

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 18/01/2027

EDUARDO DALLAZEN

**Additive manufacturing of bone grafts and fixation plates
for critical premaxillary bone defects in rabbits: an *in vivo*
study**

**Araçatuba - SP
2025**

EDUARDO DALLAZEN

**Additive manufacturing of bone grafts and fixation plates
for critical premaxillary bone defects in rabbits: an *in vivo*
study**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba Universidade
Estadual Paulista (UNESP), para
obtenção do título de Doutor em
Odontologia.

Área de concentração: Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Associado Leonardo
Perez Faverani

Coorientador: Dr. Afsar Raza Naqvi

**Araçatuba - SP
2025**

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D145a Dallazen, Eduardo.
Additive manufacturing of bone grafts and fixation
plates for critical premaxillary bone defects in rabbits :
an in vivo study / Eduardo Dallazen. - Araçatuba, 2025
63 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani
Coorientador: Prof. Afsar Raza Naqvi

1. Printing, Three-Dimensional 2. Bioprinting 3. Bone
substitutes 4. Fracture fixation, internal 5. Craniofacial
abnormalities 6. Rabbits I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dedico este trabalho a minha família, bem mais precioso cedido por Deus, alicerce e porto seguro para que os sonhos profissionais se realizem.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por conceder diariamente o dom da vida e preenchê-la com bênçãos, permitindo que minha mente conecte os ensinamentos adquiridos, meus olhos percebam as necessidades, minhas mãos ofereçam o melhor trabalho ao próximo e minha boca proclame o amor vindo do Senhor.

Ao meu orientador, Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani, por ser mais do que um orientador, um verdadeiro amigo. Durante os cinco anos que passei em Araçatuba, não mediu esforços para me ensinar, acolher e abrir oportunidades. Tenho orgulho de afirmar que busquei extrair ao máximo seu conhecimento e que me sentirei realizado se um dia puder ter uma pequena parte de sua sabedoria e dedicação. Sua postura profissional e ética são uma fonte de inspiração. Compartilhamos muitas emoções e celebramos inúmeras conquistas. Algumas pessoas passam por nossas vidas e se vão; outras permanecem para sempre em nossos corações.

Ao Prof. Afsar Raza Naqvi, por me receber em Chicago durante meu doutorado sanduíche, disponibilizando todo seu conhecimento e estrutura para o desenvolvimento da minha tese. Sua paciência em compreender minhas dificuldades com a língua estrangeira e sua dedicação em me explicar, com calma e clareza, cada etapa do processo foram fundamentais para meu crescimento acadêmico. Além disso, proporcionou-me um contato enriquecedor com a cultura indiana, uma experiência que muito me encantou e agregou ainda mais valor ao meu tempo nos Estados Unidos.

Ao Prof. Edilson Ervolino, por toda a assistência nas análises histológicas das amostras, oferecendo suporte técnico e laboratorial imprescindível, além de contribuir significativamente para o desenvolvimento teórico desta tese.

À minha família Dallazen e Garcia, em especial aos meus pais, **Paulo Miguel Dallazen e Neusa Maria Garcia Dallazen**, e aos meus irmãos, **Guilherme Dallazen, Paula Angela Dallazen e Gisele Dallazen Bernardo**, por serem meu porto seguro e fonte inesgotável de incentivo. Sem vocês, não teria alcançado meus sonhos.

À minha noiva, Mariana Elias Queiroz, por ser minha companheira incondicional ao longo de quase 13 anos de estudo. Juntos, compartilhamos angústias e alegrias que a pós-graduação nos proporcionou. Crescemos profissionalmente e fortalecemos nosso amor a cada dia. A jornada acadêmica foi mais leve porque sempre tive ao meu lado uma grande mulher e profissional, cujo apoio e incentivo foram inestimáveis.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial **Stefany Barbosa, Izabela Delamura, João Matheus e Olavo Panigali**, que auxiliaram diretamente nesta pesque e cuja companhia tornou os desafios mais leves. Tenho certeza de que aprendemos muito mais ao compartilharmos nossas experiências acadêmicas.

Aos alunos de iniciação científica, em especial **Gabrielle Dias, Beatriz Seixas, Gustavo Ribeiro e Iago Guerra**, por dedicarem tempo e esforço ao desenvolvimento deste trabalho. Espero que essa experiência tenha despertado em vocês o desejo de buscar mais conhecimento e os inspirado a voar mais alto na odontologia.

Aos membros do Immunological Laboratory, em especial **Raza Naqvi, Araceli Valverde-Esteva, Kristelle Capistrano e Sarah Elshourbagy**, por me acolherem calorosamente em Chicago, auxiliando-me com paciência e dedicação em um novo universo dentro da pesquisa laboratorial.

Aos membros do Mass Spectrometry Core, em especial **Matheus Bonato**, cujo auxílio foi essencial em uma das etapas mais desafiadoras da minha tese. Sua explicação detalhada da técnica de espectrometria de massa tornou um tema complexo mais compreensível. Agradeço a estrutura e apoio, que foram determinantes para a obtenção de achados valiosos.

Aos membros do laboratório do Dr. Deepak Shukla, em especial **Dr. Chandrashekhar D. Patil e Dr. Pankaj Sharma**, por toda a assistência na realização das análises de Western Blotting, disponibilizando materiais, equipamentos e seu conhecimento especializado.

Aos amigos da UIC, José Guilherme Neves, Wallasca Liberato e Rocio Geng, que vieram de Milwaukee para Chicago e compartilharam momentos inesquecíveis

comigo. Entre almoços e cafés, trocamos experiências e superamos desafios pessoais e profissionais, criando uma amizade que transcenderá a distância.

Aos professores do departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial a **Profª. Ana Paula Franezi Bassi** por ser um grande exemplo profissional e por todo conhecimento compartilhado durante os anos de mestrado e **Profª. Daniela Ponzoni**, que com seu jeito calmo e acolhedor sempre me ajudou nesta jornada entendendo os momentos que não estava presente.

À Profª. Letícia Helena Theodoro, cujo auxílio na etapa de envio das amostras para Chicago foi essencial para o andamento da pesquisa. Sua dedicação tornou um processo complexo muito mais viável.

Ao Dr. Jamil Awad Shibli, por seu inestimável suporte científico e teórico, contribuindo significativamente para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial ao técnico **João Batista Alves Correa**, pelo cuidado exemplar com os animais envolvidos na pesquisa. Sua dedicação foi imprescindível para a concretização deste estudo.

Aos membros do Laboratório Multiusuário, em especial ao técnico em microtomografia **Paulo Henrique**, cujo suporte foi crucial para a realização das análises.

Aos funcionários e colaboradores das instituições parceiras (Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Hospital da Unimed Araçatuba e Hospital da Unimed Birigui), onde atuei durante os plantões como doutorando.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, na pessoa do diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, por proporcionar meu desenvolvimento acadêmico e a honra de carregar o brasão desta instituição histórica.

À University of Illinois Chicago (UIC), por abrir suas portas para alunos brasileiros, oferecendo infraestrutura e excelência profissional, permitindo-nos expandir nossas capacidades intelectuais e culturais.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da FOA-Unesp, na pessoa do seu coordenador **Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção**, pelo esforço contínuo em manter a excelência do curso. Agradeço também às funcionárias **Cristiane Regina Lui Matos, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Lilian Sayuri Mada, Eduardo Moure Cícero e Camila de Abreu Rodrigues Rosa**, por sua presteza e eficiência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelos auxílios concedidos por meio das bolsas 88887.674220/2022-00, 88887.960029/2024-00 e do programa CAPES-PRINT (88887.716820/2022-00).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da bolsa de iniciação científica (Processo nº 2023/16726-2).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio à iniciação científica, por meio da bolsa 11349/9-2023.

Às empresas Plenum, Osteomed e TechSuture, pelo suporte tecnológico e financeiro no fornecimento de materiais essenciais para a pesquisa, contribuindo para avanços que beneficiarão muitos pacientes.

*“Inovação é a criatividade
emitindo notas fiscais.”*

Silvio Meira

RESUMO

DALLAZEN, E. **Manufatura aditiva de enxertos ósseos e placas de fixação para defeitos ósseos pré-maxilares críticos em coelhos: um estudo in vivo.** 2025. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Deformidades maxilofaciais afetam aproximadamente 5% da população mundial, levando a comprometimentos funcionais e estéticos. A deficiência maxilar vertical, característica da síndrome da face curta, representa um desafio cirúrgico devido à instabilidade do reposicionamento inferior da maxila. A fixação interna rígida melhorou os resultados do tratamento, mas questões relacionadas a estabilidade persistem. A utilização da manufatura aditiva para a produção de enxertos ósseos e placas de fixação oferece uma abordagem promissora para aprimorar os resultados cirúrgicos, melhorando o suporte mecânico e o reparo ósseo. Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades biológicas do reparo ósseo em defeitos críticos na pré-maxila, comparando aplicações translacionais de fixação pré-maxilar utilizando placas e parafusos convencionais comparados a enxertos e placas produzidos por manufatura aditiva. Um estudo experimental in vivo controlado foi conduzido com 24 coelhos machos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, divididos aleatoriamente em quatro grupos: PLATES, 3D-PRINTED PLATES, GRAFTS, and PLATES+GRAFTS. O desfecho primário foi a análise histomorfométrica do reparo ósseo. Os desfechos secundários incluíram avaliação do comportamento relacionado a dor, análise proteômica, Western blotting e análise por microtomografia computadorizada (micro-CT). As análises estatísticas incluíram análise de variância (ANOVA) de um fator e teste post hoc de Tukey. O comportamento de dor foi analisado usando o teste de Friedman com o teste post-hoc de Durbin-Conover. Um nível de significância de $P \leq 0,05$ foi aplicado. As análises histológicas e de micro-CT mostraram cicatrização óssea superior nos grupos 3D-PRINTED PLATES e PLATES+GRAFTS em comparação com os métodos convencionais ($P < 0,05$). O número de trabéculas e a fração de volume ósseo foram maiores nesses grupos ($P < 0,05$). A análise proteômica identificou aumento na expressão de pequenas proteoglicanas ricas em leucina (BGN, LUM, DCN), associadas a uma melhor remodelação óssea e organização da matriz extracelular. As avaliações do comportamento de dor

indicaram escores mais baixos no grupo 3D-PRINTED PLATES durante os períodos pós-operatórios iniciais. Os achados sustentam a hipótese de que placas de fixação e enxertos baseados em manufatura aditiva aprimoram a cicatrização óssea em reposicionamentos inferiores de maxila. O uso de placas de fixação impressas em 3D, isoladamente ou em combinação com enxertos, melhora a estabilidade mecânica e a resposta biológica, oferecendo uma abordagem promissora para cirurgias maxilofaciais.

Palavras-chave: impressão 3D; bioimpressão; substitutos ósseos; placas de osteossíntese; defeitos craniofaciais; oryctolagus cuniculus.

ABSTRACT

DALLAZEN, E. **Additive manufacturing of bone grafts and fixation plates for critical premaxillary bone defects in rabbits: an in vivo study**. 2025. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Maxillofacial deformities affect approximately 5% of the global population, leading to functional and esthetic impairments. Vertical maxillary deficiency, a characteristic of short face syndrome, presents surgical challenges due to the instability of inferior maxillary repositioning (IMR). Internal rigid fixation (IRF) has improved treatment outcomes, but stability issues remain. The use of additive manufacturing (AM) for bone grafts and fixation plates offers a promising approach to enhance surgical outcomes by improving mechanical support and bone healing. This study aimed to evaluate the biological properties of bone healing in critical premaxillary bone defects, comparing translational applications of premaxillary fixation using conventional plates and screws versus grafts and plates produced by additive manufacturing. A controlled in vivo experimental study was conducted using 24 male rabbits *Oryctolagus cuniculus* randomly divided into four groups: PLATES, 3D-PRINTED PLATES, GRAFTS, and PLATES+GRAFTS. The primary outcome was the histomorphometry analysis of bone healing. Secondary outcomes included pain behavior, proteomic analysis, Western blotting, and micro-CT analysis. Statistical analyses included One-Way ANOVA with Tukey post-hoc tests. Pain behavior was analyzed using the Friedman test with the Durbin-Conover post-hoc test. A significance level of $P \leq 0.05$ was applied. Histological and micro-CT analyses showed superior bone healing in the 3D-PRINTED PLATES and PLATES+GRAFTS groups compared to conventional methods ($P < .05$). The trabecular number and bone volume fraction were higher in these groups ($P < .05$). Proteomic analysis identified increased expression of small leucine-rich proteoglycans (BGN, LUM, DCN), which are associated with improved bone remodeling and extracellular matrix organization. Pain behavior assessments indicated lower scores in the 3D-PRINTED PLATES group during early postoperative periods. The findings support the hypothesis that additive manufacturing-based fixation plates and grafts enhance bone healing in IMR procedures. The use of 3D-printed fixation plates alone or in combination with grafts

improves mechanical stability and biological response, offering a promising approach for maxillofacial surgeries.

Keywords: 3D printing, bioprinting, bone substitutes, osteosynthesis plates, craniofacial defects, oryctolagus cuniculus.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1 - Scanning electron micrographs of the surface morphology of titanium fabricated via additive manufacturing, captured at (A) $\times 100$ magnification and (B) $\times 2,500$ magnification. Image (A) reveals the macro-scale surface features, while image (B) provides a detailed view of the microstructural characteristics 23
- Figure 2 - Scanning electron micrographs depicting the surface topography of β -tricalcium phosphate (β -TCP) graft blocks fabricated via additive manufacturing, acquired at increasing magnifications: (A) $\times 25$, (B) $\times 1,000$, (C) $\times 2,500$, and (D) $\times 5,000$. Image (A) illustrates the overall macro-architecture of the construct, while images (B–D) reveal progressive microstructural features. In image (D), pore diameter measurements are indicated to demonstrate the scale and distribution of surface porosity 25
- Figure 3 - (A) Illustrative image presenting the osteotomy design plan on a digital model of the rabbit premaxilla. (B) Intraoral incision in the maxillary mucosa. (C) L-shaped inverted osteotomy in the premaxilla performed using surgical ultrasound. (D) Osteotomy mobilization using a chisel, highlighting the osteotomy gap in the superior region 26
- Figure 4 - Surgical aspects of the procedures for each experimental group 27
- Figure 5 - Line chart showing pain scores (BRPS) across evaluation times (12, 24, 48, 72, and 168 hours) 40
- Figure 6 - Representative Total Ion Chromatogram (TIC) showing signal intensity and separation of the digested peptides 41
- Figure 7 - System suitability test showing clear chromatographic separation of 10 ng BSA tryptic digests before and after sample analysis 41
- Figure 8 - (A) Heatmap displaying 63 proteins with statistically significant differences between at least two groups. The color gradient ranges from red, indicating the lowest expression levels, to green, representing the highest expression levels. (B) STRING network map of the proteins included in the heatmap, with the five distinct network groups highlighted on the right side, based on the highest confidence level (0.900). (C) Bar plots comparing protein detection values across groups, highlighting their respective statistical differences 43
- Figure 9 - (A) and (B) Western blots and corresponding plots showing the chemiluminescence and graphical expression levels of the loading control (β -Actin)

and the tested proteins (COL1A2, BGN, LUM, and DCN). (C) Bar plots comparing protein expression levels across groups, highlighting their respective statistical differences 46

Figure 10 - (A, E, I, M) Micro-CT 3D reconstructions providing an overview of the materials used in each group. (B, F, J, N) Micro-CT sagittal reconstructions from each group, illustrating the gap between bone segments. (C, G, K, O) Micro-CT 3D reconstructions offering a close-up view of the gap area between the bone segments. (D, H, L, P) Bar plots displaying the results of BV/TV, Tb.N, Tb.Th, and Tb.Sp analyses, highlighting the statistical differences among the groups 49

Figure 11 - (A–D) Histological slides illustrating the distribution of newly formed bone (NFB) and connective tissue (CT) in the experimental groups. (E, F) Bar plots presenting the quantitative analysis of NFB and CT, highlighting the differences among the groups 52

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Sample list and protein concentration based on Bradford method	31
Table 2 - Sample's final concentration based on NanoDrop quantification, and the final volume used in the mass spectrometry analysis	32
Table 3 - Descriptive statistics for the BRPS analysis	39
Table 4 - Pairwise Comparisons (Durbin-Conover) test for the BRPS analysis	40
Table 5 - Descriptive statistics for the western blotting analysis	45
Table 6 - Descriptive statistics for micro-CT analysis	48
Table 7 - Normality test for micro-CT analysis	48
Table 8 - Descriptive statistics for histomorphometry analysis	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro (micron)
ABC	Ammonium Bicarbonate
AGC	Automatic Gain Control
ALB	Albumin
ALDOA	Fructose-bisphosphate Aldolase A
AM	Additive Manufacturing
ANOVA	Analysis of Variance
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
ASTM	American Society for Testing and Materials
BEH	Bridged Ethylene Hybrid (type of C18 column)
BGN	Biglycan
BME	2-Mercaptoethanol
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BRPS	Bristol Rabbit Pain Scale
BSA	Bovine Serum Albumin
BV/TV	Bone Volume over Total Volume
CAD	Computer-Aided Design
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
COL1A2	Collagen Type I Alpha 2 Chain
CT	Connective Tissue
CTAn	CTAnalyzer (Bruker Micro-CT software)
DCN	Decorin
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTG	Derivative Thermogravimetry
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELI	Extra-Low Interstitials
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FASP	Filter-Aided Sample Preparation

FDR	False Discovery Rate
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
g	Grama
GPI	Glucose-6-phosphate Isomerase
HE	Hematoxylin and Eosin
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance (SPE column type)
HP	Haptoglobin
IAA	Iodoacetamide
IMR	Inferior Maxillary Repositioning
IRF	Internal Rigid Fixation
K	Kelvin
kg	Quilograma
LAS	Luminescent Image Analyzer System
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
LDHA	L-lactate Dehydrogenase A Chain
LDS	Laemmli Sample Buffer
LUM	Lumican
mg	Miligrama
Micro-CT	Micro-computed Tomography
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Mass Spectrometry
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (Reduced Form)
NFB	Newly Formed Bone
NFW	Nuclease-Free Water
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
NS	Normal Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLATES	Conventional Titanium Plate Group (experimental group)
POR	NADPH-cytochrome P450 Reductase
PVP-I	Polyvinylpyrrolidone Iodine

RB	Remaining Biomaterial
ROI	Region of Interest
RSLC	Rapid Separation Liquid Chromatography
RUN-X	Runt-related Transcription Factor 2
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Scanning Electron Microscopy
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
Tb.N	Trabecular Number
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness
TCP	Tricalcium Phosphate
TGA	Thermogravimetric Analysis
TGX	Tris-Glycine eXtended Gel
TIC	Total Ion Chromatogram
TTR	Transthyretin
TTS	Tris/Tricine/SDS Buffer
UIC	University of Illinois at Chicago
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USA	United States of America
WB	Western Blotting
XRD	X-ray Diffraction

SUMÁRIO

1	INTRODUCTION	19
2	OBJECTIVES	21
3	MATERIALS AND METHODS	22
3.1	Ethical Statement and Protocol Registration	22
3.2	Study Design	22
3.2.1	Experimental animals	22
3.2.2	Animal care, monitoring, housing, and husbandry	22
3.2.3	Characterization of Biomaterials	22
3.2.4	Experimental procedures	25
3.2.5	Sample size	28
3.2.7	Blinding	29
3.2.8	Euthanasia and Sample collections	29
3.2.9	Inclusion and exclusion criteria	29
3.2.10	Pain Behavior Analysis	29
3.2.11	Total protein isolation and estimation	30
3.2.12	Mass Spectrometry	31
3.2.13	Western Blotting	33
3.2.14	Micro Computerized Tomography	35
3.2.15	Histomorphometry	36
3.2.16	Outcomes	36
3.2.17	Statistical Methods	36
4	RESULTS	38
4.1	Subjective Surgical Report	38
4.2	Pain Behavior	38
4.3	Mass Spectrometry	41
4.4	Validation of Mass Spectrometry data by Western blotting	44
4.5	Micro Computerized Tomography	47
4.6	Histomorphometry	49
5	DISCUSSION	53
6	CONCLUSION	59
	REFERENCES	60
	ANEXOS	63

1 INTRODUCTION

It is estimated that approximately 5% of the global population is affected by maxillofacial deformities. These deformities represent a group of conditions characterized by disproportion or asymmetry involving the maxilla, mandible, and associated facial structures. Such alterations can significantly impact dental alignment and the occlusal relationship between the maxillary and mandibular teeth, potentially leading to functional and esthetic impairments (Angle, 1899; Bolton, 1958). Breathing, swallowing, speech, temporomandibular joint function, mastication, lip closure, and body posture may be compromised in individuals with maxillofacial deformities, leading to significant functional impairments. Furthermore, these conditions are often associated with psychosocial challenges, which can further diminish the overall quality of life (Proffit; Fields; Moray, 1998).

Vertical maxillary deficiency is a type of maxillofacial deformity and represents the primary characteristic of patients with short face syndrome (Santos *et al.*, 2012). The treatment of this type of deformity presents significant challenges in surgical correction, as it requires inferior maxillary repositioning (IMR), a movement considered biomechanically unstable (Hedemark; Freihofer Júnior, 1978). Internal rigid fixation (IRF) has improved the treatment outcomes for this condition; however, some studies question the stability of fixation materials when used alone (Santos *et al.*, 2012; Wardrop; Wolford, 1989). The systematic review conducted by Covens *et al.* (2015) reported a recurrence rate of 37% in the anterior region and up to 17% in the posterior region following IMR. These rates are lower compared to the broader literature, which shows a wide variation in recurrence rates, ranging from 0.4% to 64%. Santos *et al.* emphasizes the poor long-term stability of IMR when grafts are not used between the bone segments (Santos *et al.*, 2012).

When a bone gap is present, non-union or fibrous union may occur between the bone segments due to the rapid migration of soft tissue into the osteotomy site. These complications are more commonly observed during IMR (Rohner; Hailemariam; Hammer, 2013; Van Sickels; Tucker, 1990). In such cases, the presence of fibrous tissue and the lack of bone continuity compromise the bone's resistance to masticatory forces (Stetzer *et al.*, 2002; Verschueren *et al.*, 2005). To enhance stability and promote bone healing after IMR, some authors recommend the

use of autologous, allogeneic, xenogeneic, or alloplastic grafts in conjunction with IRF, particularly in cases involving bone gaps larger than 5 mm or palpable defects. (Alyahya; Swennen, 2019; Naros *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2012; Ueki *et al.*, 2012, 2013; Wardrop; Wolford, 1989).

Non-personalized grafts are challenging to fix and adapt during surgery, which can limit their ability to improve maxillary stability. Unstable grafts may displace into the maxillary sinus, increasing the risk of complications such as infection, chronic inflammation, sinusitis, graft exposure, and eventual graft loss (Alyahya; Swennen, 2019; Wolford; Wardrop; Hartog, 1987). Additionally, the use of autogenous grafts requires a donor site, which increases surgical morbidity and patient discomfort (Rosen; Ackerman, 1991; Wardrop; Wolford, 1989).

The use of additive manufacturing (AM) and personalized grafts presents a promising alternative for optimizing the application of osteoconductive grafts in bone gaps or defects, potentially improving maxillary stability and enhancing the bone healing process in IMR. This technique enables the individualization of graft architecture, allowing for the creation of structures that simplify graft fixation. These personalized grafts provide mechanical support, maintain the space between bone segments, stabilize the clot, and facilitate bone healing. Their effectiveness relies on critical factors such as biocompatibility, biomechanical properties compatible with native bone, the absence of chronic immune responses, and complete integration with the surrounding bone tissue (Rider *et al.*, 2018). Given these characteristics, grafts based on beta-tricalcium phosphate (β -TCP) offer mechanical and biological properties similar to human cancellous bone, making them a favorable option for use in IMR (Seol *et al.*, 2013).

Finally, there is a notable lack of preclinical and randomized clinical studies in literature regarding the use of grafts in orthognathic surgery. Even more scarce are studies specifically addressing the application of grafts in bone gaps associated with IMR (Alyahya; Swennen, 2019). Therefore, preclinical studies simulating the previously described scenarios are essential for understanding the biomechanical and biological processes involved.

6 CONCLUSION

This study demonstrated that additively manufactured (AM) bone grafts and fixation plates improved bone healing in critical premaxillary defects in a rabbit model. Histological and micro-CT analyses showed that the 3D-Printed Plates and Plates+Grafts groups exhibited superior bone healing outcomes compared to other methods. Proteomic analysis revealed increased expression of small leucine-rich proteoglycans (BGN, LUM, DCN) in these groups, which are associated with extracellular matrix organization and bone remodeling. Western blot analysis confirmed higher protein expression levels in the Plates+Grafts and 3D-Printed Plates groups, reinforcing their role in promoting bone regeneration. Pain behavior analysis indicated lower scores in the 3D-Printed Plates group during early postoperative periods, suggesting improved mechanical stability. These findings confirm that AM-based fixation plates and grafts enhance bone healing compared to conventional methods. Further studies are needed to assess their long-term stability and clinical applicability.

REFERENCES

- ALYAHYA, A.; SWENNEN, G. R. J. Bone grafting in orthognathic surgery: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 3, p. 322-331, Mar. 2019.
- ANGLE, E. H. Classification of malocclusion. **Dental Cosmos**, v. 41, n. 3, p. 248-264, 1899.
- BENATO, L.; MURRELL, J.; ROONEY, N. Bristol Rabbit Pain Scale (BRPS): clinical utility, validity and reliability. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 341, Sept. 2022.
- BERTOLAMI, C. N.; MESSADI, D. V. The role of proteoglycans in hard and soft tissue repair. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 5, n. 3-4, p. 311-337, 1994.
- BESIO, R. *et al.* Early fracture healing is delayed in the Col1a2+/G610C osteogenesis imperfecta murine model. **Calcified Tissue International**, v. 103, n. 6, p. 653-662, Dec. 2018.
- BOLTON, W. A. Disharmony in tooth size and its relations to the analysis and treatment of malocclusion. **The Angle Orthodontist**, v. 28, n. 3, p. 113-130, 1958.
- CONVENS, J. M. C. *et al.* Stability of Le Fort I maxillary inferior repositioning surgery with rigid internal fixation: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 5, p. 609-614, May 2015.
- CORSI, A. *et al.* Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 7, p. 1180-1189, Jul. 2002.
- HE, R. *et al.* Decreased fibrous encapsulation and enhanced osseointegration in vitro by decorin-modified titanium surface. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 155, p. 17-24, Jul. 2017.
- HEDEMARK, A.; FREIHOFFER JÚNIOR, H. P. The behaviour of the maxilla in vertical movements after Le Fort I osteotomy. **Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 6, n. 4, p. 244-249, Nov. 1978.
- HUA, R.; JIANG, J. X. Small leucine-rich proteoglycans in physiological and biomechanical function of bone. **Matrix Biology Plus**, v. 11, p. 100063, Aug. 2021.
- LIN, A. S. P. *et al.* The effect of contouring on fatigue resistance of three types of fracture fixation plates. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 11, n. 1, p. 107, Sept. 2016.
- MEISSNER, M.; VIEHMANN, S. F.; KURTS, C. DAMPening sterile inflammation of the kidney. **Kidney International**, v. 95, n. 3, p. 489-491, Mar. 2019.

MYREN, M. *et al.* Biglycan potentially regulates angiogenesis during fracture repair by altering expression and function of endostatin. **Matrix Biology**, v. 52–54, p. 141-150, Apr. 2016.

NAROS, A. *et al.* A prospective histomorphometric and cephalometric comparison of bovine bone substitute and autogenous bone grafting in Le Fort I osteotomies. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 47, n. 2, p. 233-238, Feb. 2019.

NIKITOVIC, D. *et al.* The biology of small leucine-rich proteoglycans in bone pathophysiology. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 41, p. 33926-33933, Oct. 2012.

PARR, W. C. H. *et al.* Fatigue implications for bending orthopaedic plates. **Injury**, v. 52, n. 10, p. 2896-2902, Oct. 2021.

PERCIE DU SERT, N. *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLoS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000411, Jul. 2020.

PROFFIT, W. R.; FIELDS, H. W.; MORAY, L. J. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in the United States: estimates from the NHANES III survey. **The International Journal of Adult Orthodontics and Orthognathic Surgery**, v. 13, n. 2, p. 97-106, 1998.

RAOUF, A. *et al.* Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. **Matrix Biology**, v. 21, n. 4, p. 361-367, Jun. 2002.

RIDER, P. *et al.* Additive manufacturing for guided bone regeneration: a perspective for alveolar ridge augmentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3308, Oct. 2018.

ROHNER, D.; HAILEMARIAM, S.; HAMMER, B. Le Fort I osteotomies using Bio-Oss® collagen to promote bony union: a prospective clinical split-mouth study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 5, p. 585-591, May 2013.

ROSEN, H. M.; ACKERMAN, J. L. Porous block hydroxyapatite in orthognathic surgery. **The Angle Orthodontist**, v. 61, n. 3, p. 185-192, 1991.

SANTOS, S. E. *et al.* Skeletal stability after inferior maxillary repositioning without interpositional graft. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 4, p. 477-481, Apr. 2012.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, Jul. 2012.

SEOL, Y. J. *et al.* A new method of fabricating robust freeform 3D ceramic scaffolds for bone tissue regeneration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 1444-1455, May 2013.

STETZER, K. *et al.* Effects of fixation type and guided tissue regeneration on maxillary osteotomy healing in rabbits. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, n. 4, p. 427-437, Apr. 2002.

UEKI, K. *et al.* Assessment of bone healing and hypoesthesia in the upper lip after Le Fort I osteotomy with self-setting α -tricalcium phosphate and absorbable plates. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 41, n. 2, p. 129-134, Mar. 2013.

UEKI, K. *et al.* Effect of self-setting α -tricalcium phosphate between segments for bone healing and hypoaesthesia in lower lip after sagittal split ramus osteotomy. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 40, n. 4, p. e119-e124, Jun. 2012.

VALVERDE, A.; NARES, S.; NAQVI, A. R. Impaired cell migration and structural defects in myeloid cells overexpressing miR-30b and miR-142-3p. **Biochimica et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1863, n. 11, p. 194628, Nov. 2020.

VAN SICKELS, J. E.; TUCKER, M. R. Management of delayed union and nonunion of maxillary osteotomies. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 10, p. 1039-1044, Oct. 1990.

VERSCHUEREN, D. S. *et al.* The effects of guided tissue regeneration (GTR) on modified Le Fort I osteotomy healing in rabbits. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 6, p. 650-655, Sept. 2005.

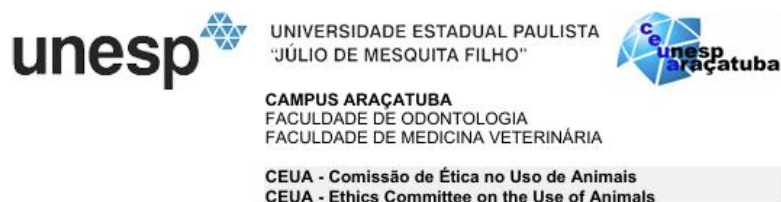
WARDROP, R. W.; WOLFORD, L. M. Maxillary stability following downgraft and/or advancement procedures with stabilization using rigid fixation and porous block hydroxyapatite implants. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 4, p. 336-342, Apr. 1989.

WOLFORD, L. M.; WARDROP, R. W.; HARTOG, J. M. Coralline porous hydroxylapatite as a bone graft substitute in orthognathic surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 12, p. 1034-1042, Dec. 1987.

XU, T. *et al.* Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. **Nature Genetics**, v. 20, n. 1, p. 78-82, Sept. 1998.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Utilização de enxertos ósseos interposicionais fabricados por manufatura aditiva em reposicionamentos inferiores de pré-maxilas de coelhos após osteotomia Le Fort I: estudo in vivo"**, Processo FOA nº 0521-2022, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 29 de Julho de 2022.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 29 de Fevereiro de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 29 de Março de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Use of additive-manufactured interpositional bone grafts in the inferior repositioning of premaxilla of rabbits after Le Fort I osteotomy: an in vivo study"**, Protocol FOA nº 0521-2022, under the supervision of Leonardo Perez Faverani presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 29, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 29, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 29, 2024.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br