

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

**PAULA SANCHES DOS SANTOS**

**Microtomographic and histologic evaluation of craniofacial reconstructions  
in rabbits using different biomaterials**

**Avaliação microtomográfica e histológica de reconstruções craniofaciais em  
coelhos utilizando diferentes biomateriais**

**BAURU**

**2020**



**PAULA SANCHES DOS SANTOS**

**Microtomographic and histologic evaluation of craniofacial reconstructions  
in rabbits using different biomaterials**

**Avaliação microtomográfica e histológica de reconstruções craniofaciais em  
coelhos utilizando diferentes biomateriais**

Tese constituída por artigos apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

**BAURU**

**2020**

Santos, Paula Sanches dos

Avaliação microtomográfica e histológica de reconstruções craniofaciais em coelhos utilizando diferentes biomateriais / Paula Sanches dos Santos – Bauru, 2020.

105p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru.  
Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**



---

---

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu Deus e aos meus pais Edson e Cidinha.

---

---





---

---

## Agradecimentos

"Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós." Bíblia Sagrada (NVI), Efésios 3:20. A **Deus**, meu Pai Eterno e Soberano, que me deu a vida e o privilégio de ser sua filha, por meio de Jesus Cristo. Sem Ele nada disso seria possível. Antes de estar em meus planos, essa conquista já estava em Seus planos e tudo preparou para que eu chegasse até aqui. Sempre estive ao meu lado, me amando incondicionalmente, me orientando, me levantando e me sustentando. Obrigada Senhor por cada forma de me mostrar seu carinho, cuidado e amor e também pelas pessoas que colocou em meu caminho. Sou eternamente grata e quero sempre viver para te honrar. "Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém." Bíblia Sagrada (NVI), Romanos 11:36.

Aos meus pais **Edson M. dos Santos e Maria A. M. S. dos Santos (Cidinha)** por toda a ajuda e retaguarda que sempre me deram. Agradeço pelo amor e paciência, pelos esforços e abdições, pelos ensinamentos e conselhos, pelas orações e palavras de incentivo. Pela companhia de sempre e por se fazerem tão presente em minha vida, inclusive neste trabalho, vibrando com minhas vitórias e participando das minhas aflições. Vocês são meus exemplos de determinação, sabedoria e temor a Deus e continuam sendo até hoje os meus melhores e principais companheiros de vida. Com certeza, sem vocês essa conquista seria muito mais difícil e penosa. Sou privilegiada e grata por tê-los como pais. Essa vitória é nossa!!! Amo vocês.

Ao meu irmão **Filipe S. R. dos Santos**, meu primeiro amigo e companheiro das brincadeiras e artes de criança, meu exemplo de dedicação e determinação aos estudos. Agradeço a ele e à minha cunhada **Vanessa P. S. Ribas** pelo apoio e orações, pela companhia, paciência e preocupação de sempre. Precocemente, quero agradecer ao meu sobrinho **Davi**, que ainda está no "forminho", mas que já é muito amado e me traz muita alegria. Estendo meus agradecimentos também à **Dona Nice** (mãe da Vanessa) pela companhia sempre agradável em nossas reuniões familiares.

---

---



---

---

Aos meus avós maternos **Sebastião** (*in memoriam*) e **Apparecida** que muito me amaram, me incentivaram, se preocuparam com meus projetos e planos. Agradeço a minha avó Apparecida que participa ativamente da minha vida até hoje, vibrando com cada conquista e deixando minha vida mais alegre. À “**Tia Cida**” que considero como uma avó. Suas preocupações, carinhos e caprichos culinários deixam minha vida mais leve e agradável. Aos meus avós paternos, **Cypriano** (*in memoriam*) e **Maria Thereza** (*in memoriam*), que muito me dedicaram carinho e amor na infância e que certamente estariam muito felizes e orgulhosos por essa conquista. Agradeço também aos meus tios, primos, seus respectivos e demais parentes das famílias **Molina Sanches** e **Martins dos Santos**, pela torcida, amizade, encontros e alegrias.

Aos meus irmãos em Cristo, em especial aos da **Igreja Batista do Jardim Bela Vista de Bauru** e da **Igreja Batista do Estoril de Bauru** e à minha amiga mais chegada que irmã, **Flávia Choi Marchesano**. Agradeço muito a todos pelas orações, acompanhamento nas lutas e vitórias, sempre me dando palavras de ânimo e incentivo.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis**, pela oportunidade dada e pela confiança depositada para que eu pudesse desenvolver o doutorado. Agradeço pela convivência, atenção, amizade e ensinamentos. Sempre muito acessível, com seu jeito descontraído, sincero e humilde, trazendo alegria aos nossos dias.

À **Dra. Tania Mary Cestari**, minha “co-orientadora”, que desde o início da minha jornada no laboratório (há 11 anos), me deu todo o suporte necessário e me ensinou a fazer ciência. Sempre muito prestativa, se desdobrando ao máximo para atender a todos e solucionar nossas dúvidas. Obrigada pelos ensinamentos diários que me permitiram grande crescimento. A sua inteligência e o seu amor pela ciência é admirável! Agradeço pelo carinho, atenção, paciência e pela amizade que se desenvolveu ao longo desses anos.

Ao **Prof. Dr. Rumio Taga**, que foi meu primeiro orientador nessa instituição, pessoa de grande admiração e respeito, com quem tive a honra de conviver e aprender durante todo o período de minha iniciação científica, mestrado e até hoje.

Aos demais professores do Laboratório de Histologia da FOB-USP. Ao **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet** pelos conhecimentos proporcionados e exemplo de grande pesquisador que é. À **Profa. Dra. Camila O. Rodini Pegoraro**, com suas palavras de incentivo e conversas a respeito da vida profissional e pelas aulas ministradas.

---

---



---

---

Agradeço à minha irmãzinha de pesquisa **Daniela Pereira Catanzaro**, pela amizade sincera, por todas as conversas e também pelo seu apoio, sensibilidade e preocupação em sempre me ajudar. Agradeço aos meus colegas do **Laboratório da Disciplina de Histologia da FOB-USP** pela companhia e amizade, pelos momentos de aprendizados e conselhos, pelo respeito e apoio que sempre recebi e também pelos momentos descontraídos, *coffees*, almoços no bandeirão e práticas esportivas. Com certeza a presença de cada um de vocês no meu dia a dia deixou tudo com mais cor, leveza e vida, sendo para mim uma terapia diária estar com vocês: **Suellen Paini, Rodrigo Buzo, Luciana Mieli Saito, Nathália Lopes, Rafael Ortiz, Angélica Fonseca, Jéssica Melchhiades, Nádia Amôr, Ana Carolina Bighetti, Michelle Soriani Azevedo, Carolina Francisconi, Priscila Colavite, Vinicius Tagliavini, Luan Damasceno, André P. Tabanêz**; e também àqueles que já ganharam asas e voaram: **Ricardo V. N. Arantes, Caroline A. Rocha, Andréia E. Vieira Ribeiro, Ever E. L. Mena, Cláudia Biguetti, Eliana Lippe e Franco Cavalla**. Estendo esses agradecimentos também às técnicas do Laboratório de Histologia, **Danielle S. Ceolin (Dani)** e **Patrícia S. M. Germino (Paty)**, e por todos os auxílios técnicos prestados, pela forma com que me acolheram no laboratório desde o início da minha iniciação científica, pelos ensinamentos, alegrias compartilhadas, conversas e pela amizade e carinho que se desenvolveram ao longo desse tempo. À secretária **Maria Teresa A. F. M. Silva (Tê)**, agradeço pelas ajudas prestadas com tanto esmero, por seu carinho e cuidado comigo demonstrado diariamente, pelas conversas, mensagens, risadas e amizade. À Dona **Aldivina Mendes da Silva (D. Divina)** pelos deliciosos cafezinhos, pela atenção e conversas sempre muito agradáveis. Às funcionárias da limpeza que se preocupavam em deixar tudo limpinho para que pudéssemos desenvolver nossas atividades em um ambiente agradável.

Aos **Professores da FOB-USP e HRAC-USP** que ministraram disciplinas a mim durante o curso e contribuíram de alguma forma para o meu crescimento.

Aos demais **Alunos de Pós-Graduação da Biologia Oral** que compartilharam comigo de aulas, estudos e trabalhos.

Às Disciplinas da FOB-USP que gentilmente abriram suas portas quando precisei de algum serviço ou equipamento, como a **Anatomia**, a **Microbiologia e Imunologia** e a **Radiologia**, e ao **Centro Integrado de Pesquisas (CIP)**.

---

---



---

---

À Secretária da Biologia Oral, **Dalva Ribeiro de Oliveira**, que sempre me auxiliou nas dúvidas e procedimentos a serem tomados, com muita atenção, dedicação e carinho.

Aos funcionários da **Pós-Graduação e Biblioteca**.

Aos funcionários do **Biotério Central da FOB-USP**.

Aos funcionários do **Restaurante Universitário (Bandejão) da FOB-USP**.

À **Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara**, pelo uso do microtomógrafo, em especial à funcionária: Luana Elis Sabino.

Aos **Membros da Banca**, pela disponibilidade e pelas sugestões e críticas que certamente contribuirão com esse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, participaram e me auxiliaram nesta caminhada.

...Muito obrigada!

“É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudá-lo a levantar-se. [...] Um cordão de três dobras não se rompe com facilidade.” **Bíblia Sagrada (NVI), Eclesiastes 4:9,10a e 12b.**

---

---





---

---

## **Agradecimentos Institucionais**

À **Universidade de São Paulo (USP)**.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB – USP)**.

Ao **Prof. Dr. Vahan Agopyan**, digníssimo Reitor da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Pedro Vitoriano Oliveira**, digníssimo secretário Geral da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**, digníssimo Vice-Diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. José Henrique Rubo**, digníssimo Prefeito do Campus da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À **Profa. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira Bullen**, digníssima Presidente da Comissão de Pós-Graduação, da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À **Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, digníssima Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas na área de Biologia Oral, da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** pelo apoio – Código de Financiamento 001.

---

---



---

---

## Epígrafe

“Por isso dediquei-me a aprender, a investigar, a buscar a sabedoria e a razão de ser das coisas.” **Bíblia Sagrada (NVI), Eclesiastes 7:25a.**

---

---



---

---

## ABSTRACT

The aim was to evaluate the bone formation and bone augmentation in two different models of craniofacial reconstructive surgery using comparatively different calcium phosphate-based ceramics or using deproteinized bovine bone (DBB) in association with angiogenic fraction F1 obtained from latex (*Hevea brasiliensis*) and hyaluronic acid hydrogel (HAH). In the article 1, bilateral maxillary sinus augmentation (MSA) was performed using carbonated deproteinized bovine bone (cDBB), sinterized deproteinized bovine bone (sDBB) or porous biphasic calcium phosphate (pBCP) in rabbits. After 2, 4 and 8 weeks the samples were collected and analyzed under microtomography, histomorphometry and immunohistochemistry for TRAP labeling. All treatments promoted maintenance of the MSA volume over time. The bone formation occurred in close contact with the surface of all materials particles. In cDBB group the number of TRAP+ cells maintaining stable during all experimental periods, while in sDBB and pBCP groups a peak was observed at 2 weeks. In all experimental periods, bone formation in sDBB group was higher compared to cDBB group and similar to pBCP group. In the article 2, bilateral cranial bone defects were performed and filled with F1/HAH/DBB or HAH/DBB and the contralateral side with F1/HAH or HAH in rabbits. After 2, 4 and 8 weeks the samples were collected to microtomography and histomorphometry analyzes. The total volume (TV) in the HAH/DBB and F1/HAH/DBB groups were significantly higher than in the HAH and F1/HAH groups. At 2 weeks, the F1/HAH/DBB group presented a greater volume bone (BV) compared to the other groups. In HAH/DBB and F1/HAH/DBB groups the bone tissue grew on the surface and pores of the DBB increasing progressively the maturity and the volume occupied. The DBB structure not changed. In defects of the HAH and F1/HAH groups occurred the invasion of the adjacent tegument with formation of a thin layer of connective tissue and small new bone formation limited to the edges during all periods. In conclusion, cDBB, sDBB and pBCP maintained the MSA volume, favoring bone formation and maturation being safe alternatives in the MSA technique. And, the F1 fraction associated to DBB provided significant increase in the bone formation of the cranial bone defects especially at the initial healing phase, suggesting a promising strategy for the treatment of craniomaxillofacial defects.

**Key-words:** Biocompatible Materials. Bone Density. Bone Regeneration. Ceramics. Rabbits. X-Ray Microtomography.

---

---



---

---

## RESUMO

O objetivo foi avaliar a formação e o ganho ósseo em dois diferentes modelos de cirurgia reconstrutiva craniofacial, usando comparativamente diferentes cerâmicas à base de fosfato de cálcio ou usando osso bovino desproteínizado (OBD) em associação à fração angiogênica F1 obtida do látex (*Hevea brasiliensis*) e hidrogel de ácido hialurônico (HAH). No artigo 1, o levantamento do seio maxilar (LSM) bilateral foi realizado utilizando osso bovino desproteínizado carbonatado (OBDc), osso bovino desproteínizado sinterizado (OBDs) ou cerâmica bifásica de fosfato de cálcio porosa (BFCp) em coelhos. Após 2, 4 e 8 semanas, as amostras foram coletadas e analisadas sob microtomografia, histomorfometria e imunohistoquímica para marcação de TRAP. Todos os tratamentos promoveram a manutenção do volume do LSM ao longo do tempo. A formação óssea ocorreu em íntimo contato com a superfície das partículas de todos os materiais. No grupo OBDc, o número de células TRAP + manteve-se estável durante todos os períodos experimentais, enquanto nos grupos OBDs e BFCp foi observado um pico em 2 semanas. Em todos os períodos experimentais, a formação óssea no grupo OBDs foi maior em comparação ao grupo OBDc e similar ao grupo BFCp. No artigo 2, defeitos ósseos cranianos bilaterais foram realizados e preenchidos com F1/HAH/OBD ou HAH/OBD e o lado contralateral com F1/HAH ou HAH em coelhos. Após 2, 4 e 8 semanas, as amostras foram coletadas para análises de microtomografia e histomorfometria. O volume total (VT) nos grupos HAH/OBD e F1/HAH/OBD foi significativamente maior que nos grupos HAH e F1/HAH. Em duas semanas, o grupo F1/HAH/OBD apresentou maior volume ósseo (VO) em comparação aos demais grupos. Nos grupos HAH/OBD e F1/HAH/OBD, o tecido ósseo cresceu na superfície e nos poros do OBD, aumentando progressivamente a maturidade e o volume ocupado. A estrutura OBD não foi alterada. Nos defeitos dos grupos HAH e F1/HAH ocorreu invasão do tegumento adjacente com formação de fina camada de tecido conjuntivo e pequena e nova formação óssea limitada às bordas durante todos os períodos. Concluindo, OBDc, OBDs e BFCp mantiveram o volume LSM, favorecendo a formação e maturação óssea, sendo alternativas seguras na técnica de LSM. E a fração F1 associada ao OBD proporcionou aumento significativo na formação óssea dos defeitos ósseos cranianos, principalmente na fase inicial do reparo, sugerindo ser uma estratégia promissora para o tratamento de defeitos craniomaxilofaciais.

**Palavras-chave:** Materiais Biocompatíveis. Densidade Óssea. Regeneração Óssea. Cerâmica. Coelhos. Microtomografia por Raio-X.

---

---





---

---

## TABLE OF CONTENTS

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	13
<b>2</b>	<b>ARTICLES</b> .....	19
2.1	ARTICLE 1 – Maxillary sinus augmentation using different calcium phosphate-based ceramics: a microtomographic, histomorfometric and immunohistochemical study. ....	21
2.2	ARTICLE 2 – Microtomographic and histomorphometric evaluations of the <i>in vivo</i> effect of the F1 fraction of the latex ( <i>Hevea brasiliensis</i> ) carried to hyaluronic acid hydrogel adsorbed to the deproteinized bovine bone in the process of bone repair. ....	45
<b>3</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	75
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	83
	<b>REFERENCES</b> .....	87
	<b>ANNEXES</b> .....	101

---

---



# **1 INTRODUCTION**

---

---



## 1 INTRODUCTION

The craniofacial region is a complex array of bone, cartilage, soft tissue, nerves and blood vessels (Ward *et al.*, 2010). The lack of sufficient bone volume in the oral and maxillofacial area, especially resulting from cancer surgeries, trauma, chronic infection, maxillary atrophy, congenital and acquired defects can compromise the normal function and aesthetics (Petrovic *et al.*, 2012; Ezirganli *et al.*, 2015; Pilipchuk *et al.*, 2015). Bone grafts or substitute biomaterials are commonly used therapeutic strategies for craniofacial reconstructions such as bone augmentation and repair of bone defects (Ezirganli *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). The American Academy of Orthopedic Surgeons estimates that over 500,000 bone grafting procedures are performed in the United States each year (Greenwald *et al.*, 2001). To date, autogenous bone is considered the gold standard for bone substitutes because it presents osteogenic, osteoinductive and osteoconductive properties (Amini *et al.*, 2012; Almubarak *et al.*, 2016; Delgado-Ruiz *et al.*, 2018). However, its use involves some disadvantages, such as tendency of resorption, obtaining limited by the quantity in the intraoral area and by the increase in surgical complexity in the extraoral area, leading to the need for hospitalization, general anesthesia, increased risk of infection and increased morbidity (Ozdemir *et al.*, 2013; Esposito *et al.*, 2014; Nkenke e Neukam, 2014; Stacchi *et al.*, 2017). In the attempt to overcome these limitations, researches have proposed and tested the performance of different bone substitutes biomaterials as an alternative to autogenous bone graft (Lutz *et al.*, 2015; Stacchi *et al.*, 2017; Oh *et al.*, 2019).

Bone substitutes biomaterials are divided into allogens, xenogens and alloplastic according to their origin (Papageorgiou *et al.*, 2016). Allogenic graft is obtained from a genetically different donor, but of the same species (Jensen e Terheyden, 2009; Pilipchuk *et al.*, 2015). The bone harvested often from a cadaveric tissue is submitted to various treatments in order to decrease its antigenicity and, depending on the method of processing, to maintain its osteoinductive property (Pilipchuk *et al.*, 2015). The bone allografts is treated with antibiotics, solvents and cold-freeze-disinfection at -80°C, and can also be lyophilized, demineralized or irradiated (Salai *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2007; Holtzclaw *et al.*, 2008). However, allografts are associated with risks of infections (as hepatitis and HIV) and immunoreactions (Amini *et al.*, 2012; Ezirganli *et al.*, 2015).

---

---

Xenogeneic grafts are derived from different species than the recipient as coral, porcine, equine or bovine sources (Jensen e Terheyden, 2009; Esposito *et al.*, 2014; Pilipchuk *et al.*, 2015). Among these, the deproteinized bovine bone (DBB) has been one of the most used, well documented and effective in reconstructive implantology (Lutz *et al.*, 2015; Fienitz *et al.*, 2017). Therefore, it has been used as a control group or substitute bone control material in several studies (Cordaro *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2009; Jun *et al.*, 2014; Calasans-Maia *et al.*, 2015; Mordenfeld *et al.*, 2015). The DBB is produced with bovine cancellous bone by deproteinization process at high temperatures and chemical cleaning procedures, resulting in a mineral, inorganic bone matrix of natural, porous and non-antigenic hydroxyapatite (Accorsi-Mendonca *et al.*, 2008; Calasans-Maia *et al.*, 2009). This biomaterial presents natural bone architecture, biocompatibility, osteoconduction and slow resorption (Yildirim *et al.*, 2000; Iezzi *et al.*, 2012; Kolerman *et al.*, 2012; Mordenfeld *et al.*, 2015).

Alloplastic graft are materials synthetically produced that can present different forms: polymers, ceramics, metals and composites (Jensen e Terheyden, 2009; Matassi *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2014). In this sense, calcium phosphate-based ceramics such as hydroxyapatite (HA), beta tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) and biphasic calcium phosphate (BCP) have been used for teeth or bone replacement, bone augmentation or repair (Legeros, 2008; Pilipchuk *et al.*, 2015). These ceramics are biocompatible, bioactive and osteoconductive (Legeros, 2008; Zimmermann e Moghaddam, 2011; Yip *et al.*, 2015) and have shown osteoinduction property in animal models (Ozdemir *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2018). BCP is composed of a more stable (HA) and a more resorbable phase ( $\beta$ -TCP) and is currently used and studied with different rates of proportion between the phases, however, the optimal ratio between HA and  $\beta$ -TCP is not yet established (Lim, Kim, *et al.*, 2015).

All non-autogenous bone substitute materials can have different shapes and can be mixed with autogenous bone or with growth factors and cells (Klijn *et al.*, 2010). Depending on their chemical characteristics, they can be slowly resorbing or fast-resorbing over time (Esposito *et al.*, 2014). The presence of pores and concavities in the structure of the biomaterial allowing adequate space through increased surface area for diffusion of nutrients and cells, blood vessel formation, as well as for growing tissues such as bone tissue inside material (Legeros, 2008; Zimmermann e Moghaddam, 2011; Pilipchuk *et al.*, 2015; Denry e Kuhn, 2016). Pores also influence the rate of degradation, so materials with high porosity are more quickly degraded than materials with low porosity (Zimmermann e Moghaddam, 2011).

---

---

Despite advances in bone biology and bone substitutes materials studies, limitations and challenges still remain (Issa *et al.*, 2016). And, the ideal bone graft substitute for all situations does not exist, being necessary application of different types of bone substitutes or their association, according to the clinical problem (Janicki e Schmidmaier, 2011). In this sense, investigations in tissue engineering area employing scaffolds alone or in combination with growth factors, cells and/or gene delivery have shown great potential to overcome existing challenges and limits in reconstructive craniofacial surgery (Pilipchuk *et al.*, 2015).

Studies of new bone substitute materials, growth factors and stem cells largely involve the choice of rabbits as an *in vivo* preclinical model (Li *et al.*, 2015; Peric *et al.*, 2015). The rabbit is the most used animal in musculoskeletal research (Neyt *et al.*, 1998) and among larger animals it is the model most commonly used to bone repair evaluation (Peric *et al.*, 2015), researches on dental implants (Coelho *et al.*, 2009) and surgical strategies for craniofacial application such as maxillary sinus augmentation (MSA) due to the similarity of the rabbit's maxillary sinus to the human maxillary sinus (Muschler *et al.*, 2010) (Lim, Zhang, *et al.*, 2015). The advantages of its use include: low cost, size and ease of handling, maturation of bone tissue in a short period of time, bone density similar to that of humans, considerable amount of data previously existing in the literature and the possibility of creating multiple defects, allowing the evaluation of different treatments in the same animal and reducing risk of errors in the analyzes (Wang *et al.*, 1998; Pearce *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2009; Pripatnanont *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2015). Another advantage of this experimental model is to be able to harvest the entire region of interest, which facilitates its evaluation through various techniques and processes.

In this context, microcomputed tomography (micro-CT) has been increasingly used in preclinical studies, because it is a non-destructive technique that allows obtaining high resolution three-dimensional images, and information to assessing the microstructure of the biomaterial and bone tissue, as well as quantifying the relative and total volume of the region of interest (Chappard *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2013; Peyrin *et al.*, 2014). In addition, Micro-CT correlated to conventional histological technique can bring interesting findings for the evaluation of craniofacial reconstructions such as MSA and treatment of bone defects with the use of biomaterials.

Given the above, the general aim of this study is to evaluate the potential effects of different biomaterials for craniofacial reconstructions such as large bone defects and bone

---

---

augmentation in posterior maxilla by MSA technique. Using rabbit experimental model, the microtomographical and histological evaluations were performed for the purpose of to understand the possible contribution of each treatment/material to bone formation and bone augmentation.

Specifically, the article 1 (in submission) presents the results of investigation of three bone substitutes materials of calcium phosphate-based ceramics in rabbit maxillary sinus augmentation (MSA). Thus, microtomographic, histomorphometric and immunohistochemical for TRAP labeling analyzes were performed to evaluate the bone formation and maintenance of gained bone volume throughout the experimental periods.

The article 2 (in preparation) presents findings in rabbit cranial defect repair model using the angiogenic fraction F1 obtained from latex and carried to the hyaluronic acid hydrogel (HAH) and deproteinized bovine bone (DBB) in order to verify the capacity of different treatments to stimulate bone formation and osteoconduction capacity by microtomographic and histomorphometric analyzes.



## **4 CONCLUSIONS**

---

---



## 4 CONCLUSIONS

In conclusion, this study originally demonstrated that:

- cDBB, sDBB and pBCP granules are good osteoconductive materials favoring the bone growth in their surface. The slow resorption of these materials could be an advantage in that it helps in keeping the dimensions of the MSA (article 1).
  - Although no reduction of sDBB and pBCP was observed along of 8 weeks of MSA, both materials stimulate an initial increase of number of TRAP+ cells compared to cDBB in MSA technique (article 1).
  - Porous DBB block-shaped plus HAH is biocompatible and good osteoconductive material for treatment of bone large defects in cranial region and its association with F1 is able to improve the bone formation in the early repair phase (article 2).
  - The treatment of bone large defects in cranial region only with HAH or HAH plus F1 results in fibrous connective tissue formation and surrounding soft tissues collapse into the defect (article 2).
- 
-



## **REFERENCES**

---

---



---

---

**REFERENCES<sup>‡</sup>**

ABDULGHANI, S.; MITCHELL, G. R. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, Nov 19 2019. ISSN 2218-273X (Electronic) 2218-273X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31752393> >.

ACCORSI-MENDONCA, T. et al. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Braz Oral Res**, v. 22, n. 1, p. 5-10, Jan-Mar 2008. ISSN 1807-3107 (Electronic) 1806-8324 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425238> >.

ALMUBARAK, S. et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. **Bone**, v. 83, p. 197-209, Feb 2016. ISSN 1873-2763 (Electronic) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26608518> >.

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Crit Rev Biomed Eng**, v. 40, n. 5, p. 363-408, 2012. ISSN 0278-940X (Print) 0278-940X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339648> >.

BIGHAM-SADEGH, A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. **Connective Tissue Research**, v. 56, n. 3, p. 175-195, 2015. ISSN 03008207.

BRUNELLO, G. et al. The Impact of Bioceramic Scaffolds on Bone Regeneration in Preclinical In Vivo Studies: A Systematic Review. **Materials (Basel)**, v. 13, n. 7, Mar 25 2020. ISSN 1996-1944 (Print) 1996-1944 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32218290> >.

CALASANS-MAIA, M. D. et al. Comparative histological evaluation of tibial bone repair in rabbits treated with xenografts. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 340-343, 2009. ISSN 1413-7852. Disponível em: < <http://www.scielo.br/aob> >.

CALASANS-MAIA, M. D. et al. Maxillary Sinus Augmentation with a New Xenograft: A Randomized Controlled Clinical Trial. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 17 Suppl 2, p. e586-

---

<sup>‡</sup> References in accordance with the standard: NBR 6023 - Information and Documentation - References - ABNT.

---

---

93, Oct 2015. ISSN 1708-8208 (Electronic) 1523-0899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25535980> >.

CESTARI, T. M. et al. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 4, p. 340-50, Apr 2009. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19298288> >.

CHAPPARD, D. et al. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. **Micron**, v. 41, n. 4, p. 321-6, Jun 2010. ISSN 1878-4291 (Electronic) 0968-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060730> >.

COELHO, P. G. et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 88, n. 2, p. 579-96, Feb 2009. ISSN 1552-4981 (Electronic) 1552-4973 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973274> >.

CORDARO, L. et al. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 8, p. 796-803, Aug 2008. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18705811> >.

CUI, Q.; DIGHE, A. S.; IRVINE, J. N., JR. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery for bone regenerative engineering. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 19, p. 3374-83, 2013. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432677> >.

DELGADO-RUIZ, R. A.; CALVO GUIRADO, J. L.; ROMANOS, G. E. Bone grafting materials in critical defects in rabbit calvariae. A systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. **Clin Oral Implants Res**, v. 29, n. 6, p. 620-634, Jun 2018. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25996344> >.

DENRY, I.; KUHN, L. T. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Dent Mater**, v. 32, n. 1, p. 43-53, Jan 2016. ISSN 1879-0097 (Electronic) 0109-5641 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26423007> >.

---

---



---

---

DIAS, F. J. et al. Growth factors expression and ultrastructural morphology after application of low-level laser and natural latex protein on a sciatic nerve crush-type injury. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210211, 2019. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30625210> >.

ESPOSITO, M.; FELICE, P.; WORTHINGTON, H. V. Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 5, p. CD008397, 2014. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825543> >.

EZIRGANLI, S. et al. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 12, p. 1482-8, Dec 2015. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264123> >.

FIENITZ, T. et al. Histological and radiological evaluation of sintered and non-sintered deproteinized bovine bone substitute materials in sinus augmentation procedures. A prospective, randomized-controlled, clinical multicenter study. **Clin Oral Investig**, v. 21, n. 3, p. 787-794, Apr 2017. ISSN 1436-3771 (Electronic) 1432-6981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27129584> >.

GINEBRA, M. P. et al. Bioceramics and bone healing. **EFORT Open Rev**, v. 3, n. 5, p. 173-183, May 2018. ISSN 2058-5241 (Print) 2058-5241 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29951254> >.

GREENWALD, A. S. et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. **J Bone Joint Surg Am**, v. 83-A Suppl 2 Pt 2, p. 98-103, 2001. ISSN 0021-9355 (Print) 0021-9355 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11712842> >.

HARRIS, G. M. et al. Strategies to direct angiogenesis within scaffolds for bone tissue engineering. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 19, p. 3456-65, 2013. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432671> >.

HOLTZCLAW, D. et al. The safety of bone allografts used in dentistry - A review. **Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 9, p. 1192-1199, Sep 2008. ISSN 0002-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259241900012 >.

IEZZI, G. et al. Comparative histological results of different biomaterials used in sinus augmentation procedures: a human study at 6 months. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 12,

---

---

p. 1369-76, Dec 2012. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092377> >.

ISSA, J. P. et al. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. **Clin Oral Implants Res**, v. 27, n. 5, p. 558-66, May 2016. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260954> >.

JANICKI, P.; SCHMIDMAIER, G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. **Injury**, v. 42 Suppl 2, p. S77-81, Sep 2011. ISSN 1879-0267 (Electronic) 0020-1383 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724186> >.

JENSEN, S. S. et al. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 90, n. 1, p. 171-81, Jul 2009. ISSN 1552-4981 (Electronic) 1552-4973 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19085941> >.

JENSEN, S. S.; TERHEYDEN, H. Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24 Suppl, p. 218-36, 2009. ISSN 0882-2786 (Print) 0882-2786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885447> >.

JENSEN, T. et al. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 1, p. 114-20, Jan 2012a. ISSN 1399-0020 (Electronic) 0901-5027 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000958> >.

\_\_\_\_\_. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 3, p. 263-73, Mar 2012b. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443592> >.

JEONG, J. et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. **Biomater Res**, v. 23, p. 4, 2019. ISSN 1226-4601 (Print) 1226-4601 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30675377> >.

---

---

JUN, S. H. et al. A prospective study on the effectiveness of newly developed autogenous tooth bone graft material for sinus bone graft procedure. **J Adv Prosthodont**, v. 6, n. 6, p. 528-38, Dec 2014. ISSN 2005-7806 (Print) 2005-7806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25551014> >.

KIM, S. K. et al. Comparative study of BMP-2 alone and combined with VEGF carried by hydrogel for maxillary alveolar bone regeneration. **Tissue Eng Regen Med**, v. 13, n. 2, p. 171-181, Apr 2016. ISSN 2212-5469 (Electronic) 1738-2696 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30603397> >.

KLIJN, R. J. et al. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 16, n. 5, p. 493-507, Oct 2010. ISSN 1937-3376 (Electronic) 1937-3368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334505> >.

KOLERMAN, R. et al. Histomorphometric analysis of newly formed bone after bilateral maxillary sinus augmentation using two different osteoconductive materials and internal collagen membrane. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 32, n. 1, p. e21-8, Feb 2012. ISSN 1945-3388 (Electronic) 0198-7569 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254231> >.

LAMBERT, F. et al. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 5, p. 538-45, May 2011. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198906> >.

LAMBERT, F. et al. The effect of collagenated space filling materials in sinus bone augmentation: a study in rabbits. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 5, p. 505-11, May 2013. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22313247> >.

LEE, D. Z.; CHEN, S. T.; DARBY, I. B. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, n. 8, p. 918-24, Aug 2012. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21707754> >.

LEGEROS, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. **Chem Rev**, v. 108, n. 11, p. 4742-53, Nov 2008. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006399> >.

---

LI, Y. et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. **J Orthop Translat**, v. 3, n. 3, p. 95-104, Jul 2015. ISSN 2214-031X (Print) 2214-031X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30035046> >.

LIM, H. C. et al. In Vivo Comparative Investigation of Three Synthetic Graft Materials with Varying Compositions Processed Using Different Methods. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 30, n. 6, p. 1280-6, Nov-Dec 2015. ISSN 1942-4434 (Electronic) 0882-2786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574853> >.

LIM, H. C. et al. Effect of different hydroxyapatite:beta-tricalcium phosphate ratios on the osteoconductivity of biphasic calcium phosphate in the rabbit sinus model. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 30, n. 1, p. 65-72, Jan-Feb 2015. ISSN 1942-4434 (Electronic) 0882-2786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25265122> >.

LUTZ, R. et al. Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 6, p. 644-8, Jun 2015. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25906198> >.

MANFRO, R. et al. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. **J Maxillofac Oral Surg**, v. 13, n. 4, p. 464-70, Dec 2014. ISSN 0972-8279 (Print) 0972-8270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26225012> >.

MATASSI, F. et al. New biomaterials for bone regeneration. **Clin Cases Miner Bone Metab**, v. 8, n. 1, p. 21-4, Jan 2011. ISSN 1971-3266 (Electronic) 1724-8914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461799> >.

MOON, J. W. et al. Comparison of two kinds of bovine bone in maxillary sinus augmentation: a histomorphometric study. **Implant Dent**, v. 24, n. 1, p. 19-24, Feb 2015. ISSN 1538-2982 (Electronic) 1056-6163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621547> >.

MORDENFELD, A.; LINDGREN, C.; HALLMAN, M. Sinus Floor Augmentation Using Straumann(R) BoneCeramic and Bio-Oss(R) in a Split Mouth Design and Later Placement of Implants: A 5-Year Report from a Longitudinal Study. **Clin Implant Dent Relat Res**, Sep 10 2015. ISSN 1708-8208 (Electronic) 1523-0899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26358740> >.

---

---

MUSCHLER, G. F. et al. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 16, n. 1, p. 123-45, Feb 2010. ISSN 1937-3376 (Electronic) 1937-3368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891542> >.

NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. **J Biomater Appl**, v. 26, n. 4, p. 383-417, Nov 2011. ISSN 1530-8022 (Electronic) 0885-3282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21926148> >.

NEYT, J.; BUCKWALTER, J. A.; CARROLL, N. Use of animal models in musculoskeletal research. **The Iowa orthopaedic journal**, v. 18, p. 118, 1998.

NGUYEN, H.; MORGAN, D. A.; FORWOOD, M. R. Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? **Cell Tissue Bank**, v. 8, n. 2, p. 81-91, 2007. ISSN 1389-9333 (Print) 1389-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16821106> >.

NKENKE, E.; NEUKAM, F. W. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. **Eur J Oral Implantol**, v. 7 Suppl 2, p. S203-17, Summer 2014. ISSN 1756-2406 (Print) 1756-2406 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24977256> >.

NKENKE, E.; STELZLE, F. Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20 Suppl 4, p. 124-33, Sep 2009. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19663959> >.

OH, J. S. et al. A Comparative Study with Biphasic Calcium Phosphate to Deproteinized Bovine Bone in Maxillary Sinus Augmentation: A Prospective Randomized and Controlled Clinical Trial. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 34, n. 1, p. 233-242, January/February 2019. ISSN 1942-4434 (Electronic) 0882-2786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30521656> >.

OZDEMIR, H. et al. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. **Arch Oral Biol**, v. 58, n. 5, p. 537-44, May 2013. ISSN 1879-1506 (Electronic) 0003-9969 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141995> >.

---

PAINI, S. et al. Concentration-dependent effects of latex F1-protein fraction incorporated into deproteinized bovine bone and biphasic calcium phosphate on the repair of critical-size bone defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, May 2020. DOI: 10.1002/jbm.b.34664. (In press)

PAPAGEORGIU, S. N. et al. Comparative effectiveness of natural and synthetic bone grafts in oral and maxillofacial surgery prior to insertion of dental implants: Systematic review and network meta-analysis of parallel and cluster randomized controlled trials. **J Dent**, v. 48, p. 1-8, May 2016. ISSN 1879-176X (Electronic) 0300-5712 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27012858> >.

PEARCE, A. I. et al. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **Eur Cell Mater**, v. 13, p. 1-10, 2007. ISSN 1473-2262 (Electronic) 1473-2262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17334975> >.

PERIC, M. et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. **Bone**, v. 70, p. 73-86, Jan 2015. ISSN 1873-2763 (Electronic) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25029375> >.

PETROVIC, V. et al. Craniofacial bone tissue engineering. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 114, n. 3, p. e1-9, Sep 2012. ISSN 2212-4411 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22862985> >.

PEYRIN, F. et al. Micro- and nano-CT for the study of bone ultrastructure. **Curr Osteoporos Rep**, v. 12, n. 4, p. 465-74, Dec 2014. ISSN 1544-2241 (Electronic) 1544-1873 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25292366> >.

PILIPCHUK, S. P. et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. **Dent Mater**, v. 31, n. 4, p. 317-38, Apr 2015. ISSN 1879-0097 (Electronic) 0109-5641 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701146> >.

PRIPATNANONT, P.; NUNTANARANONT, T.; VONGVATCHARANON, S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 4, p. 356-62, Apr 2009. ISSN 1399-0020 (Electronic) 0901-5027 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19278833> >.

RH OWEN, G.; DARD, M.; LARJAVA, H. Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. **J Biomed**

---

---

---

---

**Mater Res B Appl Biomater**, v. 106, n. 6, p. 2493-2512, Aug 2018. ISSN 1552-4981 (Electronic) 1552-4973 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29266701> >.

ROBERTS, W. E. et al. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. **Am J Orthod**, v. 86, n. 2, p. 95-111, Aug 1984. ISSN 0002-9416 (Print) 0002-9416 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6589962> >.

ROCHA, C. A. **Avaliação comparativa da neoformação óssea após enxertia de HA/TCPP, Bio-Oss e osso autógeno associados ou não ao PRP em cirurgias de levantamento de seio maxilar de coelhos** 2015. 158 Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru

ROCHA, F. S. et al. Bovine anorganic bone graft associated with platelet-rich plasma: histologic analysis in rabbit calvaria. **J Oral Implantol**, v. 37, n. 5, p. 511-8, Oct 2011. ISSN 0160-6972 (Print) 0160-6972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553125> >.

SALAI, M. et al. The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: a microbiological, histological and mechanical study. **Cell Tissue Bank**, v. 1, n. 1, p. 69-73, 2000. ISSN 1573-6814 (Electronic) 1389-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15256969> >.

SAMAVEDI, S.; WHITTINGTON, A. R.; GOLDSTEIN, A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. **Acta Biomater**, v. 9, n. 9, p. 8037-45, Sep 2013. ISSN 1878-7568 (Electronic) 1742-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791671> >.

SANTOS, P. S. et al. Osteoinductive porous biphasic calcium phosphate ceramic as an alternative to autogenous bone grafting in the treatment of mandibular bone critical-size defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 106, n. 4, p. 1546-1557, May 2018. ISSN 1552-4981 (Electronic) 1552-4973 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28755493> >.

SAUERBIER, S. et al. Bone marrow concentrate and bovine bone mineral for sinus floor augmentation: a controlled, randomized, single-blinded clinical and histological trial--per-protocol analysis. **Tissue Eng Part A**, v. 17, n. 17-18, p. 2187-97, Sep 2011. ISSN 1937-335X (Electronic) 1937-3341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529247> >.

---

---



SBORDONE, L. et al. Apical and marginal bone alterations around implants in maxillary sinus augmentation grafted with autogenous bone or bovine bone material and simultaneous or delayed dental implant positioning. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 5, p. 485-91, May 2011. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087315> >.

SHARMA, S. et al. Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 1, p. 309-15, Jan 2014. ISSN 2249-782X (Print) 0973-709X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596804> >.

SOHN, J. Y. et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. **J Periodontal Implant Sci**, v. 40, n. 4, p. 180-7, Aug 2010. ISSN 2093-2286 (Electronic) 2093-2278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20827327> >.

STACCHI, C. et al. Histologic and Histomorphometric Comparison between Sintered Nanohydroxyapatite and Anorganic Bovine Xenograft in Maxillary Sinus Grafting: A Split-Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 9489825, 2017. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28845435> >.

WANG, X.; MABREY, J. D.; AGRAWAL, C. M. An interspecies comparison of bone fracture properties. **Biomed Mater Eng**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 1998. ISSN 0959-2989 (Print) 0959-2989 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9713681> >.

WARD, B. B.; BROWN, S. E.; KREBSBACH, P. H. Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies. **Oral Dis**, v. 16, n. 8, p. 709-16, Nov 2010. ISSN 1601-0825 (Electronic) 1354-523X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534013> >.

WERNIKE, E. et al. Vegf Incorporated into Calcium Phosphate Ceramics Promotes Vascularisation and Bone Formation in Vivo. **European Cells & Materials**, v. 19, p. 30-40, Jan-Jun 2010. ISSN 1473-2262. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278752500001 >.

XU, H. et al. Grafting of deproteinized bone particles inhibits bone resorption after maxillary sinus floor elevation. **Clin Oral Implants Res**, v. 15, n. 1, p. 126-33, Feb 2004. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731186> >.

---

---



YILDIRIM, M. et al. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. **Clin Oral Implants Res**, v. 11, n. 3, p. 217-29, Jun 2000. ISSN 0905-7161 (Print) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168213> >.

YIP, I. et al. Defect healing with various bone substitutes. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 5, p. 606-14, May 2015. ISSN 1600-0501 (Electronic) 0905-7161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24702244> >.

ZHANG, L. et al. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. **Acta Biomater**, v. 84, p. 16-33, Jan 15 2019. ISSN 1878-7568 (Electronic) 1742-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30481607> >.

ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**, v. 42 Suppl 2, p. S16-21, Sep 2011. ISSN 1879-0267 (Electronic) 0020-1383 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889142> >.

---



# **ANNEXES**

---

---



## Annex 1: Confirmation of submission of Article 1

Successfully received: submission MAXILLARY SINUS AUGMENTATION USING DIFFERENT CALCIUM PHOSPHATE-BASED CERAMICS: A MICROTOMOGRAPHIC, HISTOMORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY for Materials Science & Engineering C

---

De: Materials Science & Engineering C (evisesupport@elsevier.com)

Para: santos\_ps@yahoo.com.br

Data: segunda-feira, 16 de março de 2020 09:27 BRT

---

*This message was sent automatically.*

Ref: MSEC\_2020\_1036

Title: MAXILLARY SINUS AUGMENTATION USING DIFFERENT CALCIUM PHOSPHATE-BASED CERAMICS: A MICROTOMOGRAPHIC, HISTOMORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Journal: Materials Science & Engineering C

Dear Ms. Santos,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Materials Science & Engineering C. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=MSEC](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MSEC) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Please note that we are currently handling a high volume of submissions and will assess your manuscript as soon as possible.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Materials Science & Engineering C

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

---

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#).

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

---

**Annex 2: Approval of Animal Ethical Committee (Article 1) – (CEEPA Process n. 028/2013)**



**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru**

**Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais**



**CEEPA-Proc. Nº 028/2013**

Bauru, 12 de agosto de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Levantamento de seio maxilar bilateral em coelhos utilizando diferentes biomateriais cerâmicos a base de fosfato de cálcio. Avaliação microtomográfica e histomorfométrica**, de autoria de Paula Sanches dos Santos, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO “ad referendum” desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet,  
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

**Prof. Dr. Rumio Taga**

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

**Annex 3: Approval of Animal Ethical Committee (Article 2) – (CEEPA Process n. 027/2013)****Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais****CEEPA-Proc. Nº 027/2013**

Bauru, 12 de agosto de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Reparo de defeitos ósseos no crânio de coelhos tratados com a proteína angiogênica F1 obtida do látex associada ao ácido hialurônico e ao GenOx Inorg®. Análise por microtomografia de raio-X e histomorfométrica**, de autoria de Tania Mary Cestari, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO "ad referendum" desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet,  
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

**Prof. Dr. Rumio Taga**  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas



**Annex 4: Approval of the report of Animal Ethical Committee (Article 2) – (CEEPA Process n. 027/2013)**



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru



### CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que a proposta intitulada "*Reparo de defeitos ósseos no crânio de coelhos tratados com a proteína angiogênica F1 obtida do látex associada ao ácido hialurônico e ao GenOx Inorg®. Análise por microtomografia de raio-X e histomorfométrica*", registrada sob nº CEEPA Proc. nº 027/2013, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rumio Taga, que envolveu a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** em reunião ordinária da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, realizada no dia 14 de março de 2017.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	Agosto/2013 a Agosto/2014
<b>Espécie/Linhagem</b>	Coelho / <i>Oryctolagus cuniculus</i>
<b>Nº de animais</b>	N=30
<b>Peso/Idade</b>	4 kg/5 meses
<b>Sexo</b>	Machos
<b>Origem</b>	Biotério de Criação ANILAB/Paulínia, SP

21 de março de 2017.

\_\_\_\_\_

Data



Profª Drª Ana Paula Campanelli  
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais



**CEEPA**  
Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais



**Annex 5: Approval of Animal Ethical Committee (Article 2) – (CEEPA Process n. 003/2017)**



**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru**

**Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em  
Animais**

**CEEPA-Proc. Nº 003/2017.**

Bauru, 5 de maio de 2017.

Senhor Professor,

Informamos que Projeto de Pesquisa denominado "**Avaliação microtomográfica, histomorfométrica e imunistoquímica do efeito in vivo da fração F1 do látex (*Hevea brasiliensis*) carreada ao hidrogel de ácido hialurônico adsorvidos ao osso desproteínizado bovino no processo de reparo ósseo**" tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais (logomorfos), para fins de pesquisa científica, 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), foi analisado e considerado APROVADO em reunião ordinária da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), realizada nesta data.

Vigência do projeto:	Maio/2017 a Junho/2020
Espécie/Linhagem:	Amostras biológicas (crânio de coelhos incluídos em Histosec-Merck) provenientes do protocolo CEEPA 027/2013
Nº de animais:	Não se aplica
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo:	Não se aplica
Origem:	Não se aplica

Esta CEEPA solicita que ao final da pesquisa seja enviado um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

  
Profª Drª Ana Paula Campanelli

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

**Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis**  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas