceição EC, Melo-Reis PR, Borges LL, Gonçalves PJ, Almeida LM. *Hancornia speciosa* serum fraction latex stimulates the angiogenesis and extracellular matrix remodeling processes. An Acad Bras Cienc. 2020 Jun. 1292(2):e20190107.

Deepthi, S Venkatesan, J Kim, S-K Bumgardner, J D Jayakumar, R. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016. 93:1338–1353.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011 May 31;9:66.

Dos Santos Neves J, Franchin M, Rosalen PL, Omar NF, Dos Santos MA, Paschoal JAR, Novaes PD. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. *J Ethnopharmacol*. 2016 May 13;183:151-158

Egawa S, Miura S, Yokoyama H, Endo T, Tamura K. Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration. *Dev Growth Differ*. 2014 Jun. 56(5):410-24.

Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Oct. (367 Suppl):S59-67.

Escoda-Francolí J, Sánchez-Garcés MÁ, Gimeno-Sandig Á, Muñoz-Guzón F, Barbany-Cairó JR, Badiella-Busquets L, Gay-Escoda C. Guided bone regeneration using beta-tricalcium phosphate with and without fibronectin-An experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2018 Oct;29(10):1038-1049.

Felipetti FA, Bereta RM, Piedade SMS, Novaes PD. Oral Administrations of *Hancornia speciosa* Gomes Latex Do Not Increase Bone Neoformation. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*. 2019 Dec54(6):692-696.

Felipetti FA, Costa VSLP, Neves JDS, Sousa IG, Piedade SMS, Novaes PD. *Hancornia speciosa* Gomes Latex Increases Bone Mineralization in Rats: A Preclinical Study. *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*. 2022 Jan 2057(3):488-495.

Fernandes Y, Mantovani R, Reino D, Novaes A Jr, Messoria M, Gustavo Sousa L, Palioto D, Scombatti de Souza S. Evaluation of a New Porcine Bone Graft on the Repair of Surgically Created Critical Bone Defects in Rat Calvaria: Histomorphometric and Microtomographic Study. *J Funct Biomater*. 2022 Aug 23;13(3):124.

Ferreira HC, Serra CP, Endringer DC, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*. 2007 Aug;14(7-8):473-8.

Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J*. 2016 Jan;98-B(1 Suppl A):6-9.

Fillingham YA, Cvetanovich GL, Haughom BD, Erickson BJ, Gitelis S. Bioceramic bone graft substitute for treatment of unicameral bone cysts. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2016 Aug. 24(2):222-7.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.

Fujisawa K, Akita K, Fukuda N, Kamada K, Kudoh T, Ohe G, Mano T, Tsuru K, Ishikawa K, Miyamoto Y. Compositional and histological comparison of carbonate apatite fabricated by dissolution-precipitation reaction and Bio-Oss®. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 Jul 2129(8):121.

Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, Sanroman F, Watzek G. Sinus grafting with autogenous platelet- rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histo-morphometric study in minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 200314:500–508.

Geller FC, Teixeira MR, Pereira AB, Dourado LP, Souza DG, Braga FC, Simões CM. Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. *Phytother Res*. 2015 Dec29(12):1887-93.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov. 36(3):S20-7.

Giannoudis PV, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury*. 2009 Dec. 40(3):S1-3.

Gianulis E, Wetzell B, Scheunemann D, Gazzolo P, Sohoni P, Moore MA, Chen J. Characterization of an advanced viable bone allograft with preserved native bone-forming cells. *Cell Tissue Bank*. 2023 Jun;24(2):417-434.

Groppo MF, Caria PH, Freire AR, Figueroba SR, Ribeiro-Neto WA, Bretas RES, Prado FB, Haiter-Neto F, Aguiar FH, Rossi AC. The effect of a hydroxyapatite impregnated PCL membrane in rat subcritical calvarial bone defects. *Arch Oral Biol*. 2017 Oct;82:209-215.

Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*. 2019 Jun;46 Suppl 21:92-102.

Ibrahim YHY, Regdon G Jr, Kristó K, Kelemen A, Adam ME, Hamedelniei EI, Sovány T. Design and characterization of chitosan/citrate films as carrier for oral macromolecule delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2020 Apr 15;146:105270.

Ionescu A, Kozhemyakina E, Nicolae C, Kaestner KH, Olsen BR, Lassar AB. FoxA family members are crucial regulators of the hypertrophic chondrocyte differentiation program. *Dev Cell*. 2012 May 15;22(5):927-39.

Janick J, Paull RE. *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*. 2008. 85p.

Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan. 41(1):114-20.

Jones FH. Teeth and Bones: Applications of Surface Science to Dental Materials and Related Biomaterials. Surface Science Reports. 2001. 42:75-205.

Jung SW, Oh SH, Lee IS, Byun JH, Lee JH. In Situ Gelling Hydrogel with Anti-Bacterial Activity and Bone Healing Property for Treatment of Osteomyelitis. Tissue Eng Regen Med. 2019 Aug 22;16(5):479-490.

Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J, Seeliger J, Kozak K, Jurczyszyn K, Gerber H, Dominiak M, Kunert-Keil C. New nano-hydroxyapatite in bone defect regeneration: A histological study in rats. Ann Anat. 2017 Sep;213:83-90.

Kuttappan S, Mathew D, Nair MB. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review. Int J Biol Macromol [Internet]. 2016 Dec;93:1390–401.

Kuttappan S, Mathew D, Nair MB. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review. Int J Biol Macromol. 2016 Dec;93(Pt B):1390-1401.

LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. Chem Rev. 2008 Nov;108(11):4742-53.

Machado T. Efeito do substituto ósseo particulado associado ou não ao MTA na citotoxicidade, resposta tecidual e reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba. Araçatuba, 2019.

Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS, Fernandes PD. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. J Ethnopharmacol [Internet]. 2011 May;135(2):530–7.

Mohan S, Karunanithi P, Raman Murali M, Anwar Ayob K, Megala J, Genasan K, Kamarul T, Balaji Raghavendran HR. Potential Use of 3D CORAGRAF-Loaded

PDGF-BB in PLGA Microsphere Seeded Mesenchymal Stromal Cells in Enhancing the Repair of Calvaria Critical-Size Bone Defect in Rat Model. Mar Drugs. 2022 Aug 31;20(9):561.

Moraes Tde M, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, Brito AR, Hiruma-Lima CA. *Hancornia speciosa*: indications of gastroprotective, healing and anti-Helicobacter pylori actions. J Ethnopharmacol. 2008 Nov 20;120(2):161-8

Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. Reprod Biomed Online. 2005 Aug;11(2):162-76.

Nauth A, Giannoudis PV, Einhorn TA, Hankenson KD, Friedlaender GE, Li R, Schemitsch EH. Growth factors: beyond bone morphogenetic proteins. J Orthop Trauma. 2010 Sep;24(9):543-6.

Navarro, V. P. Nelson-Filho, P. Silva, L. A. B. Freitas Aldevina Campos. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. Rev. odontol. UNESP. 2006.35(4): 233-238.

Neto LS, Moraes-Souza RQ, Soares TS, Pinheiro MS, Leal-Silva T, Hoffmann JC, Américo MF, Campos KE, Damasceno DC, Volpato GT. A treatment with a boiled aqueous extract of *Hancornia speciosa* Gomes leaves improves the metabolic status of streptozotocin-induced diabetic rats. BMC Complement Med Ther. 2020 Apr. 17;20(1):114.

Neves JS, Franchin M, Rosalen PL, Omar NF, Dos Santos MA, Paschoal JAR, et al. Newman, T. Carranza, K. Periodontia Clínica. 12. ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

Nooh N, Ramalingam S, Al-Kindi M, Al-Rasheed A, Al-Hamdan KS, Al-Hezaimi K. Real-Time Assessment of Guided Bone Regeneration in Standardized Calvarial Defects in Rats Using Bio-Oss With and Without Collagen Membrane: An In Vivo

Microcomputed Tomographic and Histologic Experiment. Int J Periodontics Restorative Dent. 2016. 36 Suppl:s139-49.

Orsini G, Scarano A, Degidi M, Caputi S, Iezzi G, Piattelli A. Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss particles in sinus augmentation. Oral Dis. 2007 Nov. 13(6):586-93.

Oryan, A Alidadi, S Moshiri, A Maffulli, N Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, v. 9, n. 1, p. 18, 2014.

Paiva DFF. Efeito da mistura de etil-cianoacrilato e látex da *Hancornia speciosa* (Gomes) sobre a regeneração óssea em ratos. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2023.

Papi P, Di Murro B, Tromba M, Passarelli PC, D'Addona A, Pompa G. The Use of a Non-Absorbable Membrane as an Occlusive Barrier for Alveolar Ridge Preservation: A One Year Follow-Up Prospective Cohort Study. Antibiotics (Basel). 2020 Mar 3;9(3):110.

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 Jul109(7):938-948.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomaterials: types, applications, and market. Química Nova, 2015.

Pistilli R, Felice P, Piattelli M, Nisii A, Barausse C, Esposito M. Blocks of autogenous bone versus xenografts for the rehabilitation of atrophic jaws with dental implants: preliminary data from a pilot randomised controlled trial. Eur J Oral Implantol. 2014 Summer;7(2):153-71.

Pott A, Pott VJ, Sobrinho AAB. Plantas Úteis À Sobrevivência No Pantanal. IV Simpósio sobre Recurso Naturais e Sócio-econômico do Pantanal, p. 1–16, 2004.

Reis VHOT, Rodrigues BM, Loubet Filho PS, Cazarin CBB, Rafacho BPM, Dos Santos EEF. Biotechnological potential of *Hancornia speciosa* whole tree: A narrative review from composition to health applicability. Heliyon. 2022 Oct. 108(10):e11018.

Resende RFB, Sartoretto SC, Uzeda MJ, Alves ATNN, Calasans-Maia JA, Rossi AM, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Randomized Controlled Clinical Trial of Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite for Alveolar Bone Repair. Materials (Basel). 2019 Nov. 612(22):3645.

Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. Clin Oral Impl. Res. 2010. 21:567-576.

Sahana TG, Rekha PD. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. Mol Biol Rep. 2018 Dec. 45(6):2857-2867.

Santos MH, Oliveira M, Souza LPF, Mansur HS & Vasconcelos WL. Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process. Materials Research. 2004. 7(4):625-630.

Santos, A. C. dos C. dos, Ribeiro, I. Índira dos A., & Rosa, F. P. P. (2015). Avaliação morfológica por imagem microtomográfica e histológica do reparo ósseo após o uso de biomaterial. Revista De Ciências Médicas E Biológicas, 14(3), 310–315.

Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, De Bruyn H, Dommisch H, Donos N, Eickholz P, Ellingsen JE, Haugen HJ, Herrera D, Lambert F, Layrolle P, Montero E, Mustafa K, Omar O, Schliephake H. 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.

Silva GC, Braga FC, Lima MP, Pesquero JL, Lemos VS, Cortes SF. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. J Ethnopharmacol. 2011 Sep 1;137(1):709-13.

Silva Junior JF. A cultura da mangaba. Rev Bras Frutic [Internet]. 2004 Apr;26(1).

Silva TF, Coelho MR, Vollú RE, de Vasconcelos Goulart FR, Alviano DS, Alviano CS, Seldin L. Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) grown in the northeast of Brazil. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011 Mar;99(3):523-32.

Son YJ, Yoon IS, Sung JH, Cho HJ, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Porous hyaluronic acid/sodium alginate composite scaffolds for human adipose-derived stem cells delivery. Int J Biol Macromol. 2013 Oct;61:175-81.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. Mol Pain. 2011 Jul 29;7:55. doi: 10.1186/1744-8069-7-55. PMID: 21801409; PMCID: PMC3163602.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. Nat Protoc. 2012 Oct;7(10):1918-29.

Tian, H Tang, Z Zhuang, X Chen, X Jing, X Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. Progress in Polymer Science. 2012. 37(2): 237–280.

Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig*. 2012 Jan;2(1):2-11.

Urist MR. Bone: Formation by Autoinduction. *Science*, 1965 Nov. 12150(3698):893-9.

Zhang Y, Li X, Zhong N, Huang Y, He K, Ye X. Injectable in situ dual-crosslinking hyaluronic acid and sodium alginate based hydrogels for drug release. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2019 Aug;30(12):995-1007.

ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)

CERTIFICADO CEUA nº 84/2021



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Influência da Hancornia speciosa e hidroxiapatita em filmes de ácido hialurônico e alginato na reparação do tecido ósseo em calvária de ratos, registrada com o nº 5747-1/2021, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Marco Antonio Tridapalli Mafra, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 15/04/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	05/04/2021 a 04/07/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/04/2021 a 04/07/2022
Espécie/ linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 350.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie/ linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 350.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie/ linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 350.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie/ linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 350.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie/ linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 350.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao IBAMA, SI SBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 28 de abril de 2021.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Prazo máximo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 550978C1 524D4975 81C562C0 9C18EF62

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

%

INTERNET SOURCES

14%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

Carlos Henrique Bertoni Reis. "Evaluation of the use of heterologous fibrin biopolymer and hydroxyapatite/tricalcium phosphate synthetic ceramic, associated or not with photobiomodulation therapy, in the repair of bone defects", Universidade de São Paulo. Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais, 2023

Publication

3%

2

José Maurício da Rocha, Marco Abdo Gravina, Marcio José da Silva Campos, Cátia Cardoso Abdo Quintão et al. "Shear bond resistance and enamel surface comparison after the bonding and debonding of ceramic and metallic brackets", Dental Press Journal of Orthodontics, 2014

Publication

2%

3

Monica Feresini Groppo, Paulo Henrique Caria, Alexandre Rodrigues Freire, Sidney R. Figueroba et al. "The effect of a hydroxyapatite impregnated PCL membrane

2%

4

Antonio Francisco da Silva Lisboa Neto.
">b/b<", Universidade de Sao Paulo, Agencia
USP de Gestao da Informacao Academica
(AGUIA), 2020

Publication

1 %

5

Mônica Dal Pian Nobre, Raquel Guedes
Fernandes, Chung Man Chin, Horácio Faig-
Leite. "Ação local do alendronato sódico na
reparação óssea de ratos espontaneamente
hipertensos (SHR)", Arquivos Brasileiros de
Cardiologia, 2008

Publication

1 %

6

Camila Vieira da Silva. "Influência da película
adquirida e do momento da aplicação da
solução de AmF/NaF/SnCl₂ na progressão da
lesão de erosão em esmalte", Universidade
de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da
Informacao Academica (AGUIA), 2019

Publication

1 %

7

Bruno Nunes de França. "Efeito da ativação
do receptor ativado por protease do tipo 2
(PAR-2) sobre a atividade osteogênica de
células mesenquimais do ligamento
periodontal", Universidade de Sao Paulo,

1 %

8

Adriana Rodrigues de Freitas. "Condições periodontais e de higiene bucal, qualidade de vida e satisfação com a vida em pacientes obesos diabéticos e não diabéticos submetidos à cirurgia bariátrica", Universidade de São Paulo. Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais, 2015

Publication

1 %

9

Ana Clara Fagundes Pedroni. "Efeito da cell sheet de células-tronco da polpa dentária humana, associada ou não à terapia de fotobiomodulação, no reparo de lesões ósseas em calvárias de ratos portadores de Diabetes Mellitus", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2020

Publication

1 %

10

Débora de Souza Ferreira Sávio. "Efeitos de agregados plaquetários produzidos por três protocolos de centrifugação na neoformação óssea em defeitos criados em calvária de ratos", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2022

Publication

1 %

11

Lana Karine Araújo, Mirrael de Sousa Lopes, Francisco Fábio Pereira de Souza, Marcelo Miranda de Melo et al. "Efficiency analysis of commercial polymeric membranes for bone regeneration in rat cranial defects", Acta Cirúrgica Brasileira, 2023

Publication

1 %

12

Yuan-Wu Chen, Dar-Jen Hsieh, Srinivasan Periasamy, Ko-Chung Yen, Hung-Chou Wang, Hua-Hong Chien. "Development of a decellularized porcine bone graft by supercritical carbon dioxide extraction technology for bone regeneration", Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2021

Publication

1 %

13

Vargas, Pedro Miguel Fernandes. "A Variabilidade da Fc Enquanto Metodo Alternativo Para A Determinacao do Limiar Lactico, em Natacao", Universidade Tecnica de Lisboa (Portugal), 2022

Publication

1 %

14

dos Santos Pires Lourenco, Ana Salome. "Vitamina C e Cancro: Estudo Experimental.", Universidade de Coimbra (Portugal), 2021

Publication

1 %

Exclude quotes On

Exclude matches

< 1%

63

Exclude bibliography On