



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

DANIEL FELIPE FERNANDES PAIVA

EFEITO DA MISTURA DE ETIL-CIANOACRILATO E LÁTEX DA *Hancornia speciosa*
(Gomes) SOBRE A REGENERAÇÃO ÓSSEA EM RATOS.

PIRACICABA

2023

DANIEL FELIPE FERNANDES PAIVA

EFEITO DA MISTURA DE ETIL-CIANOACRILATO E LÁTEX DA *Hancornia speciosa*
(Gomes) SOBRE A REGENERAÇÃO ÓSSEA EM 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 Daniel
Felipe Fernandes Paiva E ORIENTADA
PELO Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

PIRACICABA

2023

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

P166e Paiva, Daniel Felipe Fernandes, 1996-
Efeito da mistura de etil-cianoacrilato e látex da *Hancornia speciosa* (Gomes) sobre a regeneração óssea em ratos / Daniel Felipe Fernandes Paiva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Ossos - Regeneração. 2. Apocináceas. 3. Cianoacrilatos. 4. Modelos animais. I. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effect of the mixture of ethyl-cyanoacrylate and latex from *Hancornia speciosa* (Gomes) on bone regeneration in rats

Palavras-chave em inglês:

Bone regeneration

Apocynaceae

Cyanoacrylates

Models, animal

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora:

Francisco Carlos Groppo [Orientador]

Fernando de Sá Del Fiol

Klinger de Souza Amorim

Data de defesa: 10-02-2023

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4186-9856>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3485732819007625>



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 10 de fevereiro de 2023, considerou o candidato DANIEL FELIPE FERNANDES PAIVA aprovado.

PROF. DR. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

PROF. DR. FERNANDO DE SÁ DEL FIOL

PROF. DR. KLINGER DE SOUZA AMORIM

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 a minha mãe, Elça Virgínia Fernandes Gurgel, a pessoa que mais me incentivou e me deu forças, além de me inspirar a sempre buscar o caminho da educação.

Ao meu amigo, Victor Augusto Benedicto dos Santos, que tanto me auxiliou em cada uma das etapas de meu mestrado.

Aos meus demais familiares e amigos que sempre estiveram comigo em cada um dos momentos mais difíceis e felizes de minha caminhada.

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.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código de financiamento 001 pelo apoio financeiro.

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

Introdução: A regeneração óssea é de grande importância e uma necessidade tanto para a Medicina quanto Odontologia. Melhorar e acelerar esse processo tem sido um objetivo constante. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da mistura de etil-cianoacrilato (ECA) com o látex da *Hancornia speciosa* (Hs) sobre a regeneração óssea em ratos. **Metodologia:** 36 ratos Wistar tiveram dois defeitos críticos de 5mm induzidos em calvária, em cada uma das regiões parietais. Metade deles (n=18) recebeu o tratamento com a mistura de látex de Hs 50% e ECA (grupo Hs+ECA) no primeiro defeito e não recebeu tratamento no segundo defeito (grupo controle). Os outros animais (n=18) receberam no primeiro defeito tratamento com ECA + 200 µL de sangue colhido do próprio animal (grupo ECA) e o segundo defeito foi tratado com osso autógeno obtido do próprio animal durante a trefinagem (grupo OA). Os animais foram acompanhados ao longo de 30, 60 e 90 dias. Dessa forma cada um dos grupos experimentais (n=6) teve seu devido registro ao longo dos três períodos de avaliação. Decorrido esses períodos, os animais foram mortos tendo suas cabeças dissecadas e preservadas por fixação de paraformaldeído a 10% em tampão fosfatado 0,1M (pH 7,4) a 4°C. Para o preparo de microtomografia computadorizada e histologia. Os resultados da análise de microtomografia levaram em consideração os parâmetros morfométricos de volume de tecido ósseo, densidade volumétrica óssea, espessura média de trabéculas ósseas e espaço entre as trabéculas sendo comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguidos pelo pós-teste de Dunn considerado um nível de significância de 5%. Os resultados histológicos foram descritos de modo qualitativo. **Resultados:** Aos 30 dias o volume ósseo do grupo OA diferiu dos grupos controle (p=0,0007) e Hs+ECA (p=0,0111). Após 60 dias, o grupo OA apresentou melhores resultados em relação ao controle (p=0,0003) e ao ECA (p=0,0023). Após 90 dias, o grupo OA diferiu do controle (p=0,0107) e ECA (p=0,0078). Em relação a densidade óssea o grupo OA aos 60 dias foi maior do que todos os grupos analisados nesse período, aos 90 dias o grupo ECA apresentou menor densidade óssea em relação aos grupos OA (p=0,0298) e Hs+ECA (p=0,0173). A análise histológica mostrou que o grupo Hs+ECA apresentou processo de formação de novos vasos em todos os 3 períodos de análise, bem como continuidade no processo de reparação óssea. O grupo controle apresentou encapsulação fibrosa em todos os períodos e células inflamatórias aos 30 dias. O grupo OA teve boa aceitação pelo organismo, mas apresentou

encapsulação fibrosa dos enxertos. O grupo ECA apresentou encapsulamento do tratamento, bem como uma conformidade no processo de reparação óssea, houve também presença de células inflamatórias aos 60 dias. **Conclusão:** A mistura de *Hancornia speciosa* e etil-cianoacrilato possui potencial biológico. Suas características podem ser melhor exploradas em aplicações de membranas e para fixação de enxertos.

Palavras-Chave: Regeneração Óssea; Apocynaceae; Cianoacrilatos; Modelos Animais.

ABSTRACT

Introduction: Bone regeneration is of great importance and a necessity for both Medicine and Dentistry. Improving and accelerating this process has been a constant goal. **Objective:** To evaluate the effects of the mixture of ethyl cyanoacrylate (ECA) with *Hanconia speciosa* (Hs) latex on bone regeneration in rats. **Methodology:** 36 Wistar rats had two 5mm critical defects induced in each parietal region of their calvaria, with half of them (n=18) receiving treatment with a mixture of Hs latex and ECA (Hs+ECA group) in the first defect and no treatment in the second defect (control group). The other half (n=18) received ECA treatment + 200 µL of blood collected from the animal itself in the first defect (ECA group), and the second defect was treated with autogenous bone obtained from the animal during trephination (AB group). The animals were followed for 30, 60, and 90 days, and each experimental group (n=6) was registered throughout the three evaluation periods. After these periods, the animals were killed, and their heads were dissected and preserved by fixation in 10% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C for the preparation of computerized microtomography and histology. The results of microtomography analysis considered the morphometric parameters of bone tissue volume, bone volume density, mean trabecular thickness, and space between trabeculae, compared through Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test, considering a significance level of 5%. The histological results were described qualitatively. **Results:** At 30 days, the bone volume of the AB group differed from the control (p=0.0007) and Hs+ECA (p=0.0111) groups; at 60 days, the AB group showed better results compared to control (p=0.0003) and ECA (p=0.0023); at 90 days, the AB group differed from control (p=0.0107) and ECA (p=0.0078). Regarding bone density, the AB group at 60 days was higher than all groups analyzed in this period, while at 90 days, the ECA group showed lower bone density compared to the AB (p=0.0298) and Hs+ECA (p=0.0173) groups. The histological analysis showed that the Hs+ECA group demonstrated new blood vessel formation in all three analysis periods, as well as continuity in the bone repair process. The control group presented fibrous encapsulation in all periods and inflammatory cells at 30 days. The AB group was well accepted by the organism but presented fibrous encapsulation of grafts. The ECA group presented encapsulation of the treatment, as well as compliance in the bone repair process, with inflammatory cells present at 60 days.

Conclusion: The mixture of *Hancornia speciosa* and ethyl cyanoacrylate has biological potential. Its characteristics can be better explored in applications such as membranes and graft fixation.

Key-Words: Bone Regeneration; Apocynaceae; Cyanoacrylates; Models, Animal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 <i>Hancornia speciosa</i> (Gomes) em saúde	15
2.2 Cianoacrilatos em saúde	19
2.3 Reparação óssea e odontologia	23
3 PROPOSIÇÃO	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Aspectos éticos e legais	27
4.2 Amostra	27
4.3 Materiais utilizados	27
4.4 Confeção dos materiais	28
4.5 Preparo cirúrgico na calvária de ratos	30
4.6 Microtomografia computadorizada	31
4.7 Processamento histológico	33
4.8 Morfometria	33
4.9 Forma de Análise dos Resultados	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Acompanhamento dos Animais	35
5.2 Análise da Micro Tomografia Computadorizada	36
5.3 Análise histológica qualitativa	38
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
Apêndice 1 – Tabela de Sumarização dos Dados em Microtomografia Computadorizada	59
ANEXOS	60
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais	60
Anexo 2 – Relatório de similaridade	61

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo, mineralizado e caracterizado classicamente por três tipos celulares básicos: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Estas células conferem uma dinâmica própria, com estado de constante remodelação (Dimitriou et al, 2011; Fardin et al, 2010; Florencio-Silva et al, 2015).

Esse tecido tem uma boa capacidade de regeneração, mas o dano devido a traumas ou a procedimentos cirúrgicos muitas vezes superam a capacidade fisiológica regenerativa do osso. As grandes áreas de reabsorção são desafios clínicos que frequentemente necessitam de auxílio para a correta reabilitação da função óssea (Durmaz et al, 2022).

Nesse sentido, os enxertos ósseos estão entre as alternativas mais comuns para auxiliar a regeneração do tecido, com um maior destaque para os enxertos autógenos. Esses são caracterizados pelo uso de fragmentos ósseos do próprio paciente, sendo considerado o “padrão ouro” da enxertia. Em geral, apresenta as melhores respostas, mas, pela limitação de sua obtenção e aumento de comorbidades pós-operatórias, não pode ser utilizado em uma parcela considerável das cirurgias (Fardin et al, 2010; Fillingham e Jacobs, 2016; Kim e Kim, 2022).

Os enxertos homólogos ou aloenxertos, são obtidos, em geral, de banco de ossos de dentes e têm seu uso limitado pela dificuldade de compatibilidade entre doadores e pacientes, além da impossibilidade de comercialização, limitando muito seu uso clínico (Groppo et al, 2017; Chu et al, 2022).

Já os enxertos heterólogos (xenoenxertos) têm como característica o uso de ossos de animais (geralmente bovino) como base de enxertia. São comuns para procedimentos odontológicos e, apesar de uma boa resposta, seu uso não apresenta características ideais para incorporação ao organismo (Susin et al, 2022).

Por fim, os enxertos do tipo aloplástico compreendem uma gama de biomateriais que, apesar do nome, contemplam não somente polímeros, mas algumas cerâmicas. São materiais sintéticos com capacidade biológica ativa. Apesar de não serem equivalentes estruturais ao tecido ósseo, estes materiais formam uma importante classe, pois têm mostrado capacidade em substituir o uso dos enxertos

heterólogos, se aproximando das propriedades do autógeno (Fardin et al, 2010; García-Gareta et al, 2015; Vasconcelos et al, 2020).

Os materiais aloplásticos propostos, idealmente devem ter ótima biocompatibilidade; serem osteoindutores, osteogênicos, osteocondutores; não serem propensos a colonização bacteriana; serem boa fonte de cálcio e fósforo; permitirem o crescimento celular; e serem confiáveis a longo prazo (Dimitriou et al, 2010; Groppo et al, 2017; Vasconcelos et al, 2020).

Alguns compostos vegetais como o látex da *Hancornia speciosa* (Hs) já mostraram algumas dessas boas propriedades. A *Hancornia speciosa* mostrou uma importante atividade angiogênica intrínseca, auxiliando a neoformação óssea (Almeida et al, 2014; dos Santos Neves et al, 2016).

Para que ocorra a formação óssea é necessário um bom aporte sanguíneo. Assim, se espera que o enxerto tenha também uma boa aderência ao osso com uma relação próxima o suficiente as características biológicas padrões (dos Santos Neves et al, 2016; Ferreira et al, 2007).

A literatura mostra um bom potencial biológico do látex de *Hancornia speciosa*, comprovando sua segurança biológica para uso em tecidos vivos, bem como reforçam que suas propriedades fornecem subsídio para a proliferação celular. Aplicada por via sistêmica, a *Hancornia speciosa* não induziu efeito significativo sobre a formação óssea. Entretanto, aplicada topicamente em calvárias de ratos, o látex de *Hancornia speciosa* estimulou a proliferação óssea e o processo de angiogênese. Tais eventos tornam-se complementares, uma vez que demonstram um potencial uso local que parece não ter efeitos significativos sistemicamente (Felipetti et al, 2019). Enfatiza-se, no entanto, que o potencial sistêmico do material pode ter sido minimizado pela forma de administração, uma vez que a via oral minimiza e até neutraliza muitos efeitos farmacológicos.

A aplicação direta do látex de *Hancornia speciosa* sobre o osso não permite a estabilidade necessária para mantê-lo em posição, assim, seria necessário um adjuvante para conferir maior estabilidade. Compostos a base de cianoacrilato já demonstraram viabilidade como estabilizadores em razão de sua plasticidade aliado a outras propriedades biológicas singulares (Esteves et al, 2011).

Apesar de muitas vezes ser associado com a formação de formaldeído, compostos de cianoacrilato vem sendo estudados como substâncias capazes de

serem inseridas ao meio biológico com segurança, já foram propostos como colas biológicas, permitindo maior agilidade em suturas. Com propósitos endodônticos, o etil-cianoacrilato também mostrou boa biocompatibilidade *in vitro* (Shigeki, Tomohiro e Kenichi, 2020; de Melo et al, 2013).

O principal representante do cianoacrilato para uso odontológico e médico é a formulação de butil-cianoacrilato comercializado pelo nome de *Histoacryl*[®], entretanto, seu alto custo inviabiliza seu uso rotineiro. No Brasil o composto a base de cianoacrilato mais comumente encontrado é o “Super Bonder[®]”, sendo que sua popularidade e seu uso diversificado, fazem dele um composto barato e de fácil aquisição (Thorium et al, 1990; Leggat, Smith e Kedjarune, 2007; Sohn et al, 2016).

O Super Bonder[®] possui como formulação o etil-cianoacrilato, o qual tem diversas vantagens biológicas quando comparado a outras formulações. Têm também um potencial antibacteriano já comprovado, o que poderia conferir controle adicional de infecções locais no ato cirúrgico. O composto não provoca a inflamação local, bem como não parece provocar reações adversas ao organismo, caracterizando-o como um material promissor, mas ainda sem comprovação com relação à sua utilidade como enxerto ósseo (Andreotti Damante et al, 2020; Palacio et al, 2017; Gezici et al, 2009).

Assim, a associação do etil-cianoacrilato com o látex da *Hancornia speciosa* poderia agregar as boas propriedades dos dois materiais, gerando estabilidade, propriedades antimicrobianas e um bom potencial angiogênico (Almeida et al, 2019; de Melo et al, 2013).

Diante das possibilidades de indução de formação óssea que a associação do etil-cianoacrilato e o látex da *Hancornia speciosa* poderia agregar as características pertinentes a enxertia óssea, o presente trabalho tem por finalidade desenvolver mais uma alternativa em enxertos reconstrutivos com custos reduzidos e que possa ser desenvolvida para aplicabilidade tanto na implantodontia como na ortopedia médica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Hancornia speciosa* Gomes em saúde

O uso de espécies vegetais para uso biomédico tornou-se um interesse recorrente para a indústria farmacêutica em virtude da busca extensiva para novos tratamentos eficazes. Pautado pelo conhecimento popular, muitas plantas possuem potencial de uso biomédico e o Brasil, sendo um país com flora extremamente diversificada, possui grande relevância para esse campo de estudo (Reis et al, 2022; Almeida et al, 2014; da Silva et al, 2011; Moraes et al, 2008).

Nesse contexto, a *Hancornia speciosa* Gomes (Hs), típica da região do cerrado brasileiro, desperta interesse por seu uso em tratamento de diversas enfermidades, pautado pelo conhecimento popular, como hipertensão, úlceras gástricas, inflamação e doenças estomacais (Reis et al, 2022; dos Santos Neves et al, 2016; Silva et al, 2011; Marinho et al, 2011; Moraes et al, 2008).

O potencial farmacológico específico da *Hancornia speciosa* ainda é pouco explorado, apesar de ter ganhado destaque ao longo da última década. Seu uso para tratamento de úlceras gástricas demonstra ser baseado na estimulação de síntese de muco e indução de um efeito antissecretor, além de agir contra *Helicobacter pylori* sem apresentar efeitos toxicológicos para células humanas (Moraes et al, 2008).

Apesar de suas aplicabilidades diversas, o uso de amostras vegetais para uma finalidade biomédica pode também representar riscos, quando seus efeitos não possuem causa totalmente reconhecida. Nesse contexto, o uso de *Hancornia speciosa* para controle de *Candida albicans* foi observado, entretanto, uma investigação mais aprofundada verificou que o potencial antifúngico não está ligado ao extrato, mas a uma resposta fisiológica da planta em si, principalmente em virtude das diferentes comunidades bacterianas presentes no látex da planta, compreendendo exemplares da família *Enterobacteriaceae*. O potencial de infecção pelo uso do látex ainda não foi verificado, todavia, faz-se necessária precaução antes de seu uso (da Silva et al, 2011).

Em relação aos efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo uso da *Hancornia speciosa*, o látex da planta apresenta redução de edema por carragenina, bradicinina, histaminas e serotonininas, além de inibir a migração celular, volume de exsudato inflamatório e os níveis de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, prostaglandina E2, TNF- α e IL-6. Dessa forma, validando o látex vegetal como potencial redutor da inflamação (Marinho et al, 2011).

A partir de substâncias encontradas na *Hancornia speciosa* por meio de estudos etnofarmacológicos, observou-se potencial hipotensor por meio de extrato etanólico das folhas da árvore, tal composto produziu o efeito hipotensivo em modelo animal pela redução dos níveis de angiotensina II e atividade sérica da enzima conversora de angiotensina, além de aumentar o nível plasmático de nitritos. Tais resultados demonstram um potencial interessante a ser explorado para controle de doenças ligadas ao sistema cardiovascular (Silva et al, 2011). Esses achados foram reforçados por Silva et al (2016), ressaltando seu uso como hipotensivo pela redução da resistência periférica pela produção de NO e H₂O₂ nas artérias mesentéricas, ainda com efeitos biológicos adequados validando seu uso para controle pressórico.

Membranas biológicas são usualmente utilizadas na medicina, o látex produzido pela *Hancornia speciosa* permite a criação de membranas com potencial biomédico, sobretudo em relação a atividade angiogênica. Com estrutura semelhante as biomembranas já comercializadas de *Hevea brasiliensis*, os produtos baseados em *Hancornia speciosa* mostraram-se biocompatíveis em formulação aquosa, todavia, apresentam citotoxicidade quando diluídas em amônia. Tal compreensão permite validar, com maior segurança, o uso fitoterápico desses compostos, maximizando seu potencial, principalmente em relação a angiogênese (Almeida et al, 2014).

Outro uso comum para fitoterápicos é o controle da diabetes mellitus que, junto com a hipertensão arterial, compõe uma das principais doenças crônicas da atualidade. Derivados de *Hancornia speciosa* também são usados na medicina popular para controle glicêmico e seus efeitos são dados principalmente pelas folhas, inibindo a α -glicosidase em estudos laboratoriais, aumentando a captação de glicose por adipócitos. Durante a síntese do extrato de folhas da *Hancornia*

speciosa, também foram identificados bornesitol, ácido quínico, ácido corogênico e glicosídeos flavonoides (Neto et al, 2020; Pereira et al, 2015).

O ácido quínico e o bornesitol foram testados isoladamente e em conjunto com o extrato etanólico de folhas de *Hancornia speciosa* para cicatrização de feridas. Todos os compostos aumentaram a migração celular e proliferação de fibroblastos, além de diminuir a liberação de TNF- α . Tais aprofundamentos auxiliam a compreender melhor os mecanismos que contribuem para os potenciais fitoterápicos da *Hancornia speciosa* e confirmam sua função para o processo de cicatrização (Geller et al, 2015).

Diante da necessidade de compreensão das propriedades do látex da *Hancornia speciosa*, alguns estudos avaliaram o potencial citotóxico e genotóxico do composto em modelo vegetal, visando assegurar o uso biomédico. Esses efeitos são dependentes da concentração do látex nas raízes, mas, apesar de mais estudos para verificação da concentração máxima segura serem necessários, o extrato vegetal apresentou boa compatibilidade com o crescimento celular sem aberrações cromossômicas significativas, assegurando seu uso potencial para a medicina (Ribeiro et al, 2016).

Diante dos potenciais anti-inflamatórios da *Hancornia speciosa*, o desenvolvimento ósseo estimulado pelas propriedades fitoterápicas da planta foi cogitado e avaliado em modelos animais. Em uma formulação de gel a base de látex de *Hancornia speciosa* aplicado de maneira tópica na calvária de ratos, observou-se cicatrização já nos períodos de 15 e 30 dias, bem como, em regiões sem defeitos, um aumento na região do perióstio mesmo após 5 e 11 dias. Apesar dos resultados promissores, doses superiores a 0,6mg/mL limitaram a viabilidade celular óssea em testes in vitro. Os principais componentes avaliados e que podem ter relação com os efeitos são o ácido clorogênico, naringenina-7-O-glicosídeo, catequinas e procianidina (dos Santos Neves et al, 2016).

Diante dos componentes associados a propriedade fitoterápica da *Hancornia speciosa* para hipertensão, o estudo de Moreira et al (2019) evidenciou as propriedades do bornesitol como principal fator para a diminuição da pressão arterial. Suas propriedades isoladas são semelhantes aos efeitos encontrados nos extratos alcoólicos das folhas de *Hancornia speciosa*, tendo ação no óxido nítrico e

enzima conversora de angiotensina além de promover vasodilatação, subsidiando seu uso para atividade cardiovascular.

Além de seu uso isolado, é importante verificar o potencial dos compostos a base de *Hancornia speciosa* em conjunto com outros elementos de uso biomédico. As nanopartículas de prata são comumente utilizadas pela sua atividade antibactericida e antifúngica, trazendo características interessantes para os processos de cicatrização. Biomembranas formadas a partir do látex de *Hancornia speciosa* incorporaram com sucesso as nanopartículas além de auxiliarem na liberação controlada das últimas. Ademais, a junção não apresentou quaisquer efeitos citotóxicos independente da concentração, no entanto, a adição de altas concentrações de componentes a base de prata apresentou potencial genotóxico, demonstrando uma preocupação para estudos futuros em relação as concentrações seguras de uso (Bonet et al, 2020; Almeida et al, 2019).

Visando avaliar o potencial dos componentes do látex da *Hancornia speciosa* para regeneração óssea de maneira sistêmica, Felipetti et al (2019) avaliaram em modelo animal o potencial do composto, quando ingerido por gavagem diariamente, na cicatrização de defeito crítico no osso parietal. Os períodos de avaliação foram de 15 e 30 dias e não foi verificado quaisquer melhorias no processo de cicatrização óssea. Posteriormente, Felipetti et al (2022) observaram, também de maneira sistêmica, o potencial de indução a neoformação tanto em defeitos ósseos parietais de 2 mm quanto para regeneração de alvéolo, nesse estudo foi observada presença de cálcio na composição do látex, bem como um aumento nos níveis de cálcio e fósforo no osso neoformado do alvéolo, todavia, nenhum efeito regenerativo na região da calvária foi verificado.

Ainda a respeito do látex de *Hancornia speciosa*, estudos para rastrear os compostos ativos dos efeitos fitoterápicos são estimulados. Nesse sentido, D'Abadia et al (2020) avaliaram diferentes frações do látex da *Hancornia speciosa* em relação ao seu potencial angiogênico. Assim, o ácido clorogênico foi associado a remodelação de matriz extracelular, além de estar associada ao processo de angiogênese, principalmente quando levado em consideração a fração do soro do látex da *Hancornia speciosa*.

Pegorin et al (2021) avaliou e caracterizou biomembranas a base de látex de *Hancornia speciosa* em relação ao seu potencial de auxiliar o processo de cicatrização tecidual. O estudo demonstrou que as biomembranas apresentam resistências próximas a da pele humana, estimulam células inflamatórias e o processo de angiogênese e colagênese, além de melhorar a qualidade da cicatrização, ademais, não apresentou citotoxicidade, demonstrando-se um material biocompatível, com potencial cicatrizante e de baixo custo para feridas cutâneas. Costa et al (2021), visando tal uso do látex de *Hancornia speciosa*, avaliaram o potencial alergênico da fração sérica do composto, chegando a conclusão de que seu uso é seguro principalmente em virtude da baixa concentração de proteínas presentes em comparação com outros látex atualmente já comercializados, reforçando a segurança e potencial biomédico para uso de derivados da *Hancornia speciosa*.

2.2 Cianoacrilatos em saúde

A tentativa de estabelecer os efeitos de colas com potencial biológico não é recente, as propriedades dos cianoacrilatos são estudadas há bastante tempo e iniciaram suas aplicações para fechamento de feridas da pele e mucosa superficial, todavia, seu uso em tecidos mineralizados passou a ser notado, inicialmente ressaltado para propriedades adesivas de superfícies externas, como o esmalte dentário, principalmente pelo potencial indutor de inflamação (Matsui, Buonocore, Sarda e Yamaki, 1967).

Para o uso como adesivo de reparo ósseo, algumas características devem ser observadas, tais como a promoção de atividade osteoblástica e potencial de ser reabsorvido conforme o processo de cicatrização do defeito, desse modo, algumas formulações dos cianoacrilatos podem não produzir o efeito desejado, como é o caso do monômero de isobutil-2-cianoacrilato, possuindo características que retardaram o desenvolvimento ósseo pela intensa reação inflamatória persistente, assim, observa-se a necessidade de cuidado em utilizar formulações que possuam características biocompatíveis. (Hunter, 1976).

Um dos exemplares mais comuns de adesivos a base de cianoacrilato em nossa rotina é o de formulação etil-cianoacrilato da marca comercial SuberBonder®, em virtude de seu custo reduzido graças ao aumento de oferta no mercado, pesquisas com esse composto passaram a ser observadas e suas propriedades bioadesivas e potencial de histotoxicidade. Zumpano et al (1982) demonstraram o potencial na aplicação do adesivo diretamente em cérebro de coelhos e os acompanharam no período de 4 e 10 dias. Nesse período, foi observada a indução de necrose cortical superficial e a bioadesão não foi significativa, desestimulando seu uso em tecido nervoso de maneira direta.

O uso do etil-cianoacrilato como cimento ósseo foi visto pela primeira vez no estudo de Forssell, Aro e Oh (1978) onde o adesivo não demonstrou propriedades biológicas compatíveis com a regeneração óssea e inibiu a proliferação de osteoblastos nas superfícies de contato com o mesmo, bem como foi observado infiltrado inflamatório e macrófagos na região de contato com o cianoacrilato.

Mesmo com o insucesso das aplicações biológicas anteriores, os cianoacrilatos demonstram ter boas respostas em tecido vascular, por se polimerizarem rapidamente e causarem toxicidade tecidual mínima, auxiliando em hemostasias em um tempo significativamente menor aos promovidos pelo uso de celulose oxidada e pressão digital, todavia, seu uso induz uma placa cola-adventícia, sendo necessária a colagem de algumas anastomoses PTFE-artéria (Citrino et al, 1985).

Uma das percepções vistas, é que monômeros de cadeias curtas como metil e etil-cianoacrilato, dessa forma, o derivado Histoacryl® com composição referente ao butil-2-cianoacrilato passou a ser utilizado em pesquisas biomédicas para efeito comparador. Comparativamente ao etil-cianoacrilato, o composto de estrutura mais longa apresentou menor efeito histotóxico e boa capacidade de ligação enxerto-cartilagem óssea, todavia com um período de degradação biológico superior (Thorium et al, 1990).

Na busca por uma forma de fixação de ossos cranianos após craniotomia, Gonzalez et al (2000) realizaram um estudo clínico com 100 pacientes utilizando, novamente, o etil-cianoacrilato comercialmente distribuído para fixação. Sendo um método rápido que demorou em média um minuto e 58 segundos até a solidificação

do adesivo, o procedimento foi realizado levando em consideração o material estar estéril e com a preocupação em padronizar as bordas do defeito com formato de chanfro. Após o procedimento, foi verificada correta estabilidade e a tomografia computadorizada indicou osteossíntese em 100% dos casos observados. Os autores ressaltam as vantagens da segurança, rapidez e estabilidade do material, bem como não foram observadas nenhuma complicação pós-operatória, com excelentes resultados estéticos e um baixo custo.

As vantagens do uso do etil-cianoacrilato são enfatizadas ainda, para uso cardiovasculares e pulmonar, principalmente para controle de hemorragias difíceis de serem tratadas por métodos convencionais. Seu baixo custo, resultados histopatológicos aceitáveis nesses tecidos, facilidade na aplicação e segurança caracterizam esse adesivo como uma alternativa viável para uso em cirurgias onde a integridade tecidual não pode ser garantida (Kaplan et al, 2004).

O uso do etil-cianoacrilato em contato com tecido nervoso foi reavaliado e seu uso para reparo nervoso axonal mostrou-se relevante e seguro. Apesar dos efeitos de toxicidade ainda precisarem ser melhor explorados, o adesivo induziu um retorno mais rápido da função nervosa e maior regeneração axonal em comparação com suturas, garantindo resultados, no mínimo, semelhantes ao de manobras convencionais (Landegren, Risling e Persson, 2007). Esses dados foram reforçados posteriormente e o etil-cianoacrilato não apresentou toxicidade, auxiliou na resistência de união para anastomoses de nervos periféricos e nenhum efeito na condução dos impulsos nervosos foram observados, caracterizando o adesivo como alternativa para reparo de estruturas nervosas (Rickett et al, 2009; Merolli et al, 2010; Landegre, Risling, Sondén, 2010; Atam et al, 2020).

Leggat, Smith e Kedjarune (2007) revisaram a literatura acerca do uso médico dos cianoacrilatos e seus potenciais riscos e benefícios. Os autores ressaltam os benefícios do adesivo para fechamento de feridas superficiais, visto os resultados compatíveis com os verificados nas suturas e a diminuição dos riscos de acidentes perfurocortantes da equipe de saúde. Por outro lado, é explicitado que os efeitos no organismo dos cianoacrilatos ainda são desconhecidos e sua degradação em partículas citotóxicas podem prejudicar o processo cicatricial local. Outra preocupação diz respeito a formulação adjuvante dos compostos comerciais, que

não possuem padrões de esterilização compatíveis com os usos biomédicos. Os autores, por fim, propõem o cuidado no uso da substância, exceto para fechamento de feridas externas.

O uso do etil-cianoacrilato comercial para fixação de estruturas ósseas em região de crânio demonstrou benefícios quanto a seu custo e tempo de aplicação. Nesse sentido, Saska et al (2009) promoveram a fixação de enxertos autógenos com cola de etil-cianoacrilato comercial e parafusos de titânio na calvária de coelhos, a fixação com o adesivo apresentou biocompatibilidade, estabilidade semelhante ao controle e manteve a área óssea preservada, todavia, houve retardo na incorporação total do enxerto, o que pode significar um retardo da regeneração óssea pelos compostos da cola, entretanto, seu custo reduzido pode compensar essa desvantagem clínica.

O uso de cianoacrilatos para fixação de feridas cutâneas demonstra ser consenso entre os pesquisadores e seus benefícios são bem elucidados, como seu uso em mucosa oral e tecidos periodontais também apresenta benefícios de aplicação. Os adesivos podem ser usados como alternativas para os tradicionais fios de seda com objetivo de fixar enxertos gengivais livres, não apresentando diferença entre os tempos de cicatrização, o adesivo pode ser usado para pacientes com biótipo periodontal fino (Barbosa et al, 2009).

Além do uso no crânio, o etil-cianoacrilato também foi pesquisado em modelo animal, para uso na fusão de espinha lateral posterior. Apesar de haver um aparente atraso na fusão dessas estruturas, implicando em uma interferência negativa no processo osteogênico, o adesivo foi biologicamente tolerado e não induziu necrose, reações de hipersensibilidade, infecção ou algum grau de prejuízo neurológico (Gezici et al, 2009).

Esteves et al (2011) avaliaram parâmetros histomorfométricos do uso de etil-cianoacrilato para fixação de enxertos autógenos, dessa vez em modelo animal com ratos. Os autores afirmam que o adesivo permitiu a manutenção e estabilidade do enxerto, porém induziu uma reação inflamatória local de baixa intensidade persistente que inviabilizou a incorporação total do enxerto ao sítio receptor. A avaliação dos autores deu-se em um tempo de acompanhamento de 10 e 30 dias, sendo, nesse período, que o efeito de cicatrização óssea ainda fosse possível em

avaliações posteriores. Resultados semelhantes foram observados por Esteves et al (2014) em um intervalo pós-cirúrgico de 60 dias, induzindo a fixação, mas não a incorporação dos enxertos.

O efeito in vitro do etil-cianoacrilato em células características do tecido ósseo foi avaliado para validar seu uso na cicatrização óssea, a aplicação direta da substância em cultura de osteoblastos humanos foi biocompatível e suporta o uso do adesivo para fixação de enxertos ósseos (de Melo, 2013).

Sob a perspectiva de cianoacrilatos de cadeia longa possuírem melhores efeitos no organismo, Sohn et al (2016) compararam o uso do etil-cianoacrilato e do butil-cianoacrilato para regeneração óssea em calvária de camundongos. O estudo foi conduzido ao longo de 14 dias e nele foi observada menor regeneração óssea dos espécimes tratadas com a formulação etil, sugerindo que tal formulação causa perda no processo de cicatrização. Por outro lado, o estudo de Palacio et al (2017) demonstrou superioridade do etil-cianoacrilato para reparo de úmero, fêmur e tíbia quando levados em consideração períodos de 60, 120 e 180 dias, principalmente em virtude da capacidade de suportar carga nos animais tratados com o monômero de cadeia curta, bem como possui um melhor tempo de trabalho, ademais, um número maior de células inflamatórias foi observado no grupo tratado com butil-cianoacrilato.

A avaliação de citotoxicidade do etil-cianoacrilato comercial foi pesquisada novamente por Andreotti Damante et al (2020), dessa vez com foco de uso odontológico para verificação de viabilidade celular de osteoblastos e fibroblastos. A apresentação comercial foi utilizada como uma possível variante pelos autores, assim, a formulação do etil-cianoacrilato foi verificada em sua formulação líquida, gel e a formulação intitulada pelo fabricante como gel de aplicação fácil. Os autores demonstraram viabilidade de todos os tipos celulares nas apresentações líquida e gel, todavia, o gel de aplicação fácil apresentou citotoxicidade para fibroblastos orais.

Um caso cirúrgico que depende tanto da neoformação óssea quanto de reparo tecidual externo é a sutura de feridas cirúrgicas após exodontia. Nesse contexto, observou-se em modelos animais um atraso no período de recuperação nos primeiros dias de avaliação, todavia essa diferença decaía com o tempo até ser estatisticamente insignificante a partir do 30º dia, ademais, o fechamento do alvéolo

com etil-cianoacrilato permite a formação óssea de maneira plena demonstrando somente atrasar, mas não impedir o desenvolvimento ósseo (Maia et al, 2022).

2.3 Reparação óssea e odontologia

A cicatrização óssea é um evento fisiológico que inclui uma extensa variedade de cascatas biológicas e tipos celulares, levando uma modificação na bioquímica e fisiologia da região. O processo secundário de cicatrização ocorre na maioria dos casos e tem seu início imediatamente após a fratura com a interrupção do aporte sanguíneo, hipóxia e formação de hematoma. A partir desses eventos, citocinas e fatores de crescimento são liberados dando início ao processo de reparo (Arias-Betancur et al, 2022).

Dessa forma, a formação de novos vasos sanguíneos, produção de fatores de crescimento, prostaglandinas e disponibilidade de cálcio e fosfato auxiliam na diferenciação de células mesenquimais para linhagens osteogênicas. O processo é extenso e necessita de um tempo de remodelação de forma a garantir uma correta estabilidade e força mecânica (Arias-Betancur et al, 2022; Susin et al, 2022; Baca-Gonzalez et al, 2022).

Nesse contexto a odontologia constantemente preocupa-se com os fatores de regeneração óssea, uma vez que o manejo das estruturas do complexo maxilo-facial é crucial para recuperação de pacientes acometidos por defeitos congênitos, trauma, periodontite e tumores ósseos. Apesar do osso ser um órgão com uma grande capacidade de regeneração, grandes perdas de massa óssea levam a defeitos críticos que impedem a correta cicatrização das feridas, sendo necessários, portanto, uso de enxertos para um manejo adequado (Durmaz et al, 2022).

Esse processo pode, ainda, sofrer alteração por diversas alterações no organismo como presença de agentes antioxidantes, uso de bifosfonatos, ação hormonal, idade, fumo, estabilidade mecânica insuficiente, danos ao tecido mole de suporte e potencial biológico do material utilizado no processo de enxertia. Nesse contexto, o enxerto autógeno é o padrão ouro para indução de um processo cicatricial, todavia, sua obtenção gera morbidade da área doadora e pode estar

associado a complicações pós-cirúrgicas levando a necessidade do desenvolvimento de outros biomateriais (Chu et al, 2022; Kim e Kim, 2022; Durmaz et al, 2022; de Souza et al, 2022).

A característica primária de um enxerto para uso no processo de cicatrização óssea é a biocompatibilidade de forma a produzir o mínimo de reação inflamatória local e não ter efeito citotóxico, ademais, a osteoindução e osteocondução são fatores diferenciais para que o processo de reparo seja mais próximo do fisiológico. Sob essa perspectiva, ossos derivados de animais ou enxertos sintéticos a base de hidroxiapatita são as principais alternativas utilizadas na prática clínica (Susin et al, 2022).

As três características metabólicas para um reparo ósseo ideal são o potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor. Tais características são definidas pela interação do material com a interface a ser restaurada. Materiais osteogênicos são orgânicos e estimulam a neoformação óssea diretamente pela ação de osteoblastos integrados ao material; a osteoindução refere-se a capacidade do componente implantado de estimular a diferenciação de células mesenquimais do hospedeiro até a integração com o implante; a osteocondução é a característica mais comumente encontrada em enxertos sintéticos, uma vez que sua propriedade biológica limita-se a ofertar suporte para formação de osso novo (Gianulis et al, 2022).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do estudo, foi observar o efeito da mistura do etil-cianoacrilato e o látex da *Hancornia speciosa* sobre a regeneração óssea na calvária de ratos.

Os objetivos específicos do estudo foram:

1. Avaliar os efeitos histopatológicos da *Hancornia speciosa* em conjunto com etil-cianoacrilato;
2. Verificar possíveis alterações nos aspectos morfométricos do reparo ósseo entre os tratamentos experimentais e o osso autógeno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

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 5700-1/2021.

4.2 Amostra

O delineamento dos grupos experimentais foi feito adotando-se: valor crítico para 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 que o n deve ser arredondado para o próximo número inteiro, ou seja, $n = 6$ animais por grupo, havendo dois grupos e sendo avaliados em três momentos diferentes, totalizando 36 animais.

Foram utilizados 36 ratos (Ratos Heterogênicos HanUnib: WH Wistar, Specific Pathogen Free), adultos, machos, pesando 400 a 450 gramas (10 a 12 semanas de idade), provenientes do CEMIB-UNICAMP. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e após o transporte, antes do início do experimento, passaram uma semana em adaptação ambiental. Permaneceram em condições controladas de iluminação com lâmpadas fluorescentes, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro considerando o período de luz das 7h às 19h. A temperatura ambiente foi calibrada em $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade controlada, alimentação balanceada e água *ad libitum*. Nas gaiolas foram colocados dois tuneis (canos de PVC de 10") como forma de enriquecimento ambiental.

4.3 Materiais utilizados

Para a confecção de materiais, foi utilizado cola a base de etil-cianoacrilato Super Bonder® (Henkel Ltda., Jundiaí – São Paulo) e látex de *Hancornia speciosa* (Gomes) a 50% (Rei da Mangaba® – Serro, Minas Gerais). Para

manuseio e dosagem dos líquidos foi utilizado pipetas de P200 e P1000 (Gilson – Middleton, Wisconsin – EUA).

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

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

4.4 Confeção das formulações

O grupo Hs+ECA foi composto da mistura de 0.2mL de etil-cianoacrilato (ECA) e 1mL de látex da *Hancornia speciosa* (Hs) a 50% aglutinados em placa estéril e secados em estufa a $31.5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com umidade relativa de 53% durante 30 minutos. Após secagem os grânulos foram triturados até ficarem com aspecto uniforme (avaliados por inspeção visual). Foram então pesados e postos em mini tubos eppendorf plásticos com 0,0180g cada, volume esse necessário para o preenchimento completo de uma região circular de 5mm de diâmetro. Os grânulos foram confeccionados 24 horas antes do experimento e armazenados envoltos em papel alumínio para prevenir possível sensibilidade a luz e mantidos refrigerados a uma temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O processo de confecção pode ser visualizado nas figuras 1 e 2.

Figura 1 – Preparo do material Hs+ECA. A) Material utilizado; B) especificações das pipetas do preparo; C) Inclusão de 1mL de látex de *Hancornia speciosa* a 50% para aglutinação; D) Especificações da estufa no momento de secagem do material.

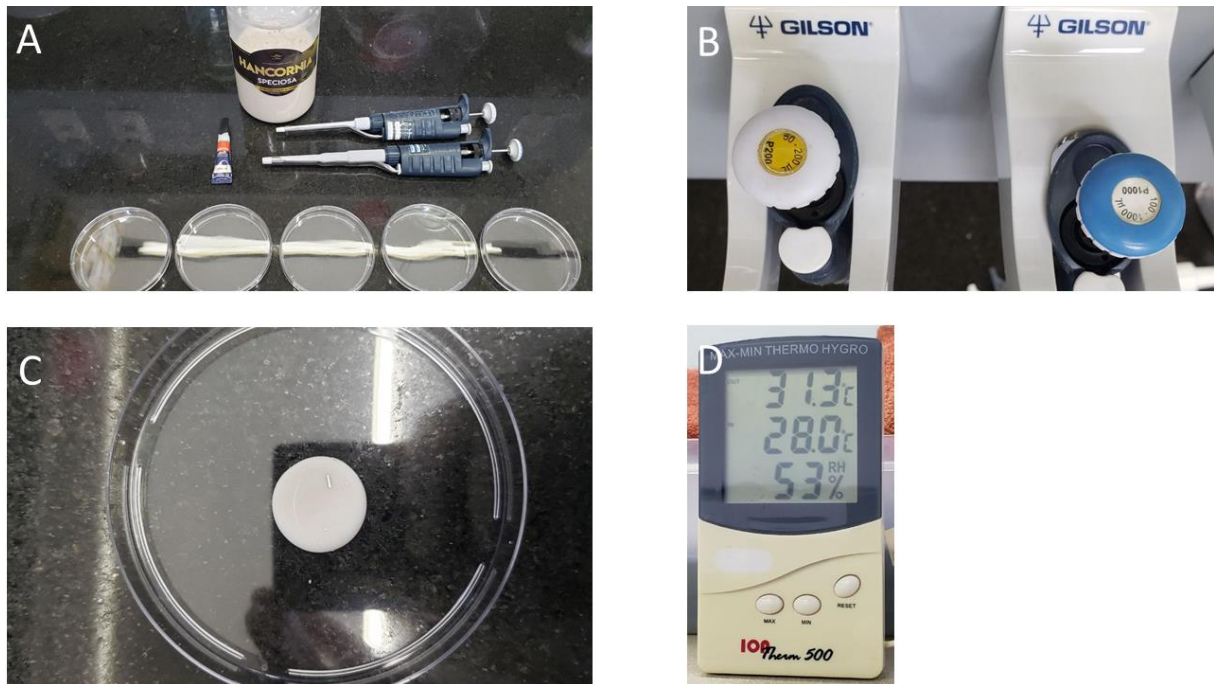
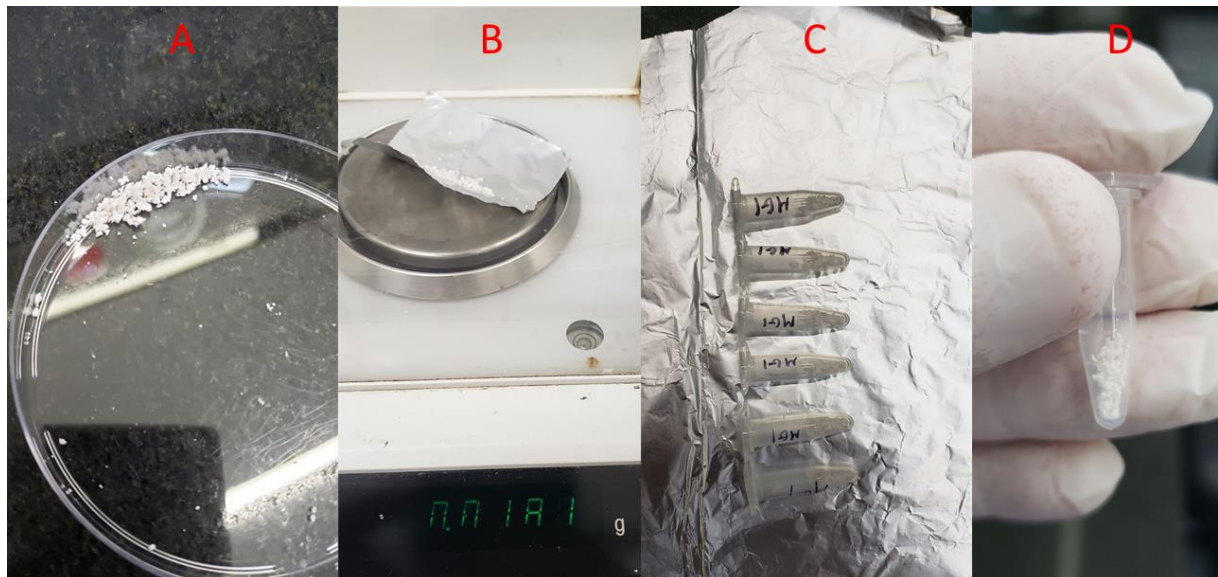


Figura 2 – Finalização e armazenamento do material Hs+ECA. A) Aspecto final após aglutinação; B) Pesagem do material; C) Preparação dos microtubos de eppendorf em papel alumínio para proteção contra exposição à luz; D) Material a ser utilizado.



O grupo ECA foi constituído de etil-cianoacrilato e coágulo do animal, preparado durante o ato cirúrgico. Para seu preparo, 0,1mL de etil-cianoacrilato foi aplicado no defeito, assim que o mesmo foi feito, entrando em contato com o sangue do animal.

Os defeitos que pertenceram ao grupo controle positivo (grupo OA) receberam enxerto autógeno retirado do hemisfério oposto que foi partido com tesoura estéril durante o ato cirúrgico. Os grupos experimentais referentes ao controle negativo não receberam quaisquer tratamentos, tendo o processo de cicatrização dependente somente do coágulo sanguíneo do defeito.

4.5 Preparo cirúrgico na calvária de ratos

Defeitos ósseos críticos da calvária dos 36 animais foram obtidos de acordo com técnica modificada e descrita por Sánchez-Garcés et al (2020).

Os animais foram anestesiados por uma injeção de xilazina a 2% (10 mg/kg) e 10% de quetamina (90 mg/kg), por via intraperitoneal. Foi realizada tricotomia e antissepsia da região craniana utilizando, solução de iodo-povidona a 10% tópica.

Uma lâmina 10 foi firmemente pressionada contra a pele até o periósteo, para realizar incisão mediana em direção ântero-posterior de 2 cm de comprimento, previamente a divulsão do tecido subcutâneo de modo a expor os ossos parietais. Após a exposição da calvária, uma trefina óssea foi pressionada levemente contra o osso, a 500 rpm, sob abundante irrigação salina a 0,9%, para cortar e remover cuidadosamente as duas corticais da região parietal da calvária do rato. Para a indução do defeito ósseo padronizado, foram realizadas duas perfurações de 5 mm cada na calvária dos animais, evitando-se a linha de sutura conforme a figura 3. O cirurgião responsável possui treinamento e experiência em cirurgias ósseas, trabalhando com auxílio de magnificação.

Figura 3 – Exposição dos defeitos críticos de 5mm na calvária do animal.



Cada animal recebeu dois tratamentos, avaliados posteriormente por microtomografia computadorizada e por histologia. A distribuição dos animais nos grupos está detalhada na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos conforme tratamento.

Microtomografia / Histologia					
Grupo 1			Grupo 2		
Dias (n amostral)	Lado direito	Lado esquerdo	Dias (n amostral)	Lado direito	Lado esquerdo
30 (n=6)	Hs+ECA	Controle	30 (n=6)	OA	ECA
60 (n=6)	Hs+ECA	Controle	60 (n=6)	OA	ECA
90 (n=6)	Hs+ECA	Controle	90 (n=6)	OA	ECA

Após a inserção dos tratamentos, a sutura foi realizada no plano muscular com fio de Nylon 5.0 (Techsuture, Bauru, SP, Brasil) na derme. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante 15 dias de forma a possibilitar a correta cicatrização da derme. O procedimento cirúrgico na calvaria dos animais enquadra-se no protocolo G3, dessa forma, os animais tiveram acompanhamento diário quanto a dor e sofrimento, utilizando a Escala de Grimace. Os animais também foram avaliados semanalmente com relação ao seu peso para observar o consumo de água e comida. Não foi necessário adotar o Ponto Final Humanitário (Endpoint) em nenhum dos animais (Sotocinal et al., 2011).

Os animais foram eutanasiados nos períodos propostos (30, 60 e 90 dias), por dose excessiva do mesmo anestésico 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), preservados a 4°C.

4.6 Microtomografia computadorizada

Após a dissecação, os crânios dos animais foram escaneados no aparelho de micro-CT SkyScan 1174. As amostras foram fixadas em cera utilidade, sobre uma haste metálica fornecida pelo fabricante do aparelho, com a finalidade de se evitarem movimentos durante o escaneamento. As imagens foram obtidas utilizando-se os seguintes parâmetros: 50 kVp, 800 µA, filtro de alumínio de 0,5 mm

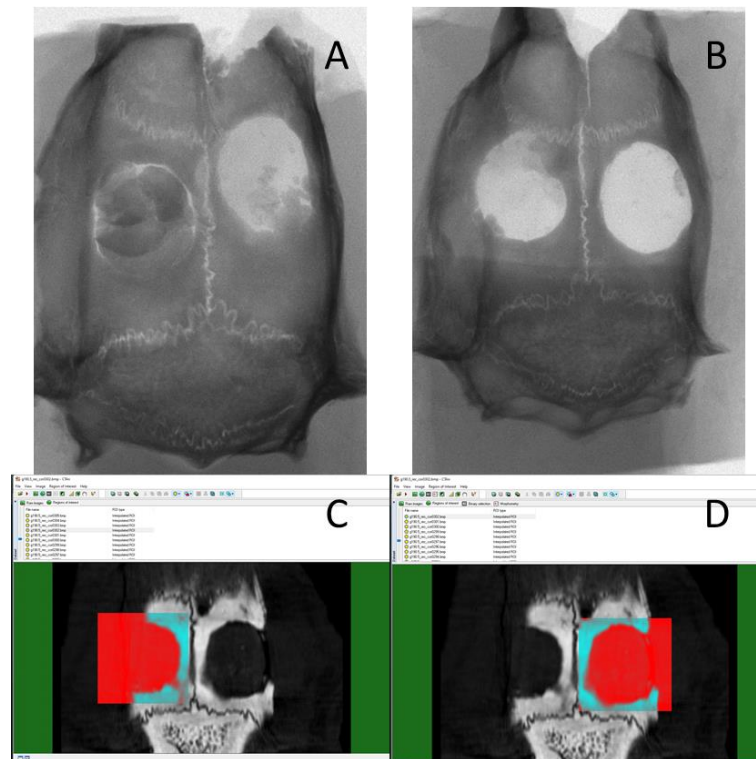
de espessura, voxel de 30,04 μm , com aquisição de 1 *frame* por 0,5° de rotação do aparelho, totalizando um giro de 180° e obtenção de 360 projeções por peça escaneada.

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.

A análise dos volumes reconstruídos foi realizada por meio do software SkyScan CT Analyser. Inicialmente, para cada volume, foi determinada a ROI inicial, então, foi desenhada manualmente, em cada reconstrução transversal do osso, a região para análise das trabéculas e espaços medulares. Sobre o volume de interesse (VOI) determinado, foram realizados os passos de binarização e limiarização. Por fim, uma lista de tarefas (task list) personalizada para esse estudo foi aplicada e as imagens volumétricas analisadas pelo software. Essas etapas podem ser visualizadas na figura 4. Os parâmetros selecionados para análise da microarquitetura óssea foram:

- volume de tecido ósseo;
- densidade volumétrica óssea (fração do tecido ósseo no volume total que reflete ganho/perda óssea)
- espessura média das trabéculas ósseas;
- espaço entre as trabéculas ósseas;
- número de trabéculas ósseas (número de vezes que uma trabécula é atravessada por outras em um determinado comprimento selecionado de forma aleatória, em todo o volume do osso analisado).

Figura 4 – Etapas para reconstrução e processamento em microtomografia computadorizada. A e B) Imagens das reconstruções dos espécimes com 90 dias de tratamento pelo NRcon; C e D) Identificação de VOI padronizada para interpretação de resultados e posicionamento para análise dos defeitos pelo CT Analyser.



4.7 Processamento histológico

Logo após a tomada das imagens no micro-CT, as calvárias foram submetidas à descalcificação em solução de EDTA a 7% até verificação de completa descalcificação durante aproximadamente 45 dias. As peças foram lavadas em água destilada, desidratadas em etanol a 70%, 95% e 100%, diafanizadas em xilol, embebida e incluídas em paraplast a 65°C, em sentido longitudinal. Nos blocos obtidos foram feitos cortes semisseriados, em micrótomo manual (LEICA, RM 2145) com espessura de corte de 7 micrometros, os quais foram colhidos em lâminas histológicas, desparafinizados, hidratados e corados por hematoxilina e eosina (HE).

4.8 Morfometria

Para a aquisição de imagens das lâminas histológicas, foram feitas fotos em micrografias dos cortes histológicos por meio de um 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 dados obtidos por análise de microtomografia computadorizada foram postos em tabelas de software Excel 2010® (Microsoft Corporation©) e separados como tratamento 1, 2, 3 e 4 e separados em colunas constando os três períodos de análise. Cada um dos desfechos foi analisado de forma individual inicialmente pelos testes de Bartlett (homoscedasticidade) e Shapiro-Wilk (normalidade). Sequencialmente, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn (pós-teste). Foi considerado um nível de significância de 5% utilizando o software GraphPad Prism 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 Acompanhamento dos Animais

Após o procedimento cirúrgico os 36 animais foram acompanhados constantemente para avaliação de sinais de dor e sofrimento. Dois animais pertencentes ao grupo 1 - 90 dias; um animal pertencente ao grupo 2 - 90 dias; um animal do grupo 2 - 60 dias e um animal do grupo 1 - 60 dias tiveram sutura aberta e prejuízo no processo de cicatrização da pele, atrasando seu tempo para serem recolocados nas gaiolas coletivas. Vale ressaltar que nenhum desses animais apresentou sinais de sofrimento e suas feridas foram tratadas a cada 48 horas com solução de iodo-povidina. A cicatrização completa ocorreu em torno de 35 dias, os animais dos grupos de 30 dias não apresentaram prejuízos visíveis no processo de cicatrização. Exemplos dos ferimentos podem ser visualizados na figura 5.

Figura 5 – Acompanhamento de espécies que tiveram falhas de sutura durante os primeiros dias pós intervenção.

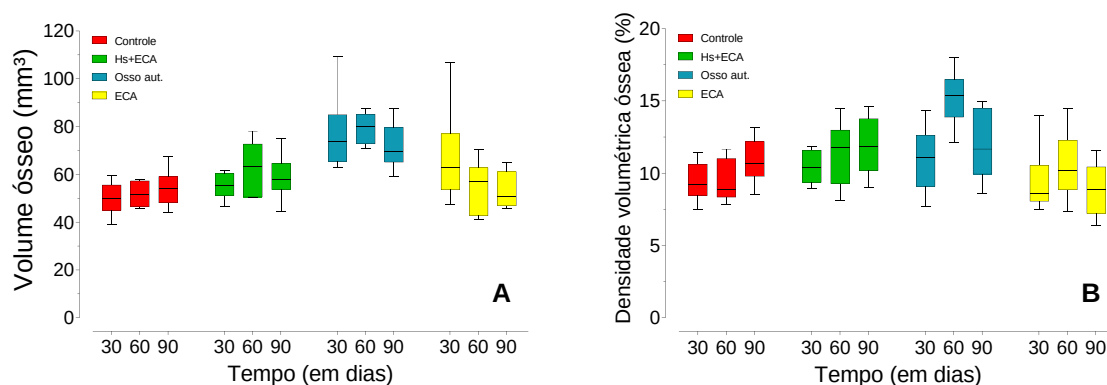


Um animal de cada grupo no período de acompanhamento de 90 dias morreu, representando uma perda amostral de dois espécies ($n=2$), assim, a amostra final contemplou 34 animais. O animal do grupo 2 foi perdido durante as primeiras 48 horas após a cirurgia, provavelmente em decorrência a efeitos da anestesia. Um animal do grupo 1 foi perdido durante ato cirúrgico.

5.2 Análise da Microtomografia Computadorizada

Não houve distribuição normal e/ou homoscedasticidade dos parâmetros ósseos observados na análise de micro-CT, os quais estão dispostos nas Figuras 6 e 7 e tiveram seus dados sumarizados e demonstrados por meio de tabela (apêndice 1) da medida de tendência central (mediana) e sua respectiva medida de variabilidade (intervalo interquartil de 25% e 75%).

Figura 6 – Volume ósseo (A) e densidade óssea (B) em função dos tratamentos e períodos observados. Linha central = mediana; caixa = 1º e 3º quartis; suíças = valores máximo e mínimo.

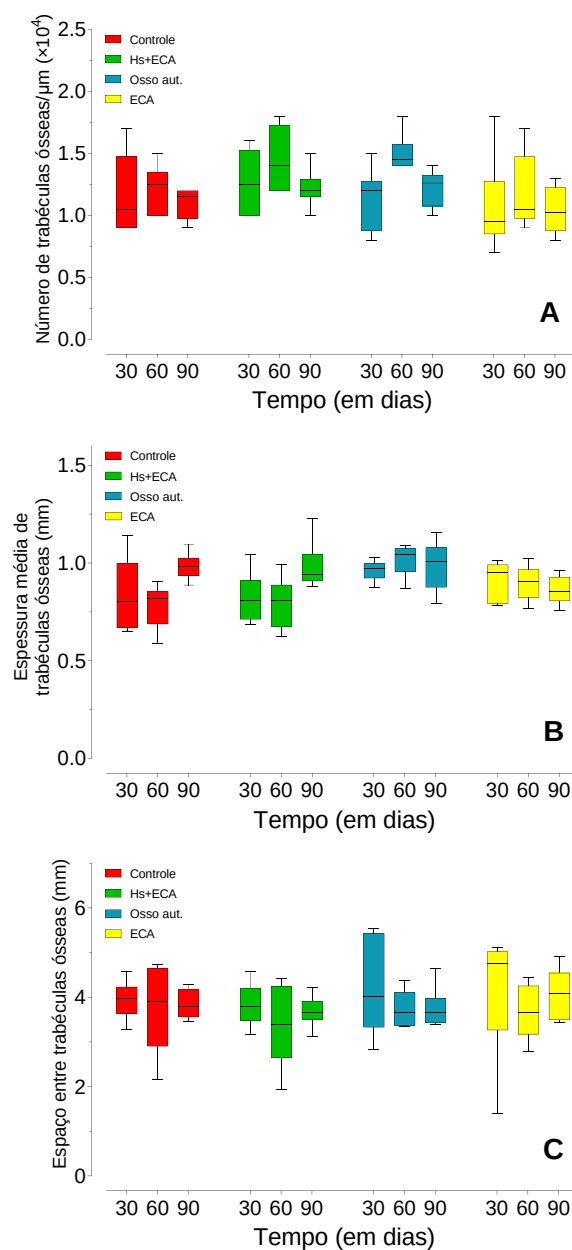


O volume ósseo (Figura 6A) não diferiu entre os três tempos avaliados ($p > 0.05$) em nenhum dos grupos, entretanto, considerando cada período separadamente, foi possível observar que o grupo com osso autógeno (OA) apresentou maior volume após 30 dias do que os grupos controle ($p = 0.0007$) e Hs+ECA ($p = 0.0111$), mas não diferiu do grupo ECA ($p = 0.16$). Nesse período, os demais grupos não mostraram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0.05$) entre si. Após 60 dias, o volume ósseo não diferiu ($p = 0.061$) entre os grupos OA e Hs+ECA, mas o OA apresentou maiores valores que os grupos controle ($p = 0.0003$) e ECA ($p = 0.0023$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos. Aos 90 dias, o volume ósseo novamente não diferiu entre os grupos OA e Hs+ECA ($p = 0.087$), mas o OA apresentou maiores valores que os grupos controle ($p = 0.0107$) e ECA ($p = 0.0078$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos.

A densidade óssea (Figura 6B) foi maior no grupo OA após 60 dias do que após 30 dias ($p = 0.0205$), não havendo diferenças estatisticamente significantes

entre os períodos para os demais grupos. No período de 60 dias, a densidade óssea do OA foi maior do que todos os demais grupos. Não houve diferenças estatisticamente significantes ($p>0.05$) entre os grupos no período de 30 dias. No período de 90 dias, o grupo ECA apresentou menor densidade óssea do que os grupos OA ($p=0.0298$) e Hs+ECA ($p=0.0173$), não diferindo do grupo controle ($p=0.11$).

Figura 7 – Número (A), espessura média (B) e espaçamento entre (C) trabéculas em função dos tratamentos e períodos observados. Linha central = mediana; caixa = 1º e 3º quartis; suíças = valores máximo e mínimo.



O número de trabéculas (Figura 7A) não diferiu entre os grupos e períodos, à exceção do grupo OA que apresentou maior número de trabéculas aos 60 dias do que aos 30 dias ($p=0.0133$) e maior em relação ao grupo ECA ($p=0.0210$) no período de 60 dias.

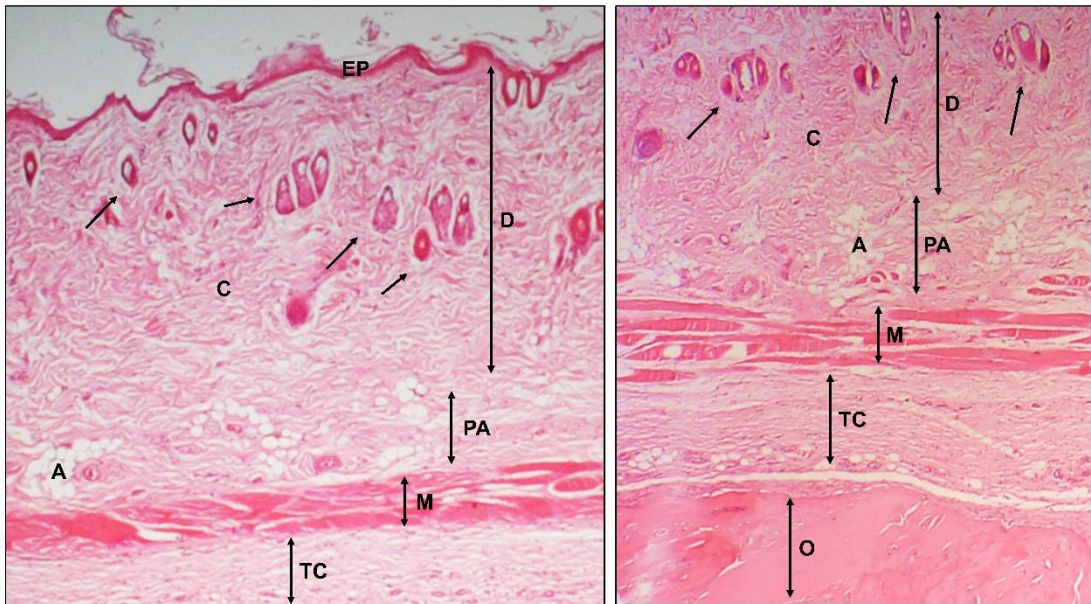
A espessura média das trabéculas (Figura 7B) foi maior aos 90 dias do que nos períodos de 30 dias ($p=0.0398$) e 60 dias ($p=0.0057$) para o grupo controle. Nesse período de 90 dias, o grupo Hs+ECA também mostrou maior espessura de trabéculas ($p=0.0401$) do que o período de 60 dias. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os períodos para os demais grupos. O grupo OA mostrou maior espessura média de trabéculas do que o Hs+ECA aos 30 ($p=0.0412$) e 60 dias ($p=0.0024$), sendo maior também do que o grupo controle aos 60 dias ($p=0.0009$). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os demais grupos e períodos.

Não houve diferenças estatisticamente significantes ($p=0.7371$) entre os grupos ou períodos considerando os espaços entre as trabéculas ósseas.

5.3 Análise histológica qualitativa

Após correto preparo e coloração, as amostras histológicas foram coloridas com hematoxilina e eosina e analisadas por dois avaliadores em relação aos achados ósseos. As lâminas correspondentes aos mesmos grupos e tempos de tratamento apresentaram características histológicas semelhantes e os aspectos gerais morfológicos das lâminas podem ser visualizados na figura 8.

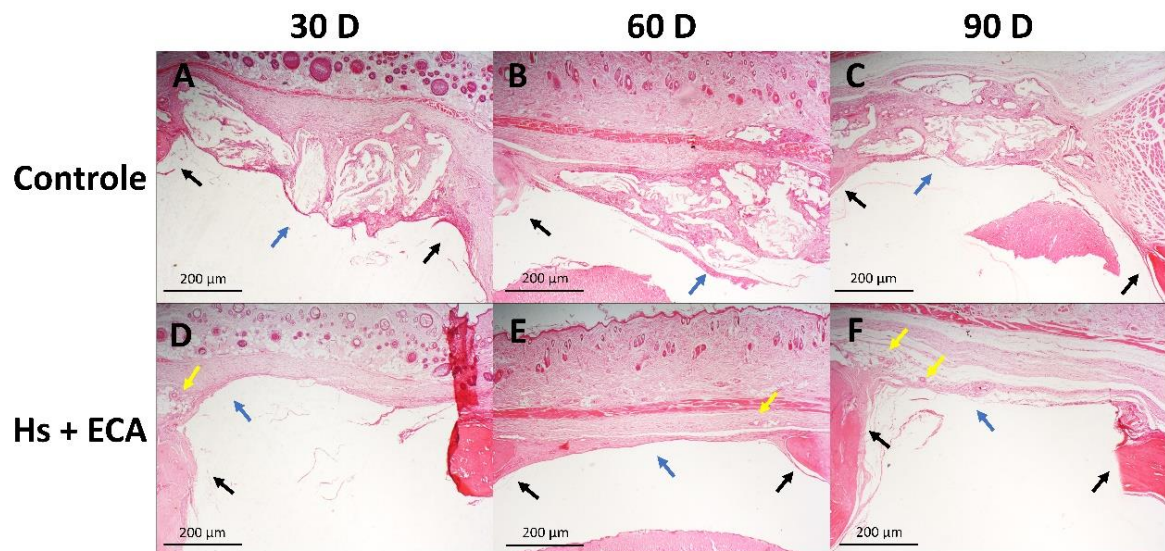
Figura 8 – Estruturas dos cortes histológicos. EP, epiderme; D, derme; PA, panniculus adiposus; M, tecido muscular; TC, tecido conectivo; O, osso; C, fibras colágenas; A, tecido adiposo branco. Setas indicam folículos capilares e glândulas.



Os achados qualitativos do grupo sem tratamento demonstraram crescimento desordenado de tecido conjuntivo e nenhum resquício de neoformação óssea. Nos grupos acompanhados em 30 e 60 dias existe presença de células inflamatórias que diminuiram no acompanhamento de 90 dias. Houve a formação de uma cápsula fibrosa ao longo do defeito.

Em relação ao grupo tratado com *Hancornia speciosa* e etil-cianoacrilato, os espécimes demonstraram uma conformidade ao longo do defeito e achados condizentes a novos vasos sanguíneos ao longo de toda a extensão independente do tempo de tratamento, sendo mais frequentes aos 90 dias. As margens foram bem definidas e resquícios de regeneração óssea pode ser percebido nas bordas do defeito. Existem marcações de células inflamatórias no acompanhamento de 30 dias que decaí nos períodos de 60 e 90 dias. As imagens referentes aos achados do grupo Hs+ECA e controle podem ser visualizados na figura 9.

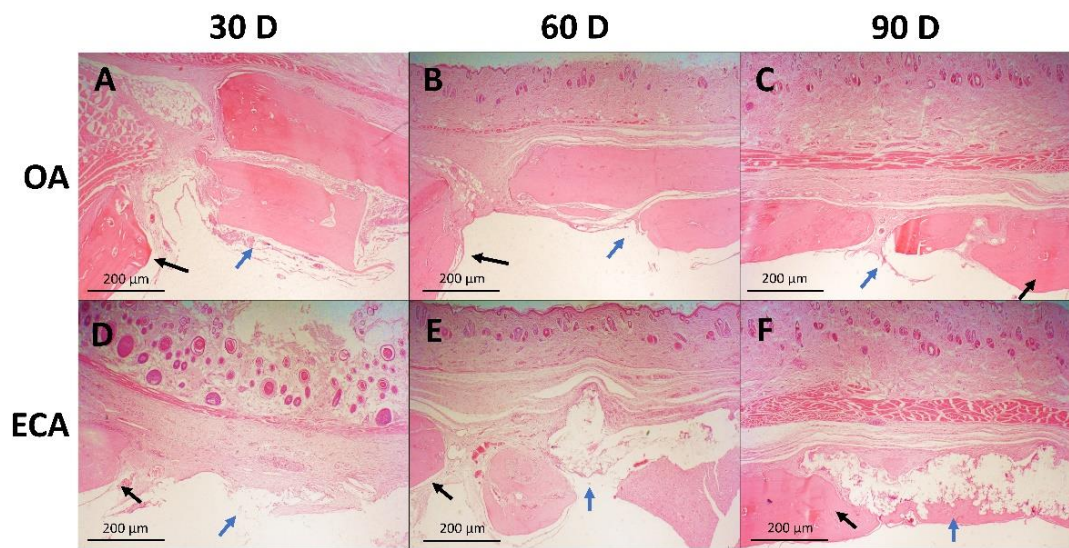
Figura 9 – Imagens representativas da morfologia das calvárias G1, submetidas a diferentes tratamentos (n = 6), coloração hematoxilina-eosina, amplificação de 2,5 X, escala Bar de 200 µm. **Grupo controle:** 30 D, fig. A: seta azul mostra cápsula fibrosa com presença de tecido inflamatório; 60D, fig. B: seta azul mostra cápsula fibrosa com tecido em processo de diferenciação e remodelação; 90D, fig. C: seta azul indica osso autógeno em processo de encapsulamento e tecido fibroso aderida ao tecido ósseo e as setas pretas indicam uma regularidade no processo de reparação óssea. **Grupo Hs + ECA:** 30D, fig. D: seta amarela indica neoangiogênese induzida pelo tratamento indicado na seta azul; 60D, fig. E: Seta amarela indica neoangiogênese e setas pretas indicam uma regularidade no processo de reparação óssea; 90D, fig. F: setas amarelas indicam neoangiogênese e seta azul indica início do processo de reparação óssea.



As regiões que receberam fragmentos de osso autógeno apresentaram margens bem circunscritas e poucas formações de pontes teciduais entre as bordas dos defeitos e os fragmentos enxertados no período de 30 dias. Existiu invaginação de tecido fibroso em todas as amostras, entretanto aos 60 e 90 dias, espículas ósseas podem ser observadas entre as margens do defeito e o enxerto.

As imagens condizentes ao grupo tratado com etil-cianoacrilato demonstrou encapsulação e resquícios do material em todos os tempos de tratamento, apresentando maior degradação no período de 90 dias. O adesivo pareceu agir como uma barreira impedindo a proliferação desordenada de tecido conjuntivo fibroso no interior do defeito. Aos 60 dias percebe-se o início de uma formação óssea na região mais profunda do defeito que aumenta significativamente aos 90 dias. Achados condizentes com inflamação foram mais presentes nesse grupo durante o período de 30 dias, diminuindo ao longo dos tempos de tratamento. Os achados histológicos do grupo OA e do grupo ECA foram demonstrados na figura 10.

Figura 10 – Imagens representativas da morfologia das calvárias G2, submetidas a diferentes tratamentos (n = 6), coloração hematoxilina-eosina, amplificação de 2,5 X, escala Bar de 200 µm. **Grupo OA:** 30 D, fig. A: seta azul mostra osso autógeno com início de encapsulamento e presença de tecido inflamatório, seta preta mostra espaço não preenchido entre extremidade da falha óssea e o tratamento; 60D, fig. B: seta azul mostra encapsulamento incompleto, porém com tecido fibroso já aderido ao osso autógeno, seta preta mostra tecido ósseo em contato com tecido fibroso devido ao tratamento; 90D, fig. C: seta azul indica tecido fibroso infiltrado e aderido intimamente ao tecido ósseo. **Grupo ECA:** 30D, fig. D: seta azul indica início do encapsulamento do tratamento, com pouco tecido fibroso e seta preta indica tecido ósseo ainda sem contato com tecido fibroso; 60D, fig. E: seta azul indica encapsulamento avançado do tratamento e presença de tecido inflamatório, seta preta indica início de contato do tecido ósseo com tecido fibroso do encapsulamento; 90D, fig. F: seta azul indica tratamento totalmente encapsulado e organizado e setas pretas mostram contato íntimo do tecido ósseo com fibras do encapsulamento.



6 DISCUSSÃO

O modelo em defeito ósseo em calvária de ratos possui como vantagens a proximidade com os principais mecanismos de reparo ósseo das estruturas cranianas em virtude ao processo de formação intramembranoso. Dessa forma, os defeitos nessa região permitem uma boa compreensão dos aspectos biológicos da enxertia óssea, tal modelo passou a ser considerado em etapas pré-clínicas do desenvolvimento de novos biomateriais (Cooper et al, 2010; Fernandes et al, 2022)

Por definição, um defeito ósseo de tamanho crítico remete ao menor tamanho que não possibilite a cicatrização completa durante o período de reparo durante a vida do animal. Um defeito de menor tamanho gera menor motricidade ao animal, além de possibilitar um maior número de intervenções em um mesmo espécime, reduzindo o número nos grupos experimentais. Dessa forma, defeitos bicorticais de 5mm de diâmetro, como os utilizados no presente estudo, são usados com frequência e com bons resultados comparativos (Mohan et al, 2022; Fernandes et al, 2022; Uribe et al, 2022).

Os mecanismos que correspondem ao processo de ossificação intramembranoso são de especial interesse para a odontologia em virtude da maioria das estruturas do crânio possuir esse tipo de formação. O processo de reparo dessas estruturas é complexo e demanda inflamação, formação de calos moles e duros e um constante processo de remodelação óssea. Células mesenquimais possuem papel ativo durante todas as fases do reparo, realizando migração, proliferação e diferenciação celular (Vasconcelos et al, 2020; Egawa et al, 2014).

Um dos principais parâmetros para a enxertia óssea diz respeito a esterilização dos materiais implantados, visando a neutralização de microorganismos que possam dificultar o processo de incorporação do material ao organismo (Steijvers, Ghei e Xia, 2022). Dessa forma, um importante fator a ser considerado no presente trabalho foi a não esterilização dos materiais durante o experimento. Tal fator pode ter limitado as propriedades reparadoras do tecido ósseo ao longo do experimento, todavia, uma vez que as propriedades do látex de *Hancornia speciosa* demonstram interrelação com seu estado natural, bem como a dificuldade em esterilizar o etil-cianoacrilato em virtude de sua polimerização rápida, a esterilização dos materiais experimentais no presente modelo foi inviabilizada. Mesmo sem a esterilização dos materiais, não foi detectada rejeição nos espécimes observados.

No presente estudo, observou-se a tentativa de aprimorar o processo de regeneração óssea intramembranoso com dois tratamentos por aloenxertos comparativamente com o não tratamento e ao uso de osso autógeno no processo de enxertia. Dada as propriedades do osso autógeno em carregar células nativas do desenvolvimento ósseo como osteócitos, matriz extracelular e osteoblastos, características do potencial osteogênico, presume-se que tais materiais terão melhores resultados no processo de reparo (Groppo et al, 2017).

Tal pressuposto foi corroborado com os resultados aqui apresentados, obtendo no grupo tratado com enxertos de osso autógeno recém trefinado maiores níveis médios de volume ósseo, independente de seu tempo de acompanhamento, todavia, um achado percebido ao longo das etapas laboratoriais de análise, ressaltou a importância da fixação desse enxerto de maneira apropriada. Em alguns espécimes estudados, somente a sutura não foi suficiente para a fixação do enxerto, comprometendo a cicatrização. Dessa forma, membranas, tais quais as utilizadas na periodontia, podem ser alternativas para essas fragilidades (Angelis et al, 2022; Messina et al, 2022).

Os aloenxertos, apesar de menos eficientes no processo de cicatrização óssea que os autógenos, devem permitir, pelo menos, o processo de osteocondução de maneira adequada e é bastante comum nesse tipo de material, todavia, o potencial biológico para indução da diferenciação de células mesenquimais em linhagens ósseas se faz desejado. Algumas características podem auxiliar nesse processo, como a biodisponibilidade de cálcio e fósforo e uma correta nutrição tecidual por meio da circulação sanguínea na região da fratura (Vasconcelos et al, 2020; Gianulis et al, 2022).

Em nosso estudo, o látex da *Hancornia speciosa* demonstrou, além da biocompatibilidade, averiguada pela baixa presença de células inflamatórias ao longo dos acompanhamentos, um potencial angiogênico compatível com o encontrado na literatura (Almeida et al, 2014; D'Abadia et al, 2020). A mistura com o etil-cianoacrilato permitiu que o defeito ósseo tratado tivesse margens regulares e controle na invaginação de tecido conjuntivo fibroso.

Todavia, os efeitos osteoindutores não foram perceptíveis em nenhum dos grupos tratados com os aloenxertos deste estudo, uma vez que, mesmo contribuindo com o processo de nutrição tecidual, não foram observadas maior

números de osteoblastos e células mesenquimais nas margens dos defeitos em contraste com os materiais utilizados por Vasconcelos et al (2020) que auxiliaram em tal processo de diferenciação celular.

O grupo Hs+ECA apresentou parâmetros de volume ósseo próximos aos do osso autógeno nos períodos de 60 e 90 dias, diferindo do controle negativo e do grupo ECA que apresentaram nesses períodos de tempo valores inferiores aos do tratamento padrão-ouro. Tais resultados condizem com a aplicação tópica feita por dos Santos Neves et al (2016) que também apresentou maiores resultados de um gel a base de *Hancornia speciosa* de maneira tópica, entretanto, entram em contraste com os de Felipetti (2019), que utilizou o látex de *Hancornia speciosa* por gavagem e não encontrou resultados, sugerindo que o efeito do látex de Hs ocorre de maneira tópica e suas propriedades podem ser prejudicadas pela via oral.

Em relação a densidade óssea, os grupos OA e Hs+ECA apresentaram resultados semelhantes entre si aos 90 dias, que foram superiores estatisticamente aos encontrados nos grupos controle e ECA no mesmo período. Tais dados correlacionam-se com os achados histopatológicos elucidando que o reparo ósseo proveniente do grupo ECA possui um prejuízo na densidade óssea em virtude da encapsulação completa do material, minimizando a área óssea apresentada. Tais resultados demonstram uma limitação quanto ao uso do etil-cianoacrilato, de maneira isolada, como material para enxertia óssea, mas elucidam sua capacidade de auxiliar na organização do reparo ósseo.

Ao que se refere ao etil-cianoacrilato, suas propriedades osteocondutoras, encontradas no presente relato, correspondem aos achados da literatura. O adesivo é responsável por uma fixação e proteção da superfície do defeito, bem como promove uma reação inflamatória local que retarda a formação de osso novo. Seu uso não comprovou promover vantagens para o processo de cicatrização com outros biomateriais, mas apresenta um grande potencial para fixação de enxertos (Gonzalez et al, 2000; Saska et al, 2009; Esteves et al, 2011; Esteves et al, 2014).

A cola a base de etil-cianoacrilato permite separar o defeito das camadas de tecidos adjacentes e demonstra não interferir negativamente nas propriedades biológicas de seus adjuvantes, visto o potencial angiogênico da Hs ter sido mantido mesmo com a mistura do monômero, percebido com a presença de novos vasos na avaliação histológica, ademais, suas propriedades adesivas mesmo em ambiente

úmido, rápida polimerização, biocompatibilidade e baixo custo podem auxiliar a fixação de membranas e enxertos sem a necessidade de parafusos (Rickett et al, 2009; Merolli et al, 2010; Landegre, Risling, Sondén, 2010; Atam et al, 2020; Andreotti Damante et al, 2020).

Apesar dos resultados promissores, a *Hancornia speciosa* comprovou ter mais influência no aporte de nutrição tecidual do que na diferenciação óssea, dessa forma servindo como um auxiliar para o preparo dos tecidos circundantes ao implante. O etil-cianoacrilato, por sua vez, não demonstrou propriedades biológicas ativas, todavia, apresenta um potencial a ser utilizado para fixação de membranas biológicas em reparo ósseo, uma vez que apresentou inflamação mínima e não inviabilizou a formação de tecido ósseo.

O presente trabalho conta com algumas limitações metodológicas, tais como a não fixação dos enxertos (com exceção do etil-cianoacrilato) no defeito; impossibilidade de isolar os tratamentos, dificuldade na padronização do local da criação dos defeitos, dificultando as análises posteriores; investigação histológica, somente considerando aspectos qualitativos. Por fim, os cortes e a avaliação histopatológica não foram realizadas de maneira cega, permitindo viés de análise.

7 CONCLUSÃO

Considerando as limitações do presente estudo, podemos concluir que a mistura de etil-cianoacrilato e látex da *Hancornia speciosa* (Gomes) a 50%, auxiliou no processo de cicatrização óssea principalmente pelo efeito angiogênico da *Hancornia speciosa*. O etil-cianoacrilato mostrou-se com potencial osteocondutor em defeito ósseo, mesmo quando aplicado isoladamente em sua formulação líquida, ademais, o enxerto autógeno demonstra superioridade em relação aos demais tratamentos.

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.

Almeida LM, Magno LN, Pereira AC, Guidelli ÉJ, Filho OB, Kinoshita A, Gonçalves PJ. Toxicity of silver nanoparticles released by *Hancornia speciosa* (Mangabeira) biomembrane. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2019 Mar 5;210:329-334. doi: 10.1016/j.saa.2018.11.050. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30472596.

Andreotti Damante C, Cardoso MV, Hage Karam PSB, Haiter AC, Sant'ana ACP, Greggi SLA, Zangrando MSR, De Rezende MLR, Oliveira RC. Evaluation of Regular Market Ethyl Cyanoacrylate Cytotoxicity for Human Gingival Fibroblasts and Osteoblasts. Surg Infect (Larchmt). 2020 Feb;21(1):29-34. doi: 10.1089/sur.2019.141. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31397637.

Arias-Betancur A, Badilla-Wenzel N, Astete-Sanhueza Á, Farfán-Beltrán N, Dias FJ. Carrier systems for bone morphogenetic proteins: An overview of biomaterials used for dentoalveolar and maxillofacial bone regeneration. Jpn Dent Sci Rev. 2022 Nov;58:316-327. doi: 10.1016/j.jdsr.2022.10.001. Epub 2022 Oct 19. PMID: 36281233; PMCID: PMC9587372.

Atam C, Orhan Z, Toplu G, Serin M, Karaduman ZO, Öztürk A. Comparison of peripheral nerve repair using ethyl-cyanoacrylate and conventional suture technique

*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.

in a rat sciatic nerve injury model. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2020 May;54(3):330-336. doi: 10.5152/j.aott.2020.03.156. PMID: 32544069; PMCID: PMC7586772.

Baca-Gonzalez L, Serrano Zamora R, Rancan L, González Fernández-Tresguerres F, Fernández-Tresguerres I, López-Pintor RM, López-Quiles J, Leco I, Torres J. Plasma rich in growth factors (PRGF) and leukocyte-platelet rich fibrin (L-PRF): comparative release of growth factors and biological effect on osteoblasts. *Int J Implant Dent.* 2022 Oct 3;8(1):39. doi: 10.1186/s40729-022-00440-4. PMID: 36184700; PMCID: PMC9527267.

Barbosa FI, Corrêa DS, Zenóbio EG, Costa FO, Shibli JA. Dimensional changes between free gingival grafts fixed with ethyl cyanoacrylate and silk sutures. *J Int Acad Periodontol.* 2009 Apr;11(2):170-6. PMID: 19431956.

Bonete JM, Silva GD, Guidelli ÉJ, Gonçalves PJ, Almeida LM, Baffa O, Kinoshita A. Tissue reaction and anti-biofilm action of new biomaterial composed of latex from *Hancornia speciosa* Gomes and silver nanoparticles. *An Acad Bras Cienc.* 2020 Nov 16;92(4):e20191584. doi: 10.1590/0001-3765202020191584. PMID: 33206788.

Carvalho Vasconcelos R, Ferreira C, de Araújo EM, Motta F, Bomio M, de Araújo Júnior RF, Paiva DFF, Pirihi 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. PMID: 32655782; PMCID: PMC7344105.

Chu YS, Wong PC, Jang JS, Chen CH, Wu SH. Combining Mg-Zn-Ca Bulk Metallic Glass with a Mesoporous Silica Nanocomposite for Bone Tissue Engineering. *Pharmaceutics.* 2022 May 17;14(5):1078. doi: 10.3390/pharmaceutics14051078. PMID: 35631664; PMCID: PMC9145403.

Citrin P, Doscher W, Wise L, Margolis IB. Control of needle hole bleeding with ethyl-cyanoacrylate glue (Krazy Glue). *J Vasc Surg.* 1985 May;2(3):488-90. doi: 10.1067/mva.1985.avs0020488. PMID: 3999241.

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. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3. PMID: 20517092; PMCID: PMC2946111.

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 11;83:e251075. doi: 10.1590/1519-6984.251075. PMID: 34669807.

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 12;92(2):e20190107. doi: 10.1590/0001-3765202020190107. PMID: 32556049.

De Angelis P, Manicone PF, De Angelis S, Passarelli PC, Desantis V, Romeo A, Liguori MG, D'Addona A. Implant Placement with Simultaneous Guided Bone Regeneration Using Advanced Platelet-Rich Fibrin and a Deproteinized Bovine Bone Mineral: A 2-Year Retrospective and Comparative Study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2022 Nov-Dec;42(6):e209-e216. doi: 10.11607/prd.5414. PMID: 36305938.

De Melo WM, Maximiano WM, Antunes AA, Beloti MM, Rosa AL, de Oliveira PT. Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Jan;71(1):35-41. doi:

10.1016/j.joms.2012.09.002. Epub 2012 Oct 26. Erratum in: J Oral Maxillofac Surg. 2013 Apr;71(4):824. PMID: 23102812.

de Souza JR, Kukulka EC, Araújo JCR, Campos TMB, do Prado RF, de Vasconcellos LMR, Thin GP, Borges ALS. Electrospun polylactic acid scaffolds with strontium- and cobalt-doped bioglass for potential use in bone tissue engineering applications. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2023 Jan;111(1):151-160. doi: 10.1002/jbm.b.35141. Epub 2022 Aug 11. PMID: 35950464.

Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. BMC Med. 2011 May 31;9:66. doi: 10.1186/1741-7015-9-66. PMID: 21627784; PMCID: PMC3123714.

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. doi: 10.1016/j.jep.2016.02.041. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26940898.

Durmaz B, Gunes N, Koparal M, Gul M, Dundar S, Bingul MB. Investigation of the effects of quercetin and xenograft on the healing of bone defects: An experimental study. J Oral Biol Craniofac Res. 2023 Jan-Feb;13(1):22-27. doi: 10.1016/j.jobcr.2022.10.008. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36345499; PMCID: PMC9636472.

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. doi: 10.3390/jfb13030124. PMID: 36135558; PMCID: PMC9504591.

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. doi: 10.1111/dgd.12136. Epub 2014 May 23. PMID: 24860986.

Esteves JC, Borrasca AG, Aranega AM, Garcia Junior IR, Magro Filho O. Histomorphometric analysis of the repair process of autogenous bone grafts fixed at rat calvaria with cyanoacrylate. *J Appl Oral Sci*. 2011 Oct;19(5):529-34. doi: 10.1590/s1678-77572011000500016. PMID: 21986659; PMCID: PMC3984202.

Esteves JC, Monteiro JM, Aranega AM, Betoni Junior W, Sonoda CK. Utilization of ethyl cyanoacrylate and 2-octyl cyanoacrylate adhesives for autogenous bone graft fixation: histomorphometric study in rats. *J Oral Implantol*. 2014 Aug;40(4):411-7. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-12-00063. PMID: 25106004.

Fardin AC, Jardim ECG, Pereira FC, Guskuma MH, Aranega AM, Garcia Júnior IR. Enxerto ósseo em odontologia: revisão de literatura. *Innov Implant J, Biomater Esthet (Online)*. 2010 Sep;5(3):48–52.

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 Dec;54(6):692-696. doi: 10.1055/s-0039-1697019. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31875068; PMCID: PMC6923651.

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 20;57(3):488-495. doi: 10.1055/s-0041-1741020. PMID: 35785126; PMCID: PMC9246514.

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. doi: 10.1016/j.phymed.2006.11.008. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17174539.

Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J*. 2016 Jan;98-B(1 Suppl A):6-9. doi: 10.1302/0301-620X.98B.36350. PMID: 26733632.

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. doi: 10.1155/2015/421746. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26247020; PMCID: PMC4515490.

Forssell H, Aro H, Aho AJ. Experimental osteosynthesis with liquid ethyl cyanacrylate polymerized with ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* (1978). 1984;103(4):278-83. doi: 10.1007/BF00387334. PMID: 6391416.

García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015 Dec;81:112-121. doi: 10.1016/j.bone.2015.07.007. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26163110.

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 Dec;29(12):1887-93. doi: 10.1002/ptr.5438. Epub 2015 Sep 6. PMID: 26344935.

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*. 2022 Nov 25. doi: 10.1007/s10561-022-10044-2. Epub ahead of print. PMID: 36434165.

Gonzalez E, Orta J, Quero C, Niemshik L, Galera R, Onay D, Rojas O. Ethyl-2-cyanoacrylate fixation of the cranial bone flap after craniotomy. *Surg Neurol*. 2000 Mar;53(3):288-9. doi: 10.1016/s0090-3019(00)00180-4. PMID: 10773263.

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. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.06.018. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28651093.

Hunter KM. Cyanoacrylate tissue adhesive in osseous repair. *Br J Oral Surg*. 1976 Jul;14(1):80-6. doi: 10.1016/0007-117x(76)90098-6. PMID: 1066161.

Kaplan M, Bozkurt S, Kut MS, Kullu S, Demirtas MM. Histopathological effects of ethyl 2-cyanoacrylate tissue adhesive following surgical application: an experimental study. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Feb;25(2):167-72. doi: 10.1016/j.ejcts.2003.11.016. PMID: 14747107.

Landegren T, Risling M, Persson JK, SONDÉN A. Cyanoacrylate in nerve repair: transient cytotoxic effect. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jul;39(7):705-12. doi: 10.1016/j.ijom.2010.03.008. PMID: 20434310.

Leggat PA, Smith DR, Kedjarune U. Surgical applications of cyanoacrylate adhesives: a review of toxicity. *ANZ J Surg*. 2007 Apr;77(4):209-13. doi: 10.1111/j.1445-2197.2007.04020.x. PMID: 17388821.

Maia GV, Sousa CW, de Lima JCR, Vecchio JL, de Barros Silva PG, de Souza Carvalho ACG. Cyanoacrylate glue in socket repair: a comparative study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2022 Feb;60(2):145-151. doi: 10.1016/j.bjoms.2021.01.017. Epub 2021 Feb 12. PMID: 34953568.

Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS, Fernandes PD. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *J Ethnopharmacol*. 2011 May 17;135(2):530-7. doi: 10.1016/j.jep.2011.03.059. Epub 2011 Apr 2. PMID: 21463669.

Matsui A, Buonocore M, Sarda O, Yamaki M. Tissue reactions to methyl- and ethyl-2-cyanoacrylate adhesives. *J Dent Res*. 1967 Mar-Apr;46(2):389-94. doi: 10.1177/00220345670460021301. PMID: 5228072.

Merolli A, Marceddu S, Rocchi L, Catalano F. In vivo study of ethyl-2-cyanoacrylate applied in direct contact with nerves regenerating in a novel nerve-guide. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Jun;21(6):1979-87. doi: 10.1007/s10856-010-4036-2. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20300954.

Messina AM, Oh DS, Marini L, Marini E. Reconstruction of the Maxillary Sinus After Previous Major Sinus Elevation Failure: A Study with a 3-Year Follow-up. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2022 Nov-Dec;42(6):799-807. doi: 10.11607/prd.5241. PMID: 36305935.

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. doi: 10.3390/md20090561. PMID: 36135749; PMCID: PMC9506139.

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. doi: 10.1016/j.jep.2008.08.001. Epub 2008 Aug 8. PMID: 18761076.

Moreira LN, Silva GC, Câmara DV, Pádua RM, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. The Cyclitol L-(+)-Bornesitol as an Active Marker for the Cardiovascular Activity of the Brazilian Medicinal Plant *Hancornia speciosa*. Biol Pharm Bull. 2019;42(12):2076-2082. doi: 10.1248/bpb.b19-00601. PMID: 31787722.

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. doi: 10.1186/s12906-020-02919-2. PMID: 32303220; PMCID: PMC7164147.

Palacio EP, Pereira GJC, Silveira PRA, Stasi GGD, Staut CA, Sardenberg T. The effects of ethyl-2-cyanoacrylate and butyl-2-cyanoacrylate in the process of bone healing in rats. A controlled experimental study. Rev Bras Ortop. 2017 Dec 6;53(1):53-59. doi: 10.1016/j.rboe.2017.11.010. PMID: 29367907; PMCID: PMC5771781.

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 Jul;109(7):938-948. doi: 10.1002/jbm.b.34758. Epub 2020 Nov 25. PMID: 33241610.

Pereira AC, Pereira AB, Moreira CC, Botion LM, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. J Ethnopharmacol. 2015 Feb 23;161:30-5. doi: 10.1016/j.jep.2014.11.050. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25500300.

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 10;8(10):e11018. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11018. PMID: 36276713; PMCID: PMC9578994.

Ribeiro TP, Sousa TR, Arruda AS, Peixoto N, Gonçalves PJ, Almeida LM. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. Braz J Biol. 2016 Feb;76(1):245-9. doi: 10.1590/1519-6984.20114. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26909640.

Rickett T, Li J, Patel M, Sun W, Leung G, Shi R. Ethyl-cyanoacrylate is acutely nontoxic and provides sufficient bond strength for anastomosis of peripheral nerves. J Biomed Mater Res A. 2009 Sep 1;90(3):750-4. doi: 10.1002/jbm.a.32137. PMID: 18570316.

Sánchez-Garcés MÁ, Camps-Font O, Escoda-Francolí J, Muñoz-Guzón F, Toledano-Serrabona J, Gay-Escoda C. Short time guided bone regeneration using beta-tricalcium phosphate with and without fibronectin - An experimental study in rats. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2020 Jul 1;25(4):e532-e540. doi: 10.4317/medoral.23564. PMID: 32388521; PMCID: PMC7338076.

Saska S, Hochuli-Vieira E, Minarelli-Gaspar AM, Gabrielli MF, Capela MV, Gabrielli MA. Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009 Feb;38(2):180-6. doi: 10.1016/j.ijom.2008.12.004. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19157782.

Shigeki S, Tomohiro I, Kenichi H. Endoscopic treatment of bronchopleural fistula using ethyl-2-cyanoacrylate: A report of two cases. *Respir Med Case Rep*. 2020 Jun 10;30:101123. doi: 10.1016/j.rmcr.2020.101123. PMID: 32577364; PMCID: PMC7303975.

Silva GC, Braga FC, Lemos VS, Cortes SF. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. *Phytomedicine*. 2016 Feb 15;23(2):214-9. doi: 10.1016/j.phymed.2015.12.010. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26926183.

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. doi: 10.1016/j.jep.2011.06.031. Epub 2011 Jul 3. PMID: 21756990.

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. doi: 10.1007/s10482-010-9520-7. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20960060.

Sohn JJ, Gruber TM, Zahorsky-Reeves JL, Lawson GW. Comparison of 2-Ethyl-Cyanoacrylate and 2-Butyl-Cyanoacrylate for Use on the Calvaria of CD1 Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2016 Mar;55(2):199-203. PMID: 27025812; PMCID: PMC4783639.

Susin C, Lee J, Fiorini T, Koo KT, Schüpbach P, Finger Stadler A, Wikesjö UM. Screening of Hydroxyapatite Biomaterials for Alveolar Augmentation Using a Rat Calvaria Critical-Size Defect Model: Bone Formation/Maturation and Biomaterials

Resolution. *Biomolecules*. 2022 Nov 12;12(11):1677. doi: 10.3390/biom12111677. PMID: 36421691; PMCID: PMC9687935.

Steijvers E, Ghei A, Xia Z. Manufacturing artificial bone allografts: a perspective. *Biomater Transl*. 2022 Mar 28;3(1):65-80. doi: 10.12336/biomatertransl.2022.01.007. PMID: 35837344; PMCID: PMC9255790.

Toriumi DM, Raslan WF, Friedman M, Tardy ME. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990 May;116(5):546-50. doi: 10.1001/archotol.1990.01870050046004. PMID: 2183824.

Uribe F, Vásquez B, Alister JP, Olate S. Comparison of rhBMP-2 in Combination with Different Biomaterials for Regeneration in Rat Calvaria Critical-Size Defects. *Biomed Res Int*. 2022 Apr 25;2022:6281641. doi: 10.1155/2022/6281641. PMID: 35509708; PMCID: PMC9061001.

Zumpano BJ, Jacobs LR, Hall JB, Margolis G, Sachs E Jr. Bioadhesive and histotoxic properties of ethyl-2-cyanoacrylate. *Surg Neurol*. 1982 Dec;18(6):452-7. doi: 10.1016/0090-3019(82)90186-0. PMID: 7163966.

APÊNDICE 1 – TABELA DE SUMARIZAÇÃO DOS DADOS EM MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Sumarização dos dados mensurados a partir de microtomografia computadorizada.

Grupo	Volume Ósseo (mm ³)					
	30		60		90	
	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q
Hs+ECA	55.6	53-59.3	63.2	53.7-69	57.2	56.7-61.2
Controle	50	47-53.8	51.8	47.2-56.5	53.9	49.4-56.4
OA	73.9	68.2-76.1	80.2	75.1-83.4	67.3	67.1-77.2
ECA	62.8	56.6-66.8	57.2	46.6-59.7	48.4	47.2-59.9

	Densidade volumétrica óssea (%)					
	30		60		90	
	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q
Hs+ECA	10.4	9.62-11.4	11.8	10.1-12.4	11.8	10.6-13.5
Controle	9.23	8.82-10.1	8.88	8.58-10.3	10.5	10.2-11.9
OA	11.1	9.79-12	15.4	14.7-15.9	11.4	10.4-14.3
ECA	8.62	8.31-9.23	10.2	9.48-11.3	8.86	7.49-10.1

	Número de Trabéculas ósseas (1/um) *10 ⁻⁴					
	30		60		90	
	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q
Hs+ECA	1.25	1.025-1.475	1.4	1.225-1.65	1.2	1.2-1.2
Controle	1.05	0.9-1.35	1.25	1.05-1.3	1.2	1-1.2
OA	1.2	0.975-1.2	1.45	1.4-1.5	1.3	1.1-1.3
ECA	0.95	0.9-1.075	1.05	1-1.325	1	0.9-1.2

	Espessura média de Trabéculas ósseas (mm)					
	30		60		90	
	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q
Hs+ECA	0.8095	0.731-0.8625	0.8085	0.7175-0.84775	0.939	0.917-0.945
Controle	0.8045	0.70525-0.91725	0.82	0.7435-0.83575	0.982	0.95-0.999
OA	0.97	0.9425-0.987	1.0425	0.99675-1.06425	1.033	0.904-1.053
ECA	0.9535	0.83025-0.98225	0.905	0.85025-0.9455	0.848	0.825-0.916

	Espaço entre Trabéculas ósseas (mm)					
	30		60		90	
	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q	Mediana	25%Q-75%Q
Hs+ECA	3.804	3.61825-4.02725	3.3845	2.9845-4.04025	3.649	3.635-3.81
Controle	3.9735	3.8025-4.0845	3.899	3.26625-4.50325	3.754	3.589-4.128
OA	4.0285	3.55425-5.12675	3.668	3.43875-3.94675	3.59	3.444-3.73
ECA	4.7485	4.04975-4.9878	3.6715	3.38025-4.082	4.09	3.514-4.422

Legenda: mm³: milímetros cúbicos; %: percentual de densidade volumétrica óssea; 30, 60, 90: períodos de dias de acompanhamento; 25%Q-75%Q: intervalo interquartil; Hs+ECA: Grupo *Hancornia speciosa* e etil-cianoacrilato; OA: Osso autógeno; ECA: Etil-cianoacrilato.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

ANEXO 2 – RELATÓRIO DE SIMILARIDADE

tese			
ORIGINALITY REPORT			
6%	%	6%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	Patrícia Lima D'Abadia, Susy Ricardo Lemes, Paulo Roberto de Melo-Reis, Ruy de Souza Lino Júnior et al. "Tissue healing changes on wounds in rats after treatment with Hancornia speciosa latex in cream-gel formulation", Acta Cirúrgica Brasileira, 2022 Publication		2%
2	Pengren Huang, peng yang, Keming Liu, wei tao, Jun Tao, Fanrong Ai. "Evaluation of "surgery-friendly" bone scaffold characteristics: 3D printed ductile BG/PCL scaffold with high inorganic content to repair critical bone defects", Biomedical Materials, 2022 Publication		1%
3	"Produtos Naturais e Suas Aplicações: da comunidade para o laboratório", Editora Científica Digital, 2021 Publication		1%
4	Oscar Oswaldo Marcillo Toala. "Anti-adherent and antifungal activity of synthetic and organic adhesive polymers on >i/< biofilms", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2015 Publication		1%
5	Leila S. Neto, Rafaianne Q. Moraes-Souza, Thaigra S. Soares, Marcelo S. Pinheiro et al. "A treatment with a boiled aqueous extract of Hancornia speciosa Gomes leaves improves the metabolic status of streptozotocin-induced diabetic rats", BMC Complementary Medicine and Therapies, 2020 Publication		1%
6	Anderson Antonio Mamede, Elizabeth Ferreira Martinez, Roberta Tarkany Basting. "Mechanical and histological evaluation of a titanium device for orthodontic anchorage, placed with or without cyanoacrylate adhesive", Dental Press Journal of Orthodontics, 2019 Publication		1%
Exclude quotes Off			
Exclude bibliography Off			
Exclude matches < 1%			