

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado de Pós-graduação em Odontologia

Daniel Marques Leão

**EFEITOS DE UM BIOMATERIAL DE ORIGEM VEGETAL (*Equisetum
hyemale*) ASSOCIADO A HIDROGEL CONTENDO ÁCIDO
HIALURÔNICO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO EM
MAXILA: *UM ESTUDO PRELIMINAR***

Belo Horizonte
2023

Daniel Marques Leão

EFEITOS DE UM BIOMATERIAL DE ORIGEM VEGETAL (*Equisetum hyemale*) ASSOCIADO A HIDROGEL CONTENDO ÁCIDO HIALURÔNICO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO EM MAXILA: *UM ESTUDO PRELIMINAR*

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Ivana Márcia Alves Diniz
Coorientador: Prof. Frederico Santos Lages

Belo Horizonte
2023

Ficha Catalográfica

L437e Leão, Daniel Marques.
2023 Efeitos de um biomaterial de origem vegetal (equisetum
T hyemale) associado a hidrogel contendo ácido hialurônico na
regeneração de defeito ósseo em maxila: um estudo preliminar
/ Daniel Marques Leão. -- 2023.

66 f. : il.

Orientadora: Ivana Márcia Alves Diniz .

Coorientador: Frederico Santos Lages.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Regeneração óssea. 2. Materiais biocompatíveis. 3.
Hidrogéis. I. Diniz , Ivana Márcia Alves. II. Lages,
Frederico Santos . III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITOS DE UM BIOMATERIAL DE ORIGEM VEGETAL (EQUISETUM HYEMALE) ASSOCIADO A HIDROGEL DE ÁCIDO HIALURÔNICO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO EM MAXILA – UM ESTUDO PRELIMINAR

DANIEL MARQUES LEÃO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração CLÍNICA ODONTOLÓGICA.

Aprovada em 31 de março de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Ivana Márcia Alves Diniz - Orientador
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof. Frederico Santos Lages
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Gerluza Aparecida Borges Silva
UFMG

Profa. Rosângela Maria Ferreira da Costa e Silva
Universidade Federal da Fronteira Sul

Belo Horizonte, 31 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por Gerluza Aparecida Borges Silva, Professora do Magistério Superior, em 31/03/2023, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Frederico Santos Lages, Professor do Magistério Superior, em 31/03/2023, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ivana Marcia Alves Diniz, Professora do Magistério Superior, em 31/03/2023, às 18:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

rio
io art. 5º



Documento assinado eletronicamente por Rosangela Maria Ferreira da Costa e Silva, Usuária Externa, em 04/04/2023, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

ria
o art. 5º



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2173451 e o código CRC 86EC5C50.

173498 e

Dedico este trabalho aos meu pais e ao meu irmão, que sempre me apoiaram e incentivaram o meu crescimento, bem como aos meus amigos e familiares que por mim torceram. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Anjo da Guarda por me guiar pelos melhores caminhos junto às bênçãos de Deus, ambos sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe por seu carinho, preocupação e dedicação, sempre me amparando com o que me é necessário.

Ao meu pai por toda ajuda, incentivo na área odontológica e pelos conhecimentos, principalmente, clínicos.

Ao meu irmão pelo apoio e pela ajuda nos momentos de sufoco.

A todos os meus familiares que por mim torceram e se preocuparam com o meu desenvolvimento profissional.

Aos meus amigos por compartilharem comigo todas as alegrias, além de me oferecerem um ombro nos momentos difíceis, sempre me apoiando e aconselhando. Muito obrigado, Rafa, por dividir comigo todo o processo desde a graduação até a nossa defesa da dissertação.

À professora Dr^a. Ivana Márcia Alves Diniz, pela oportunidade e confiança depositada em mim, bem como por compartilhar comigo seus conhecimentos, me orientando durante essa fase de mestrado.

Ao professor Dr. Frederico Santos Lages, pelas contribuições como coorientador, bem como pelas conversas, conselhos e conhecimentos clínicos no período de estágio docente.

A professora Dr^a. Rosângela Maria Ferreira da Costa e Silva por, gentilmente, ceder o biomaterial *BG-Carb* para ser utilizado na pesquisa.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação humana e profissional, não apenas nestes dois últimos anos, mas desde o início dos meus estudos.

À funcionária Mara pela sua colaboração com o preparo das lâminas histológicas.

A Isabella Bittencourt e ao Juliano Albergaria por gentilmente ajudarem no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos colegas do “Time Ivana” que colaboraram com este trabalho, em especial a Natália Gomes, que me transferiu muito aprendizado em laboratório.

Aos colegas da Pós-graduação por terem compartilhado comigo diversos momentos únicos e sabedoria.

Por fim, agradeço aos animais que cederam suas vidas para o desenvolvimento da ciência.

“ A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O tecido ósseo é um tecido naturalmente capaz de se autorregenerar. Entretanto, defeitos ósseos de maiores dimensões têm tal processo dificultado e, em situações de difícil reparação espontânea necessitam de auxílio de enxertos ou materiais apropriados para dar suporte à neoformação óssea. Hidrogéis são excelentes materiais a serem utilizados para esse fim, uma vez que são capazes de mimetizar a maioria das propriedades dos tecidos conjuntivos. Recentemente, despertou-se um interesse significativo no desenvolvimento de hidrogéis híbridos que pudessem ser utilizados em várias aplicações biomédicas. Uma diversidade de partículas é combinada a esse hidrogéis resultando em melhores propriedades. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar a influência de um *scaffold* contendo ácido hialurônico associado a um biovidro experimental de origem vegetal - *Equisetum hyemale* (*BG-Carb*), na regeneração de um defeito ósseo em maxila de camundongos. Nesse estudo preliminar, camundongos C57BL/6 (n = 3 por grupo e tempo experimental) (CEUA #042/2022) tiveram seu primeiro molar superior esquerdo extraído. Em seguida, uma ponta diamantada KGS #2128 (KG Soresen®), acoplada a um motor em baixa rotação (5000 rpm) foi utilizada para a realização de um defeito com a remoção do septo alveolar. Parte dos animais tiveram os defeitos preenchidos exclusivamente por *HyStem®-HP* (hidrogel à base de ácido hialurônico) (2 µL), enquanto a outra parte recebeu *BG-Carb* (1 µg) disperso em *HyStem®-HP* (2 µL). Após a eutanásia, as amostras foram processadas para análise histológica de rotina para histomorfometria, graduação do processo inflamatório, vascularização e neoformação óssea após 7 e 21 dias pós-cirúrgicos. Os resultados foram analisados considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Aos 7 dias, o grupo que recebeu a associação *BG-Carb* e *HyStem®-HP* apresentou maiores valores numéricos de neoformação óssea, todavia sem diferença significativa em relação ao uso exclusivo de *HyStem®-HP* (controle). Aos 21 dias, os grupos *HyStem®-HP* e *BG-Carb* associado a *HyStem®-HP* apresentaram resultados semelhantes tanto na quantificação de tecido ósseo como de conjuntivo. O escore total para graduação para cada material também foi semelhante aos 7 e 21 dias. Apesar disso, comparando-se cada material nos tempos 7 e 21 dias, o grupo *HyStem®-HP* apresentou aumento significativo de parâmetros qualitativos e quantitativos, demonstrando que a associação *HyStem®-HP* + *BG-Carb* apresentou neoformação óssea inicial mais robusta. A quantificação epitelial da região da cirurgia aos 21 dias em ambos os grupos revelou aumento significativo da espessura, continuidade e uniformidade do epitélio nos grupos tratados com o a associação dos biomateriais em relação ao controle. Nas condições experimentais deste estudo, tanto o uso do *HyStem®-HP* como do *HyStem®-HP* + *BG-Carb* podem promover neoformação óssea. No entanto, a associação do hidrogel à base de ácido hialurônico com o *BG-Carb* parece promover neoformação óssea inicial mais consistente e estimular a proliferação da mucosa adjacente à cirurgia com maior espessura do tecido epitelial.

Palavras-chave: materiais biocompatíveis; defeito ósseo; regeneração óssea; *BG-Carb*; *HyStem®-HP*.

ABSTRACT

Effects of a plant-derived biomaterial (*Equisetum hyemale*) associated with a hyaluronic acid-containing hydrogel on the regeneration of a bone defect in the maxilla: A preliminary study

Bone tissue is a naturally regenerative tissue. However, larger bone defects have a difficult time undergoing this process and require the assistance of grafts or appropriate materials to support new bone formation. Hydrogels are excellent materials to use for this purpose since they can mimic most of the properties of connective tissues. Recently, there has been significant interest in the development of hybrid hydrogels that can be used in various biomedical applications. A variety of particles can be combined with these hydrogels, resulting in better properties. Thus, this study aims to evaluate the influence of a scaffold containing hyaluronic acid associated with an experimental plant-derived bioactive glass - *Equisetum hyemale* (BG-Carb), on the regeneration of a mouse maxillary bone defect. In this preliminary study, C57BL/6 mice (n = 3 per group and experimental time) (CEUA # 042/2022) had their upper left first molar extracted. Then, a KGS # 2128 diamond bur (KG Soresen®), attached to a low-speed motor (5000 rpm), was used to create a defect with removal of the alveolar septum. Some of the animals had defects filled exclusively with *HyStem®-HP* (hyaluronic acid-based hydrogel) (2 µL), while the other part received BG-Carb (1 µg) dispersed in *HyStem®-HP* (2 µL). After euthanasia, the samples were processed for routine histological analysis for histomorphometry, grading of the inflammatory process, vascularization, and new bone formation after 7 and 21 post-surgical days. The results were analyzed considering a significance level of 5% (p < 0.05). At 7 days, the group that received the *BG-Carb* and *HyStem®-HP* association showed higher numerical values of new bone formation, but without a significant difference compared to the exclusive use of *HyStem®-HP* (control). At 21 days, the *HyStem®-HP* and *BG-Carb* groups associated with *HyStem®-HP* showed similar results in both bone and connective tissue quantification. The total score for grading for each material was also similar at 7 and 21 days. However, comparing each material at 7 and 21 days, the *HyStem®-HP* group showed a significant increase in qualitative and quantitative parameters, demonstrating that the *HyStem®-HP* + *BG-Carb* association presented a more robust initial bone formation. The epithelial quantification of the surgery region at 21 days in both groups revealed a significant increase in thickness, continuity, and uniformity of the epithelium in the groups treated with the association of biomaterials compared to the control. Under the experimental conditions of this study, both the use of *HyStem®-HP* and *HyStem®-HP* + *BG-Carb* can promote bone formation. However, the association of the hyaluronic acid-based hydrogel with *BG-Carb* appears to promote a more consistent initial bone formation and stimulate the proliferation of the mucosa adjacent to the surgery with greater thickness of the epithelial tissue.

Keywords: biocompatible materials; bone defect; bone regeneration; *BG-Carb*; *HyStem®-HP*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equisetum hyemale.....	19
Figura 1 – Materiais utilizados no procedimento experimental.....	26
Figura 2 – Sequência do procedimento experimental cirúrgico.....	27
Figura 3 – Fotomicrografia corada em hematoxilina e eosina representativa de um primeiro molar superior esquerdo fixado em seu tecido periodontal de suporte	30
Figura 1 (artigo) – Materiais utilizados no procedimento experimental	36
Figura 2 (artigo) – Sequência do procedimento experimental cirúrgico.	37
Figura 3 (artigo) – Fotomicrografia corada em hematoxilina e eosina representativa de um alvéolo intacto sobre a qual foi desenhada a macro	39
Figura 4 (artigo) – Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina do sítio cirúrgico dos grupos no 7º dia pós-cirurgia	41
Figura 5 (artigo) – Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina do sítio cirúrgico dos grupos no 21º dia pós-cirurgia	41
Figura 6 (artigo) - Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina do sítio cirúrgico dos grupos no 21º dia pós-cirurgia – epitélio.....	42
Figura 7 (artigo) – Fotoicrografias coradas em hematoxilina e eosina do sítio cirúrgico dos grupos no 21º dia pós-cirurgia. Controle negativo.....	43
Figura 8 (artigo) – FotoMicrografias coradas em hematoxilina e eosina do sítio cirúrgico do grupo no 21º dia pós-cirurgia – Controle negativo.....	44
Figura suplementar 1 – Peças histológicas imediatamente após eutanásia e dissecação	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1 – Escore total (média) de pontuação histológica para classificação da cicatrização óssea.....	45
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupos experimentais	25
Tabela 2– Sistema de pontuação histológica para classificação da regeneração óssea	31
Tabela 1 (artigo) – Distribuição dos animais por grupos experimentais	35
Tabela 2 (artigo) – Sistema de pontuação histológica para classificação da regeneração óssea.....	40
Tabela 3 (artigo) – Pontuação histológica para classificação da regeneração óssea	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
<i>BG-Carb</i>	Composto bioativo vidro/carbono
CEUA	Comissão de Ética e Uso Animal
g	Gramas
kg	Quilograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
ROI	Área de interesse

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
1.1 Ácido hialurônico	17
1.2 Biocompostos de vidro ativo	18
1.3 <i>Equisetum hyemale</i>	19
1.4 Composto bioativo vidro/carbono (<i>BG-Carb</i>)	20
1.5 Justificativa	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS (EXPANDIDO)	24
3.1 Aspectos éticos.....	24
3.2 Animais.....	24
3.3 Procedimentos cirúrgicos.....	25
3.4 Eutanásia.....	28
3.5 Processamento histológico.....	28
3.5.1 Padronização da região de análise histomorfométrica.....	29
3.5.2 Avaliação histomorfométrica	30
3.6 Estatística	31
4 ARTIGO	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A – PEÇAS HISTOLÓGICAS	64
ANEXO A – PROTOCOLO CEUA #42/2022	65

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O tecido ósseo é um tecido naturalmente capaz de se autorregenerar, entretanto, no que diz respeito a defeitos ósseos maiores, o processo torna-se dificultado (TANAKA *et al.*, 2020). Por isso, alguns defeitos ósseos são considerados grandes desafios para a prática clínica médica ortopédica e odontológica/craniofacial (MEINEL *et al.*, 2005; TAGA, 2005; TOLLEMAR *et al.*, 2016).

Quando defeitos ósseos não podem mais ser reparados espontaneamente, necessitando, então, de uma abordagem reconstrutiva mais complexa com auxílio de enxertos ou materiais apropriados, estes são chamados de defeitos ósseos de tamanho crítico (SCHMIDMAIER *et al.*, 2009; TOLLEMAR *et al.*, 2016). Esses defeitos podem ser de origem congênita, infecciosa, traumática ou por consequência de ressecção tumoral e exodontias (SPICER *et al.*, 2012; TOLLERMAR *et al.*, 2016), atingindo os ossos maxilares e trazendo prejuízos ao paciente. Dentre as limitações na reabilitação odontológica estão dificuldades na alimentação e fala, além de comprometimento estético que afeta a autoestima e gastos financeiros consideráveis.

As especialidades cirurgia bucomaxilofacial, periodontia, prótese e implantodontia são as principais áreas da Odontologia que se deparam com a necessidade de indução de neoformação óssea para preenchimento de defeitos patológicos, traumáticos ou mesmo fisiológicos (PRADO *et al.*, 2006; SPIN-NETO *et al.*, 2011). Dessa forma, a reconstrução óssea é importante para a reabilitação funcional e estética do paciente (AMARAL *et al.*, 2017), principalmente na correção de perdas causadas por trauma, atrofia e doenças periodontais (CHIAPASCO *et al.*, 2012). Para isso, uma técnica já bastante difundida é a utilização de enxertos de biomateriais. Alam *et al.* (2008) afirmam que o osso autógeno é considerado padrão-ouro em material de enxertia, sendo, portanto, passível de ser utilizado para correção – em volume e qualidade – de defeitos ósseos. No entanto, a sua utilização apresenta desvantagens, dentre as quais a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, a dependência de áreas doadoras viáveis e o risco significativo de morbidade. Devido a esses fatores limitadores, observa-se ainda uma extensa investigação por biomateriais naturais ou sintéticos que possam substituir ou até suplantam as vantagens do enxerto autógeno (TOLLEMAR *et al.*, 2016; AMARAL *et al.*, 2017).

Segundo Tollemar *et al.* (2016), enxertos com materiais da categoria aloplástica têm demonstrado sucesso quanto ao uso, porém costumam apresentar risco aumentado de infecção quando comparados ao enxerto autógeno, além de risco maior de falha com o tempo. Dessa forma, para o reparo de defeitos maiores do complexo bucomaxilofacial, biomateriais – cujas propriedades físicas, químicas e biológicas são controladas e aumentam a capacidade regenerativa natural dos ossos – são versáteis e promissores no desenvolvimento funcional de tecidos (FISHER *et al.*, 2010; FISHERO *et al.*, 2015; SLAUGHTER *et al.*, 2009). Nessa perspectiva, a engenharia tecidual tem contribuído para a neoformação de tecidos capazes de mimetizar ou estimular as suas próprias funções naturais, o que a torna bastante promissora no tratamento de órgãos patologicamente comprometidos por doenças, senilidade e trauma (KHADEMHOSEINI *et al.*, 2009; PEPPAS *et al.*, 2006).

Dessa forma, para que ocorra a regeneração óssea, três mecanismos são necessários: osteoindução, que estimula as células do hospedeiro a se diferenciarem em osteoblastos; osteocondução, que promove o crescimento do tecido sobre a superfície do material; e osteointegração, que corresponde à fixação estável do material ao osso (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; DI SILVIO; JAYAKUMAR, 2009). Por isso, os biomateriais e enxertos ideais são aqueles que orientam o reparo do tecido ósseo em três dimensões, promovendo tais mecanismos, com recrutamento celular adequado e induzindo a diferenciação das células ósseas (ELSALANTY; GENECOV, 2009).

Assim, comparando-se biomateriais osteoindutores a enxertos sintéticos, os primeiros são preferíveis, uma vez que apresentam essas características, como capacidade de autorregulação da adesão de células-tronco mesenquimais e proliferação e diferenciação em células osteoblásticas (DE GODOY *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2018). Tal comportamento pode ser comparado ao uso adicional de fatores de crescimento, porém apresenta a vantagem de evitar os efeitos adversos prejudiciais associados às doses suprafisiológicas de proteínas ósseas morfogenéticas (CARRAGEE; HURWITZ; WEINER, 2011).

Nesse contexto, biomateriais que formam um arcabouço tridimensional (*scaffold*) para a regeneração óssea têm sido alvo de estudos da engenharia tecidual (RODDY *et al.*, 2017), sendo essa estrutura física e sua composição química de grande importância no tratamento de defeitos ósseos. A porosidade desses *scaffolds*, por exemplo, deve estar próxima a dos ossos trabeculares, interagindo com as

biomoléculas do tecido e permitindo infiltração celular, migração, vascularização, remoção de excretas metabólicas e difusão adequada de nutrientes e oxigênio às células (FILIPPOV *et al.*, 2020; LIMMAHAKHUN *et al.*, 2020; WALIA *et al.*, 2020).

Entretanto, alguns *scaffolds* mais imunogênicos estão sujeitos a desencadear resposta do tipo corpo estranho quando implantados no tecido, ocorrendo deposição, e subsequente desnaturação, de proteínas na superfície do material (ZHANG; CHIAO, 2015), ocasionando uma possível inflamação, seja aguda ou crônica (YEH; OH; HSUEH, 2016). Com isso, uma solução em potencial seria o desenvolvimento de materiais capazes de criar um ambiente semelhante ao do tecido hospedeiro, mais especificamente, mimetizar a matriz extracelular (WALIA *et al.*, 2020), sem despertar, entretanto, respostas imunes importantes.

Dentre os diversos biomateriais existentes, os hidrogéis são materiais bastante compatíveis, ou seja, apresentam baixa imunogenicidade, uma vez que são capazes de mimetizar a maioria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos tecidos (FISHER *et al.*, 2010; SLAUGHTER *et al.*, 2009). Diversos hidrogéis, tanto de natureza sintética quanto natural, têm sido utilizados como substitutos de matriz extracelular (CHANG; PARK; FAMILI, 2019; ROWLEY; MADLAMBAYAN; MOONEY, 1999). Devido às suas propriedades físicas peculiares, essas redes conseguem ser moldadas ou fixadas em diversas formas e tamanhos, pois retêm interações favoráveis à água (CHANG; PARK; FAMILI, 2019; GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSEINI, 2014). Por isso mesmo, a estrutura flexível dos hidrogéis inviabiliza que eles sejam utilizados diretamente onde há necessidade de resistência mecânica estrutural e estabilidade de forma, como é o caso dos defeitos ósseos (WALIA *et al.*, 2020). Porém, tal problema pode ser contornado com a sua interação e ligação a estruturas sólidas que podem fornecer a esse material a resistência e a estabilidade necessárias (WHIRTHL *et al.*, 2017; YUK *et al.*, 2016).

Dessa forma, hidrogéis híbridos podem ser definidos como redes poliméricas hidratadas, tanto física quanto covalentemente interligadas entre si e/ou com partículas ou estruturas, em que essas interações levam a novas propriedades dos compostos (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSEINI, 2014; GOENKA; SANT; SANT, 2014; THOMAS *et al.*, 2006). Recentemente, despertou-se interesse significativo no desenvolvimento de um hidrogel híbrido que pode ser utilizado em várias aplicações biomédicas. Uma diversidade de partículas, dentre elas os materiais

à base de sílica, são combinadas à rede polimérica para se obter esses hidrogéis híbridos (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSEINI, 2014).

Gaharwar, Peppas e Khademhosseneni (2014) afirmam que, nos últimos anos, uma grande variedade de materiais, incluindo os poliméricos, cerâmicos, metálicos e os que têm o carbono como base, foram incorporados a hidrogéis para que estes se tornassem compostos com propriedades superiores e com a funcionalidade desejada, de modo a serem melhores osteoindutores e osteocondutores.

1.1 Ácido hialurônico

O AH é um polissacarídeo natural composto por concentrações equimolares de N-acetil-D-glicosamina e ácido D-glucurônico, presente na matriz extracelular do tecido conjuntivo (MASON; CROSSMAN; SWEENEY, 1989). Tais componentes apresentam elevado número de grupos hidroxila e carboxila, conferindo ao AH um caráter altamente hidrofílico. A estrutura formada pelo AH funciona como uma peneira, realizando o controle do transporte de água no tecido, restringindo o movimento de patógenos, aumentando a adesão celular, absorvendo exsudatos e modulando a inflamação, uma vez que inibe a migração e a agregação de macrófagos (GRAÇA *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2012).

No entanto, a concentração de AH, seja na matriz extracelular, seja nos biomateriais industrialmente sintetizados, deve ser relativamente reduzida, uma vez que maiores concentrações podem reduzir a adesão celular, já que ele possui carga negativa (MASON; CROSSMAN; SWEENEY, 1989; REN *et al.*, 2009). Essa desvantagem pode ser contornada combinando-se o AH a espécies quimicamente positivas (TIAN *et al.*, 2005), como silício ou carbono, de modo a melhorar as suas interações com os tecidos biológicos (AYALA-HAM *et al.*, 2021). Além disso, o ácido hialurônico puro não é considerado um bom biomaterial devido a sua suscetibilidade natural à biodegradação e por possuir propriedades mecânicas inferiores. No entanto, com o objetivo de conferir estabilidade ao AH, ele pode ser reticulado a outras espécies químicas (XU *et al.*, 2012), como ocorre com o *HyStem®-HP* comercializado pela Sigma-Aldrich (Louis, USA).

O *HyStem®-HP* é um hidrogel semissintético contendo ácido hialurônico em sua composição sendo composto por 3 componentes distribuídos em dois frascos: (1) ácido hialurônico + tiolato; gelatina suína + tiolato; e (2) polietileno glicol diacrilato +

tiolato-reativo, em que estes dois reagem entre si formando ligações cruzadas em aproximadamente 20 minutos. Sabe-se ainda que a utilização do composto tiol em sua formulação permite que uma gama de espécies biológicas, como proteínas e anticorpos, se ligue quimicamente ao hidrogel (ZAREMBINSKI *et al.*, 2017 In: GLICKMAN *et al.*, 2021; ZAREMBINSKI; SKARDAL, 2019). Ainda, o ânion tiolato ($-S^-$) possui expressivo caráter nucleofílico, sendo rico em pares de elétrons disponíveis para ligação, o qual pode prontamente reagir com grupos funcionais eletrofílicos e agentes oxidantes (BISCHOFF; SCHLÜTER, 2012; LUEBKE; GIEDROC, 2015).

Esse material – HyStem®-HP – já vem sendo utilizado de diversas formas com segurança em roedores, por exemplo, no cérebro, espaço intracutâneo e espaço subconjuntival (COOK *et al.*, 2016; HYNES *et al.*, 2014; PLACONE *et al.*, 2015). Além disso, em 2019, recebeu na Europa a marcação CE de segurança em uso biológico, o que inclui seres humanos (ZAREMBINSKI; SKARDAL, 2019).

Dessa forma, as características dos hidrogéis constituídos de ácido hialurônico no que diz respeito à biocompatibilidade, biodegradabilidade (por meio da ação das enzimas hialuronidase, beta-D glucuronidase e beta D-N-acetil-hexosaminidase) e fácil modificação química têm levado esses materiais a serem utilizados no reparo de feridas (GRAÇA *et al.*, 2020; STERN, 2004).

1.2 Biocompostos de vidro ativo

Compostos de vidro bioativo, além de possuírem a sílica como composto principal, possuem quantidades variáveis de óxido de sódio (Na_2O), óxido de cálcio (CaO) e pentóxido de fósforo (P_2O_5) recebendo essa denominação devido a sua capacidade de se ligarem a tecidos duros e moles (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2022; HENCH; THOMPSON, 2010), induzindo a formação de uma camada sobre o osso e promovendo a atividade dos osteoblastos (FERRAZ *et al.*, 2017; HOPPE *et al.*, 2011; XYNOS *et al.* 2001). Células-tronco mesenquimais do hospedeiro podem migrar então para o sítio da ferida e se diferenciarem no tipo de célula requerida, como os osteoblastos (DETSCH; BOCCACCINI, 2014; ZHAO *et al.*, 2018).

Scaffolds compostos de vidro bioativo, além de apresentarem características singulares, como robustez, capacidade de preenchimento e bioatividade (AZNAR *et al.*, 2016; GIMÉNEZ *et al.*, 2015), possuem ainda uma estrutura porosa similar ao osso trabecular. Portanto, têm potencial para conduzir o processo de regeneração óssea,

forneendo às células um molde temporário para que cresçam em seu interior (NOMMEOTS-NOMM *et al.*, 2017). Além disso, os íons de dissolução do vidro apresentam um comportamento semelhante aos fatores de crescimento temporalmente presentes no microambiente dos tecidos ósseos, os quais fornecem sinais às células-tronco levando à osteoestimulação (IMANI FOOLADI *et al.*, 2013; JOHARI *et al.*, 2016). Alguns vidros bioativos podem também ter atividade antimicrobiana, o que também pode ser importante para controlar o risco de contaminação no sítio cirúrgico (IMANI FOOLADI *et al.*, 2013; HOPPE *et al.*, 2011; JOHARI *et al.*, 2016; KARGOZAR *et al.*, 2018).

1.3 *Equisetum hyemale*

Segundo da Costa e Silva *et al.* (2022), plantas do gênero *Equisetum* (FIGURA 1) podem ser encontradas em todos os continentes, totalizando cerca de 30 espécies. No Brasil, as espécies *Equisetum giganteum* e *Equisetum hyemale* são plantas nativas, popularmente conhecidas como cavalinha, sendo cientificamente comprovadas propriedades antibióticas, hepatoprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias da *Equisetum hyemale* (DE QUEIROZ *et al.*, 2015).

Figura 1 – *Equisetum hyemale*.



Fonte: Dos autores, 2023.

Silício ou derivados de sílica podem ser obtidos de diversas fontes naturais, dentre as quais estão as plantas do gênero *Equisetum* (HOLZHÜTER; NARAYANAN; GERBER, 2003; PERMATASARI; SUCAHYA; NANDIYANTO, 2016). Essas plantas

permitem serem cultivadas e apresentam facilidade para se propagarem em solo calcário e úmido (DES MARAIS *et al.*, 2003; ZEMNUKHOVA *et al.*, 2019). Isso faz com que questões ecológicas, como o cultivo em áreas de difícil acesso e agricultura sustentável ou extrativa, sejam pontos importantes a serem considerados (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2022).

Elementos de relevância industrial e fisiológica podem estar presentes na massa seca das plantas do gênero *Equisetum* em porcentagens elevadas (NEUMANN *et al.*, 2010; SAPEI, 2007; TAYEBEE *et al.*, 2017; ZEMNUKHOVA *et al.*, 2019). Mais especificamente, micronutrientes como cálcio, magnésio, flúor, zinco, cobre, ferro, selênio e algumas vitaminas presentes nessas plantas são de grande importância no metabolismo ósseo (ILICH; BROWNBILL; TAMBORINI, 2003).

Com isso, a incorporação desses elementos aos vidros bioativos pode fornecer funções terapêuticas interessantes a esses materiais, de modo a contribuir para a regeneração tecidual (DELIORMANLI, 2015; KARGOZAR *et al.*, 2018; RANA *et al.*, 2017). No que diz respeito aos aspectos químicos e biológicos, os vidros bioativos à base de sílica apresentam diversas propriedades associadas a um material ideal para enxertia e *scaffold*, o que permitiu abrir novas perspectivas como biomateriais osteoindutores da regeneração do tecido ósseo, também chamados de terceira geração (HENCH; POLAK, 2002; HENCH; XYNOS; POLAK, 2004).

Segundo Xynos *et al.* (2000), essas propriedades osteoindutoras estão relacionadas à superfície de contato entre a célula e o material juntamente com a liberação de íons. Esses subprodutos de biovidro promovem uma regulação positiva do fator de crescimento mitogênico ósseo IGF-II (do inglês, *insulin-like growth factor II*) e com isso leva à proliferação celular do tecido, sendo útil na regeneração óssea.

Dessa forma, visto as propriedades dos biovidros, observa-se que esses materiais podem ser bastante interessantes para os defeitos ósseos craniofaciais, tanto no que diz respeito ao nível celular, quanto ao tecidual.

1.4 Composto bioativo vidro/carbono (*BG-Carb*)

Os processos padrões de produção de biovidros naturais contendo sílica consistem em diversas etapas, como queima, acidificação e alcalinização (LIOU e YANG, 2011; NEUMANN *et al.*, 2010; SAPEI, 2007). Porém, mais algumas outras – moagem, homogeneização, filtração, precipitação e lavagem – podem ser adicionadas

com o objetivo de aumentar o nível de pureza dessa sílica e outros derivados (LIOU e YANG, 2011; SAPEI, 2007; TAYEBEE *et al.*, 2017). Todavia, o carbono e alguns íons presentes na planta são eliminados ao longo dessas etapas (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2022), fazendo com que haja a perda de características importantes relacionadas ao carbono, tais como elevada área de superfície específica e porosidade, ambas desejáveis em *scaffolds* de vidro bioativos, cujo objetivo é induzir osteointegração e regeneração óssea (JONES; EHRENFRIED; HENCH, 2006; ONNA; MINABERRY; JOBBAGY, 2015; PALANICHAMY; ARIHARAPUTHIRAN; DARCHEN, 2013).

Utilizando uma técnica diferente, de forma a preservar as características do carbono, Da Costa e Silva *et al.* (2022) produziram um composto de vidro bioativo chamado *BG-Carb*. A técnica utilizada permitiu aumentar a concentração final sílica, cálcio e fósforo no material.

Elementos presentes no plasma sanguíneo – Na, K, Mg, Ca, HCO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} –, que favorecem à formação de hidroxiapatita (KIM *et al.*, 1999), estão presentes também na composição do *BG-Carb* (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2022), o que torna a superfície do material interessante, já que imita a composição dos sais no organismo humano. Além disso, outros elementos, como Mg, Fe, B, Mn, Se, Zn, Co, Cr e Cu também presentes no material, podem conferir funções terapêuticas e regenerativas a ele (DA COSTA E SILVA *et al.*, 2022).

Esses elementos presentes no *BG-Carb* apresentam, ainda, propriedades que podem aumentar a resistência mecânica do material, melhorar sua bioatividade, controlar sua taxa de degradação, fornecer ação antibacteriana, participar da angiogênese do tecido neoformado e modular a inflamação (HOPPE *et al.*, 2011; KARGOZAR *et al.*, 2018; LYSENKO *et al.*, 2015; NEŠČÁKOVÁ *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2013). A presença de carbono no material permite que a sua superfície aumente, diminuindo a densidade da estrutura do *scaffold*, favorecendo sua bioatividade (KALYANI; ANITHA; DARCHEN, 2013; ONNA; MINABERRY; JOBBAGY, 2015).

Um dos requisitos essenciais no desenvolvimento de biovidros é que haja uma interação bem-sucedida entre esse material e os tecidos receptores (HENCH; THOMPSON, 2010). No entanto, os vidros bioativos ainda são materiais caros devido às elevadas exigências de pureza dos reagentes e controle rigoroso dos processos de produção (SHIH; CHOU; CHIEN, 2012). Assim, a ideia de utilização do *BG-Carb* torna-se bastante interessante, uma vez que seu processo de produção tem custo inferior (DA COSTA e SILVA *et al.*, 2022). Ainda, sua riqueza de componentes

potencialmente osteoindutores e osteogênicos poderia possibilitar vantagens ao profissional e ao paciente, com um pós-operatório mais curto e eficiente em termos de neoformação óssea.

1.5 Justificativa

Diante do exposto, em que os defeitos ósseos são desafios na prática clínica dos cirurgiões-dentistas, bem como o hidrogel contendo AH e o *BG-Carb* apresentam elevado potencial para a regeneração óssea, a inexistência de estudos *in vivo* avaliando a eficiência da combinação desses dois materiais na neoformação óssea dos maxilares motiva a realização deste trabalho e faz com que ele seja inédito.

A hipótese do estudo é de que esse defeito ósseo criado possa ser regenerado de forma acelerada com a utilização da combinação desses materiais, ou seja, do hidrogel híbrido formado pela associação entre *BG-Carb* e *HyStem®-HP*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar a influência de um biomaterial constituído pela associação entre um hidrogel à base de AH (*HyStem®-HP*) com um biovidro (*BG-Carb*) incorporado a ele na regeneração óssea de um defeito ósseo em maxila de camundongo.

2.2 Objetivos específicos

a) Avaliar histologicamente o processo inflamatório induzido durante o reparo tecidual quando o defeito ósseo foi preenchido com *HyStem®-HP*, quando foi preenchido com *HyStem®-HP* associado ao *BG-Carb* e quando não recebeu nenhum material (controle negativo), após 7 e 21 dias.

b) Avaliar histologicamente a formação óssea e a quantidade de tecido de granulação/conjuntivo na região do defeito ósseo maxilar dos animais quando preenchido com *HyStem®-HP* associado ao *BG-Carb* e quando não recebeu nenhum material (controle negativo), após 7 e 21 dias.

c) Avaliar histologicamente a epitelização da mucosa sobre o sítio cirúrgico quando o defeito ósseo foi preenchido com *HyStem®-HP* e quando foi preenchido com *HyStem®-HP* associado ao *BG-Carb* e quando não recebeu nenhum material (controle negativo) após 7 e 21 dias.

3 MATERIAIS E MÉTODOS (EXPANDIDO)

3.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi submetida a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, a qual a aprovou sob o protocolo de número 42/2022 (ANEXO A).

3.2 Animais

Foi realizada uma estimativa por intervalo para o cálculo amostral (SAMPAIO *et al.*, 2003):

Uma estimativa por intervalo para a média, μ , de uma população normal, obtida através de uma amostra aleatória de tamanho n , ao nível de confiança $1-\alpha$, é dada por

$$IC[\mu](1-\alpha) : x \pm t(\alpha; n-1) \cdot s/\sqrt{n}$$

Onde: x é a estimativa por ponto, da média; s é a estimativa por ponto do desvio padrão; n é o tamanho da amostra; t é um valor tabelado obtido com $n-1$ graus de liberdade e α bilateral.

Dessa forma, utilizando os dados de média 79,096 e desvio-padrão 9,089 relativos à formação óssea (variável mais instável a ser avaliada) em defeitos ósseos alveolares (AMARAL *et al.* 2017), com $n = 5$, tem-se:

$$IC: 79,096 \pm 1,96 \cdot S/\sqrt{n}$$

$$IC: 79,096 \pm 1,96 (9,089)/\sqrt{5} = IC: 79,096 \pm 7,988$$

Portanto, o tamanho amostral: $(r) = (t.S/IC)^2$ será:

$$(r) = (2,132 \text{ (tabelado } n-1; \alpha 0,05) \cdot 9,089/7,988)^2$$

$$(r) = 5,88 \text{ ou } 6 \text{ camundongos por grupo}$$

Dessa forma, foram calculados 36 camundongos C57BL/6, com peso entre 15 e 25g, de ambos os sexos e idade de 5 semanas, que foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram distribuídos aleatoriamente segundo os grupos descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupos experimentais

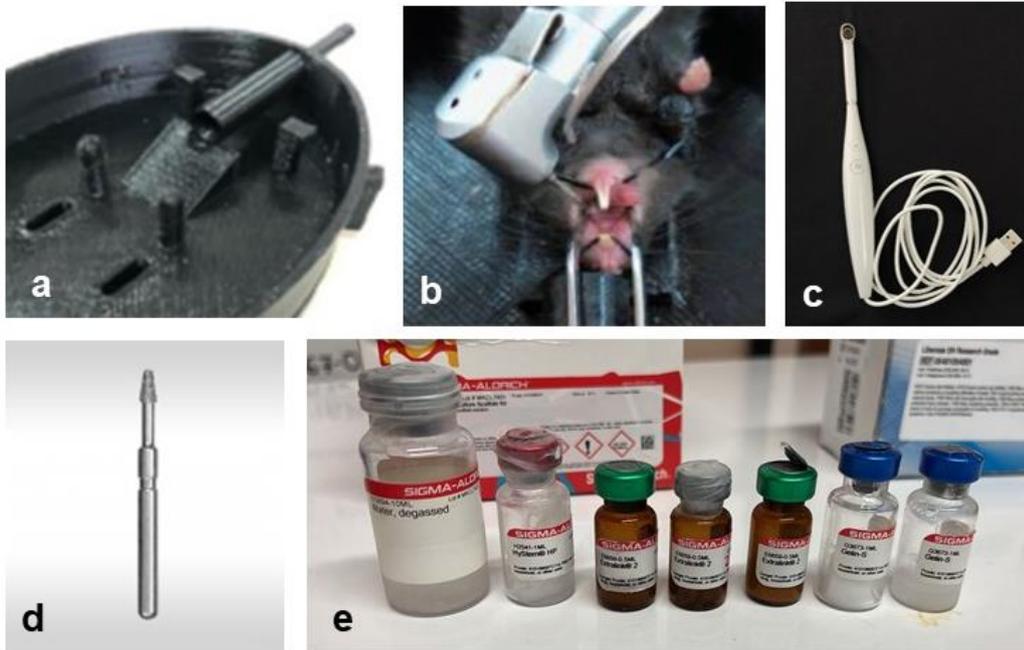
Grupos	Tempo	Réplicas calculadas	Réplicas analisadas
Controle negativo	7 dias	n = 6	n = 0
<i>HyStem</i> ®	7 dias	n = 6	n = 3
<i>HyStem</i> ® + <i>BG-Carb</i>	7 dias	n = 6	n = 3
Controle negativo	21 dias	n = 6	n = 2
<i>HyStem</i> ®	21 dias	n = 6	n = 3
<i>HyStem</i> ® + <i>BG-Carb</i>	21 dias	n = 6	n = 3

É digno de nota que a extensiva perda de animais no pós-operatório levou a uma divergência entre o número de réplicas calculadas e o número de réplicas analisadas, o que fez com que o estudo fosse tratado como preliminar.

3.3 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal (IP) de cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de ketamina (100 mg/kg) e adaptados em uma mesa cirúrgica desenvolvida em colaboração com o Ohlab (Associação Mineira de Reabilitação, Belo Horizonte, Brasil) (FIGURA 1a), baseada em publicações prévias (MARCHEZAN *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2022). A mesa cirúrgica, impressa tridimensionalmente (Impressora 3D Fortus 380 MC, Stratasys, Estados Unidos da América), foi utilizada para manter os animais posicionados com a cavidade oral aberta (FIGURA 1b), otimizando o acesso intrabucal aos primeiros molares superiores esquerdos dos camundongos. Além disso, com o objetivo de assegurar os procedimentos, uma câmera intraoral – de uso humano – com luz (FIGURA 1c), posicionada a aproximadamente 3 centímetros da cavidade oral do camundongo, foi utilizada para ampliar, em tempo real, a visualização dos operadores em um monitor de 15 polegadas.

Figura 1 – Materiais utilizados no procedimento experimental. Mesa cirúrgica (a). Imagem ilustrativa do animal posicionado na mesa cirúrgica com um contra-ângulo próximo à sua cavidade oral (b). Câmera intraoral de uso humano adaptada para magnificação da cirurgia no camundongo (c). Ponta diamantada tronco-cônica de topo plano KGS #2128 com 1 mm de ponta ativa (d). *HyStem®-HP* (Sigma-Aldrich) (e).

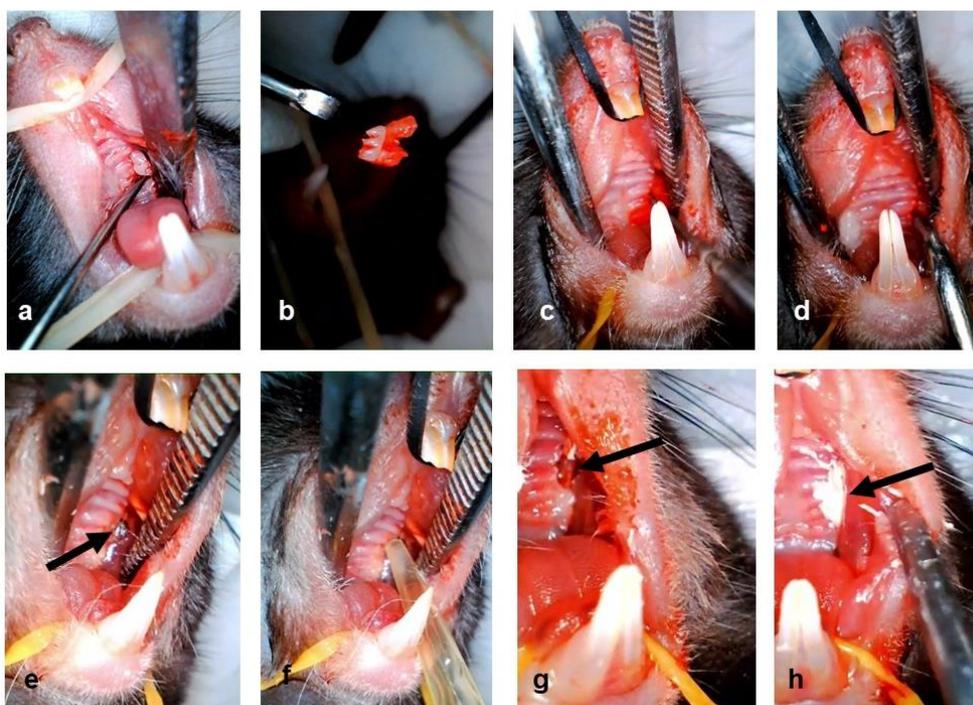


Fonte: Dos autores, 2023 (a, b, c, e). KG Soresen® (d).

Os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar superior esquerdo, em que se realizou a luxação do dente com a ponta de uma agulha hipodérmica 22G 1 x 1/2 (25 x 0,7 mm) (FIGURA 2a). Um defeito ósseo de quatro paredes foi, então, produzido com a remoção do septo alveolar e planificação da parede inferior do seio maxilar após o procedimento de extração de forma adaptada à literatura prévia (AMARAL *et al.*, 2017). Com o cuidado de preservar os tecidos moles, os defeitos foram criados na área dos alvéolos das raízes do primeiro molar superior esquerdo, com o auxílio do contra-ângulo (Kavo, Biberach an der Riß, Alemanha) e do micromotor elétrico LB100 (Beltec, São Paulo, Brasil) à 5.000 rotações por minuto acoplados a uma ponta diamantada tronco-cônica de topo plano KGS #2128 (KG Sorensen, Cotia, Brasil), de 1 mm de ponta ativa (FIGURA 1d) sob irrigação com soro fisiológico, o qual foi gotejado manualmente junto à ponta diamantada e removido com o auxílio de bolinhas de algodão estéril absorvente. Essa ponta diamantada foi inserida no alvéolo em posição paralela ao eixo central do dente, de modo que a sua ponta ativa penetrasse (tamanho correspondente 1 mm) tendo como limite a altura da

gengiva marginal livre, sem que ocorressem movimentos laterais (FIGURA 2c). Sua remoção acontecia seguindo a mesma trajetória, porém em sentido inverso. Em seguida, a ponta de uma sonda periodontal era inserida no defeito criado para inspecionar de modo tátil a qualidade do defeito realizado (FIGURA 2d).

Figura 2 – Sequência do procedimento experimental cirúrgico. Luxação do primeiro molar superior esquerdo do camundongo com o auxílio da ponta de uma agulha hipodérmica (a). Inspeção visual do primeiro molar superior esquerdo após exodontia (b). Confecção do defeito ósseo utilizando uma ponta diamantada KGS #2128 (c). Inspeção tátil do defeito ósseo com uma sonda periodontal (d). Defeito ósseo criado – indicado pela seta (e). Inserção do biomaterial com o auxílio de uma pipeta (f). Defeito ósseo preenchido com o biomaterial – indicado pela seta (g). Proteção do defeito ósseo e estabilização do biomaterial com o auxílio do cimento cirúrgico sem eugenol (h).



Fonte: Dos autores, 2023.

Para os animais que receberam os biomateriais, utilizando uma pipeta (FIGURA 2f), a cavidade foi preenchida com aproximadamente 2 μ L de *HyStem®-HP* (Sigma-Aldrich) (FIGURA 2e), manipulado de acordo com as orientações do fabricante, ou com a associação entre *HyStem®-HP* e *BG-Carb*, tendo este último sido gentilmente cedido pela química Rosângela Ferreira Da Costa e Silva (COSTA e SILVA et al., 2022). A associação entre o *HyStem®-HP* e o *BG-Carb* consistiu na

mistura manual desses itens preparada em placa de vidro estéril na proporção de 2:1, como realizado por Zhou *et al.* (2019) também com hidrogel e biovidro. Dessa forma, aproximadamente 10 µg de *BG-Carb* foi incorporado a 20 µL do hidrogel, com o auxílio da ponta de uma agulha hipodérmica 22G 1 x 1/2 (25 x 0,7 mm) estéril descartável. Em seguida, essa associação dos biomateriais foi pipetada e despejada sobre a placa de vidro diversas vezes de forma a tentar obter a maior homogeneidade possível do material.

O grupo controle negativo não recebeu qualquer biomaterial. Confirmada a integridade das paredes do defeito e a estabilidade dos materiais nos defeitos, o sítio operado foi coberto e protegido por cimento cirúrgico sem eugenol (Coe-Pak™ - GC Amercia Inc) (FIGURA 2h). Após o retorno da anestesia, os animais receberam uma dose de anti-inflamatório via oral, meloxicam (0,1mg/kg). Ainda, foram administradas a mesma dose 24h e 48h após a cirurgia.

Os animais foram mantidos em biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG com controle de temperatura e luminosidade. Os camundongos tinham acesso *ad libitum* à água e ração própria para animais de laboratório. Durante 72 horas no período pós-cirúrgico, foram ofertados água e alimento pastoso, preparado por meio da mistura simples de ração e água até a consistência adequada (1:1p/v), tendo sido renovados a cada 24 horas.

3.4 Eutanásia

Após 7 ou 21 dias, todos os animais foram submetidos à eutanásia por meio da técnica de sobredose anestésica, os quais receberam uma injeção intraperitoneal (IP) de cloridrato de xilazina (30 mg/kg) e cloridrato de ketamina (300 mg/Kg), de modo a não causar nenhum sofrimento a eles.

As maxilas dos camundongos foram dissecadas e conservadas em paraformaldeído (PFA) 4%, pH 7,0, por 24 horas.

3.5 Processamento histológico

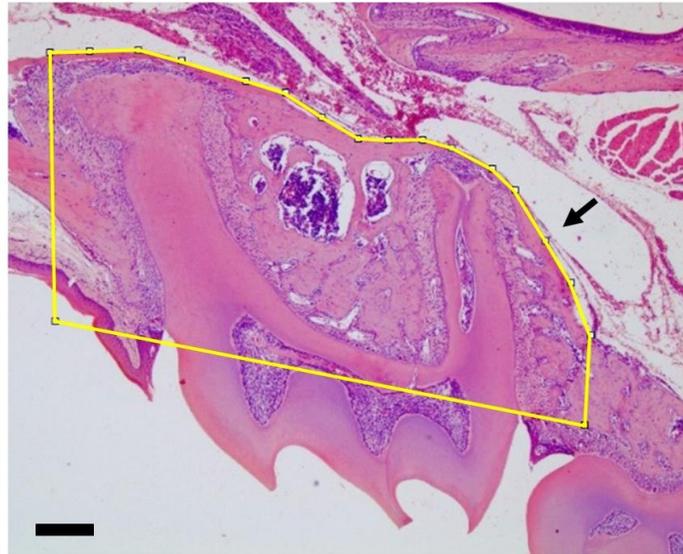
As maxilas foram submetidas a processamento histológico de rotina. As peças foram retiradas do PFA, lavadas em álcool à 70% e transferidas para a solução

tamponada de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) à 10%, pH 7,2, por cerca de 30 dias, sendo esse ácido substituído a cada 3 dias, para o processo de desmineralização. Após esse período, as peças foram desidratadas em séries crescentes de álcool, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em plano sagital (5 μ m) e corados com Hematoxilina e Eosina (HE – 1 e 3 minutos). As lâminas foram montadas com Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha) e fotografadas no microscópio Opticam® O600R (Opticam Microscopy Technology, São Paulo, Brasil), nos aumentos de 4x, 10x, 20 e 40x, para análises de morfometria do defeito, da deposição óssea, do tecido de granulação e análise de infiltrado inflamatório, vascularização (MUSSON *et al.*, 2019) e quantidade de tecido epitelial presente (espessura e área). Todas as imagens foram avaliadas por meio do programa ImageJ.

3.5.1 Padronização da região de análise histomorfométrica

Uma imagem representativa de um primeiro molar superior fixado em seu tecido periodontal de suporte foi utilizada como referência de área alveolar a ser avaliada nas amostras tratadas. No programa ImageJ, foi desenhada a área de interesse (ROI), chamada “macro” (FIGURA 3), a qual pôde ser transferida para todas as outras imagens de modo a padronizar uma mesma área e região para todas as amostras. Pequenos ajustes individualizados foram realizados posteriormente para cada amostra (aproximadamente 2,78% para mais ou para menos), quando necessário, uma vez que variações anatômicas entre os animais ou distorções no procedimento de inclusão das amostras poderiam estar presentes. Dentro dessa ROI, toda área representativa de tecido ósseo foi demarcada, contabilizada em micrômetro quadrado (μ m²) e registrada em planilhas do programa Microsoft Excel®.

Figura 3 – Fotomicrografia corada em hematoxilina e eosina (H&E) representativa de um primeiro molar superior esquerdo fixado em seu tecido periodontal de suporte. Sobre essa região qual foi desenhada a macro (indicada pela seta). Barra de magnificação = 200 μ m.



Fonte: Dos autores, 2023.

3.5.2 Avaliação histomorfométrica

Para contabilização da área de formação óssea e tecido conjuntivo/granulação, o aumento de 4x foi utilizado, uma vez que era possível visualizar todo o defeito ósseo correspondente ao primeiro molar superior esquerdo. Considerou-se como ela sendo a área total de tecido ósseo subtraída da ROI. Os valores foram registrados em planilhas do programa Microsoft Excel®.

O tecido epitelial foi mensurado em cada amostra dentro da ROI previamente estabelecida, sendo primeiramente tomadas medidas de espessura do epitélio. Para cada imagem foram realizadas dez medições ao longo do comprimento do tecido epitelial adjacente ao defeito ósseo. Posteriormente, a área de tecido epitelial foi demarcada e contabilizada. Considerou-se a extensão do epitélio limitada ao alvéolo do dente extraído. Todos os dados foram registrados em planilhas do programa Microsoft Excel®.

3.5.2.1 Sistema de pontuação para classificação da regeneração óssea

Utilizando um sistema de pontuação para classificação da regeneração óssea proposta por Musson *et al.* (2019), três amostras para cada grupo (*HyStem®-HP* e *HyStem®-HP + BG-Carb*) e cada tempo experimental (7 e 21 dias) foram avaliadas de acordo com escores para os seguintes parâmetros histológicos: porcentagem de defeito recoberto por osso, novo tipo ósseo formado, vascularização e inflamação. Um escore total de 0 – 10 (TABELA 2) foi atribuído a cada amostra ao final. Os escores de cada grupo, em cada tempo, foram comparados. Importante ressaltar que essa avaliação foi realizada de forma terceirizada por um avaliador cego (I.B.V.) que teve acesso ao banco de imagens com os aumentos de 4x, 10x e 20x.

Tabela 2 – Sistema de pontuação histológica para classificação da regeneração óssea.

Porcentagem de defeito recoberto por osso	Novo tipo ósseo formado (Natureza do tecido formado no defeito)	Vascularização (Presença de vascularização em meio ao osso neoformado)	Inflamação (Presença de células inflamatórias ao redor do osso neoformado)
Escore: 0 – 0% 1 – 1-24% 2 – 25-49% 3 – 50-74% 4 – 75-100%	Escore: 0 – Ausência de osso novo 1 – Predominantemente tecido 2 – Predominantemente lamelar remodelado	Escore: 0 – Sem evidências 1 – Poucos novos vasos (<10) 2 – Neovascularização abundante	Escore: 0 – Inflamação abundante 1 – Poucas células inflamatórias (10-50) 2 – Sem evidência de células inflamatórias presentes

Fonte: adaptado de Musson *et al.*, 2019.

3.6 Estatística

Todos os resultados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism Software (GraphPad Prism versão 9.5.0 para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os testes *t* de Student ou Mann-Whitney foram utilizados para identificar diferenças entre os tratamentos. Os dados foram analisados no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4 ARTIGO

(Formatado de acordo com as normas da revista “Biomedical Materials”)

EFEITOS DE UM BIOMATERIAL DE ORIGEM VEGETAL (*Equisetum hyemale*) ASSOCIADO A HIDROGEL DE ÁCIDO HIALURÔNICO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO EM MAXILA – UM ESTUDO PRELIMINAR

DANIEL MARQUES **LEÃO**¹, NATÁLIA APARECIDA **GOMES**¹, BEATRIZ GOMES DE **LUCARDIANS**¹, ISABELLA BITTENCOURT **DO VALLE**¹, JULIANO DOUGLAS SILVA **ALBERGARIA**², RODRIGO RICHARD **DA SILVEIRA**¹, FREDERICO SANTOS **LAGES**¹, IVANA MÁRCIA ALVES **DINIZ**¹

¹ Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais

² Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

O tecido ósseo é um tecido naturalmente capaz de se autorregenerar. Entretanto, defeitos ósseos de maiores dimensões têm tal processo dificultado e, em situações de difícil reparação espontânea necessitam de auxílio de enxertos ou materiais apropriados para dar suporte à neoformação óssea. Hidrogéis são excelentes materiais a serem utilizados para esse fim, uma vez que são capazes de mimetizar a maioria das propriedades dos tecidos conjuntivos. Recentemente, despertou-se um interesse significativo no desenvolvimento de hidrogéis híbridos que pudessem ser utilizados em várias aplicações biomédicas. Uma diversidade de partículas é combinada a esse hidrogéis resultando em melhores propriedades. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar a influência de um *scaffold* contendo ácido hialurônico associado a um biovidro experimental de origem vegetal - *Equisetum hyemale* (*BG-Carb*), na regeneração de um defeito ósseo em maxila de camundongos. Nesse estudo preliminar, camundongos C57BL/6 (n = 3 por grupo e tempo experimental) (CEUA #042/2022) tiveram seu primeiro molar superior esquerdo extraído. Em seguida, uma ponta diamantada KGS #2128 (KG Soresen®), acoplada a um motor em baixa rotação (5000 rpm) foi utilizada para a realização de um defeito com a remoção do septo alveolar. Parte dos animais tiveram os defeitos preenchidos exclusivamente por *HyStem®-HP* (hidrogel à base de ácido hialurônico) (2 µL), enquanto a outra parte recebeu *BG-Carb* (1 µg) disperso em *HyStem®-HP* (2 µL). Após a eutanásia, as amostras foram processadas para análise histológica de rotina para histomorfometria, graduação do processo inflamatório, vascularização e neoformação óssea após 7 e 21 dias pós-cirúrgicos. Os resultados foram analisados considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Aos 7 dias, o grupo que recebeu a associação *BG-Carb* e *HyStem®-HP* apresentou maiores valores

numéricos de neoformação óssea, todavia sem diferença significativa em relação ao uso exclusivo de *HyStem®-HP* (controle). Aos 21 dias, os grupos *HyStem®-HP* e *BG-Carb* associado a *HyStem®-HP* apresentaram resultados semelhantes tanto na quantificação de tecido ósseo como de conjuntivo. O escore total para graduação para cada material também foi semelhante aos 7 e 21 dias. Apesar disso, comparando-se cada material nos tempos 7 e 21 dias, o grupo *HyStem®-HP* apresentou aumento significativo de parâmetros qualitativos e quantitativos, demonstrando que a associação *HyStem®-HP* + *BG-Carb* apresentou neoformação óssea inicial mais robusta. A quantificação epitelial da região da cirurgia aos 21 dias em ambos os grupos revelou aumento significativo da espessura, continuidade e uniformidade do epitélio nos grupos tratados com o a associação dos biomateriais em relação ao controle. Nas condições experimentais deste estudo, tanto o uso do *HyStem®-HP* como do *HyStem®-HP* + *BG-Carb* podem promover neoformação óssea. No entanto, a associação do hidrogel à base de ácido hialurônico com o *BG-Carb* parece promover neoformação óssea inicial mais consistente e estimular a proliferação da mucosa adjacente à cirurgia com maior espessura do tecido epitelial.

Palavras-chave: materiais biocompatíveis; nanogéis; regeneração óssea

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido naturalmente capaz de se autorregenerar. Entretanto, no que diz respeito a defeitos ósseos maiores, o processo torna-se dificultado [1]. Por isso, alguns defeitos ósseos são considerados grandes desafios para a prática clínica médica ortopédica e odontológica/craniofacial [2,3,4]. Esses defeitos podem ser de origem congênita, infecciosa, traumática ou por consequência de ressecção tumoral e exodontia [4,5], os quais atingem os ossos maxilares podendo trazer prejuízos ao paciente.

No âmbito da Odontologia, a reconstrução óssea é importante para a reabilitação funcional e estética do paciente [6]. Para isso, uma técnica já bastante utilizada é a colocação de enxertos de biomateriais. Dentre os diversos biomateriais existentes, os hidrogéis são materiais bastante compatíveis, uma vez que são capazes de mimetizar a maioria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos tecidos [7,8] (FISHER *et al.*, 2010; SLAUGHTER *et al.*, 2009). O ácido hialurônico (AH), polissacarídeo natural presente na matriz extracelular do tecido conjuntivo [9] (MASON; CROSSMAN; SWEENEY, 1989), é também constituinte de hidrogéis, os quais são amplamente utilizados como *scaffolds* na engenharia tecidual.

Nos últimos anos, uma grande variedade de materiais foram encapsulados em meio a hidrogéis para que estes se tornassem compostos com propriedades

superiores e com a funcionalidade desejada [10], como os compostos de vidro bioativo que, além de apresentarem robustez, capacidade de preenchimento e bioatividade [11,12], possuem ainda uma estrutura porosa similar ao osso trabecular. Portanto, têm potencial em ajudar no processo de regeneração óssea, fornecendo às células um molde temporário e elementos essenciais para que cresçam em seu interior [13]. Nesse contexto, está o *BG-Carb*, um vidro bioativo vegetal com elevado teor de sílica, carbono e diversos oligoelementos, derivado da queima da planta vulgarmente chamada cavalinha (*Equisetum hyemale*) [14].

Vidros bioativos disponíveis comercialmente ainda são materiais de elevado custo [15]. No entanto, a utilização do *BG-Carb* é atraente uma vez que seu processo de produção tem custo inferior [14]. Além disso, sua riqueza de componentes potencialmente osteoindutores e osteogênicos, poderia possibilitar vantagens ao profissional e ao paciente, com um pós-operatório mais curto e eficiente em termos de neoformação óssea.

A inexistência de estudos com abordagem *in vivo* avaliando a eficiência da combinação do AH com o *BG-Carb* na neoformação óssea dos maxilares motiva a realização deste trabalho. Assim, este estudo buscou avaliar a influência de um *scaffold* constituído desses materiais na regeneração óssea de um defeito crítico criado na região maxilar de camundongos, em área remanescente dos alvéolos das raízes dos primeiros molares superiores após a sua extração. A hipótese do estudo é de que esse defeito ósseo criado possa ser regenerado de forma acelerada com a utilização desse nanocomposto.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram calculados 36 camundongos C57BL/6, com peso entre 15 e 25g, de ambos os sexos e idade de 5 semanas, que foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram distribuídos aleatoriamente segundo os grupos descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupos experimentais

Grupos	Tempo	Réplicas analisadas
<i>HyStem®-HP</i>	7 dias	n = 3
<i>HyStem®-HP + BG-Carb</i>	7 dias	n = 3
Controle negativo	21 dias	n = 2
<i>HyStem®-HP</i>	21 dias	n = 3
<i>HyStem®-HP +BG-Carb</i>	21 dias	n = 3

É digno de nota que a extensiva perda de animais no pós-operatório levou a uma divergência entre o número de réplicas calculadas e o número de réplicas analisadas, o que fez com que o estudo fosse tratado como preliminar.

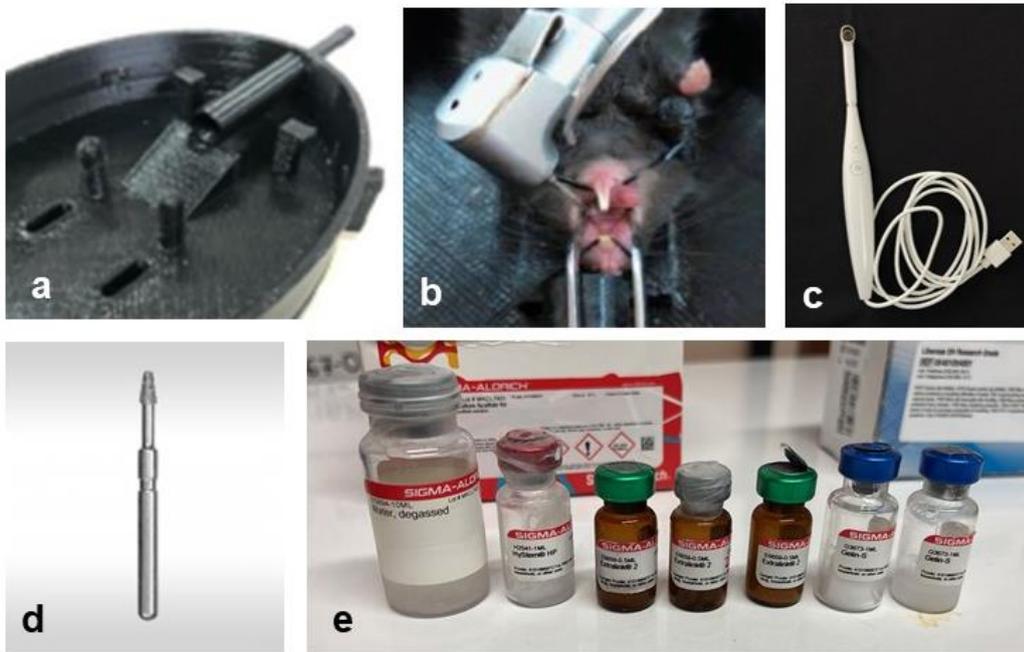
Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram pesados e anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de ketamina (100 mg/kg). Os animais foram, então, posicionados na mesa cirúrgica (FIGURA 1a e 1b) [16] e submetidos à exodontia do primeiro molar superior esquerdo. Com o objetivo de assegurar os procedimentos, uma câmera intraoral – de uso humano – com luz (FIGURA 1c), posicionada a aproximadamente 3 centímetros da cavidade oral do camundongo, foi utilizada para ampliar, em tempo real, a visualização dos operadores em um monitor de 15 polegadas.

O primeiro molar superior esquerdo do camundongo foi luxado utilizando-se a ponta de uma agulha hipodérmica 22G (FIGURA 2a). Um defeito ósseo de quatro paredes foi, então, produzido com a remoção do septo alveolar e planificação da parede inferior do seio maxilar após o procedimento de extração, de forma adaptada à literatura prévia [6]. Os defeitos foram criados na área dos alvéolos das raízes do primeiro molar, com o auxílio de um micromotor elétrico acoplado a um contra-ângulo com uma ponta diamantada tronco-cônica KGS#2128 (KG Soresen, Cotia, Brasil), de 1 mm de ponta ativa (FIGURA 1d), girando à 5.000 rpm, sob irrigação com soro fisiológico –, o qual foi gotejado manualmente junto à ponta diamantada e removido com o auxílio de bolinhas de algodão estéril absorvente. Essa ponta diamantada foi

inserida no alvéolo em posição paralela ao eixo central do dente, de modo que a sua ponta ativa penetrasse (tamanho correspondente a 1 mm) tendo como limite a altura da gengiva marginal livre, sem que ocorressem movimentos laterais (FIGURA 2c). Sua remoção acontecia seguindo a mesma trajetória, porém em sentido inverso. Em seguida, a ponta de uma sonda periodontal era inserida no defeito criado para inspecionar de modo tátil a qualidade do defeito realizado (FIGURA 2d).

Figura 1 – Materiais utilizados no procedimento experimental. Mesa cirúrgica personalizada (a). Imagem ilustrativa do animal posicionado na mesa cirúrgica com um contra-ângulo próximo à sua cavidade oral (b). Câmera intraoral de uso humano adaptada para magnificação da cirurgia no camundongo (c). Ponta diamantada tronco-cônica de topo plano KGS #2128 com 1 mm de ponta ativa (d). *HyStem®-HP* (Sigma-Aldrich) (e).



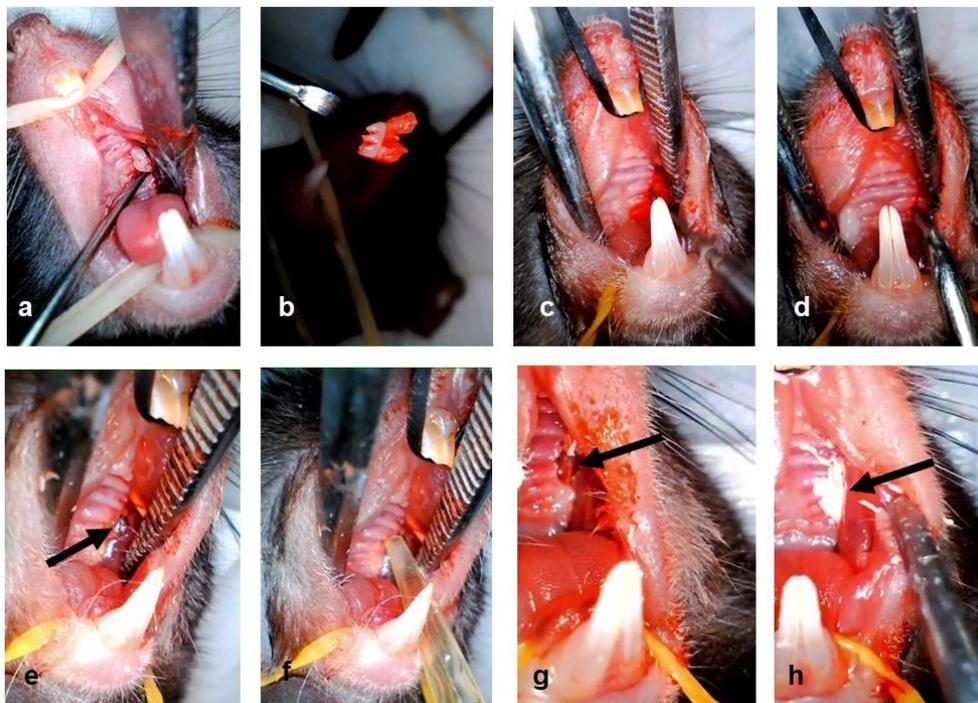
Fonte: Dos autores, 2023 (a, b, c, e). KG Soresen® (d).

Para os animais que receberam os biomateriais, a cavidade foi preenchida, utilizando uma pipeta (FIGURA 2f), com aproximadamente 20 μ L de ácido hialurônico (*HyStem®-HP*, Sigma-Aldrich) (FIGURA 1e), manipulado de acordo com as orientações do fabricante ou com a associação entre ácido hialurônico e o *BG-Carb*, tendo este último sido gentilmente cedido pela química Rosângela Maria Ferreira Da Costa e Silva [14]. A associação entre o *HyStem®-HP* e o *BG-Carb* consistia na mistura manual desses itens preparada em placa de vidro estéril. Dessa forma, aproximadamente 10 μ g de *BG-Carb* foi incorporado a 20 μ L do hidrogel, com o auxílio

de uma agulha hipodérmica 22G 1 x 1/2 estéril descartável. Em seguida, a associação foi pipetada e despejada sobre a placa diversas vezes de forma a obter a maior homogeneidade possível do material.

O grupo controle negativo não recebeu qualquer biomaterial. Confirmada a integridade das paredes do defeito e a estabilidade dos materiais nele inserido (FIGURA 2g), o sítio operado foi coberto e protegido por cimento cirúrgico sem eugenol (Coe-Pak™ - GC Amercia Inc) (FIGURA 2h). Após o retorno da anestesia, os animais receberam uma dose de anti-inflamatório via oral, meloxicam (0,1 mg/Kg). Ainda, foram administradas a mesma dose 24h e 48h após a cirurgia.

Figura 2 – Sequência do procedimento experimental cirúrgico. Luxação do primeiro molar superior esquerdo do camundongo com o auxílio da ponta de uma agulha hipodérmica (a). Primeiro molar superior esquerdo após exodontia (b). Confecção do defeito ósseo utilizando uma ponta diamantada KGS #2128 (c). Inspeção tátil do defeito ósseo com uma cureta Gracey 5-6 (d). Defeito ósseo criado – indicado pela seta (e). Inserção do biomaterial com o auxílio de uma pipeta (f). Defeito ósseo preenchido com o biomaterial – indicado pela seta (g). Proteção do defeito ósseo e estabilização do biomaterial com o auxílio do cimento cirúrgico sem eugenol (h).



Fonte: Dos autores, 2023.

Os animais foram mantidos em biotério do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG com controle de temperatura e luminosidade. Os camundongos tinham acesso *ad libitum* à água e ração própria para animais de laboratório. Durante 72 horas no período pós-cirúrgico, foram ofertados água e alimento pastoso, preparado por meio da mistura simples de ração e água até a consistência adequada (1:1 p/v), tendo sido renovados a cada 24 horas.

Eutanásia

Após 7 ou 21 dias, todos os animais foram submetidos à eutanásia. As maxilas dos camundongos foram dissecadas e conservadas em paraformaldeído (PFA) 4%, pH 7,0, por 24 horas.

Processamento histológico

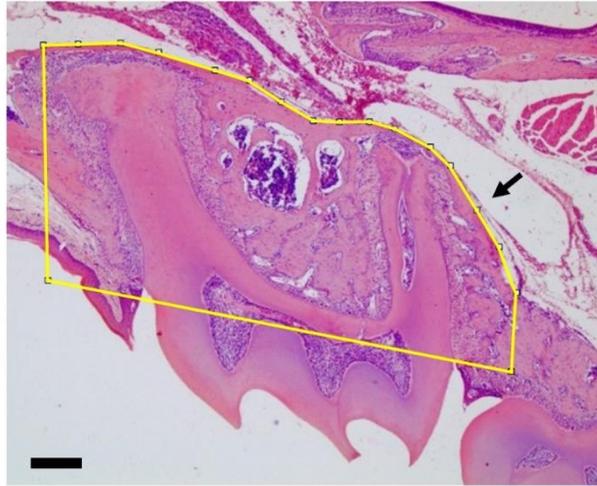
As peças foram retiradas do PFA, lavadas em álcool à 70% e transferidas para a solução tamponada de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) à 10%, pH 7,2, por cerca de 30 dias, sendo esse ácido substituído a cada 3 dias, para o processo de desmineralização. Em seguida, foram desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em plano sagital (5 μ m) e corados com Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram montadas e fotografadas para análises de morfometria do defeito, da deposição óssea, do tecido de granulação e análise de infiltrado inflamatório, vascularização [17] (MUSSON *et al.*, 2019) e quantidade de tecido epitelial presente (espessura e área). Todas as imagens foram avaliadas por meio do programa ImageJ.

Padronização da região de análise histomorfométrica

Uma imagem representativa de um alvéolo intacto contendo o primeiro molar superior esquerdo foi utilizada como referência de área alveolar a ser avaliada nas amostras tratadas. No programa ImageJ, foi desenhada a área de interesse (ROI), chamada “macro”, a qual pôde ser transferida para todas as outras imagens de modo a padronizar uma mesma área e região para todas as amostras. Dentro dessa ROI,

toda área representativa de tecido ósseo foi demarcada e contabilizada em micrômetro quadrado (μm^2) (FIGURA 3).

Figura 3 – Fotomicrografia corada em hematoxilina e eosina (H&E) representativa de um alvéolo intacto sobre a qual foi desenhada a macro (indicada pela seta). Barra de magnificação = 200 μm .



Fonte: Dos autores, 2023.

Avaliação histomorfométrica

Para contabilização da área de formação óssea e tecido conjuntivo/granulação, o aumento de 4x foi utilizado, uma vez que era possível visualizar todo o alvéolo correspondente ao primeiro molar superior. Considerou-se como ela sendo a área total de tecido ósseo subtraída da ROI.

O tecido epitelial foi mensurado em espessura e área, considerando-se a extensão do epitélio limitada ao defeito ósseo criado.

Sistema de pontuação para classificação da regeneração óssea

Três amostras para cada grupo (*HyStem®-HP* e *HyStem®-HP + BG-Carb*) e cada tempo experimental (7 e 21 dias) foram avaliadas de acordo com escores [17 adaptado] para os seguintes parâmetros histológicos: porcentagem de defeito recoberto por osso, novo tipo ósseo formado, vascularização e inflamação. Um escore

total de 0 - 10 (TABELA 2) foi atribuído a cada amostra ao final. Os escores de cada grupo, em cada tempo, foram comparados.

Tabela 2 – Sistema de pontuação histológica para classificação da regeneração óssea.

Porcentagem de defeito recoberto por osso	Novo tipo ósseo formado (Natureza do tecido formado no defeito)	Vascularização (Presença de vascularização em meio ao osso neoformado)	Inflamação (Presença de células inflamatórias ao redor do osso neoformado)
Escore: 0 – 0% 1 – 1-24% 2 – 25-49% 3 – 50-74% 4 – 75-100%	Escore: 0 – Ausência de osso novo 1 – Predominantemente tecido 2 – Predominantemente lamelar remodelado	Escore: 0 – Sem evidências 1 – Poucos novos vasos (<10) 2 – Neovascularização abundante	Escore: 0 – Inflamação abundante 1 – Poucas células inflamatórias (10-50) 2 – Sem evidência de células inflamatórias presentes

Fonte: adaptado de Musson *et al*, 2019.

Estatística

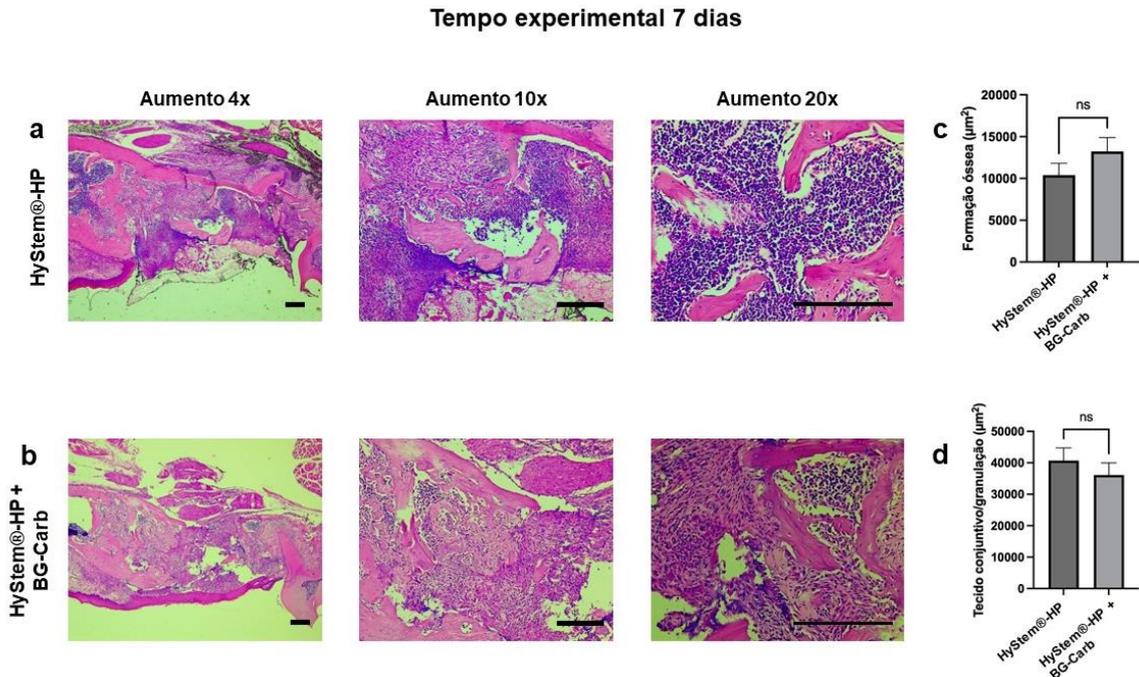
Todos os resultados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism Software (GraphPad Prism versão 9.5.0 para Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os testes t de Student ou Mann-Whitney foram utilizados para identificar diferenças entre os tratamentos. Os dados foram analisados no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A quantificação da formação óssea para cada um dos tratamentos realizados pôde ser visualizada aos 7 dias (FIGURA 4) e aos 21 dias (FIGURA 5). Apesar de numericamente aumentada para o grupo *HyStem®-HP + BG-Carb* aos 7 dias, a quantificação óssea não apresentou diferença estatística significativa quando comparada ao grupo *HyStem®-HP* ($p = 0,057$). Aos 21 dias, a quantificação óssea em ambos os grupos com biomaterial foi similar ($p = 0,660$). Ressalta-se que significativa neoformação óssea foi observada no intervalo entre 7 e 21 dias para o grupo tratado com *HyStem®-HP* ($p < 0,0001$), indicando que esse biomaterial levou mais tempo para atingir os níveis de neoformação óssea do nanocomposto. Aos 21 dias, ao se comparar os grupos tratados *HyStem®-HP* e *HyStem®-HP + BG-Carb* com o controle negativo em que apenas o defeito ósseo foi realizado, também não

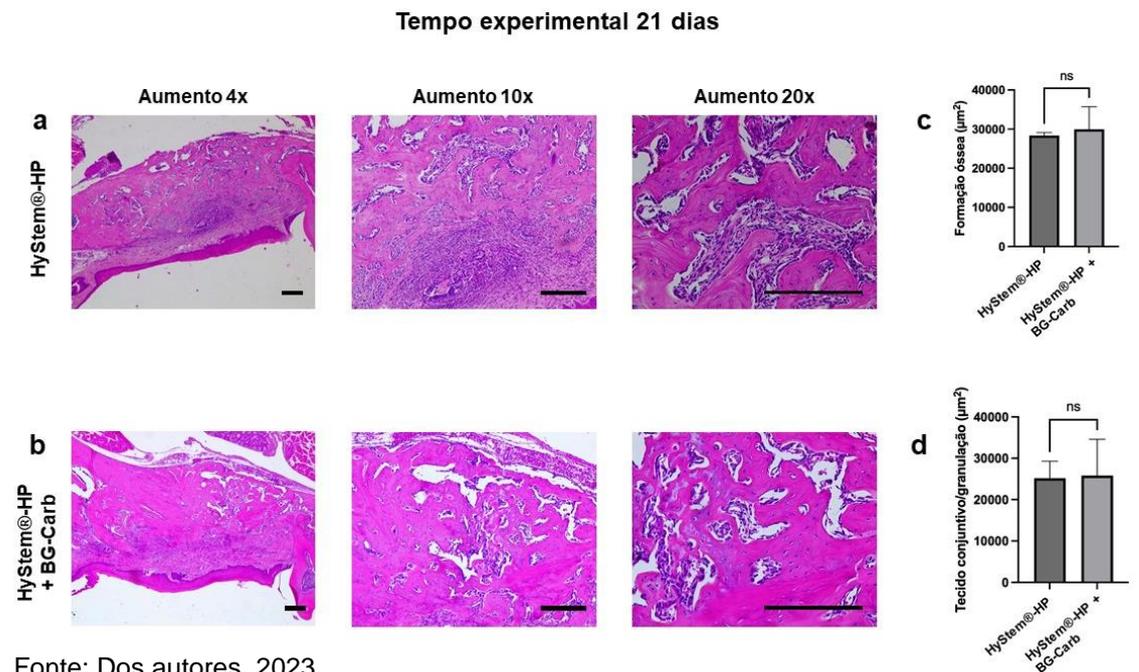
houve diferença estatística em relação à formação óssea ($p = 0,886$ e $p = 0,669$, respectivamente) (FIGURA 7).

Figura 4 – Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina (H&E) do sítio cirúrgico dos grupos no 7º dia pós-cirurgia. *HyStem®-HP* (a) e *HyStem®-HP + BG-Carb* (b). Gráficos de barra mostrando a média \pm erro padrão, sendo ns = não significativo. Formação óssea (μm^2) (c) e Tecido conjuntivo/granulação (μm^2) (d). Barra de magnificação = 200 μm .



Fonte: Dos autores, 2023.

Figura 5 – Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina (H&E) do sítio cirúrgico dos grupos no 21º dia pós-cirurgia. *HyStem®-HP* (a) e *HyStem®-HP + BG-Carb* (b). Gráficos de barra mostrando a média \pm erro padrão, sendo ns = não significativo. Formação óssea (μm^2) (c) e Tecido conjuntivo/granulação (μm^2) (d). Barra de magnificação = 200 μm .



Fonte: Dos autores, 2023.

Com relação à análise de tecido intertrabecular, não houve diferença estatística na quantificação de tecido conjuntivo/granulação aos 7 dias ($p = 0,190$) (FIGURA 4d) ou 21 dias ($p = 0,914$) (FIGURA 5d) entre os grupos tratados com biomateriais. No entanto, para o grupo que não recebeu nenhum tratamento (controle negativo), a quantidade de tecido mole/granulação foi estatisticamente maior em relação a ambos os grupos *HyStem®-HP* ($p = 0,009$) e *HyStem®-HP + BG-Carb* ($p = 0,008$) (FIGURA 7).

Figura 6 - Fotomicrografias coradas em hematoxilina e eosina (H&E) do sítio cirúrgico dos grupos no 21º dia pós-cirurgia – epitélio. *HyStem®-HP* (a) e *HyStem®-HP + BG-Carb* (b). Gráficos de barra mostrando a média \pm erro padrão, sendo ns = não significativo; **** = estatisticamente significativo com $p < 0,05$. Espessura epitelial (μm) (c) e Área epitelial (μm^2) (d). Barra de magnificação = 200 μm .

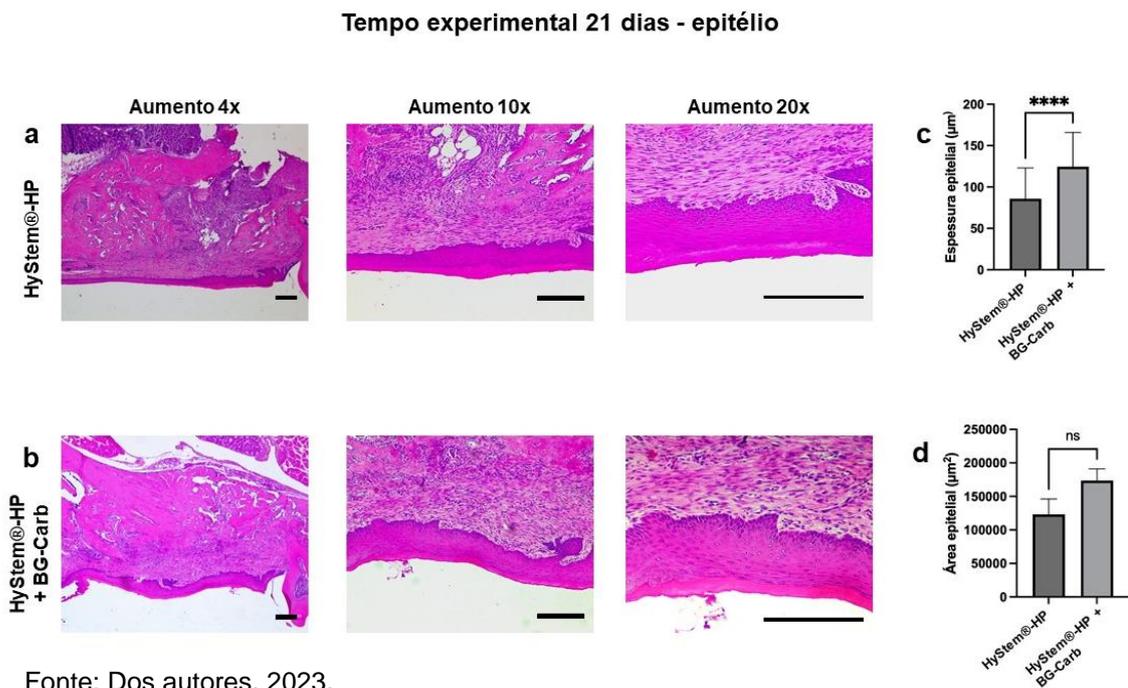
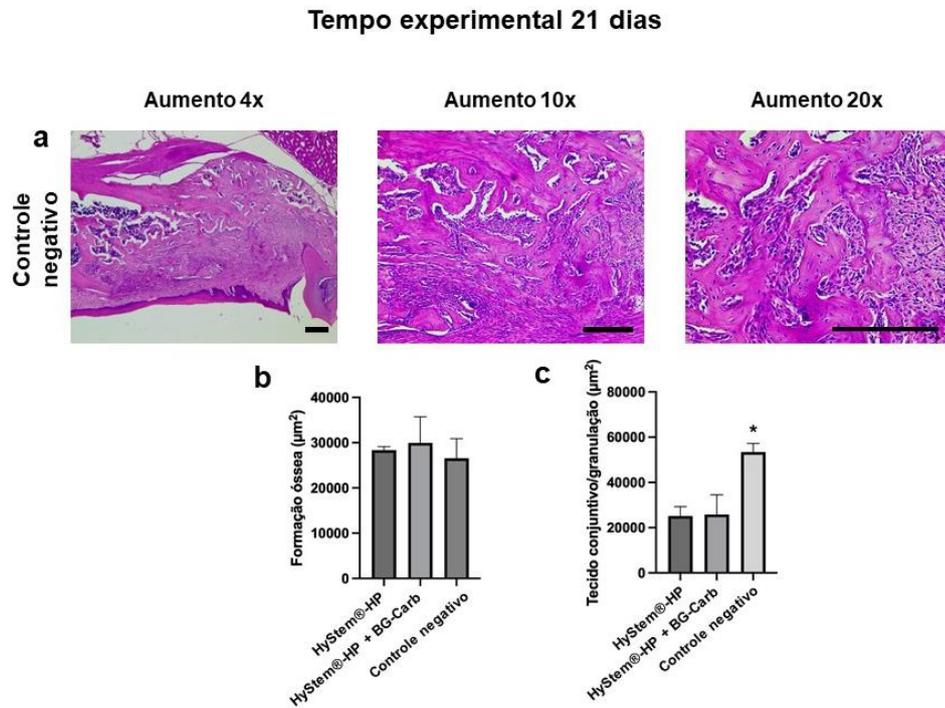


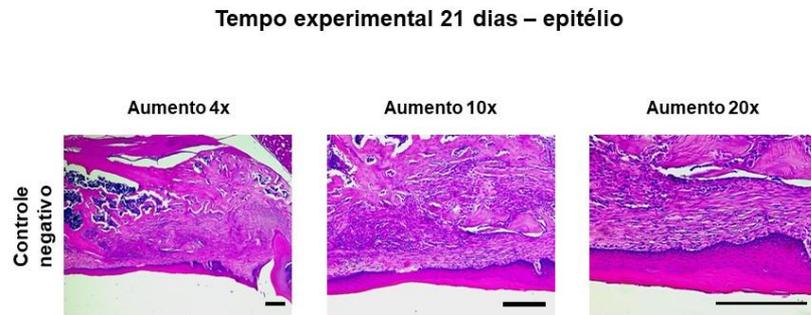
Figura 7 – Fotoicrografias coradas em hematoxilina e eosina (H&E) do sítio cirúrgico dos grupos no 21^o dia pós-cirurgia. Controle negativo (a). Gráficos de barra mostrando a média \pm erro padrão, sendo * = $p < 0,05$. Formação óssea (μm^2) (b) e Tecido conjuntivo/granulação (c). Barra de magnificação = 200 μm



Fonte: Dos autores, 2023.

Ao se avaliar o componente epitelial dos tratamentos aos 21 dias, observou-se maior espessura nos grupos tratados com *HyStem®-HP + BG-Carb* em comparação ao *HyStem®-HP* ($p < 0,0001$). Embora tenha sido observado maior valor numérico para a área epitelial no grupo *HyStem®-HP + BG-Carb*, essa diferença não foi estatisticamente significativa em relação ao ácido hialurônico ($p = 0,135$) (FIGURA 6).

Figura 8 – FotoMicrografias coradas em hematoxilina e eosina (H&E) do sítio cirúrgico do grupo no 21º dia pós-cirurgia. Controle negativo. Barra de magnificação = 200 µm



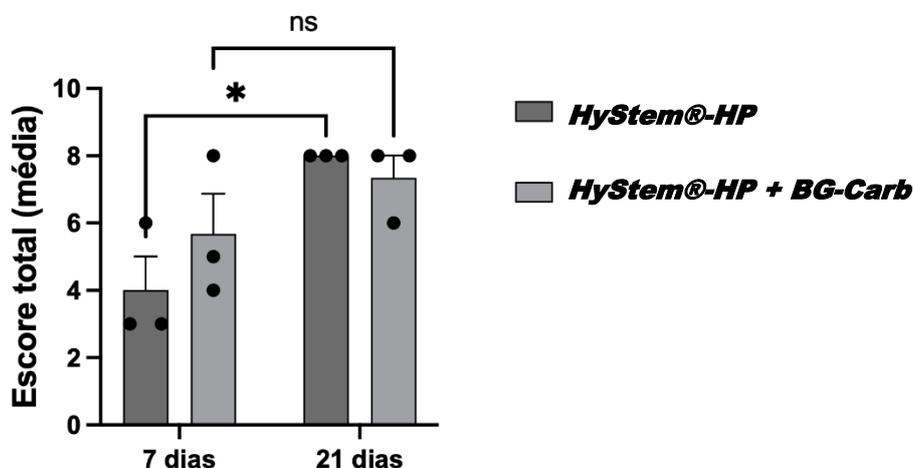
Fonte: Dos autores, 2023.

Tabela 3– Pontuação histológica para classificação da regeneração óssea

Grupos	Porcentagem de defeito recoberto por osso	Novo tipo ósseo formado (Natureza do tecido formado no defeito)	Vascularização (Presença de vascularização em meio ao osso neoformado)	Inflamação (Presença de células inflamatórias ao redor do osso neoformado)	Escore total (0-10)
	Escore: 0 – 0% 1 – 1-24% 2 – 25-49% 3 – 50-74% 4 – 75-100%	Escore: 0 – Ausência de osso novo 1 – Predominantemente tecido 2 – Predominantemente lamelar remodelado	Escore: 0 – Sem evidências 1 – Poucos novos vasos (<10) 2 – Neovascularização abundante	Escore: 0 – Inflamação abundante 1 – Poucas células inflamatórias (10-50) 2 – Sem evidência de células inflamatórias presentes	
T1_G1_A1	1	1	1	0	3
T1_G1_A2	2	2	2	0	6
T1_G1_A3	1	1	1	0	3
T1_G2_A1	2	1	1	0	4
T1_G2_A2	3	2	2	1	8
T1_G2_A3	2	1	2	0	5
T2_G1_A1	4	2	2	0	8
T2_G1_A2	4	2	2	0	8
T2_G1_A3	4	2	2	0	8
T2_G2_A1	4	2	2	0	8
T2_G2_A2	4	2	2	0	8
T2_G2_A3	3	1	1	1	6

Fonte: Dos autores, 2023.

Gráfico1 – Escore total (média) de pontuação histológica para classificação da cicatrização óssea



Fonte: Dos autores, 2023.

No sistema de pontuação histológica (TABELA 2) observou-se um aumento estatisticamente significativo de escore histológico total do grupo *HyStem®-HP* comparando-se o tempo 7 dias e o tempo 21 dias ($p = 0,044$), com aumento da neoformação óssea nesse intervalo. Ainda se comparando os dois tempos experimentais, não houve diferença estatística para os grupos tratados com *HyStem®-HP + BG-Carb* $p = 0,369$) (GRÁFICO 1). Dentro do mesmo tempo experimental, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com biomateriais quanto aos parâmetros histológicos estudados (GRÁFICO 1). A análise qualitativa histológica confirmou os achados quantitativos.

DISCUSSÃO

Considerando-se a possibilidade de novas abordagens terapêuticas para aprimoramento dos resultados de neoformação óssea, os biomateriais naturais se destacam por possuírem uma capacidade ímpar de facilitar os processos celulares, isto é, adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, indicando o seu elevado potencial para utilização na engenharia tecidual [18]. Com isso, materiais que apresentem boa biodegradabilidade, bom custo-benefício, biocompatibilidade e sejam biogênicos têm sido alvo de pesquisas [19].

Desde que a Organização das Nações Unidas determinou diversas metas para o milênio, dentre elas, aquelas que dizem respeito ao meio ambiente e com a

necessidade de produção responsável e ações contra a mudança climática global, e considerando ainda a preocupação com a redução no desperdício de recursos naturais, a busca por tecnologias limpas tem se tornado frequente [20]. Nesse contexto, podem-se citar os *scaffolds* vegetais, que se destacam, uma vez que a maioria dos *scaffolds* utilizados na engenharia tecidual é sintético ou derivado de animais, o que faz com que sejam dispendiosos e gerem grande impacto ambiental [21]. No entanto, uma limitação importante a se citar a respeito dos *scaffolds* vegetais é a sua deficiência nas propriedades mecânicas [22]. Ainda que o objetivo deste trabalho não tenha sido avaliar a resistência mecânica do *HyStem®-HP* associado ao *BG-Carb* é possível hipotetizar que o composto melhora a resistência mecânica da base de ácido hialurônico – *HyStem®-HP* sozinho. Esse hidrogel consegue estabelecer interações e ligações químicas com a água, mimetizando a maioria das propriedades físicas, químicas e biológicas dos tecidos [7,8,23], e assim como o *BG-Carb*, possui a mesma composição inorgânica dos fluidos corporais [14].

O potencial osteogênico do *BG-Carb* foi testado *in vitro* [14]. Esses autores observaram que esse material promoveu a proliferação celular e a deposição de cálcio nas culturas de células pré-osteoblásticas, com a formação de uma camada superficial de hidroxiapatita, corroborando com estudos prévios sobre biovidros [24,25].

Até o presente momento, após ampla pesquisa na literatura, constatou-se não haver estudos que avaliem o efeito *in vivo* do *BG-Carb*, destacando-se ainda a sua aplicação direta em defeitos ósseos intrabucais. Os resultados do presente estudo mostram que a associação *HyStem®-HP* + *BG-Carb* apresentou maiores valores numéricos de neoformação óssea, aos 7 dias, ainda que sem diferença significativa em relação ao uso exclusivo de *HyStem®-HP*. Qualitativamente, segundo o escore total aos 7 dias, esses achados se confirmaram.

Aos 21 dias ambos os biomateriais atingiram resultados semelhantes de formação de tecido ósseo e tecido conjuntivo. Assim também foi observado para o escore total de cada material nesse último tempo experimental. No entanto, o grupo tratado com *HyStem®-HP* apresentou aumento significativo no escore total de parâmetros aos 7 e 21 dias. Isso também se deu na análise quantitativa de osso. Essa diferença é sugestiva de que o biomaterial sozinho, sem o *BG-Carb*, teve a neoformação óssea impulsionada apenas nas últimas semanas de análise. Inversamente, sugere-se que o *BG-Carb* associado ao *HyStem®-HP* promoveu uma formação óssea inicial mais robusta que continuou até o último tempo experimental

mesmo utilizando metade da quantidade de ácido hialurônico do grupo controle. Um efeito muito importante dos vidros bioativos, descobertos no início deste século é o controle que esses materiais exercem sobre a expressão gênica de osteoblastos [26], explicando a capacidade que os biovidros têm na indução da neoformação óssea. Apesar de serem resultados ainda preliminares, o uso do hidrogel contendo ácido hialurônico e do *BG-Carb* parece ser promissor na indução inicial de tecido mineralizado em lojas cirúrgicas produzidas artificialmente na cavidade bucal.

Em modelos de estudo murino, o reparo tecidual ósseo em camundongos resulta na formação de um calo cartilaginoso 7 dias após a lesão, sendo, então, convertido em osso 14 dias depois [27]. Aos 21 dias, esses animais já passaram por um reparo ósseo alveolar completo [28]. Por outro lado, o tempo de regeneração óssea em ratos utilizando biovidro como material de enxertia foi avaliado e observou-se que o tempo de regeneração óssea foi superior ao tempo em que nenhum material foi utilizado [29]. Isso se justificaria pelo fato de *scaffolds* apresentarem uma dissolução lenta, impedindo o fechamento completo do defeito ósseo no tempo necessário para que isso ocorra na ausência de materiais. Corroborando com os achados desses últimos autores, nenhuma das amostras analisadas neste trabalho apresentou o reparo completo aos 21 dias, como mostra a tabela 2, em que não atingiram o escore máximo de neoformação óssea. Apesar disso, ambos os biomateriais levaram a menor formação de tecido conjuntivo/granulação quando comparados a não-utilização de quaisquer biomateriais.

O modelo animal do presente trabalho foi adaptado de Amaral *et al.* (2017), que utilizando um modelo de defeito ósseo alveolar de 4 paredes em ratos – encontraram que a droga sintética osteoindutora ranelato de estrôncio tem influência positiva no reparo de defeitos ósseos intrabucais, sendo essa substância capaz de acelerar o processo de neoformação e maturação óssea em ratos. Esses achados prévios e nossos dados preliminares confirmam as vantagens da utilização de biomateriais osteoindutores, destacando-se o benefício de se ser de origem natural/vegetal, em defeitos ósseos que demandem maiores volumes de regeneração óssea. Além disso, ambos biomateriais testados no presente estudo levaram a menor formação de tecido conjuntivo/granulação quando comparados a não-utilização de biomateriais. Esses dados podem sugerir um caminho importante para novas pesquisas

O potencial regenerador do AH no tecido epitelial oral foi comprovado, em que se observou a cicatrização do tecido periodontal, com formação de tecido de

granulação, reepitelização e angiogênese [30]. Um outro estudo [31], apresentando resultados semelhantes, foi conduzido tratando feridas em mucosa oral de coelhos com vidros bioativos. Observou-se, então, o fechamento completo da ferida com a ausência de sinais de inflamação em uma semana de pós-operatório. Esses resultados corroboram com os achados histológicos e imuno-histoquímicos dos autores, com um aumento na atividade celular e na vascularização, enquanto o grupo não tratado apresentou ferida aberta com infiltrado supurativo e vascularização diminuída. Ainda, tais resultados levaram à importante conclusão de que o uso do biovidro como *scaffold* natural em um ambiente úmido e com micro-organismos presentes, como é a cavidade oral, é bastante favorável. Neste estudo, observaram na quantificação epitelial da mucosa que recobria o sítio cirúrgico aos 21, a associação *HyStem®-HP + BG-Carb* parece estimular a proliferação da mucosa adjacente à cirurgia com maior espessura epitelial e um selamento mais uniforme da região operada. Esse pode ser um ponto importante no sucesso da enxertia de forma a prevenir ulcerações e garantir a estabilidade de tratamentos pré-protéticos e protéticos subsequentes. Ainda, esses resultados apontam uma direção de pesquisas futuras, em que esse material poderá ser testado para reparo tecidual do epitélio oral.

O modelo de alvéolo pós-exodontia tem sido bastante utilizado em pesquisas para avaliação de fatores que podem influenciar no processo de reparo ósseo [32,33]. Entretanto, ainda que represente um modelo viável para análise da regeneração óssea, essas cavidades geradas pela exodontia simples dos molares dos animais apresentam limitações, como variação anatômica do tamanho do alvéolo, presença de septos inter-radiculares e resíduos remanescentes do ligamento periodontal, os quais podem interferir na interpretação dos resultados. Modelos de defeitos ósseos mais amplos e padronizados têm sido tradicionalmente criados em tíbias, fêmures e calotas cranianas de animais de laboratório [34,35]. No entanto, para pesquisas odontológicas, o ideal seria a utilização de um modelo de defeito ósseo com características semelhantes ao reparo ósseo do complexo bucomaxilofacial, uma vez que a cavidade oral representa um desafio aos processos de reparo ósseo, diferentemente de outras localidades, considerando sua microbiota residente e seus tecidos estão constantemente expostos a forças mecânicas multidirecionais e diferenças de temperatura [28,36].

Assim, como mencionado anteriormente, este trabalho utilizou, de forma adaptada, um modelo de defeito ósseo em alvéolo dentário de ratos padronizado por

Amaral *et al.* (2017), de modo que os benefícios das técnicas de padronização animal em defeitos extraorais se aproximassem dos desafios encontrados no meio bucal, mais especificamente nos ossos maxilares. No entanto, algumas dificuldades foram encontradas, uma vez que esse modelo adaptado ainda não foi validado. Camundongos são animais bastante pequenos e frágeis, o que fez com que o processo cirúrgico fosse delicado. A ponta diamantada foi penetrada para confecção do defeito ósseo em aproximadamente 1 mm, a medida de sua ponta ativa. Porém, a fragilidade da parede inferior do seio maxilar e seu rompimento levou à perda prematura de muitos animais tratados, o que fez com que o número amostral para cada grupo se reduzisse. Adicionalmente, o rompimento do assoalho do seio maxilar comprometeu diretamente as análises histológicas posteriores de outros animais que sobreviveram ao procedimento. Talvez, devido à pequena variação anatômica individual da profundidade do alvéolo de cada animal tenha ocorrido perfuração desse assoalho ou até a própria luxação do dente levou à descontinuidade de sua integridade. Ainda, mesmo com a utilização da câmera intraoral para ampliar a visualização dos operadores, nem sempre foi possível garantir, por meio visual, a destruição completa dos septos inter-radulares ou a remoção de eventual raiz fraturada remanescente no alvéolo. Dessa forma, o procedimento de criação da loja cirúrgica com o defeito ósseo no modelo murino se revelou de alto grau de dificuldade.

Essas intercorrências e limitações levaram à perda de amostras após todo o processo experimental, sendo em sua maioria detectadas após a análise das lâminas histológicas. Ou, ainda, possivelmente, devido ao estresse do procedimento, houve uma perda precoce expressiva de animais no período pós-cirurgia, mesmo com sangramento intra/pós-operatório controlado e medicações administradas conforme protocolo aprovado pela CEUA. Assim, esses diversos fatores, certamente, contribuíram para a redução do número de amostras.

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais deste estudo, tanto o uso do biomaterial *HyStem®-HP* + BG-Carb como do *HyStem®-HP* indicam a possibilidade de promover neoformação óssea. No entanto, a associação *HyStem®-HP* + BG-Carb parece promover neoformação óssea inicial mais consistente e estimular a proliferação da

mucosa adjacente à cirurgia com maior espessura epitelial, levando possivelmente a um selamento epitelial uniforme da região.

ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi submetida a Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA) da UFMG, a qual a aprovou sob o protocolo de número 42/2022.

REFERÊNCIAS

- [1] Tanaka M *et al* 2020 Applications of Carbon Nanotubes in Bone Regenerative Medicine *Nanomaterials* **10** 659
- [2] Meinel L *et al* 2005 Silk implants for the healing of critical size bone defects *Bone* **37** 688-398
- [3] Taga MLL 2005 Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia. (*Cavia porcellus*) Dissertação Faculdade de Odontologia de Bauru Universidade de São Paulo
- [4] Tollemar V *et al* 2016 Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine *Genes & Diseases* **3** 56–71
- [5] Spicer PP *et al* 2012 Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect *Nature Protocols* **7** 1918-1929
- [6] Amaral SA *et al* 2017 Evaluation of strontium ranelate in the repair of standardized intrabuccal bone defects in a rat model *Int J Clin Exp Med* **10** 7 10616a–10624
- [7] Fisher OZ *et al* 2010 Bioinspired materials for controlling stem cell fate *Accounts of Chemical Research* **43** 419–428
- [8] Slaughter BV *et al* 2009 Hydrogels in regenerative medicine *Advanced Materials* **21** 3307–3329
- [9] Mason RM *et al* 1989 The biology of hyaluronan New York: Wiley

- [10] Gaharwar AK *et al* 2014 Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications. *Biotechnology and Bioengineering* **111** 441-453
- [11] Aznar E 2016 Gated materials for on-command release of guest molecules. *Chemical Reviews* **116** 561–718
- [12] Giménez C *et al* 2015 Gated mesoporous silica nanoparticles for the controlled delivery of drugs in cancer cells *Langmuir* **31** 3753–62
- [13] Nommeots-Nomm A 2017 Highly degradable porous melt-derived bioactive glass foam scaffolds for bone regeneration *Acta Biomater* **57** 449–461
- [14] Da Costa E Silva RMF *et al* 2022 Equisetum hyemale-derived unprecedented bioactive composite for hard and soft tissues engineering *Sci Rep* **12**
- [15] Shih SJ *et al* 2012 One-step synthesis of bioactive glass by spray pyrolysis. *Journal of Nanoparticle Research* **14**
- [16] Gomes NA *et al* 2022 Nestin and NG2 transgenes reveal two populations of perivascular cells stimulated by photobiomodulation *J Cell Physiol* **237** 2198-2210
- [17] Musson DS *et al* 2019 Bovine bone particulates containing bone anabolic factors as a potential xenogenic bone graft substitute *J Orthop Surg Res* **14** 60
- [18] Bao HA *et al* 2013 Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*
- [19] Yousaf SS *et al* 2020 Importance of biomaterials in biomedical engineering. *Advances in Medical and Surgical Engineering* 149–176
- [20] Programa Das Nações Unidas Para O Desenvolvimento 2003 As metas de desenvolvimento do milênio
- [21] Andonegi M *et al* 2020 Green Approach towards Native Collagen Scaffolds: Environmental and Physicochemical Assessment *Polymers* **12** 1597
- [22] Seah J *et al* 2021 Scaffolds for the manufacture of cultured meat *Critical Reviews in Biotechnology* **42** 1-13
- [23] Graça MFP *et al* 2020 Hyaluronic acid - based wound dressings: a review *Carbohydrate Polymers* **241** 2020.

- [24] Imani Fooladi AA *et al* 2013 Sol–gel-derived bioactive glass containing SiO₂–MgO–CaO–P₂O₅ as an antibacterial scaffold *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **101** 1582-1587
- [25] Johari B *et al* 2016 Osteoblast–seeded bioglass/gelatin nanocomposite: a promising bone substitute in critical-size calvarial defect repair in rat *The International journal of artificial organs* **39** 524-533
- [26] Xynos ID *et al* 2001 Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution *Journal of Biomedical Materials Research* **55** 151–157
- [27] Serowoky MA *et al* 2022 A murine model of large-scale bone regeneration reveals a selective requirement for Sonic Hedgehog *npj Regen Med* **7**
- [28] Pan J *et al* 2020 Interspecies comparison of alveolar bone biology: Tooth extraction socket healing in mini pigs and mice *J Periodontol* **91** 1653–1663
- [29] Moura C *et al* 2016 Análise do tempo de regeneração óssea utilizando biovidro em ratos *Revista Odontológica de Araçatuba* **37** 39-45
- [30] Prato GPP *et al* 2000 Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: a case report *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **20**
- [31] Elshazly N *et al* 2020 Efficacy of bioactive glass nanofibers tested for oral mucosal regeneration in rabbits with induced diabetes *Materials* **13** 2603
- [32] Kanyama M *et al* 2003 Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction *Archives of Oral Biology* **48** 723–730
- [33] Teófilo JM *et al* 2004 Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass *Arch Oral Biol* **49** 755–62
- [34] Lee JA *et al* 2010 Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects *J Periodontal Implant Sci* **40** 211–9
- [35] Puricelli E *et al* 2010 Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft *Head Face Med* **6**
- [36] Kilian M *et al* 2016 The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals *Br Dent J* **221** 657–666

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos biológicos no que diz respeito à regeneração óssea possivelmente proporcionada pelo hidrogel à base de ácido hialurônico *HyStem®-HP*, bem como da associação entre *BG-Carb* e *HyStem®-HP*, sem que fossem avaliados os efeitos físico-químicos no processo biológico. Além disso, não foi enfoque avaliar a interação química ocorrida na mistura do *BG-Carb* com o *HyStem®-HP*. Portanto, estudos que façam essas avaliações são também necessários.

Diante das dificuldades e limitações técnicas e obedecendo aos princípios dos 3Rs (refinar, reduzir, substituir) da experimentação animal, esta pesquisa foi considerada um estudo preliminar *in vivo*. Recomendamos fortemente que o instrumental e modelo experimental seja aprimorado antes que novos testes sejam feitos *in vivo*, a fim de poupar sofrimento e vidas animais.

REFERÊNCIAS

ALAM, S.; UEKI, K.; NAKAGAWA, K.; MARUKAWA, K.; HASHIBA, Y.; YAMAMOTO, E.; SAKULSAK, N.; ISEKI, S. Statin-induced Bone Morphogenetic Protein (BMP) 2 Expression During Bone Regeneration: An Immunohistochemical Study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 1, p. 22–9, 2009.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**, v. Suppl 2, n. Suppl 2, p. 96-101, 2001.

AMARAL, S.A.; REIS, I.D.G.; OLIVEIRA, P.A.D.; COSTA, F.O.; DE GOES, A.M.; SILVA, G.A.B.; COTA, L.O.M. Evaluation of strontium ranelate in the repair of standardized intrabuccal bone defects in a rat model. **Int J Clin Exp Med**, v. 10, n. 7, p. 10616–10624, 2017.

ANDONEGI, M.; IRASTORZA, A.; IZETA, A.; CABEZUDO, S.; DE LA CABA, K.; GUERRERO, P. A Green Approach towards Native Collagen Scaffolds: Environmental and Physicochemical Assessment. **Polymers**, v. 12, n. 7, p. 1597, 2020.

AYALA-HAM, A.; LÓPEZ-GUTIERREZ, J.; BERMÚDEZ, M.; AGUILAR-MEDINA, M.; SARMIENTO-SÁNCHEZ, J.I.; LÓPEZ-CAMARILLO, C.; SANCHEZ-SCHMITZ, G.; RAMOS-PAYAN, R. Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering, **Frontiers in Materials**, v. 8, 2021.

AZNAR, E.; OROVAL, M.; PASCUAL, L.; MURGUÍA, J.R.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; SANCENÓN, F. Gated materials for on-command release of guest molecules. **Chemical Reviews**. v. 116, p. 561–718, 2016.

BAO HA, T.L.; MINH, T.; NGUYEN, D.; MINH, D. Naturally Derived Biomaterials: Preparation and Application. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**, 2013.

BISCHOFF, R., SCHLÜTER, H. Amino acids: Chemistry, functionality and selected nonenzymatic post-translational modifications. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2275–2296, 2012.

CARRAGEE, E.J.; HURWITZ, E.L.; WEINER, B.K. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. **The spine journal**, v. 11, n. 6, p. 471–491, 2011.

CHANG, D., PARK, K.; FAMILI, A. Hydrogels for sustained delivery of biologics to the back of the eye. **Drug Discov Today**, v. 24, n. 8, p. 1470–1482, 2019.

CHIAPASCO, M.; AUTELITANO, L.; RABBIOSI, D.; ZANIBONI, M. The role of pericranium grafts in the reduction of postoperative dehiscences and bone resorption after reconstruction of severely deficient edentulous ridges with autogenous onlay bone grafts. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 6, p. 679–687, 2013.

COOK, D.J.; NGUYEN, C.; CHUN, H.N.; LLORENTE, I.L.; CHIU, A.S.; MACHNICKI, M.; ZAREMBINKI, T.I.; CARMICHAEL, S.T. Hydrogel-delivered brain-derived neurotrophic factor promotes tissue repair and recovery after stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 37, n. 3, p. 1030–1045, 2016.

DA COSTA E SILVA, R.M.F.; DINIZ, I.M.A.; GOMES N.A.; SILVA, G.J.B., DA FONTE FERREIRA, J.M.; DE FREITAS FILHO, R.L.; FREITAS, E.T.F.; MARTINS, D.A.; DOMINGUES, R.Z., ANDRADE, Â.L. Equisetum hyemale-derived unprecedented bioactive composite for hard and soft tissues engineering. **Sci Rep.**, v. 12, n. 1, 2022.

DELIORMANLI, A.M. Synthesis and characterization of cerium- and gallium-containing borate bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 26, n. 2, 2015.

DE QUEIROZ, G.M.; POLITI, F.A.; RODRIGUES, E.R.; SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.; CARDOSO, C.R.; SANTOS, L.C.; PIETRO, R.C. Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and Antioxidant Potential of Equisetum hyemale L. (Equisetaceae) Extracts. **J Med Food**, v. 18, n. 7, p. 830–4, 2015.

DETSCH, R.; BOCCACCINI, A.R. The role of osteoclasts in bone tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 10, p. 1133–1149, 2014.

DES MARAIS, D.L.; SMITH, A.R.; BRITTON, D.M.; PRYER, K.M. Phylogenetic relationships and evolution of extant horsetails, Equisetum, based on chloroplast DNA sequence data (rbc L and trn LF). **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, p. 737-751, 2003.

DI SILVIO, L.; JAYAKUMAR, P. Cellular response to osteoinductive materials in orthopaedic surgery. **Biology, Materials Science**, 2009.

ELSHAZLY, N.; KHALIL, A.; SAAD, M.; PATRUNO, M.; CHAKRABORTY, J.; MAREI, M. Efficacy of bioactive glass nanofibers tested for oral mucosal regeneration in rabbits with induced diabetes. **Materials**, v. 13, n. 11, p. 2603, 2020.

FERRAZ, E.P.; OLIVEIRA, F.S.; DE OLIVEIRA, P.T.; CROVACE, M.C.; PEITL-FILHO, O.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L. Bioactive glass-based surfaces induce differential gene expression profiling of osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research Part a.**, v. 105, p. 419–423, 2017.

FILIPPOV, Y.Y.; ORLOV, E.D.; KLIMASHINA, E.S.; EVDOKIMOV, P.V., SAFRONOVA TV, PUTLAYEV VI, RAU JV. Colloidal forming of macroporous calcium pyrophosphate bioceramics in 3D-printed molds. **Bioact Mater**, v. 5, n. 2, p. 309–317, 2020.

FISHER, O.Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R.; PEPPAS, N.A. Bioinspired materials for controlling stem cell fate. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 3, p. 419–428, 2010.

FISHERO, B.A.; KOHLI, N.; DAS, A.; CHRISTOPHEL, J.J.; CUI, Q. Current Concepts of Bone Tissue Engineering for Craniofacial Bone Defect Repair. **Craniofacial Trauma Reconstruction**, v. 8, n. 1, p. 23–30, 2015.

GAHARWAR, A.K.; PEPPAS, N.A.; KHADEMHOSEINI, A. Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n.3, p. 441-453, 2014.

GIMÉNEZ, C.; DE LA TORRE, C.; GORBE, M.; AZNAR, E.; SANCENÓN, F.; MURGUÍA, J.R.; MARTÍNEZ-MÁNEZ, R.; MARCOS, M.D.; AMORÓS, P. Gated mesoporous silica nanoparticles for the controlled delivery of drugs in cancer cells. **Langmuir**, v. 31, n. 12, p. 3753–62, 2015.

GLICKMAN, R.D.; ONORATO, M.; CAMPOS, M.M.; O'BOYLE, M.P.; SINGH, R.K.; ZAREMBINSKI, T.I.; BINETTE, F.; NASONKIN, I.O. Intraocular Injection of HyStem Hydrogel Is Tolerated Well in the Rabbit Eye. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 37, n. 1, p. 60–71, 2021.

DE GODOY, R.F.; HUTCHENS, S.; CAMPION, C.; BLUNN, G. Silicate substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity stimulates osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, n. 26, 2015.

ELSALANTY, M.E.; GENECOV, D.G. Bone Grafts in Craniofacial Surgery. **Craniofacial Trauma & Reconstruction**, v. 2, n. 3-4, p. 125-134, 2009.

GOENKA, S.; SANT, V.; SANT, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 173, n. 1, p. 75–88, 2014.

GOJGINI, S.; TOKATLIAN, T.; SEGURA, T. Utilizing cell–matrix interactions to modulate gene transfer to stem cells inside hyaluronic acid hydrogels. **Molecular pharmaceuticals**, v. 8, n. 5, p. 1582-91, 2011.

GOMES, N.A.; DO VALLE, I.B.; GLEBER-NETTO, F.O.; SILVA, T.A.; OLIVEIRA, H.M.C.; DE OLIVEIRA, R.F.; FERREIRA, L.A.Q.; CASTILHO, L.S.; REIS, P.H.R.G.; PRAZERES, P.H.D.M.; MENEZES, G.B.; DE MAGALHÃES, C.S.; MESQUITA, R.A.; MARQUES, M.M.; BIRBRAIR, A.; DINIZ, I.M.A. Nestin and NG2 transgenes reveal two populations of perivascular cells stimulated by photobiomodulation. **J Cell Physiol**, v. 237, n. 4, p. 2198-2210, 2022.

GRAÇA, M.F.P.; MIGUEL, S.P.; CABRAL, C.S.D.; CORREIA, I.J. Hyaluronic acid - based wound dressings: a review. **Carbohydrate Polymers**, 241, 2020.

HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1014–1017, 2002.

HENCH, L.L.; THOMPSON, I. Twenty-first century challenges for biomaterials. **J R Soc Interface**, v. 7, Suppl 4(Suppl 4), S379-91, 2010.

HENCH, L.L.; XYNOS, I.D.; POLAK, J.M. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 15, n. 4, p. 543–562, 2004.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N.S.; BOCCACCINI, A.R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, p. 2757–2774, 2011.

HOLZHÜTER, G.; NARAYANAN, K.; GERBER, T. Structure of silica in *Equisetum arvense*. **Anal Bioanal Chem**, v. 376, n. 4, p. 512–7, 2003.

ILICH, J.Z.; BROWNBILL, R.A.; TAMBORINI, L. Bone and nutrition in elderly women: protein, energy, and calcium as main determinants of bone mineral density. **Eur J Clin Nutr**, v. 57, n. 4, p. 554–65, 2003.

IMANI FOOLADI, A.A.; HOSSEINI, H.M.; HAFEZI, F.; HOSSEINNEJAD, F.; NOURANI, M.R. Sol–gel-derived bioactive glass containing SiO₂–MgO–CaO–P₂O₅ as an antibacterial scaffold. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 6, p. 1582–1587, 2013.

JEN, A.C.; WAKE, M.C.; MIKOS, A.G. Review: hydrogels for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 4, p. 357–64, 1996.

JOHARI, B.; KADIVAR, M.; LAK, S.; GHOLIPOURMALEKABADI, M.; URBANSKA, A.M.; MOZAFARI, M.; AHMADZADEHZARAJABAD, M.; AZARNEZHAD, A.; AFSHARI, S.; ZARGAN, J.; KARGOZAR, S. Osteoblast–seeded bioglass/gelatin nanocomposite: a promising bone substitute in critical-size calvarial defect repair in rat. **The International journal of artificial organs**, v. 39, n. 10, p. 524–533, 2016.

KALYANI, P.; ANITHA, A.; DARCHEN, A. Activated carbon from grass – A green alternative catalyst support for water electrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 25, p. 10364–10372, 2013.

KANYAMA, M.; KUBOKI, T.; AKIYAMA, K.; NAWACHI, K.; MIYAUCHI, F.M.; YATANI, H.; KUBOTA, S.; NAKANISHI, T.; TAKIGAWA, M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. **Archives of Oral Biology**, v. 48, n. 10, p. 723–730, 2003.

KARGOZAR, S.; BAINO, F.; HAMZEHLU, S.; HILL, R.G.; MOZAFARI, M. Bioactive glasses entering the mainstream. **Drug Discov Today**, v. 23, n. 10, p. 1700–1704, 2018.

KHADEMHOSEINI, A.; VACANTI, J.P.; LANGER, R. Progress in tissue engineering. **Scientific American**, v. 300, n. 5, p. 64–71, 2009.

KILIAN, M.; CHAPPLE, I.L.; HANNIG, M.; MARSH, P.D.; MEURIC, V.; PEDERSEN, A.M.; TONETTI, M.S.; WADE, W.G.; ZAURA, E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. **Br Dent J**, v. 221, n. 10, p. 657–666, 2016.

KIM, H.M.; KISHIMOTO, K.; MIYAJI, F.; KOKUBO, T.; YAO, T.; SUETSUGU, Y.; TANAKA, J.; NAKAMURA, T. Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products. **J Biomed Mater Res**, v. 46, n. 2, p. 228–235, 1999.

LEE, J.A.; KU, Y.; RHYU, I.C.; CHUNG, C.P.; PARK, Y.J. Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. **J Periodontal Implant Sci**, v. 40, n. 5, p. 211–9, 2010.

LIMMAHAKHUN, S.; OLOYEDE, A.; SITTHISERIPRATIP, K.; XIAO, Y.; YAN, C. 3D-printed cellular structures for bone biomimetic implants. **Additive Manufacturing**, v. 15, p. 93-101, 2017.

LIU, T.-H.; YANG, C.-C. Synthesis and surface characteristics of nanosilica produced from alkaliextracted rice husk ash. **Materials science and Engineering: B**, v. 176, p. 521-529.

LUEBKE, J.L.; GIEDROC, D.P. Cysteine sulfur chemistry in transcriptional regulators at the host–bacterial pathogen interface. **Biochemistry**, v. 54, p. 3235–3249, 2015.

LYSENKO, O., DUBOK, O., BORYSENKO, A., & SHINKARUK, O. The biological properties of the silver- and copper-doped ceramic biomaterial. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n.4), 2015.

MARCHESAN, J.; GIRNARY, M.S.; JING, L.; MIAO, M.Z.; ZHANG, S.; SUN, L.; MORELLI, T.; SCHOENFISCH, M.H.; INOHARA, N.; OFFENBACHER, S.; JIAO, Y. An experimental murine model to study periodontitis. **Nat Protoc**, v. 13, n. 10, p. 2247–2267, 2018.

MASON, R.M.; CROSSMAN, M.V.; SWEENEY, C. In: LAURENT TC, editor. The biology of hyaluronan. New York: Wiley, 1989.

MEINEL, L.; FARJAL, R.; HOFFMAN, S.; LANGER, R.; CHEN, J.; SNYDER, B.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D. Silk implants for the healing of critical size bone defects, **Bone**, v. 37, p. 688-398, 2005.

MUSSON, D.S.; GAO, R.; WATSON, M.; LIN, J.M.; PARK, Y.E.; TUARI, D.; CALLON, K.E.; ZHU, M.; DALBETH, N.; NAOT, D.; MUNRO, J.T.; CORNISH, J. Bovine bone particulates containing bone anabolic factors as a potential xenogenic bone graft substitute. **J Orthop Surg Res**, v. 14, n. 1, p. 60, 2019.

NEŠČÁKOVÁ, Z.; ZHENG, K.; LIVERANI, L.; NAWAZ, Q.; GALUSKOVÁ, D.; KAŇKOVÁ, H.; MICHÁLEK, M.; GALUSEK, D.; BOCCACCINI, A.R. Multifunctional zinc ion doped sol – gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. **Bioactive Materials**, v. 4, p. 312–321, 2019.

NEUMANN, M.; WAGNER, S.; NOSKE, R.; TIERSCH, B.; STRAUCH, P. Morphology and Structure of Biomorphous Silica Isolated from Equisetum hyemale and Equisetum telmateia. **Zeitschrift Für Naturforschung B**, v. 65, n. 9, p. 1113–1120, 2010.

NOMMEOTS-NOMM, A.; LABBAF, S.; DEVLIN, A.; TODD, N.; GENG, H.; SOLANKI, A.K.; TANG H.M.; PERDIKA, P.; PINNA, A.; EJEIAN, F.; TSIGKOU, O.; LEE, P.D.; ESFAHANI, M.H.N.; MITCHELL, C.A.; JONES, J.R. Highly degradable porous melt-derived bioactive glass foam scaffolds for bone regeneration. **Acta Biomater**, v. 57, p. 449–461, 2017.

ONNA, D.; MINABERRY, Y.; JOBBAGY, M. Hierarchical bioglass scaffolds: Introducing the "milky way" for templated bioceramics. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 2971–2977, 2015.

PALANICHAMY, K.; ARIHARAPUTHIRAN, A.; DARCHEN, A. Activated carbon from grass – A green alternative catalyst support for water electrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, 2013.

PAN, J.; PILAWSKI, I.; YUAN, X.; ARIOKA, M.; TICHA, P.; TIAN, Y.; HELMS, J.A. Interspecies comparison of alveolar bone biology: Tooth extraction socket healing in mini pigs and mice. **J Periodontol**, v. 91, n. 12, p. 1653–1663, 2020.

PERMATASARI, N.; SUCAHYA, T. N.; NANDIYANTO, A.B.D. Review: Agricultural wastes as a source of silica material. **Indonesian Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 82-106, 2016.

PEPPAS, N.; HILT, J.Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. **Advanced Materials**, v. 18, p. 1345-1360, 2006.

PLACONE, A.L.; MCGUIGGAN, P.M.; BERGLES, D.E.; GUERRERO-CAZARES, H.; QUIÑONES-HINOJOSA, A.; SEARSON, P.C. Human astrocytes develop physiological morphology and remain quiescent in a novel 3D matrix. **Biomaterials**, v. 42, n. 134–143, 2015.

PRADO, F.A.; ANBINDER, A.L.; JAIME, A.P.G.; LIMA, A.P.; BALDUCCI, I.; DA ROCHA, R.F. Defeitos ósseos em tíbias de camundongos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 18, n. 1, p. 7–13, 2006.

PRATO, G.P.P.; ROTUNDO, R.; MOGNONI, C.; SORANZO, C. Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: a case report. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 20, n. 6, 2000.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. As metas de desenvolvimento do milênio. 2003. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metas_desenvolvimento_milenio.pdf>. Acesso em 28 fev. 2023.

PURICELLI, E.; CORSETTI, A.; PONZONI, D.; MARTINS, G.L.; LEITE, M.G.; SANTOS, L.A. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. **Head Face Med**, v. 6, n. 10 2010.

PUTNAM, A.J.; MOONEY, D.J. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices. **Nature Medicine**, v. 2, n. 7, p. 824–826, 1996.

RANA, K.S.; SOUZA, L.P.; ISAACS, M.A.; RAJA, F.N.S.; MORRELL, A.P.; MARTIN, R.A. Development and Characterization of Gallium-Doped Bioactive Glasses for Potential Bone Cancer Applications. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 3, n. 12, p. 3425–3432, 2017.

REN, Y.-J.; ZHOU, Z.-Y.; LIU, B.-F.; XU, Q.-Y.; CUI, F.-Z. Preparation and characterization of fibroin/hyaluronic acid composite scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 4, p. 372–378, 2009.

RODDY, E.; DEBAUN, M.R.; DAOUD-GRAY, A.; YANG, Y.P.; GARDNER, M.J. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. **Eur J Orthop Surg Traumatol**, v. 28, n. 3, p. 351–362, 2018.

ROWLEY, J.A.; MADLAMBAYAN, G.; MOONEY, D.J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterial**, v. 20, n. 1, p. 45-53, 1999.

SAPEI, L. Characterisation of Silica in Equisetum hyemale and its Transformation into Biomorphous Ceramics. Universität Potsdam, 2007.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2ªed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003.

SEAH, J.; SINGH, S.; TAN, L.P.; CHOUDHURY, D. Scaffolds for the manufacture of cultured meat, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, p. 1-13, 2021.

SEROWOKY, M.A.; KUWAHARA, S.T.; LIU, S.; VAKHSHORI, V.; LIEVERMAN, J.R.; MARIANI, F.V. A murine model of large-scale bone regeneration reveals a selective requirement for Sonic Hedgehog. **npj Regen Med**, v. 7, n. 30, 2022.

SHIH, S.-J.; CHOU, Y.-J.; & CHIEN, I.-C. One-step synthesis of bioactive glass by spray pyrolysis. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 12, 2012.

SCHMIDMAIER, G.; CAPANNA, R.; WILDEMANN, B.; BEQUE, T.; LOWENBERG, D. Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options? **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 40, p. 39–43, 2009.

SLAUGHTER, B.V.; KHURSHID, S.S.; FISHER, O.Z.; KHADEMHOSEINI, A.; PEPPAS, N.A. Hydrogels in regenerative medicine. **Advanced Materials**, v. 21, n. 32–33, p. 3307–3329, 2009.

SPICER, P.P.; KRETLOW, J.D.; YOUNG, S.; JANSEN, J.A.; KASPER, F.K.; MIKOS, A.G. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. **Nature Protocols**, v. 7, n. 10, p. 1918-1929, 2012.

SPIN-NETO, R.; MARCANTONIO E, JR.; GOTFREDSEN, E.; WENZEL, A. Exploring CBCT-based DICOM files: A systematic review on the properties of images used to evaluate maxillofacial bone grafts. **Journal of Digital Imaging**, v. 24, n. 6, p. 959–966, 2011.

STERN, R., 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. **European journal of cell biology**, v. 83, n. 7, p.317–325.

TAGA, M.L.L. Análise histológica e radiográfica do potencial osteopromotor da membrana de cortical óssea bovina no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de cobaia. (*Cavia porcellus*). Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

TANAKA, M.; AOKI, K.; HANIU, H.; KAMANAKA, T.; TAKIZAWA, T.; SOBAJIMA, A.; YOSHIDA, K.; OKAMOTO, M.; KATO, H.; SAITO, N. Applications of Carbon Nanotubes in Bone Regenerative Medicine. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, 2020.

TAYEBEE, R.; PEJHAN, A.; RAMSHINI, H.; MALEKI, B.; ERFANINIA, N.; TABATABAIE, Z.; ESMAEILI, E. Equisetum arvense As an abundant source of silica nanoparticles. SiO₂/H₃PW₁₂O₄₀ nanohybrid material as an efficient and environmental benign catalyst in the synthesis of 2-amino-4H-chromenes under solventfree conditions. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, 2017.

TEÓFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. **Arch Oral Biol**, v. 49, n. 9, p. 755–62, 2004.

THOMAS, J.; PEPPAS, N.; SATO, M.; WEBSTER, T. Nanotechnology and biomaterials. In: GOGOTSI, Y., editor. Nanomaterials handbook. Taylor and Francis, p. 605-636, 2006.

TIAN, W.M.; HOU, S.P.; MA, J.; ZHANG, C.L.; XU, Q.Y.; LEE, I.S. Hyaluronic acid–poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. **Tissue Eng**, v. 11, 2005.

TOLLEMAR, V.; COLLIER, Z.J.; MOHAMMED, M.K.; LEE, M.J.; AMEER, G.A.; REID, R.R. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 1, p. 56–71, 2016.

WALIA, R.; AKHAVAN, B.; KOSOBRODOVA, E.; KONDYURIN, A.; OVEISSI, F.; NAFICY, S.; YEO, G.C.; HAWKER, M.; KAPLAN, D.L.; DEGHANI, F.; BILEK, M.M. Hydrogel– solid hybrid materials for biomedical applications enabled by surface-embedded radicals. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 38, p. 2004599, 2020.

WIRTHL, D.; PICHLER, R.; DRACK, M.; KETTLGUBER, G.; MOSER, R.; GERSTMAYR, R.; HARTMANN, F.; BRADT, E.; KALTSEIS, R.; SIKET, C.M.; SCHAUSBERGER, S.E.; HILD, S.; BAUER, S.; KALTENBRUNNER, M. Instant tough bonding of hydrogels for soft machines and electronics. **Science advances**, v. 3, n. 6, p. e1700053, 2017.

WU, C., ZHOU, Y., XU, M., HAN, P., CHEN, L., CHANG, J., & XIAO, Y. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. **Biomaterials**, v. 34, n. 2, p. 422–433, 2013.

XU, X.; JHA, A.K.; HARRINGTON, D.A.; FARACH-CARSON, M.C.; JIA, X. Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks. **Soft Matter**, v. 8, n. 12, p. 3280-3294, 2012.

XYNOS, I.D.; EDGAR, A.J.; BUTTERY, L.D.K.; HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 276, n. 2, p. 461-465, 2000.

XYNOS, I.D.; EDGAR, A.J.; BUTTERY, L.D.K.; HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, p. 151–157, 2001.

YEH, J.S.; OH, S.J.; HSUEH, C.M. Frequency of vascular inflammation and impact on neointimal proliferation of drug eluting stents in porcine coronary arteries. **Acta Cardiologica Sinica**, v. 32, n. 5, p. 570, 2016.

YUK, H.; ZHANG, T.; PARADA, G.; LIU, X.; ZHAO, X. Skin-inspired hydrogel–elastomer hybrids with robust interfaces and functional microstructures. **Nat Commun**, v. 7, n. 12028, 2016.

YOUSAF, S.S.; HOUACINE, C.; KHAN, I.; AHMED, W.; JACKSON, M.J. Importance of biomaterials in biomedical engineering. **Advances in Medical and Surgical Engineering**, 149–176, 2020.

ZAREMBINSKI, T.; SKARDAL, A. HyStem®: A Unique Clinical Grade Hydrogel for Present and Future Medical Applications, 2018.

ZEMNUKHOVA, L.A.; AREFIEVA, O.D.; KOVEKHOVA, A.V.; POLYAKOVA, N.; PANASENKO, A.E.; KAMAIEVA, A.Y. Silicon-containing compounds in horsetail (*Equisetum Equisetaceae*) composition. **Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология**, v. 9, 2019.

ZHANG, H., CHIAO, M. Anti-fouling Coatings of Poly(dimethylsiloxane) Devices for Biological and Biomedical Applications. **J. Med. Biol. Eng.**, v. 35, p. 143–155, 2015.

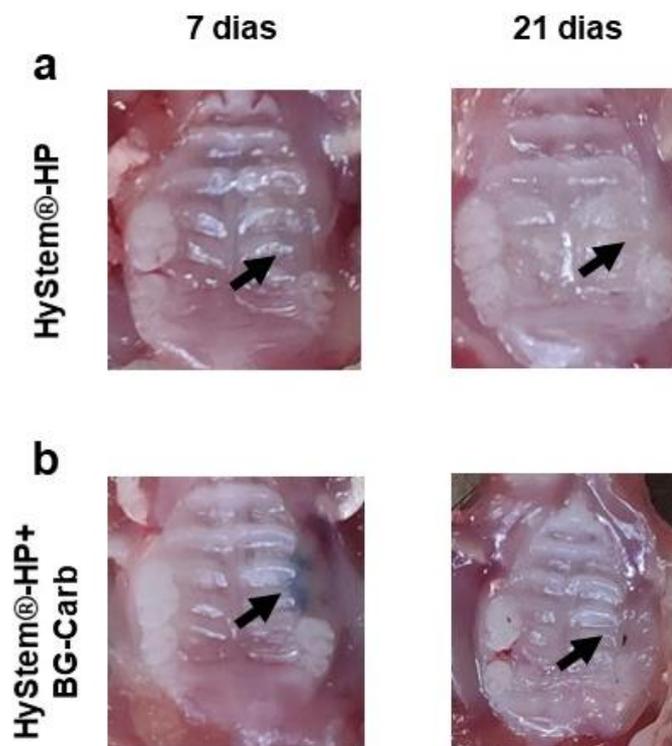
ZHAO, F.; XIE, W.; ZHANG, W.; FU, X.; GAO, W.; LEI, B.; CHEN, X. 3D printing nanoscale bioactive glass scaffolds enhance osteoblast migration and extramembranous osteogenesis through stimulating immunomodulation. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, 2018.

ZHOU, Y.; YAO, Q.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; XU, Y. Design and characterization of a novel bioactive glass/hydrogel composite scaffold for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 11, 2019.

APÊNDICE A – PEÇAS HISTOLÓGICAS

Figura suplementar 1 – Peças histológicas imediatamente após eutanásia e dissecação. *HyStem®-HP* (a). *HyStem®-HP + BG-Carb* (b). A seta indica o local referente ao alvéolo do primeiro molar superior esquerdo.

Aspecto macroscópico



Fonte: Dos autores, 2023.

ANEXO A – PROTOCOLO CEUA #42/2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITOS DO USO DE BG-CARB ASSOCIADO A HIDROGEL DE ÁCIDO HIALURÔNICO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO EM MAXILA", protocolo do CEUA: 42/2022 sob a responsabilidade de Ivana Márcia Alves Diniz que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 22/02/2022.

Vigência da Autorização	22/02/2022 a 21/02/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6 NG2-Ds Red
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério da Morfologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6 NG2-Ds Red
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério da Morfologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6 NG2-Ds Red
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério da Morfologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6 NG2-Ds Red
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério da Morfologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6 NG2-Ds Red
Nº de animais	6

Peso/Idade	20g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério da Morfologia

Considerações posteriores:

22/02/2022	Aprovado no dia 22/02/2022. Validade: 22/02/2022 à 21/02/2027. Este protocolo foi aprovado condicionado a resposta à diligência na reunião de 21/02/2022.
------------	---

Belo Horizonte, 15/06/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@ppq.ufmg.br