

Atendendo a solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese/dissertação
será disponibilizado somente a partir de
29/07/2024.

At the author's request, the full text of
this thesis/dissertation will not be
available until Jul 29, 2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

KAUÊ ALBERTO PEREIRA

**FIBRA DE CARBONO EM DEFEITOS ÓSSEOS DE TAMANHO
CRÍTICO: estudo *in vivo* em ratos**

KAUÊ ALBERTO PEREIRA

**FIBRA DE CARBONO EM DEFEITOS ÓSSEOS DE TAMANHO CRÍTICO: estudo
in vivo em ratos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Periodontia. Linha de pesquisa: Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Carvalho De Marco

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Pereira, Kauê Alberto

Fibra de carbono em defeitos ósseos de tamanho crítico: estudo in vivo em ratos / Kauê Alberto Pereira. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Andrea Carvalho De Marco.

1. Fibra de Carbono. 2. Regeneração óssea. 3. Materiais biocompatíveis. 4. Engenharia tecidual. I. De Marco, Andrea Carvalho, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Andréa Carvalho De Marco (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista - Unesp

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Claudemir de Carvalho

Centro Universitário Funvic (Unifunvic)

Pindamonhangaba

São José dos Campos, 29 de julho de 2022.

DEDICATÓRIA

Á Deus por não ter me abandonado em nenhum momento, pelas bênçãos, glórias, e suporte nos momentos difíceis, assim como pela força para acreditar no caminho que Ele me ajudou a traçar, e por ter permitido chegar até aqui e alcançar todos os meus sonhos e objetivos.

Aos meus pais Magnus e Kelly pelo suporte e incentivo constante, pelo carinho e paciência. Se hoje estou aqui é devido a tudo o que me ensinaram, vocês são meu maior exemplo de vida, não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

A minha irmã Beatriz pelo incentivo e conselhos, aprendo muito com você e saiba que muita coisa que me disse me ajudou a chegar até aqui e a acreditar em mim mesmo.

A minha namorada Nathalia por ser minha maior companheira de vida e uma inspiração para mim. Sem seu apoio nada disso teria sido possível, você nunca me deixou abaixar a guarda e sempre estive ao meu lado quando eu mais precisei, seja para celebrar algo ou apenas ouvir minhas reclamações. Essa conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Ciência e Tecnologia - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dra. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof.Dr. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Aos meus amigos da Pós-graduação, pelo companheirismo e ajuda diária.

À Clarissa Carvalho Martins Maciel, Letícia Cavassini Torquato, Eduardo Antônio Chelin Suarez, Camilla Magnoni Moretto, Ludmilla Oliveira Mantovani, Vitor Galdino Pantoja Torres, e Juliani Caroline Ribeiro de Araújo Souto por participarem ativamente deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado, pelos processos nº 88887.475133/2020-00 e 88887.529145/2020-00 no período de 01/02/2020 a 28/02/2022.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica aos estudantes de Ensino Médio (PIBIC Jr), pela concessão de bolsa ao Vitor Galdino Pantoja Torres no ano de 2022.

À equipe técnica da clínica, Jacqueline Amaral Gomes Bueno, Marcia Cristina Lopes Garcia e Valeria Santos da Silva, pela ajuda e dedicação.

À minha orientadora Prof. Dra. Andréa Carvalho De Marco pelo carinho, empatia, paciência, compreensão e companheirismo nesse tempo de trabalho.

Aos animais deste estudo por doarem suas vidas em prol da ciência. Fizemos de tudo para honrá-los, respeitá-los e para que todo o sacrifício de vocês não fosse em vão.

“Como seres humanos, nossa grandeza não está tanto em ser capaz de refazer o mundo..., mas em ser capaz de refazer a nós mesmos.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Preparação da fibra de carbono e ativação.....	16
3.2 Modelo experimental <i>in vivo</i>	18
3.3 Cálculo Amostral	20
3.4 Procedimento Cirúrgico.....	21
3.5 Avaliação por microtomografia computadorizada tridimensional	22
3.6 Processamento histológico.....	24
3.7 Análise Histomorfométrica.....	25
3.8 Análise Estatística.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Análise descritiva histológica e da Micro-CT.....	28
4.2 Resultado da MicroCT.....	30
4.3 Análise Histomorfométrica	37
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE	53
ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquematização do forno tubular elétrico onde será inserido a porta amostra contendo a matéria prima que passará pelo processo de carbonização e ativação. 16	
Figura 2 – Análise microscópica do FFCA 17	17
Figura 3 – Análise microscópica do FFCAAg 18	18
Figura 4 - Fluxograma dos animais em grupos e subgrupos..... 20	20
Figura 5 – Imagens após a realização dos defeitos e inserção dos biomateriais 22	22
Figura 6 – Linha do tempo dos procedimentos experimentais 22	22
Figura 7 - microtomógrafo SkyScan 1172 (Kontich, Bélgica) usado para a realização das microtomografias 24	24
Figura 8 - Espécimes do período de 15 dias; fotomicrografias da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original de X2,5) .. 29	29
Figura 9 - Espécimes do período de 60 dias; fotomicrografias da visão panorâmica do defeito cirúrgico (coloração por hematoxilina e eosina, aumento original de X2,5) .. 30	30
Figura 10 – Imagens da metodologia de reconstrução das calvárias após a microCT 31	31
Figura 11 – Delimitação das áreas de interesse na reconstrução das calvárias após análise por microCT 32	32
Figura 12 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando Volume ósseo (BV)..... 34	34

Figura 13 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando volume total tecidual (<i>TV</i>)	35
Figura 14 - Dados obtidos por MicroCT para os grupos de 15 e 60 dias, avaliando volume ósseo/fração de volume ósseo (<i>BV/TV</i>)	36
Figura 15 - Dados obtidos por MicroCT para os períodos de 15 e 60 dias, avaliando número de trabéculas (<i>Tb.N</i>)	37
Figura 16 – Média e desvio padrão da Área total do defeito (<i>AT</i>) em mm ²	40
Figura 17 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação óssea (<i>AN</i>) em %	40
Figura 18 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação Lamelar (<i>ANL</i>) em %	41
Figura 19 - Média e desvio padrão da Área de Neoformação Intramembranosa (<i>ANI</i>) em %	41
Figura 20 - Média e desvio padrão da Medida Central Linear (<i>MCL</i>) em mm	42

Pereira KA. Fibra de carbono em defeitos ósseos de tamanho crítico: estudo in vivo em ratos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

RESUMO

Materiais a base de carbono têm sido utilizado em várias áreas como química, engenharia, ciência dos materiais, ciências biomédicas, entre outras. Além disso, por serem quimicamente estáveis, mecanicamente fortes, acessíveis economicamente, e biologicamente compatíveis, chamaram a atenção como material de arcabouço para a engenharia tecidual óssea. Assim, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a fibra de carbono obtida a partir de fibra PAN têxtil, nas suas diferentes formas, com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial enxerto ósseo sintético. Foram utilizados 34 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*), e realizados dois defeitos ósseos críticos na calvária de cada animal com 5 mm de diâmetro. Vinte e quatro animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Defeito ósseo + coágulo sanguíneo, Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Não Ativado (FFCNA), Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Ativado (FFCA), Defeito ósseo + Feltro Fibra de Carbono Ativado com Prata (FFCAAg), e foram observados por períodos distintos de 15 e 60 dias para análise histomorfométrica e micro CT. Dez animais foram divididos aleatoriamente nos mesmos 4 grupos para aplicação de marcadores fluorocromáticos e análise de aposição mineral (em andamento). Após o período de observação dos subgrupos, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestesia geral. Em seguida, as calvárias foram removidas para as análises. Na avaliação dos dois períodos (15 e 60 dias), o FFCNA mostrou-se melhor para os parâmetros de Área de Neoformação óssea, Área de Neoformação Lamelar e Área de Neoformação Intramembranosa. Em 60 dias, o grupo FFCNA apresentou maior volume ósseo, volume tecidual e maior número de trabéculas, mostrando-se um material sintético promissor como *scaffold* para regeneração óssea.

Palavras-chave: Fibra de Carbono. Regeneração óssea. Materiais biocompatíveis. Engenharia tecidual.

Pereira KA. Carbon fiber in critical size bone defects: an in vivo study in rats [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

ABSTRACT

*Carbon based materials have been used in some areas like chemistry, engineering, materials science, biomedical science, among others. In addition, because they are chemically stables, mechanically strong, economically accessible, and biologically compatible, they have drawn attention as a scaffold material for bone tissue engineering. Thus, the present study had a main objective to evaluate the carbon fiber obtained from textile PAN fiber, in its different forms, as a scaffold's potential synthetic bone. Thirty-four adult rats were used (*Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar), and two critical bone defects were made with 5mm in diameter. Twenty for animals was randomly divided in 4 groups: Bone defect + blood clot; Bone defect + Unactivated Carbon Fiber Felt (FFCNA); Bone defect + Activated Carbon Fiber Felt (FFCA); Bone defect + Carbon Fiber Felt Activated with Silver (FFCAAg), and was observed for different periods of 15 and 60 days for histomorphometrical analysis and micro CT. Ten animals were randomly divided in the same four groups for application of fluorochromatic markers and mineral apposition analysis (in progress). After the observation period of the subgroups, the animals were euthanized by general anesthesia overdose. Then, the calvarias were removed for the analysis. In the evaluation of the two periods (15 and 60 days), the FFCNA was better for the parameters of Bone Neoformation Area, Lamellar Neoformation Area and Intramembranous Neoformation Area. In 60 days, the FFCNA group presented higher bone volume, tissue volume and higher number of trabeculae, showing a promising synthetic material as scaffold for bone regeneration.*

Keywords: Carbon Fiber. Bone regeneration. Biocompatible materials. Tissue engineering.

1 INTRODUÇÃO

O osso é uma estrutura hierarquicamente organizada, que realiza as principais funções fisiológicas e estruturais, desempenhando assim, um importante papel nos seres vertebrados, porém, pode facilmente ser comprometido (Olszta et al., 2007). No entanto, microfraturas podem ser curadas sem que haja a percepção do indivíduo, devido a capacidade de autocura do osso (Peng et al., 2020). Entretanto, em se tratando de defeitos de larga escala, não ocorrerá a reparação completa da fratura (Schemitsch, 2017). Os defeitos ósseos têm etiologia variada. Alguns fatores podem estar associados, tais como: periodontite, conhecida como o principal fator etiológico da perda óssea alveolar, além de trauma, tumores, reabsorção pós extração dentária, osteomielite, e medicamentos que podem causar necrose do osso mandibular (Tüz et al., 2019). Os defeitos de tamanho crítico não têm uma única definição, mas no geral, podem ser considerados defeitos que apesar da estabilização cirúrgica, não reparam espontaneamente e requerem intervenção cirúrgica adicional, como enxertos ósseos (Keating et al., 2005).

O osso autógeno tem sido reconhecido como o padrão-ouro para o enxerto ósseo, fornecendo células osteogênicas, matriz extracelular, e sinais moleculares para a indução e diferenciação óssea (Khouri et al., 1996; Springfield, 1992). As vantagens dos enxertos autógenos são: osteocondução, osteoindução e efeitos osteogênicos que promovem elevado potencial regenerativo (Klijn et al., 2010). Porém, a remoção de enxertos autógenos implica em um segundo sítio cirúrgico doador e aumenta a morbidade do paciente (Chaushu et al., 2009; Sbordone et al., 2009). Um dos enxertos que apresenta o melhor resultado, juntamente com uma boa documentação clínica, é o xenoenxerto Bio-Oss®, que é uma matriz mineral óssea de origem natural, porosa e bovina, que oferece excelente compatibilidade com a matriz óssea humana, e estimula a osteogênese devido à compatibilidade que oferece. E deve-se notar que o osso criado pelo enxerto Bio-Oss® não é reabsorvível (Li et al., 2017; Oliveira et al., 2015). Sendo assim, algumas estratégias alternativas, como os substitutos ósseos, utilizando engenharia tecidual podem ser utilizados para a reconstrução óssea.

Engenharia tecidual é a combinação do uso de materiais e células para substituir o tecido biológico ou melhorá-lo (Yu et al., 2018). Seu principal objetivo por meio da modelação de estruturas biológicas com a finalidade de construir órgãos artificiais, é superar a dificuldade dos transplantes existentes. Para fabricar arcabouços, os pesquisadores utilizam materiais sintéticos ou recursos naturais. Além disso, esses arcabouços não devem exacerbar a resposta imune, e a resposta inflamatória, e devem ser biocompatíveis. Ademais, da mesma maneira, é necessário compatibilidade com o ambiente encontrado no corpo do indivíduo e com seus tipos específicos de células (Gomes et al., 2017; Murdock, Badylak, 2017).

Vários biomateriais para engenharia tecidual óssea foram desenvolvidos, como o colágeno, hidroxiapatita (HA), e fosfatos tricálcicos, no entanto, eles são incapazes de atender a demanda clínica, tendo em vista que possuem rápida taxa de degradação, e propriedades mecânicas insuficientes (Van Der Stok et al., 2011). Materiais a base de carbono tem sido utilizado em várias áreas como química, engenharia, ciência dos materiais, ciências biomédicas, entre outras. Além disso, por serem quimicamente estáveis, mecanicamente fortes, acessíveis economicamente, e biologicamente compatíveis, esses materiais chamaram a atenção como material de arcabouço para a engenharia tecidual óssea (Peng et al., 2020). Para fornecer espaço para adesão e migração celular, além de formação tecidual, os arcabouços normalmente precisam de uma estrutura tridimensional (3D) (Correa-Duarte et al., 2004; Crowder et al., 2013). O grafite e o diamante são os materiais 3D a base de carbono mais conhecidos, porém eles não foram estudados como arcabouços de engenharia tecidual óssea devido a sua falta de poros. O que torna-se um fator importante, devido ao fato de que a estrutura deve conter uma certa quantidade de poros para ocorrer adesão e proliferação celular, e diferenciação osteogênica para funcionar como arcabouço na engenharia tecidual óssea (Roseti et al., 2017).

Comparado a outros tipos comuns de carbono, a fibra de carbono ativada (FCA) possui características especiais. Ela proporciona uma capacidade alta e rápida de adsorção para componentes específicos, como íons, metais ou componentes orgânicos, devido ao fato destes possuírem pequenas dimensões, e pelo fato da FCA ter estruturas de poros bem definidas (Botanni, Tascón, 2005; Marsh, Reinoso, 2000). Devido ao fato da estrutura desses poros e de sua arquitetura serem formados diretamente na superfície por uma grande quantidade de microporos, a FCA tem um

mecanismo de adsorção rápido e menos energético, principalmente para gases (Mochida et al., 2000). A obtenção da FCA é feita a partir de fibra PAN (polímero de poliacrilonitrila) têxtil que passa por processo de carbonização e ativação para a produção do feltro fibra carbono ativado (FFCA) (do Amaral Junior et al., 2017; Marcuzzo et al., 2016).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo principal avaliar a fibra de carbono obtida a partir de fibra PAN têxtil, nas suas diferentes formas de apresentação, com vistas à obtenção de *scaffolds* como potencial enxerto ósseo sintético.

6 CONCLUSÃO

Na avaliação dos dois períodos (15 e 60 dias), o FFCNA mostrou-se melhor para os parâmetros de Área de Neoformação óssea, Área de Neoformação Lamelar e Área de Neoformação Intramembranosa.

Em 60 dias, o grupo FFCNA apresentou maior volume ósseo, volume tecidual e maior número de trabéculas, mostrando-se um material sintético promissor como *scaffold* para regeneração óssea.

REFERÊNCIAS*

- Amaral Junior MA, Matsushima JT, Rezende MC, Gonçalves ES, Marcuzzo JS, Baldan MR. Production and characterization of activated carbon fiber from textile PAN Fiber. *J Aerosp Tec Manage*. 2017;9(4):423–30. doi: <https://doi.org/10.5028/jatm.v9i4.83>.
- Aroni MAT, Costa Neto PF, Oliveira GJPL, Marcantonio RAC, Marcantonio Junior E. Bone repair induced by different bone graft substitutes in critical-sized defects in rat calvaria. *Rev Odontol UNESP*. 2019;48:1–11. doi: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.04119>.
- Barbirato DS, Fogacci MF, Gusman H, Takiya C, Carvalho DP, Samsone C. Hydroxyapatite calvaria graft repair in experimental diabetes mellitus in rats. *J Craniomaxillofac Trauma*. 2018; 46 (9): 1576–85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.04.016>
- Botanni EJ, Tascón JMD. *Adsorption by Carbons*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2005. ISBN 9780080444642
- Bosco AF, Faleiros PL, Carmona LR, Garcia VG, Theodoro LH, de Araujo NJ, et al. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Oct; 163:303-10. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.040
- Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Apr;39(3):215-20. doi: 10.1016/j.jcms.2010.03.009. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20456964.
- Canè V, Zaffe D, Cavani F, Botti P, Soana S. PEMFs modulate the enzymatic activity during the bone repair process. *Bone* 1996;19(3):133. doi:10.1016/S8756-3282(96)90742-5.
- Chaushu G, Mardinger O, Calderon S, Moses O, Nissan J. The use of cancellous block allograft for sinus floor augmentation with simultaneous implant placement in the posterior atrophic maxilla. *J Periodontol*. 2009 Mar;80(3):422-8. doi: 10.1902/jop.2009.080451. PMID: 19254126

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Correa-Duarte MA, Wagner N, Rojas-Chapana J, Morsczech C, Thie M, Giersig M. Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth. *Nano Letters*. 2004;4(11):2233–6. doi:<https://doi.org/10.1021/nl048574f>

Crowder SW, Prasai D, Rath R, Balikov DA, Bae H, Bolotin KI, et al. Three-dimensional graphene foams promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nanoscale*. 2013 May 21;5(10):4171-6. doi: 10.1039/c3nr00803g. PMID: 23592029; PMCID: PMC3672224.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747-54. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80257-3. PMID: 9182762

Fan YP, Lu JF, Xu AT, He FM. Physio chemical characterization and biological effect of anorganic bovine bone matrix and organic-containing bovine bone matrix in comparison with Bio-Oss in rabbits. *J Biomater Appl*. 2018 Oct;33(4):566-75. doi: 10.1177/0885328218804926

Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J Phys Soc Japan* 1957;12:1158-62

Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, Fernandes LA, Gualberto Junior EC, Novaes VC, et al. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014 Oct;42(7):1196-202. doi: 10.1016/j.jcms.2014.02.008. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24657115.

Gaharwar AK, Mihaila SM, Swami A, Patel A, Sant S, Reis RL, et al. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Adv Mater*. 2013 Jun 25; 25(24):3329-36. doi: 10.1002/adma.201300584. Epub 2013 May 13. PMID: 23670944.

Gomes ME, Rodrigues MT, Domingues RMA, Reis RL. Tissue engineering and regenerative medicine: new trends and directions-a year in review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017 Jun;23(3):211-24. doi: 10.1089/ten.TEB.2017.0081. PMID: 28457175.

Guskuma MH, Hochuli-Vieira E, Pereira FP, Rangel-Garcia Junior I, Okamoto R, Okamoto T, et al. Bone regeneration in surgically created defects filled with autogenous bone: an epifluorescence microscopy analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2010 Jul-Aug;18(4):346-53. doi: 10.1590/s1678-77572010000400005. PMID: 20835568; PMCID: PMC5349066.

Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwardt JD, Chao EY. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *J Orthop Res*. 2002 Sep;20(5):1106-14. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00031-1. PMID: 12382979.

Keating JF, Simpson AH, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br.* 2005 Feb;87(2):142-50. doi: 10.1302/0301-620x.87b2.15874. PMID: 15736731.

Khoury RK, Brown DM, Koudsi B, Deune EG, Gilula LA, Cooley BC, et al. Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. *Plast Reconstr Surg.* 1996 Jul;98(1):103-9. doi: 10.1097/00006534-199607000-00017. PMID: 8657761.

Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. 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.* 2010 Oct;16(5):493-507. doi: 10.1089/ten.TEB.2010.0035. PMID: 20334505.

Li Y, Yang L, Zheng Z, Li Z, Deng T, Ren W, et al. Bio-Oss® modified by calcitonin gene-related peptide promotes osteogenesis in vitro. *Exp Ther Med.* 2017 Nov;14(5):4001-8. doi: 10.3892/etm.2017.5048. Epub 2017 Aug 28. PMID: 29067095; PMCID: PMC5647716.

Marcuzzo JS, Cuña A, Tancredi N, Mendez E, Bernardi HH. Microporus activated carbon fiber felt from Brazilian textile PAN fiber: preparation, characterization and application as super capacitor electrode. *Rev Bras Apl Vác.* 2016; 35(2):58–63. <https://doi.org/10.17563/rbav.v35i2.10>

Marsh H, Reinoso FR. *Sciences of carbon materials* 1st edition. Amsterdam: Elsevier Science; 2006. ISBN: 9780080444635

Messora MR, Nagata MJ, Mariano RC, Dornelles RC, Bomfim SR, Fucini SE, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res.* 2008 Apr;43(2):217-23. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01017.x. PMID: 18302625.

Mochida I, Korai Y, Shirahama M, Kawano S, Hada T, Seo Y, et al. Removal of SO_x and NO_x over activated carbon fibers. *Carbon.* 2000;38(2):227–39.

Murdock MH, Badylak SF. Biomaterials-based In situ tissue engineering. *Curr Opin Biomed Eng.* 2017 Mar 1;1:4-7. doi: 10.1016/j.cobme.2017.01.001. Epub 2017 Mar 22. PMID: 29038794; PMCID: PMC5640432.

Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messora MR, Bomfim SR, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B.* 2013 Apr 5;121:6-14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.013. Epub 2013 Feb 16. PMID: 23474527.

Namgung S, Kim T, Baik KY, Lee M, Nam JM, Hong S. Fibronectin-carbon-nanotube hybrid nanostructures for controlled cell growth. *Small.* 2011 Jan 3;7(1):56-61. doi:10.1002/smll.201001513. PMID: 21061404.

Nunes CMM, Ferreira CL, Bernardo DV, Oblack GB, Longo M, Santamaria MP, et al. The influence of LLLT applied on applied on calvarial defect in rats under effect of cigarette smoke. *J Appl Oral Sci.* 2019 Jun 13;27:e20180621. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0621. PMID: 31215599; PMCID: PMC6559756.

Oliveira MR, deC Silva A, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR Jr, Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015 May;44(5):649-55. doi: 10.1016/j.ijom.2014.12.005. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25553712.

Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater Sci Eng R: Reports.* 2007; 58 (3–5): 77–116. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>

Peng Z, Zhao T, Zhou Y, Li S, Li J, Leblanc RM. Bone tissue engineering via carbon-based nanomaterials. *Adv Healthc Mater.* 2020 Mar;9(5):e1901495. doi: 10.1002/adhm.201901495. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31976623.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410. PMID: 32663219; PMCID: PMC7360023.

Rasouli Ghahroudi AA, Rokn AR, Kalhori KA, Khorsand A, Pournabi A, Pinheiro AL, et al. Effect of low-level laser therapy irradiation and Bio-Oss graft material on the osteogenesis process in rabbit calvarium defects: a double blind experimental study. *Lasers Med Sci.* 2014 May;29(3):925-32. doi: 10.1007/s10103-013-1403-5. Epub 2013 Aug 31. PMID: 23996072.

Rodrigues AC, Da Silva EL, Quirino SF, Cuña A, Marcuzzo JS, Matsushima JT, et al. Ag@activated carbon felt composite as electrode for supercapacitors and a study of three different aqueous electrolytes. *Mater Res.* 2019;22(1):1–9. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2018-0530>.

Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C.* 2017;78:1246–62. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.

Russell W, Burch R. The principles of humane experimental technique. *Med J Austr.* 1959;1(13):500. doi: <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x> .05.017.

Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris G, Sbordone C, Guidetti F. Implant success in sinus-lifted maxillae and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Mar-Apr;24(2):316-24. PMID: 19492648.

Schemitsch EH. Size matters: defining critical in bone defect size! J Orthop Trauma. 2017 Oct;31 Suppl 5:S20-S22. doi: 10.1097/BOT.0000000000000978. PMID: 28938386.

Springfield DS. Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. Orthopedics. 1992;15(10):1237–41.

Tüz HH, Koç O, Meral SE, El AS. Reconstruction and implant-supported rehabilitation of an iatrogenically caused maxillary alveolar defect. Implant Dent. 2019 Oct;28(5):510-3. doi: 10.1097/ID.0000000000000910. PMID: 31135650.

Van der Stok J, Van Lieshout EM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review. Acta Biomater. 2011 Feb;7(2):739-50. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.035. Epub 2010 Aug 3. PMID: 20688196.

Yu L, Wu Y, Liu J, Li B, Ma B, Li Y, Huang Z, He Y, Wang H, Wu Z, Qiu G. 3D culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) could improve bone regeneration in 3d-printed porous Ti6Al4V Scaffolds. Stem Cells Int. 2018 Sep 5;2018:2074021. doi: 10.1155/2018/2074021. PMID: 30254680; PMCID: PMC6145055.