

Mestrado Integrado em Medicina Dentária  
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



**Impressão tridimensional de biomateriais para encerramento da  
fenda alveolar**

Revisão sistemática

Ângela Basílio Frango

**Orientador:** Prof. Doutor Francisco José Fernandes do Vale

**Coorientadora:** Doutora Inês Alexandre Neves Francisco

**Coimbra, 2022**



Mestrado Integrado em Medicina Dentária  
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

**Impressão tridimensional de biomateriais para encerramento da fenda  
alveolar**

Revisão sistemática

Frango Â<sup>1</sup>, Francisco I<sup>2,3</sup>, Vale F<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Aluna do 5<sup>o</sup> ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Ortodontia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>3</sup> Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), Área de Genética Ambiental e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Área de Medicina Dentária, FMUC, Coimbra – Portugal

Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000–075 Coimbra

Tel.: +351 239 484 183

Fax.: +351 239 402 910

Endereço eletrónico: [angelabasiliof@gmail.com](mailto:angelabasiliof@gmail.com)

## Resumo

**Introdução:** Os defeitos ósseos craniofaciais continuam a ser um dos maiores desafios clínicos na medicina regenerativa, sendo o enxerto secundário de osso autólogo a técnica *gold-standard*. Contudo, este método apresenta algumas limitações como: risco de resposta imune, tempo e custo operatório. O desenvolvimento de novas matrizes tridimensionais permite colmatar estas desvantagens. O objetivo desta revisão sistemática é responder à seguinte questão “ As matrizes impressas tridimensionalmente são mais efetivas no tratamento dos defeitos ósseos alveolares que o enxerto ósseo convencional?”.

**Materiais e Métodos:** A presente revisão sistemática foi elaborada de acordo com o protocolo *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* utilizando as seguintes bases de dados: MEDLINE via PubMed, Cochrane Library, Scopus, Web of Science e EMBASE. O risco de viés dos estudos *in vitro* e *in vivo* foi realizado através das normas para o relato de estudos pré-clínicos sobre materiais dentários de Faggion Jr e a ferramenta de risco de viés do Centro de Revisão Sistemática para Experimentação em Animais de Laboratório (SYRCLE), respetivamente.

**Resultados:** 83 referências foram incluídas na amostra final. Destas, 48 analisaram as propriedades dos biomateriais *in vitro* e 68 avaliaram *in vivo*. Os biomateriais mais referenciados na literatura são as matrizes de policaprolactona,  $\beta$ -fosfato-tricálcio e hidroxiapatite. Estas podem ser combinadas com diferentes polímeros e moléculas bioativas, tal como a proteína óssea humana recombinante tipo-2. A maioria dos estudos incluídos apresentou um risco de viés elevado.

**Discussão/Conclusão:** Apesar da intensa investigação sobre os novos biomateriais impressos tridimensionalmente na regeneração óssea, o enxerto de osso autólogo continua a ser o método mais efetivo para tratamento de defeitos ósseos, pois permite obter uma maior osteocondução, osteoindução e osteogénese.

**Palavras-chave:** Impressão Tridimensional; Enxerto ósseo alveolar; Regeneração óssea; Substitutos ósseos, Biomateriais.

## Abstract

**Introduction:** Craniofacial bone defects are one of the biggest clinical challenges in regenerative medicine, with secondary autologous bone grafting being the gold-standard technique. However, this method has some limitations, namely risk of immune response, operative time and cost. The development of new three-dimensional scaffolds intends to overcome these disadvantages. The aim of this systematic review is to answer the following question “Are three-dimensional printed scaffolds more effective in the treatment of alveolar bone defects than conventional bone grafting?”.

**Materials and Methods:** This systematic review was prepared according to the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses protocol using the following databases: MEDLINE via PubMed, Cochrane Library, Scopus, Web of Science and EMBASE. The risk of bias of the *in vitro* and *in vivo* studies was performed using the guidelines for the reporting of pre-clinical studies on dental materials by Faggion Jr and Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) risk of bias tool, respectively.

**Results:** 83 publications were included in the final sample. Of these, 48 analyzed the properties of biomaterials *in vitro* and 68 evaluated *in vivo*. The most referenced biomaterials in the literature are polycaprolactone,  $\beta$  - tricalcium phosphate and hydroxyapatite scaffolds. These biomaterials can be combined with different polymers and bioactive molecules such as recombinant human bone morphogenetic protein-2. Most of the included studies had a high risk of bias.

**Discussion/Conclusion:** Despite the advances in the research on new three-dimensionally printed biomaterials in bone regeneration, autologous bone grafting remains the most effective method for treating bone defects, as it allows for greater osteoconduction, osteoinduction and osteogenesis.

**Keywords:** Printing, Three-Dimensional; Alveolar Bone Grafting; Bone Regeneration; Bone Substitutes, Biomaterials.

## Índice

<b>Resumo</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Índice de figuras</b> .....	vii
<b>Índice de tabelas</b> .....	viii
<b>Lista de siglas e acrónimos</b> .....	ix
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	5
2.1 Protocolo .....	5
2.2. Critérios de elegibilidade .....	5
2.3. Estratégia de pesquisa e seleção dos estudos.....	5
2.4. Extração de dados.....	7
2.5. Risco de viés .....	7
<b>3. Resultados</b> .....	8
3.1. Seleção dos estudos.....	8
3.2. Características dos estudos incluídos .....	9
3.2.1 Estudos <i>in vitro</i> .....	9
3.2.2 Estudos <i>in vivo</i> .....	9
3.3 Risco de viés .....	10
<b>4. Discussão</b> .....	39
<b>5. Conclusão</b> .....	42
<b>6. Agradecimentos</b> .....	43
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	44

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Preparação da fenda para receção do enxerto; Fenda alveolar após a colocação do enxerto de osso autólogo da crista ilíaca .....	2
<b>Figura 2.</b> Matrizes mais utilizadas na regeneração óssea. ....	3
<b>Figura 3.</b> Fluxograma PRISMA .....	8
<b>Figura 4.</b> Risco de viés dos estudos <i>in vitro</i> .....	36
<b>Figura 5.</b> Risco de viés dos estudos <i>in vivo</i> .....	37

## Índice de tabelas

**Tabela 1.** Frases de pesquisa por base de dados utilizadas na revisão sistemática ..... 6

**Tabela 2.** Resumo dos parâmetros e resultados dos estudos *in vitro* incluídos na revisão sistemática..... 11

**Tabela 3.** Resumo dos parâmetros e resultados dos estudos *in vivo* incluídos na revisão sistemática..... 18

## Lista de siglas e acrónimos

Asp@Lipo - Lipossomas carregados de aspirina

AW – Apatite/volastonite

BFP-1 - Peptídeo formador de osso 1

BG - Vidro bioativo

BG/PVA-2d - Vidro bioativo/ácido polivinílico em tampão fosfato-salino 2 dias

BG/PVA-30d - Vidro bioativo/ácido polivinílico em tampão fosfato-salino 30 dias

Bio-Oss - Mineral de osso bovino desproteínizado

BMP-2 - Proteína morfogenética óssea tipo-2

CH – Quitosano

CS - Sulfato de cálcio

Cu – Cobre

Cu (10Cu-BG) - Vidro bioativo com 15% de cobre

Cu (2Cu-BG) - Vidro bioativo com 7% de cobre

Cu (5Cu-BG) - Vidro bioativo com 10% de cobre

DCPD - Fosfato de cálcio dihidratado

dECM – Matriz extracelular descelularizada

FA - Fosfatase alcalina

FDM - Fusão e deposição

Fe – Ferro

FP - Nanopartículas de fósforo preto

GCP- Silicato de cálcio com grafeno/ policaprolactona

GTA – Glutaraldeído

HA - Hidroxiapatite

hSF-MSCs - Células estaminais mesenquimatosas sinoviais

KR-34893 - Composto orgânico bioativo

MeSH- *Medical Subject Headings*

MEW- *Melt electrospinning writing*

MgO - Óxido de magnésio

MgP - Fosfato de magnésio

MH – Minociclina

miRNA – MicroRNA

nanoZIF-8 - *Nanoscale zeolitic imidazolate framework-8*

NaOH- Hidróxido de sódio

nt – Nanotubos

OG - Óxido de grafeno

PBS - Tampão fosfato-salino

PCL- Policaprolactona

PDA – Polidopamina

PDASC - Silicato de cálcio modificado por polidopamina

PEEK – Polietercetona

PGA - Ácido glicólico

PICO - População, intervenção, comparação e *outcome*

PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLLA - Ácido polilático

PLLA/col - Ácido polilático / colagénio

PRP - Plasma rico em plaquetas

PRISMA - *Preferred Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*

PROSPERO - *International Prospective Register of Systematic Reviews*

p-Ta- Tântalo poroso

PVA - Ácido polivinílico

qPCR - Reação de cadeia de polimerase em tempo real

RCP - Peptídeo recombinante de colagénio

rhBMP-2 - Proteína óssea recombinante humana tipo 2

S1P - Esfingosina-1-Fosfato

SC - Silicato de cálcio

SD - *Sprague Dawley*,

SiO<sub>2</sub> - Sílica

SrO - Óxido de estrôncio

SrSC - Silicato de cálcio com estrôncio

Ti – Titânio

VEGF - Fator de crescimento endotelial

WOS - *Web of Science Core Collection*

ZnO – Óxido de zinco

$\beta$ -TCP –  $\beta$ -fosfato-tricálcio

$\mu$ -CT -Tomografia microcomputorizada

3D - Tridimensional

## 1. Introdução

A fenda lábio palatina (FLP) é uma malformação congénita, com uma prevalência de 1 por 700 nados vivos. [1] A incidência desta patologia é afetada pela localização geográfica, fatores socioeconómicos e raça. [2] Embora a etiologia não seja totalmente conhecida, sabe-se que é multifatorial, existindo diversos fatores genéticos e epigenéticos identificados. [3] Vários estudos demonstraram, de forma consistente, que o consumo de tabaco durante a gravidez e a diabetes gestacional são fatores de risco ambientais. Outros fatores foram descritos como o consumo de álcool e contato com agentes teratogénicos, nomeadamente o monóxido de carbono e corticosteroides. No entanto, são necessários mais estudos para corroborar esta associação. [3–5] Relativamente ao componente genético, esta malformação não pode ser associada a um só gene. Alguns dos genes e *loci* genéticos mais bem suportados são o *IRF6*, *ch8q24*, *VAX1* e *PAX7*. [6]

Os doentes com FLP apresentam frequentemente várias complicações a nível da audição, alimentação, fonética e desenvolvimento dentofacial, com consequências a longo prazo na anatomia facial e autoestima do doente. [7] Algumas destas características clínicas são decorrentes das cirurgias efetuadas para correção da fenda. As anomalias dentárias são uma das possíveis características que acompanham a fenda, sendo que as mais comuns são hipodontia, dentes supranumerários, alteração da forma e tamanho dos dentes bem como erupção ectópica. [4] A agenesia dentária mais frequente é a do incisivo lateral maxilar no lado da fenda. [4] O deficiente desenvolvimento craniofacial pode originar más oclusões como a mordida cruzada (anterior ou posterior), a mordida aberta, a classe III esquelética e o apinhamento dentário. [8]

No sentido de minimizar as anomalias decorrentes desta malformação, o tratamento dos doentes com FLP inicia-se desde o nascimento até à idade adulta e deve incluir uma equipa multidisciplinar por forma a atingir resultados desejáveis. [9] Durante a dentição mista, os indivíduos com FLP podem requerer a realização de um enxerto alveolar secundário. Esta terapêutica, nesta faixa etária, apresenta inúmeras vantagens como o encerramento das fístulas oronasais, a estabilização dos dois segmentos maxilares da fenda e o suporte da base alar, o que confere simetria nasal e labial. Nos casos de FLP bilateral, o enxerto ósseo também permite a estabilização e minimiza a protrusão da pré-maxila. [4] [10] O enxerto alveolar secundário foi introduzido por Boyne e Sands, em 1972, e é atualmente considerado o tratamento *gold standard*, sendo a crista ilíaca o local de eleição (Figura 1). [4] O *timing* para a realização deste

procedimento é determinado pelo desenvolvimento dentário do canino superior (dois terços da raiz formada), o que normalmente ocorre entre os 9 e 11 anos. [4]



**Figura 1.** A: Preparação da fenda para recepção do enxerto; B: Fenda alveolar após a colocação do enxerto de osso autólogo da crista ilíaca. Imagens cedidas pelo Instituto de Ortodontia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

O enxerto ósseo autólogo apresenta várias limitações como a oferta limitada de osso doador, risco de resposta imune, tempo operatório e custo. Adicionalmente, após um ano do enxerto, a reabsorção óssea pode ocorrer em aproximadamente 40%, o que aumenta a necessidade de reintervenção. [11,12] Os procedimentos adicionais podem provocar um aumento da fibrose de tecidos, levando à manutenção da fístula oroantral ou, em última instância, à necrose dos tecidos. [13]

Atualmente, a medicina regenerativa tem sido estabelecida como método alternativo de tratamento de defeitos ósseos, incluindo a FLP. [14–17] Além da capacidade de regeneração óssea, as estratégias regenerativas podem modular a inflamação e potencializar o processo de cicatrização. Diversos biomateriais têm sido desenvolvidos com o intuito de superar as limitações do enxerto ósseo convencional. [18] Os materiais de substituição podem ser aplicados sozinhos ou combinados com o enxerto ósseo autólogo e/ou matrizes. As matrizes (Figura 2) são um substrato que permitem que as células se diferenciem e proliferem. A sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteocondução e propriedades mecânicas são as características que influenciam o sucesso da eficácia da regeneração óssea. [19]

Biocerâmicas	Biopolímeros	Biocompósitos	Metais
<ul style="list-style-type: none"> <li>•HA</li> <li>•β-TCP</li> <li>•Vidro Bioativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Colagénio</li> <li>•PLLA</li> <li>•PGA</li> <li>•PCL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•HA- PCL</li> <li>•HA - PLLA</li> <li>•PCL - β-TCP</li> <li>•PLGA - β-TCP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Titânio</li> <li>•Tântalo</li> </ul>

**Figura 2.** Matrizes mais utilizadas na regeneração óssea. HA – hidroxiapatite; β -TCP - β-fosfato-tricálcio; PLLA - ácido polilático; PGA - ácido glicólico; PCL – policaprolactona; PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

Estas matrizes podem ser impressas tridimensionalmente, conferido uma melhor adaptação do enxerto ao defeito ósseo. O recurso a tecnologias tridimensionais (3D) permite criar uma matriz específica para as necessidades de cada doente, através da modificação da sua arquitetura interna e externa, com a possibilidade de ser constituída por vários materiais. [19,20]

As matrizes mais utilizadas na reparação de defeitos ósseos são as biocerâmicas, na qual se inclui a hidroxiapatite (HA) e o β-fosfato-tricálcio (β -TCP). Estes materiais têm elevada biocompatibilidade e capacidade osteoindutora. [21] Adicionalmente, promovem rápida formação óssea devido à sinalização intracelular osteogénica desencadeada pela presença de cálcio solúvel e fosfatos inorgânicos. [19] A fase do mineral e a solubilidade das matrizes com fosfato de cálcio são os fatores chave que determinam a osteoindução.[20] O desenvolvimento destas baseou-se na síntese de materiais com composição semelhante aos minerais encontrados no osso natural, assegurando as boas propriedades mecânicas. Contudo, apresentavam algumas desvantagens como a baixas propriedades mecânicas e biodegradabilidade, limitando a sua aplicação em defeitos ósseos de grandes dimensões. [20] [22] Não obstante, a matriz contendo vidro bioativo é uma biocerâmica cujo o potencial de regeneração está relacionado com a sua capacidade de reagir quimicamente com os fluídos corporais, formando uma camada de hidroxicarbonato de apatite à qual o osso se consegue ligar. Contudo, este biomaterial apresenta algumas limitações como a baixa resistência à fratura, não sendo, por isso, a primeira opção na regeneração óssea. [23]

Contrariamente às biocerâmicas, os biopolímeros apresentam uma grande flexibilidade devido à sua composição. [24] Os biopolímeros naturais como o colagénio e o ácido hialurónico mimetizam a estrutura, composição química e propriedades bioquímicas da matriz óssea. Porém, as suas maiores desvantagens são as baixas propriedades mecânicas, risco de infeção e reações alérgicas. [25] As matrizes constituídas por polímeros sintéticos como policaprolactona (PCL), ácido polilático

(PLLA) e ácido glicólico (PGA) foram desenvolvidas com o intuito de obter um maior controle das propriedades mecânicas. Contudo, os produtos de degradação causam alterações no pH resultando numa diminuição da osteoindução. Neste sentido, a hibridização dos materiais naturais e sintéticos tem sido sugerida como uma alternativa promissora, permitindo obter as vantagens de ambos os biopolímeros. [20]

Para ultrapassar as limitações das cerâmicas e polímeros, têm sido desenvolvidos biocompósitos, tais como matrizes constituídas por colagénio/HA [26], HA/PLLA [27] e PCL/  $\beta$ -TCP [28], HA/PCL [29] que possuam melhores taxas de reabsorção e resistência mecânica. [30,31]

Por fim, as matrizes metálicas também têm demonstrado resultados satisfatórios na regeneração de defeitos ósseos. [32] As de titânio apresentam várias vantagens como a excelente biocompatibilidade e a resistência à corrosão, o que permite a sua utilização em grandes defeitos ósseos. Contudo, o fato de não serem biodegradáveis é uma limitação, ou seja, a taxa de degradação não é compatível com a taxa de osteogénese. [20]

Apesar do recente interesse da literatura nas vantagens da impressão 3D das matrizes utilizadas na regeneração óssea, não existe nenhuma síntese geral da eficácia destes biomateriais. Neste sentido, este trabalho propõe-se a realizar uma revisão abrangente para avaliar a eficácia clínica de estratégias regenerativas impressas tridimensionalmente no tratamento dos defeitos ósseos alveolares. Neste sentido, esta revisão tem como objetivo responder à seguinte questão “ As matrizes impressas 3D são mais efetivas no tratamento dos defeitos ósseos alveolares que o enxerto ósseo convencional?”

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Protocolo

A presente revisão sistemática foi elaborada de acordo com o protocolo *Preferred Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) bem como com as *guidelines* da *Cochrane* para revisões sistemáticas. O protocolo realizado foi registado no *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO) com o número CRD42021286499.

A pesquisa bibliográfica foi orientada de forma a responder à seguinte questão PICO (população, intervenção, comparação e *outcome*): “Os biomateriais impressos por técnicas 3D disponíveis são igualmente eficazes no enxerto ósseo alveolar comparativamente ao *gold standard* (enxerto autólogo)?”

### 2.2. Critérios de elegibilidade

A questão PICO utilizada foi a seguinte:

População (P) - Doentes com defeito ósseo que necessitam de regeneração óssea;

Intervenção (I) - Abordagens de tratamento com engenharia de tecido ósseo utilizando impressão tridimensional;

Comparação (C) - Qualquer tipo de substituto ósseo utilizado como grupo de controlo;

Outcome (O) - Taxa de regeneração óssea.

### 2.3. Estratégia de pesquisa e seleção dos estudos

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica recorrendo às bases de dados MEDLINE via *Pubmed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), *Cochrane Library* (<https://www.cochranelibrary.com/>), *Web of Science Core Collection* (<https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>), EMBASE (<https://www.embase.com>) e na literatura cinzenta. A última pesquisa foi realizada até o dia 22 de outubro de 2021, independentemente, por dois investigadores.

Uma combinação de *Medical Subject Headings* (MeSH) com palavras de texto livre foram usadas em cada base de dados (tabela 1). Os seguintes filtros de linguagem foram aplicados: português, inglês, espanhol e francês. Nenhum filtro foi utilizado relativamente à data de publicação.

**Tabela 1.** Frases de pesquisa por base de dados utilizadas na revisão sistemática

<b>Base de dados</b>	<b>Frase de pesquisa</b>
MEDLINE <i>via Pubmed</i>	"Printing, Three-Dimensional"[Mesh] AND ("Bone Regeneration"[Mesh] OR "Alveolar Bone Grafting"[Mesh] OR "bone graft*" OR "Bone Substitutes"[Mesh]) AND (Dentistry [Mesh] OR oral* OR orofacial OR dental OR maxillofacial OR "Surgery, Oral" [Mesh])
<i>Cochrane Library</i>	#1: MeSH descriptor: [Printing, Three-Dimensional] explode all trees #2: MeSH descriptor: [Bone Regeneration] explode all trees #3: MeSH descriptor: [Alveolar Bone Grafting] explode all trees #4: MeSH descriptor: [Bone Transplantation] explode all trees #5: "bone graft*" #6: MeSH descriptor: [Bone Substitutes] explode all trees #7: MeSH descriptor: [Dentistry] explode all trees #8: Oral #9: Orofacial #10: Dental #11: Maxillofacial #12: MeSH descriptor: [Surgery, Oral] explode all trees #13: #2 OR #3 OR #4 OR #5 Or #6 #14: #7 OR #8 OR #9 OR #10 OR #11 OR #12 #15: #1 AND #13 AND #14
<i>Web of Science Core Collection (WOS)</i>	TS= ("Print*", Three Dimensional" OR "Three-Dimensional Print*" OR "3-Dimensional Print*" OR "3 Dimensional Print*" OR "Print*, 3-Dimensional" OR "3-D Print*" OR "3D Print*" OR "Print*, 3-D" OR "Print*, 3D") AND TS= ("Regenerati*, Bone" OR "Bone Regenerati*" OR osteoconduction OR "Alveolar Bone Graft*" OR "alveolar cleft grafting" OR "bone graft*" OR "Replacement Material*, Bone" OR "Material*, Bone Replacement" OR "Substitute*, Bone" OR "Bone Replacement Material*" OR "Material, Bone Replacement" OR "bone substitute*") AND TS=(dent* OR oral* OR orofacial OR maxillofacial OR "Surgery, Oral" OR "oral surgery")
EMBASE	('three dimensional printing' OR 'three dimensional printing'/exp) AND ('bone regeneration' OR 'bone regeneration'/exp OR 'alveolar bone grafting' OR 'alveolar bone grafting'/exp OR 'bone graft' OR 'bone graft'/exp OR 'bone transplantation' OR 'bone transplantation'/exp OR 'bone prosthesis' OR 'bone prosthesis'/exp) AND (dentistry OR 'dentistry'/exp OR oral OR orofacial OR dental OR maxillofacial OR 'oral surgery'/exp OR 'oral surgery')

Os artigos foram inicialmente escrutinados, de forma independente, por dois investigadores, com base no título e resumo. Seguidamente, os artigos foram analisados segundo o seu texto integral e, se alguma dúvida houvesse sobre a inclusão dos mesmos, um terceiro investigador era consultado.

Na avaliação dos estudos foram considerados os seguintes critérios de inclusão: estudos *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* e clínicos; e, estudos que avaliassem a regeneração óssea realizada por biomateriais impressos por técnicas 3D. Os critérios de exclusão aplicados foram: estudos não clínicos e todos os outros tipos de pesquisa (por exemplo: editoriais, livros didáticos e relatórios); relatos de casos ou estudos descritivos; publicações duplicadas; estudos com dados incompletos; e, estudos que se limitavam a caracterizar o novo biomaterial sem reportar as taxas do novo osso formado.

#### 2.4. Extração de dados

Após o processo de elegibilidade, os artigos foram divididos em categorias de acordo com o tipo de estudo: *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* ou clínico. De cada publicação foram extraídas as seguintes informações: autor, data de publicação, desenho do estudo, grupo experimental e controle, tempo de avaliação, método de avaliação da regeneração óssea, resultados e principais conclusões.

#### 2.5. Risco de viés

O risco de viés dos estudos *in vitro* foi obtido utilizando as normas para o relato de estudos pré-clínicos sobre materiais dentários de Faggion Jr. [33] Para os estudos *in vivo*, foi utilizada a ferramenta de risco de viés do Centro de Revisão Sistemática para Experimentação em Animais de Laboratório (SYRCLE).

### 3. Resultados

#### 3.1. Seleção dos estudos

A pesquisa inicial, nas bases de dados mencionadas na secção anterior, resultou em 779 estudos. Após a remoção dos duplicados, 591 estudos foram escrutinados segundo o título e resumo. Seguidamente, todas as referências não relevantes para a revisão sistemática foram excluídas, resultando em 111 estudos potencialmente relevantes. Tendo em conta que 30 artigos não reportaram as taxas de regeneração óssea, apenas 83 referências foram incluídas na amostra final. O processo de identificação, triagem e elegibilidade está resumido no fluxograma PRISMA (Figura 3).

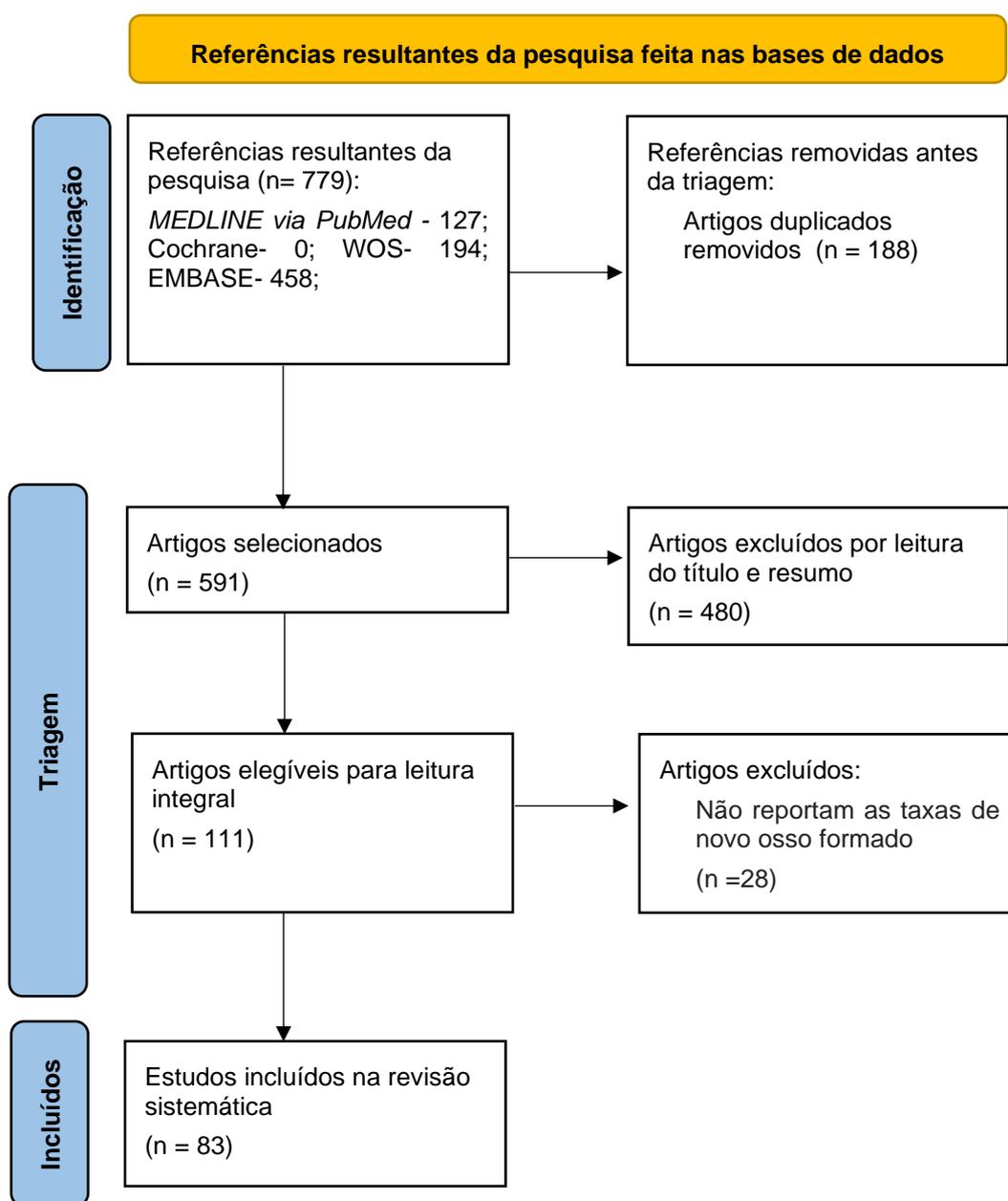


Figura 3. Fluxograma PRISMA

## 3.2. Características dos estudos incluídos

### 3.2.1 Estudos *in vitro*

Quarenta e oito artigos analisaram as propriedades dos biomateriais *in vitro*. O ano de publicação variou entre 2015 e 2022, com exceção de um estudo realizado em 2006. [34]

O biomaterial mais utilizado no grupo de controlo foi a matriz de PCL, seguida de  $\beta$ -TCP e a de PLLA. A atividade osteogénica através da fosfatase alcalina foi o método de avaliação da regeneração óssea mais utilizado, tendo sido descrito em vinte e seis artigos. O tempo de avaliação variou desde um até quarenta e dois dias. Dezassete estudos avaliaram a regeneração óssea através da expressão de genes relacionados com osteogénese. Apenas um estudo [35] reportou a taxa de libertação dos fatores de crescimento. Por outro lado, um estudo [36] avaliou a porosidade da matriz, tendo verificado que a presença de nanotubos apresenta resultados mais favoráveis para a osteogénese do que poros de maiores dimensões.

A tabela 2 resume os resultados dos estudos *in vitro* incluídos na presente revisão sistemática.

### 3.2.2 Estudos *in vivo*

A regeneração óssea *in vivo* foi avaliada em sessenta e oito artigos, publicados entre 2015 e 2022, em diversas espécies de animais, tais como coelhos *New Zealand*, cães *beagle*, ratos *Fisher*, *Murine*, *Sprague Dawley* e *BALB/c*. O número de animais utilizado em cada estudo variou entre três a quarenta, sendo que sete artigos não reportaram o tamanho da amostra. [37–43] O tempo de avaliação variou desde uma a vinte e quatro semanas.

O biomaterial mais utilizado no grupo de controlo foi a matriz de  $\beta$ -TCP, seguida da matriz de PCL. Relativamente ao método de avaliação, a tomografia microcomputorizada foi a mais utilizada seguida da histologia. Outros dos métodos foram a reação de cadeia de polimerase em tempo real [44,45] e a imunohistoquímica [39].

As matrizes mais referenciadas foram a de PCL,  $\beta$ -TCP e HA. Em sete artigos, a matriz do grupo experimental continha proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2). [20] [35,45–49]. A regeneração óssea foi superior em todos os grupos experimentais, à

exceção de três artigos [52–54], que verificaram valores semelhantes entre o grupo de controlo e experimental.

Relativamente aos *outcome* secundários, Van hede e colaboradores [55] analisaram a geometria das matrizes, tendo verificado que a geometria giróide apresenta melhores resultados do que a ortogonal. Chang e colaboradores [56] verificaram que a combinação da matriz de HA com um peptídeo RGD oxidado em matriz de elevada rigidez pode ser vantajosa para a regeneração maxilo-facial comparativamente a matrizes de baixa rigidez.

A tabela 3 resume os resultados dos estudos *in vivo* incluídos na presente revisão sistemática.

### 3.3 Risco de viés

O risco de viés dos estudos *in vitro* e *in vivo* encontra-se sumariado nas figuras 4 e 5, respetivamente. Relativamente aos estudos *in vitro*, nenhum descreveu a metodologia para determinar o tamanho da amostra e a alocação das células. Por outro lado, todos os estudos *in vitro* também não referiram informações sobre a alocação da amostra, mecanismo utilizado para alocação aleatória, implementação e ocultação. Todos os artigos referem as fontes de financiamento, à exceção de cinco. [34] [57–60]

Em relação aos estudos *in vivo*, a maioria dos estudos apresenta sérias falhas de metodologia, não referindo diversas informações nomeadamente, alocação aleatória, mecanismo utilizado para alocação aleatória e ocultação. Apenas dois estudos indicam que os investigadores estavam cegos aquando análise do *outcome*. [50] [61] Por outro lado, dois estudos reportam outras fontes de viés. [51] [62]

**Tabela 2.** Resumo dos parâmetros e resultados dos estudos *in vitro* incluídos na revisão sistemática

<b>Autores, Ano</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Alksne M. <i>et al</i> , 2020 [63]	Matriz de PLLA	-Matriz PLLA + HA 10% -Matriz PLLA+ BG	1,7,10 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz com BG mostra melhores propriedades osteoindutivas que aquela com HA	A matriz PLLA+BG é promissora na regeneração óssea
Bae E. <i>et al</i> , 2018 [28]	Matriz de PCL/ $\beta$ TCP	-Matriz dECM/PCL/ $\beta$ TCP -Matriz dECM/PCL/ $\beta$ TCP/ rhBMP-2	1,3,5,7,14,21 e 28 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz dECM/PCL/ $\beta$ TCP/ rhBMP-2 mostrou maior expressão da FA do que as outras matrizes	A dECM pode ser combinada com rhBMP-2 para aumentar a regeneração óssea
Cao Y. <i>et al</i> , 2019 [64]	Matriz de $\beta$ TCP sem S1P	Matriz $\beta$ -TCP revestida com S1P	3 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz $\beta$ -TCP revestida com S1P aumentou a expressão de genes relacionados com a osteogénese	A matriz $\beta$ -TCP revestida com S1P promove regeneração óssea
Chen Y. <i>et al</i> , 2018 [65]	Células cultivadas no meio sem matriz	-Matriz PDASC/PCL -Matriz PDASC/PCL/hidrogel	1,3,7 dias	Expressão de proteínas relacionados com osteogénese	A matriz PDASC/PCL/hidrogel apresentou maior expressão de proteínas relacionadas com a osteogénese	A matriz PDASC/PCL/hidrogel pode ser aplicada na regeneração óssea
Chiu Y. <i>et al</i> , 2019 [38]	Matriz de SC	Matriz de SrSC	1,3,7 dias	Atividade osteogénica através da FA	Maior mineralização na matriz SrSC	A matriz SrSC é promissora na regeneração óssea
Cooke M. <i>et al</i> , 2020 [66]	DPSCs sem dexametasona e $\beta$ -glicerol-2-fosfato no meio de cultura numa matriz LayFomm	DPSCs com dexametasona e $\beta$ -glicerol-2-fosfato no meio de cultura numa matriz LayFomm	21 dias	Formação de matriz mineralizada	As DPSCs com dexametasona e $\beta$ -glicerol-2-fosfato no meio de cultura conseguem formar matriz mineralizada	A LayFomm é uma matriz promissora na regeneração óssea craniofacial

**Tabela 2.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Dai Q. <i>et al</i> , 2021 [67]	Vidro Bioativo sem Cu (0Cu-BG)	- 2Cu-BG - 5Cu-BG - 10Cu-BG	1,3,7 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	- Na presença de Cu há um aumento da diferenciação das células estaminais - A maior expressão de genes relacionados com a osteogénese ocorreu no grupo com 2Cu	Vidro ativo contendo Cu promove a proliferação de células estaminais e a qualidade do tecido ósseo regenerado
Dubey N. <i>et al</i> , 2020 [57]	Matriz de hidrogel	Matriz de hidrogel com MgP	7, 14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz com MP aumentou a expressão de genes relacionada com osteogénese	A presença de MP na matriz pode aumentar a formação óssea
Fahimipour F. <i>et al</i> , 2019 [46]	Matriz de $\beta$ TCP/colagénio/heparina	Matriz de $\beta$ TCP/colagénio/heparina/ BMP-2	7, 14 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A presença de BMP-2 levou a uma maior expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz $\beta$ TCP/colagénio/heparina/ BMP-2 é eficaz e deve ser explorada para outras moléculas bioativas
Gómez-Cerezo M. <i>et al</i> , 2020 [68]	Matriz de BG/ PVA	-BG/PVA-2d -BG/PVA-30d	3,7 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz BG/PVA-2d apresentou maior expressão de genes relacionada com a osteogénese	A imersão da matriz BG/PVA em PBS melhora as propriedades osteogénicas da matriz
Han L. <i>et al</i> , 2021 [69]	Matriz de PLGA sem revestimento de Fe	Matriz PLGA revestida com Fe	1, 2,3,7 e 14 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz de PLGA revestida com Fe aumentou a expressão de genes relacionada com a osteogénese	Matrizes 3D com nanocompósitos aumentam a diferenciação osteogénica das células estaminais mesenquimatosas
Huang K. <i>et al</i> , 2021 [45]	Matriz SC/ CS	Matriz MS/CS/BMP-2	3 dias	Atividade osteogénica da FA	A matriz SC/CS/BMP-2 apresentou níveis de atividade osteogénica da FA superiores	A matriz SC/CS/BMP-2 é promissora para a regeneração óssea

**Tabela 2.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Jeong J. <i>et al</i> , 2020 [70]	Matriz gelatina 100%	Matriz de gelatina e $\beta$ -TCP	7 dias	Atividade osteogénica da FA	Matrizes com 60% $\beta$ -TCP e 40% gelatina apresentam a melhor atividade celular	Matrizes com 60% $\beta$ -TCP e 40% gelatina são um substituto ósseo com potencial
Kao C. <i>et al</i> , 2015 [71]	Matriz PLLA	Matriz PLLA/PDA	3, 7 dias	Atividade osteogénica da FA	A atividade da FA era superior na matriz PLLA/PDA	A PDA é uma ferramenta promissora na regeneração óssea
Ke, D. <i>et al</i> , 2018 [72]	Matriz $\beta$ TCP	Matriz $\beta$ TCP e SrO, SiO <sub>2</sub> , MgO e ZnO	3, 9 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	As matrizes $\beta$ TCP/MgO e $\beta$ TCP/SiO <sub>2</sub> demonstraram a maior expressão de genes relacionada com osteogénese	As matrizes $\beta$ TCP/MgO e $\beta$ TCP/SiO <sub>2</sub> são promissoras regeneração óssea
Kim B. <i>et al</i> , 2018 [50]	Matriz PCL	Matriz PCL+ BMP-2+ HA	7 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz PCL+ BMP-2+ HA aumentou a atividade da FA	As propriedades osteogénicas são superiores na matriz PCL+ BMP-2+ HA
Kim J. <i>et al</i> , 2017 [73]	Matriz de MgP	Matriz MgP/ KR-34893	1,3,5,7 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz MgP/ KR-34893 aumentou a expressão de genes relacionada com osteogénese	A adição de KR-34893 promove maior diferenciação osteogénica
Lee S. <i>et al</i> , 2018 [74]	Matriz PCL	Matriz PCL e BFP-1	7, 14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz PCL/BFP-1 mostrou ter a maior eficácia osteogénica	A matriz PCL/BFP-1 é promissora é eficiente na regeneração óssea
Li J. <i>et al</i> , 2017 [75]	Matriz PCL	- Matriz PCL e PRP tradicional - Matriz PCL/PRP <i>freeze-dried</i>	7, 14 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz PCL/PRP <i>freeze-dried</i> aumentou a expressão de genes relacionada com osteogénese	A matriz PCL/PRP <i>freeze-dried</i> promove maior formação óssea
Li Y. <i>et al</i> , 2019 [40]	Matriz PCL	Matriz PCL/Asp@Lipo/ BFP-1	7, 14, 21 dias	Atividade osteogénica FA	O ratio 3:7 Asp@Lipo/BFP-1 mostrou ter a maior eficácia osteogénica	Esta é uma matriz promissora na regeneração óssea craniofacial

**Tabela 2.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Grupo de controle</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Lin Y. <i>et al</i> , 2019 [76]	Meio de cultura plástico com hSF-MSCs	Matriz de PEEK com hSF-MSCs	1,4,7,14,21 dias	Atividade osteogénica através da FA	As hSF-MSCs proliferam na matriz PEEK	A matriz PEEK/ hSF-MSCs promissora na regeneração óssea
Lin YH. <i>et al</i> , 2017 [77]	Matriz PCL	- Matriz PCL/10%SC - Matriz PCL/30%SC - Matriz PCL/50%SC	7 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz PCL/50% induziu maior expressão de genes relacionadas com a osteogénese	A matriz PCL/SC apresenta propriedades osteocondutoras favoráveis sendo um biomaterial promissor para a regeneração óssea
Lin YH. <i>et al</i> , 2019 [78]	Solução de grafeno	Matriz GCP	3,7 dias	Expressão de proteínas relacionados com osteogénese	A matriz GCP induziu maior expressão de proteínas relacionadas com a osteogénese	A matriz GCP promove a osteogénese
Martin V. <i>et al</i> , 2019 [79]	Matriz PLLA/col	- Matriz PLLA/col/MH - Matriz PLLA/col/MH/HA	5,10,15 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	- A incorporação de HA aumentou a expressão de genes relacionados com a osteogénese - A combinação de HA e MH resultou num aumento da atividade osteogénica	A matriz PLLA/col/MH/HA estimula a osteogénese e tem uma ação terapêutica contra <i>Staphylococcus aureus</i> , o que a torna promissora na regeneração óssea
Miao Y. <i>et al</i> , 2019 [41]	Matriz de hidrogel	Matriz de hidrogel com FP	7, 14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A adição de FP aumentou a atividade da FA	A matriz de hidrogel e FP pode constituir uma boa estratégia para a regeneração óssea
Midha S. <i>et al</i> , 2018 [80]	Vidro bioativo Bioglass 45S5	- Vidro Bioativo de fibrina de seda com estrôncio - Vidro bioativo de fibrina de seda sem estrôncio	21 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	O grupo com estrôncio apresentou maior expressão de genes relacionados com a osteogénese	Vidro Bioativo de fibrina de seda promissor para a formação óssea

**Tabela 2.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Pan T. <i>et al</i> , 2022 [81]	Matriz de hidrogel combinada com miRNA	Matriz de hidrogel com miRNA e 0.25;1;2.5% de GTA	7,14,21,28, 42 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz com 1% de GTA foi a que apresentou melhores características para a regeneração óssea	A matriz de hidrogel/miRNA/1%GTA é promissora para a regeneração óssea
Park J. <i>et al</i> , 2015 [35]	Matriz PCL	Matriz PCL/ VEGF/ BMP-2	7,14 dias	Taxa de libertação dos fatores de crescimento	Regeneração óssea foi superior na matriz com fatores de crescimento	As matrizes com fatores de crescimento são uma alternativa promissora
Park S. <i>et al</i> , 2020 [82]	Matriz PCL	Matriz PCL/ $\beta$ TCP	7 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz PCL/ $\beta$ TCP apresentou maior atividade da FA	A adição de $\beta$ TCP na matriz de PCL é vantajosa para a regeneração óssea
Ratheesh. G. <i>et al</i> , 2021 [83]	Matriz PCL fabricada através de FDM	Matriz PCL por FDM e MEW	3,7,21 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz PCL por FDM/MEW mostrou maior expressão de genes relacionados com a osteogénese	A membrana MEW promove um ambiente mais propício para a diferenciação osteogénica
Remy M. <i>et al</i> , 2021 [84]	Matriz TCP/miRNA $\beta$	Matriz $\beta$ TCP/miRNA/colagénio	7 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz $\beta$ TCP/miRNA/colagénio apresentou maior expressão de genes relacionados com a osteogénese	A matriz $\beta$ TCP/miRNA/colagénio é promissora no tratamento de defeitos ósseos
Roh H. <i>et al</i> , 2016 [85]	Matriz PCL/HA	Matriz PCL/HA e MgO	1, 3 e 5 dias	Atividade osteogénica através da FA	A adição de MgO aumentou a atividade da FA	A matriz PCL/HA/MgO é promissora para a formação óssea
Shim J. <i>et al</i> , 2017 [86]	Membrana colagénio de	- Matriz PCL - Matriz PCL/ $\beta$ -TCP	1,4,7,14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A diferenciação osteogénica foi superior na matriz PCL/ $\beta$ -TCP	A matriz PCL/ $\beta$ -TCP apresenta bons resultados a nível de regeneração óssea
Shuai C. <i>et al</i> , 2020 [27]	Matriz de HA/PLLA	Matriz HA/PLLA e PGA	8 semanas	Formação de matriz mineralizada	A matriz HA/PLLA/PGA mostrou ser um ambiente indicado para cultura de células	A matriz HA/PLLA/PGA tem capacidade de formação óssea e vascular

**Tabela 2.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Tcacencu I. <i>et al</i> , 2018 [59]	-Matriz vítrea cerâmica AW - Matriz PLLA	Matriz AW/PLLA	7, 14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz AW apresentou maior atividade da FA	A matriz AW apresenta boas propriedades osteocondutoras
Tsai C. <i>et al</i> , 2019 [87]	Matriz de Ti	Matriz Ti com Mg- SC e CH	3, 7 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz Ti/Mg-CS/CH aumentou a atividade da FA	A matriz Ti/Mg-CS/CH aumenta a osteogénese
Umeyama R. <i>et al</i> , 2020 [42]	Matriz $\beta$ TCP	Matriz $\beta$ TCP/ RCP	4,7, 14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz $\beta$ TCP/RCP apresentava maior atividade da FA	A adição de RCP é eficiente na regeneração óssea
Wang P. <i>et al</i> , 2021 [88]	Matriz PLLA	-Matriz PLLA condicionada com hidróxido de sódio -Matriz PLLA com PDA condicionada com NaOH	7,14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz PLLA com PDA condicionada com hidróxido de sódio apresentava maior atividade da FA	A matriz PLLA com PDA condicionada com hidróxido de sódio é promissora para a formação óssea
Wang S. <i>et al</i> , 2020 [89]	Matriz PCL e Bio-Oss	Matriz PCL/ Bio-Oss e NaOH	7, 14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz PCL/ Bio-Oss/NaOH aumentou a atividade da FA	A matriz PCL/ Bio-Oss/NaOH é promissora para a formação óssea
Weinand C. <i>et al</i> , 2006 [34]	Matriz $\beta$ TCP	Matriz $\beta$ TCP/ colagénio tipo I em matriz de hidrogel	6 semanas	Atividade osteogénica através da FA	A expressão de genes relacionada com a osteogénese foi superior na matriz $\beta$ TCP/colagénio tipo I	A matriz $\beta$ TCP/colagénio tipo I é promissora para a formação óssea
Wu Y. <i>et al</i> , 2019 [43]	Matriz de SC e PCL	Matriz dECM/SC/PCL	6 horas, 1 e 7 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz dECM/SC/PCL aumentou a expressão de genes relacionada com a osteogénese	A matriz dECM/SC/PCL é promissora para a regeneração óssea
Xu Z. <i>et al</i> , 2019 [90]	Matriz $\beta$ TCP/ PLGA	Matriz $\beta$ TCP/PLGA/PDA	7, 14 dias	Atividade osteogénica através da FA	Matriz $\beta$ TCP/PLGA/PDA aumentou a atividade da FA	A adição de PDA promove a osteogénese
Yun S. <i>et al</i> , 2021 [91]	Matriz PCL	Matriz dECM/ $\beta$ TCP/PCL	1,3,5,7,14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz dECM/ $\beta$ TCP/PCL aumentou a atividade da FA	A matriz dECM/ $\beta$ TCP/PCL mostrou ter potencial osteogénico superior

**Tabela 2.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Grupo de controle</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Zamani Y. <i>et al</i> , 2021 [92]	Matriz $\beta$ TCP/ PLGA através da técnica solvente/lixiviação	Matriz $\beta$ TCP/ PLGA impressas 3D	14 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz $\beta$ TCP/ PLGA 3D apresentava maior atividade da FA	A matriz $\beta$ TCP/ PLGA 3D é mais favorável para a formação óssea
Zhang Y. <i>et al</i> , 2019 [49]	Matriz $\beta$ TCP/ PLGA	Matriz $\beta$ TCP/ PLGA/ OG/ BMP-2	1,4,7 dias	Atividade osteogénica através da FA	A matriz $\beta$ TCP/ PLGA/ OG/ BMP-2 aumentou a atividade da FA	A matriz $\beta$ TCP/ PLGA/ OG/ BMP-2 promissora para a regeneração óssea
Zhang Z. <i>et al</i> , 2021 [36]	Matriz de p-Ta	Matriz p-Ta-nt	7 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	A matriz de tântalo com nanotubos demonstrou maior expressão de genes relacionada com osteogénese	A matriz de tântalo com nanotubos é promissora para a formação óssea
Zhao N. <i>et al</i> , 2017 [93]	Matriz $\beta$ TCP e matriz HA	Matriz HA/ $\beta$ TCP com diferentes composições de HA (0.20, 0.40,0.60, 0.80 e 1.00)	1, 4, 7 dias	Atividade osteogénica através da FA	Matriz com 40% HA mostrou maior capacidade osteogénica	A matriz HA/ $\beta$ TCP é promissora para a formação óssea
Zhong L. <i>et al</i> , 2020 [94]	Matriz PCL	-Matriz de PCL/ DCPD -Matriz de PCL/DCPD e nanoZIF-8	25 dias	Expressão de genes relacionados com osteogénese	Matriz de PCL/DCPD/ nanoZIF-8 aumentou a expressão de genes relacionada com osteogénese	A matriz de PCL/DCPD/ nanoZIF-8 é um substituto ósseo com potencial

3D – tridimensionalmente, Asp@Lipo - lipossomas carregados de aspirina, AW - apatite-volastonite, BFP-1 - peptídeo formador de osso 1, BG - vidro bioativo, BG/PVA-2d - vidro bioativo/ácido polivinílico em tampão fosfato-salino 2 dias, BG/PVA-30d - vidro bioativo/ácido polivinílico em tampão fosfato-salino 30 dias, Bio-Oss - mineral de osso bovino desproteínizado, BMP-2 proteína morfogenética óssea tipo-2, CH – quitosano, CS - sulfato de cálcio, Cu – cobre, Cu (10Cu-BG) - vidro bioativo com 15% de cobre, Cu (2Cu-BG) - vidro bioativo com 7% de cobre, Cu (5Cu-BG) - vidro bioativo com 10% de cobre, DCPD - fosfato de cálcio dihidratado, dECM – matriz extracelular descelularizada, FA - fosfatase alcalina, Fe – ferro, FDM - método fusão e deposição, FP - fósforo preto, GCP- silicato de cálcio com grafeno/ policaprolactona, GTA – glutaraldeído, HA - hidroxiapatite, hSF-MSCs - células estaminais mesenquimatosas sinoviais, KR-34893 - composto orgânico bioativo, MEW- *melt electrospinning writing*, MgO - óxido de magnésio, MgP - fosfato de magnésio, MH – minociclina, miRNA – microRNA, nanoZIF-8 - *nanoscale zeolitic imidazolate framework-8*, NaOH- hidróxido de sódio, nt – nanotubos, OG - óxido de grafeno, PCL- policaprolactona, PDA – polidopamina, PDASC - silicato de cálcio modificado por polidopamina, PEEK – polietercetona, PGA - ácido poliglicólico, PLGA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico), PLLA - ácido polilático, PLLA/col - ácido polilático / colagénio, PRP - plasma rico em plaquetas, p-Ta- tântalo poroso, PVA - ácido polivinílico, PBS - tampão fosfato-salino, RCP - peptídeo recombinante de colagénio, rhBMP-2 - proteína óssea recombinante humana tipo 2, S1P - Esfingosina-1-Fosfato, SC - silicato de cálcio, SiO<sub>2</sub> - sílica, SrO - óxido de estrôncio, SrSC – silicato de cálcio e estrôncio, Ti – titânio, VEGF - fator de crescimento endotelial, ZnO – óxido de zinco,  $\beta$  TCP –  $\beta$ -fosfato-tricálcio

**Tabela 3.** Resumo dos parâmetros e resultados dos estudos *in vivo* incluídos na revisão sistemática

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Bae E. <i>et al</i> , 2018 [28]	n = 28 ratos machos SD	Grupo sem matriz (n = 7)	- Grupo com matriz PCL/ $\beta$ -TCP (n = 7) - Grupo com dECM/ PCL/ $\beta$ -TCP (n = 7) - Grupo com matriz dECM/ PCL/ $\beta$ -TCP/ rhBMP-2 (n = 7)	4 semanas	$\mu$ -CT, histologia	A formação de osso foi significativamente superior no grupo com a matriz dECM/ PCL/ $\beta$ -TCP/rhBMP-2	A matriz dECM/ PCL/ $\beta$ -TCP/rhBMP-2 promove regeneração óssea
Bekisz J. <i>et al</i> , 2017 [95]	n = 10 defeitos em ovelhas <i>Finn Dorset</i>	Grupo com matriz HA/ colagénio $\beta$ -TCP/	Grupo com matriz HA/ $\beta$ -TCP/ colagénio/dipiridamol 100 $\mu$ M	3, 6 semanas	$\mu$ -CT, histologia	A osteogénese foi superior no grupo experimental nas 3 e 6 semanas	O dipiridamol aumenta significativamente a capacidade de regeneração óssea
Bose S. <i>et al</i> , 2018 [37]	ratos machos SD	Grupo com matriz $\beta$ -TCP	Grupo com matriz $\beta$ -TCP/curcumina/ PCL/ PEG	6 semanas	Histologia	A formação de osso mineralizado, após 6 semanas, foi superior no grupo experimental	A matriz $\beta$ -TCP/curcumina/PCL /PEG é uma excelente candidata para a regeneração óssea

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Chang P. <i>et al</i> , 2021 [56]	n = 30 ratos machos SD	Grupo sem matriz (n = 6)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grupo com matriz de HA (n = 6)</li> <li>- Grupo com matriz HA e peptídeo RGD não oxidado com matriz de baixa rigidez (n = 6)</li> <li>- Grupo com matriz HA e peptídeo RGD não oxidado com matriz de elevada rigidez (n = 6)</li> <li>- Grupo com matriz HA e peptídeo RGD oxidado com matriz de elevada rigidez (n = 6)</li> </ul>	7, 28 dias	μ-CT, Histologia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Na matriz HA e peptídeo RGD não oxidado com rigidez elevada observou-se regeneração óssea limitada</li> <li>- Na matriz HA e peptídeo RGD oxidado com elevada rigidez houve maior formação de osso em ambos os momentos</li> </ul>	A combinação da matriz de HA com peptídeo RGD oxidado em matriz de elevada rigidez pode ser vantajosa para a regeneração maxilofacial
Chen M. <i>et al</i> , 2021 [96]	n = 32 ratos machos SD	Grupo sem matriz (n = 8)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grupo com PRF (n = 8)</li> <li>- Grupo com matriz de PCL (n = 8)</li> <li>- Grupo com matriz PRF/PCL (n = 8)</li> </ul>	4,8 semanas	μ-CT, histologia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Foi observado maior mineralização nos grupos com matriz, nas 4 e 8 semanas</li> <li>- A presença de PRF não influenciou a formação óssea</li> </ul>	A utilização de matrizes PCL incrementa a formação óssea
Chiu Y. <i>et al</i> , 2019 [38]	coelhos <i>New Zealand</i>	Grupo de SC com matriz	Grupo com matriz de SrSC	4,8 semanas	μ-CT, histologia	Existe maior formação óssea e vascular no grupo experimental nas 4 e 8 semanas	A matriz SrSC incrementa a regeneração óssea
Cooke M. <i>et al</i> , 2020 [66]	n = 12 ratos machos SD	Grupo sem matriz LayFomm (n=6)	Grupo com matriz LayFomm (n=6)	6 semanas	μ-CT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- As propriedades mecânicas da matriz são uma limitação em grandes defeitos</li> <li>- Existe maior produção de tecido mineralizado no grupo com matriz LayFomm</li> </ul>	A matriz LayFomm é promissora na regeneração craniofacial

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Dai Q. <i>et al</i> , 2021 [67]	n = 40 defeitos em 20 ratos machos SD	Defeitos sem matriz	- Defeitos com matriz Gel/SF - Defeito com matriz Gel/SF/0Cu-BG - Defeito com matriz Gel/SF/2Cu-BG, Gel/SF/5Cu-BG e Gel/SF/10Cu-BG	4,8 semanas	μ-CT, histologia	- O grupo com a matriz Gel/SF/2Cu-BG produziu o maior número de vasos sanguíneos - Nas 4 semanas, a matriz Gel/SF/5Cu-BG apresentou a maior formação óssea - Nas 8 semanas, a matriz Gel/SF/2Cu-BG apresentou a maior formação óssea	A matriz mais eficaz na regeneração óssea foi a Gel/SF/5Cu-BG
Diomedea F. <i>et al</i> , 2018 [97]	n = 24 ratos machos Wistar	Grupo com matriz PLLA (n=4)	- Grupo com matriz PLLA e hGMSCs (n=4) - Grupo com matriz PLLA/ EV (n=4) - Grupo com matriz PLLA/hGMSCs/ EV (n=4) - Grupo com matriz PLLA/ PEI-EVs (n=4) - Grupo com matriz PLLA/ PEI-EVs/ hGMSCs (n=4)	6 semanas	μ-CT	Os grupos com a matriz PLLA/ PEI-EVs e PLLA/ PEI-EVs/ hGMSCs demonstraram maior regeneração óssea e melhores propriedades osteogénicas	As matrizes PLLA conjugadas com PEI-EVs são promissoras na regeneração óssea
Dubey N. <i>et al</i> , 2020 [57]	n = 16 ratos machos Fisher 344	Grupo sem matriz (n=4)	- Grupo com PTFE (n=4) - Grupo com matriz ECM (n=4) - Grupo com matriz ECM/MgP (n=4)	4,8 semanas	μ-CT, histologia	- O grupo de controlo e o da membrana de PTFE mostrou escassa formação óssea - No grupo com a matriz ECM/AMP observou-se maior densidade óssea nas 4 e 8 semanas em relação aos outros grupos	A presença de MgP aumenta a regeneração óssea sendo promissora para reparação de defeitos ósseos

**Tabela 3.** Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
El-Habashy S. <i>et al</i> , 2021 [98]	n = 24 coelhos <i>New Zealand</i>	Grupo sem matriz (n=6)	- Grupo com matriz ácido polivinílico (n=6) - Grupo com matriz HA (n=6) - Grupo com matriz HA/PCL (n=6)	2,6 semanas	μ-CT	A matriz HA/PCL demonstrou maior biocompatibilidade, osteocondução e melhores propriedades osteogénicas em ambos os momentos	A matriz HA/PCL é promissora na reparação de defeitos ósseos
Fahimipour F. <i>et al</i> , 2019 [46]	n = 15 ratos machos <i>Fisher 344</i>	- Grupo com matriz de β TCP/colagénio/heparina (n = 5) - Grupo com matriz de β TCP/colagénio / BMP-2 (n = 5)	Grupo com matriz de β TCP/colagénio/heparina/BMP-2 (n = 5)	6 semanas	Histologia, qPCR	A matriz do grupo experimental revelou superior diferenciação osteogénica e maior formação óssea	A molécula bioativa BMP-2 aumenta a eficiência da matriz na regeneração óssea
Fama C. <i>et al</i> , 2020 [62]	n = 14 defeitos em 7 ratos	-----	- Grupo com matriz porosa β-TCP (n = 7) - Grupo com matriz não porosa β-TCP (n = 7)	8 semanas	μ-CT, histologia	- Nos grupos com a matriz não porosa, observou-se maior formação óssea - A matriz porosa exibiu maior volume de tecido mole	A matriz não porosa aumenta a regeneração óssea

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Guéhennecc L. <i>et al</i> , 2019 [52]	n = 12 ratos machos SD	Grupo com matriz HA (n=6)	Grupo com matriz HA:60- $\beta$ TCP:40 (n=6)	3,6 meses	$\mu$ -CT, histologia	Os grupos demonstraram semelhante quantidade de osso formado 3 e 6 meses após intervenção	As matrizes de fosfato de cálcio apresentam boa osteointegração e biocompatibilidade devendo ser estudadas para atingir o nível de regeneração óssea ideal
Han L. <i>et al</i> , 2021 [69]	n = 14 ratos machos SD	Grupo sem matriz (n=6)	-Grupo com matriz PLGA revestida de Fe (n=4) -Grupo com matriz PLGA sem revestimento de Fe (n=4)	8 semanas	$\mu$ -CT	A quantidade de osso formado foi superior na matriz revestido por Fe, seguido da matriz sem revestimento	A matriz magnética promove regeneração óssea
He M. <i>et al</i> , 2021 [99]	n = 12 ratos fêmeas SD	Grupo sem matriz (n= 4)	Grupo com matriz de hidrogel com PPG-1.5 (n = 4)	4 semanas	Histologia	No grupo com a matriz PPG-1.5 a formação de osso foi superior	A matriz PPG-1.5 promove um bom suporte mecânico para o crescimento ósseo
Huang K. <i>et al</i> , 2021 [45]	n = 6 coelhos machos New Zealand	Grupo com matriz SC/ CS (n= 3)	Grupo com matriz MS/CS/BMP-2 (n= 3)	4 semanas	$\mu$ -CT, histologia	A matriz MS/CS/BMP-2 promoveu maior crescimento ósseo vascular e	A matriz MS/CS pode atuar como transportador de BMP-2 sendo um biomaterial ideal para a regeneração óssea

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Ishack S. <i>et al</i> , 2017 [47]	n = 15 ratos murine	Grupo com matriz HA/ $\beta$ -TCP (n = 5)	-Grupo com matriz HA/ $\beta$ -TCP/ dipiridamol (n = 5) - Grupo com matriz HA/ $\beta$ -TCP/ BMP-2 (n = 5)	2,4 e 8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	Os grupos experimentais demonstraram maior formação óssea nas 2,4 e 8 semanas comparativamente ao grupo de controlo	A adição de dipiridamol e BMP-2 à matriz HA/ $\beta$ -TCP promove formação óssea
Jeong J. <i>et al</i> , 2020 [70]	n = 20 ratos machos SD	Grupo com matriz 100% gelatina (n=4)	Grupo com matriz de gelatina (40%) e $\beta$ -TCP (60%)	4 semanas	$\mu$ -CT	A matriz com $\beta$ -TCP induziu uma formação óssea significativamente maior	A presença de $\beta$ -TCP fornece um ambiente mais propício à formação de osso
Jia L. <i>et al</i> , 2021 [100]	n = 18 ratos machos SD	Grupo sem matriz (n = 6)	- Grupo com matriz de PLLA (n = 6) - Grupo com matriz PLLA e óxido de ferro (n = 6)	4 semanas	$\mu$ -CT	A matriz com óxido de ferro promoveu a formação óssea e alterou a composição do microbioma oral	A matriz com óxido de ferro pode ser utilizada para tratar defeitos ósseos do palato
Johnson Z. <i>et al</i> , 2021 [101]	n = 6 suínos yorkshire	Grupo sem matriz (n = 3)	Grupo com matriz HA/ $\beta$ -TCP (n = 3)	8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	A regeneração óssea foi superior no grupo com a matriz HA/ $\beta$ -TCP	A matriz HA/ $\beta$ -TCP parece ser efetiva na regeneração óssea
Ke D. <i>et al</i> , 2018 [72]	n=12 Fémur distal de ratos com 300 gramas	Grupo com matriz $\beta$ TCP	Grupo com matriz $\beta$ TCP, SiO <sub>2</sub> e MgO	8,12,16 semanas	Histologia	- Na 8 <sup>a</sup> semana, ambos os grupos apresentavam semelhante quantidade de osso mineralizado - O grupo experimental apresentava maior formação óssea nas 12 e 16 semanas	A matriz TCP/Si/Mg aumentou significativamente a osteogénese comparado com a matriz do grupo controlo, o que a torna promissora para a regeneração óssea

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Kim J. <i>et al</i> , 2020 [102]	n = 12 cães <i>beagles</i> machos	Grupo sem matriz (n = 4)	- Grupo com matriz $\beta$ -TCP/ HA sem polímero sintético (n = 4) - Grupo com matriz $\beta$ -TCP/ HA com polímero sintético (n = 4)	4, 8 semanas	Histologia, imagiologia	O grupo com a matriz $\beta$ -TCP/ HA sem o polímero sintético apresentou maior regeneração óssea em ambos os momentos	A matriz $\beta$ -TCP/ HA sem o polímero sintético pode ser utilizada para regeneração óssea
Kim J. <i>et al</i> , 2017 [73]	n = 24 ratos machos SD	Grupo sem matriz (n= 6)	- Grupo com matriz de MgP (n= 6) - Grupo com matriz MgP e 5 $\mu$ M de KR-34893 (n= 6) - Grupo com matriz MgP e 25 $\mu$ M KR-34893 (n= 6)	4, 8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	- O número de osteoclastos diminui na presença de KR-34893 - A formação óssea é superior nos grupos com matriz que contenha KR-34893	O composto KR-34893 é libertado gradualmente da matriz, aumentando o volume ósseo
Lee D. <i>et al</i> , 2018 [103]	n = 12 ratos machos SD	-----	- Grupo com matriz HCCS-PDA e poros de 250 $\mu$ m (n = 6) - Grupo com matriz HCCS-PDA e poros de 500 $\mu$ m (n = 6)	8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	- No grupo com a matriz de poros 250 $\mu$ m observou-se crescimento ósseo limitado - O grupo com a matriz de poros 500 $\mu$ m mostrou maior regeneração óssea	O tamanho dos poros da matriz HCCS-PDA que induz a regeneração óssea mais eficaz é 500 $\mu$ m
Lee J. <i>et al</i> , 2021 [44]	n = 10 <i>beagles</i>	PCL/ TCP/dECM; (n = 5)	$\beta$ - Grupo com matriz PCL/ TCP/bdECM + injeção de ADSC $\beta$ - (n = 5)	8 semanas	$\mu$ -CT, histologia, qPCR	O grupo experimental demonstrou maior expressão de genes relacionados com a osteogénese e osteoblastos	A injeção de células estaminais derivadas do tecido adiposo aumenta a ossificação

Tabela 3. Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
Lee S. et al, 2019 [74]	n = 12 coelhos machos New Zealand	Grupo com matriz PCL (n=3)	- Grupo com matriz PCLD (n=3) - Matriz PCLDB100 (n=3) - Matriz PCLDB1000 (n=3)	8 semanas	Histologia, imagiologia	No grupo tratado com matriz PCLDB1000 observou uma taxa superior de formação óssea e número de vasos sanguíneos	A matriz PCLDB1000 é promissora para a regeneração óssea
Lee SH. et al, 2019 [39]	coelhos New Zealand	Grupo com matriz PCL	Grupo com matriz PCL de estrutura cristalina <i>kagome</i>	4, 16 semanas	μ-CT, histologia, imunohistoquímica	O grupo experimental demonstrou formação óssea nas 4 e 16 semanas	A matriz com estrutura cristalina <i>kagome</i> pode ser aplicada na reconstrução de defeitos ósseos
Liang T. et al, 2020 [104]	n = 9 cães beagles	Grupo sem matriz	- Grupo com matriz HA/ SA - Grupo com matriz HA/SA/NG - Grupo com matriz HA/SA/ CGRP	1, 2 e 3 meses	μ-CT	- Observou-se maior crescimento ósseo nos grupos experimentais nos meses 1,2 e 3 - Os grupos com as matrizes HA/SA/NG e HA/SA/CGRP demonstraram maior potencial osteogénico	- A matriz HA/SA é promissora para a regeneração óssea - A NG E o CGRP podem levar ao aumento da proliferação óssea
Li J. et al, 2017 [75]	n = 24 ratos machos SD	Grupo com matriz PCL (n = 8)	- Grupo com matriz PCL e PRP tradicional (n= 8) - Matriz PCL/PRP <i>freeze-dried</i> (n= 8)	2,4,8,12 semanas	μ-CT, histologia	- A matriz com PRP <i>freeze-dried</i> induziu maior formação óssea do que as restantes	A adição de PRP <i>freeze-dried</i> à matriz de PCL promove maior regeneração óssea

Tabela 3. Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
Li Y. <i>et al</i> , 2019 [40]	Coelhos machos New Zealand	Grupo sem matriz	- Grupo com matriz PCL/Asp@Lipo/BFP-1 - Grupo com matriz PCL/ Asp@Lipo - Grupo com matriz PCL/BFP-1	8 semanas	Histologia	No grupo tratado com matriz PCL/ Asp@Lipo/ BFP-1 observou-se maior formação óssea, seguido do grupo tratado com PCL/BFP-1	A matriz híbrida PCL/ Asp@Lipo/ BFP-1 mostrou boas propriedades osteogénicas
Lim H. <i>et al</i> , 2020 [29]	n = 12 coelhos machos New Zealand	-----	Grupo com matriz HA/TCP com poros 0,8; 1,0;1,2;1,4 mm	4, 8 semanas	μ-CT	- Na quarta semana, poros maiores resultam numa maior formação de osso - Na oitava semana, não existiu correlação entre % formação de osso e o tamanho dos poros	O tamanho do poro só influencia a regeneração óssea na fase inicial
Lin YH. <i>et al</i> , 2019 [76]	n = 10 coelhos fêmeas New Zealand	Grupo sem matriz PEEK	- Grupo com matriz PEEK hSF-MSCs num meio de cultura <i>standard</i> - Grupo com matriz PEEK + hSF-MSCs num meio de cultura osteogénico - Grupo com matriz PEEK	4,12 semanas	μ-CT, histologia	O maior volume de osso formado foi observado no grupo com a matriz PEEK + hSF-MSCs) num meio de cultura <i>standard</i> , nas 4 e 12 semanas	A combinação da matriz PEEK + hSF-MSCs é efetiva na regeneração de defeitos ósseos
Lin YH. <i>et al</i> , 2019 [78]	n = 12 coelhos New Zealand	Grupo com matriz de SC/ PCL (n = 6)	Grupo com matriz de grafeno/SC/PCL num ratio de 10/40/50 (n = 6)	4, 8 semanas	μ-CT, histologia	No grupo experimental o volume de osso formado foi significativamente superior, nas 4 e 8 semanas	As matrizes de PCL que contém grafeno e silicato de cálcio são promissoras na regeneração óssea

Tabela 3. Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
Liu A. <i>et al</i> , 2016 [105]	n = 20 coelhos machos <i>New Zealand</i>	Grupo com matriz $\beta$ TCP (n=10)	Grupo com matriz de <i>akermanite</i> (n=10)	6, 12 semanas	$\mu$ -CT, histologia	- A percentagem de osso formado nas 6 e 12 semanas foi significativamente superior no grupo experimental - A matriz $\beta$ TCP exibiu baixas propriedades mecânicas	A matriz de <i>akermanite</i> são promissoras na regeneração óssea
Lopez C. <i>et al</i> , 2019 [61]	n = 15 coelhos <i>New Zealand</i>	-Grupo com matriz $\beta$ TCP (n=5)	- Grupo com matriz $\beta$ -TCP e colagénio (n=5) - Grupo com matriz $\beta$ -TCP e colagénio e dipiridamol (n=5)	8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	Nos grupos sem dipiridamol observou-se menos crescimento ósseo e maior matriz residual do que no grupo com dipiridamol	O dipiridamol aumentou significativamente a capacidade de regeneração óssea da matriz biocerâmica
Miao Y. <i>et al</i> , 2019 [41]	Ratos machos <i>Wistar</i>	- Grupo sem matriz -Grupo com matriz de hidrogel	Grupo com matriz de hidrogel com nanopartículas de FP	3,6 e 9 semanas	$\mu$ -CT, histologia	- A incorporação de FP promoveu a mineralização e reforçou as propriedades mecânicas da matriz - A regeneração óssea do grupo experimental foi superior nas 3,6 e 9 semanas	A matriz hidrogel/FP pode ser aplicada na regeneração óssea
Naudot M. <i>et al</i> , 2020 [106]	n=22 ratos machos SD	Grupo com matriz PCL (n=11)	Grupo com matriz PCL/HA/ BM- MSCs (n=11)	2 meses	$\mu$ -CT, histologia	O grupo experimental demonstrou formação óssea significativamente superior ao longo dos dois meses	A combinação da matriz PCL com HA e BM-MSCs é promissora para regeneração de defeitos ósseos

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Pan T. <i>et al</i> , 2022 [81]	n=20 ratos BALB/c	- Grupo sem matriz (n=4) - Grupo com matriz de hidrogel combinada com miRNA (n=4)	- Grupo com matriz de hidrogel com miRNA e 0.25 GTA (n=4) - Grupo com matriz de hidrogel com miRNA e 1 GTA (n=4) - Grupo com matriz de hidrogel com miRNA e 2.5 GTA (n=4)	2,4,8 semanas	μ-CT, histologia	A regeneração óssea foi significativamente superior nos grupos com 1GTA e 2.5GTA nas 2,4 e 8 semanas	A presença de miRNA e GTA induz a osteogénese, tornando esta matriz promissora para a área da regeneração óssea
Park S. <i>et al</i> , 2020 [82]	n= 8 defeitos em 4 cães machos beagles	Defeitos com matriz PCL (n=2)	- Defeitos com matriz PCL/T50 (n=2) - Defeitos com matriz PCL/T0/B2, (n=2) - Defeitos com matriz PCL/T50/B2 (n=2)	3 meses	μ-CT	- O volume de osso formado nos defeitos com a matriz PCL/T50 foi significativamente superior do que com a matriz PCL - Nas matrizes com rhBMP-2 a regeneração óssea foi significativamente superior às restantes	A matriz PCL/T50 é vantajosa para transportar rhBMP-2 e regenerar osso em defeitos mandibulares
Park J. <i>et al</i> , 2015 [35]	n=30 ratos BALB/c-nu/nu	Grupo com matriz PCL (n=10)	- Grupo com matriz PCL/BMP-2 (n=10) -Grupo com matriz PCL/BMP-2/VEGF	4 semanas	Quantificação de genes osteogénicos nas células estaminais da polpa dentária	A regeneração óssea foi mais rápida na matriz vascularizada	A matriz vascularizada é promissora na regeneração óssea
Pae H. <i>et al</i> , 2018 [107]	n = 10 coelhos machos New Zealand	Grupo sem matriz	- Grupo com matriz PCL - Grupo com matriz PCL/10% β-TCP -Grupo PCL/10% β-TCP e membrana de colagénio	2, 8 semanas	μ-CT	A formação de osso só foi observada nas matrizes que continham β-TCP	A adição de β-TCP na matriz de PCL aumenta a osteocondutividade

Tabela 3. Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
Qiao S. <i>et al</i> , 2020 [108]	n = 30 coelhos fêmeas New Zealand	Grupo com matriz Ti (n=15)	Grupo com matriz Ti modificada por hidrogel com concentrações médias de nanopartículas de prata (n=15)	6, 12 semanas	μ-CT, histologia	O grupo experimental demonstrou regeneração óssea significativamente superior nas 6 e 12 semanas	A matriz Ti modificada por hidrogel com concentrações médias de nanopartículas de prata é promissora para tratar defeitos ósseos
Remy M. <i>et al</i> , 2021 [84]	n = 30 ratos machos SD	- Grupo com matriz β TCP (n=5) - Grupo com matriz β TCP e colagénio (n=5)	- Grupo com matriz β-TCP/colagénio/vetor vazio (n=5) - Grupo com matriz β-TCP/ pDNA 5 μg miRNA 200c (n=5) - Grupo com matriz β-TCP/colagénio/pDNA 1 μg miRNA-200c (n=5) - Grupo com matriz β-TCP/colagénio/pDNA 5 μg miR-200c (n=5)	4 semanas	μ-CT, histologia	- Os grupos que continham matrizes com miR-200c demonstraram maior formação óssea - A formação óssea foi superior na matriz que continha βTCP/colagénio/pDNA 5 μg miR-200c	A incorporação de miR aumenta a eficácia da matriz na regeneração óssea
Rogowska-Tylman J. <i>et al</i> , 2019 [109]	n = 15 coelhos machos	- Grupo com matriz β TCP - Grupo com matriz PCL	- Grupo com matriz β-TCP/ HA - Grupo com matriz PCL/HA	3 meses	μ-CT, histologia, imunohistoquímica	O maior crescimento ósseo ocorreu no grupo que tinha a matriz β-TCP/ HA, seguido do grupo com a matriz β TCP	A adição de partículas de HA aumenta a regeneração óssea

Tabela 3. Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
Ryu J. <i>et al</i> , 2021 [53]	n = 32 defeitos mandibulares em cães <i>beagles</i> machos	-Grupo sem matriz (n = 8) - Grupo com Bio-Oss e rhBMP-2 (n = 12)	Grupo com matriz HA/ $\beta$ -TCP/ rhBMP-2 (n = 12)	6,12 semanas	Histologia, imagiologia	Não houve diferença significativa entre o grupo com Bio-Oss e o experimental	A formação de osso não é significativamente diferente com a matriz HA/ $\beta$ -TCP/ rhBMP-2 ou com partículas Bio-Oss e rhBMP-2
Shim J. <i>et al</i> , 2017 [86]	n = 3 cães <i>beagles</i> machos	Grupo com membrana de colagénio (n = 1)	- Grupo com matriz PCL (n = 1) - Grupo com matriz PCL/ $\beta$ -TCP (n = 1)	8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	A matriz PCL/ $\beta$ -TCP é mais efetiva do que a de PCL e que a membrana de colagénio em termos de regeneração óssea	A matriz PCL/ $\beta$ -TCP aparenta ser uma alternativa mais eficaz que a membrana de colagénio na regeneração óssea
Shim J. <i>et al</i> , 2017 [110]	n = 8 coelhos <i>New Zealand</i>	Grupo sem matriz	- Grupo com membrana PCL de 30% porosidade - Grupo com membrana PCL de 50% porosidade - Grupo com membrana PCL de 70% porosidade	4 semanas	$\mu$ -CT, histomorfometria	- O grupo com a matriz de 30% porosidade mostrou um nível superior de osso formado comparativamente aos grupos experimentais - No grupo de controlo obteve maior formação óssea que a matriz com 50% porosidade	- A formação óssea foi significativamente superior nas membranas de PCL com baixa porosidade - A membrana de PCL com 30% de porosidade é a mais favorável para a regeneração óssea

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Shuai C. <i>et al</i> , 2021 [27]	n = 18 coelhos New Zealand	Grupo sem matriz (n = 6)	- Grupo com matriz 1PLLA/1 PGA/HA (n = 6) - Grupo com matriz PLLA/HA (n = 6)	4, 8 semanas	μ-CT	A matriz PLLA/PGA/HA apresentou maior osteogénese e vascularização	A matriz PLLA/PGA/HA é promissora para a regeneração óssea
Tcacencu I. <i>et al</i> , 2018 [59]	n = 15 ratos machos SD	Grupo com matriz PLLA (n = 3)	- Grupo com matriz vítrea cerâmica AW (n = 3) - Grupo com matriz PLLA/AW (n = 6)	12 semanas	Histologia	- Não foi observada formação óssea no grupo de controlo - A maior formação óssea deu-se no grupo com a matriz PLLA/AW	A matriz PLLA/AW é efetiva na regeneração óssea
Tovar N. <i>et al</i> , 2018 [111]	n = 14 coelhos New Zealand	Grupo sem matriz (n = 4)	Grupo com matriz β-TCP (n = 10)	8,12,24 semanas	μ-CT, histologia	- O grupo de controlo mostrou crescimento ósseo limitado - No grupo experimental, a quantidade de osso formada foi superior às 12 e 24 semanas	As matrizes β-TCP são biocompatíveis, reabsorvíveis e conseguem regenerar osso
Tsai C. <i>et al</i> , 2019 [87]	n = 12 coelhos New Zealand	Grupo com matriz de titânio (n = 6)	Grupo com matriz de titânio/ Mg- CS e CH	6 semanas	Histologia	Observou-se menor regeneração óssea no grupo de controlo	A mineralização foi superior na matriz experimental, o que a torna promissora na regeneração de defeitos ósseos
Umeyama R. <i>et al</i> , 2020 [42]	Ratos machos C57BL/6J	Grupo com matriz β-TCP/ RCP	Grupo com matriz β-TCP/RCP e células da medula óssea cultivadas num ambiente osteogénico durante 4, 7 e 14 dias	8 semanas	Histologia	O grupo com a matriz cujas células tinham sido cultivadas num ambiente osteogénico durante 7 dias demonstraram maior potencial osteogénico	As células da medula óssea devem cultivadas num meio osteogénico durante 7 dias antes de integrarem a matriz β-TCP/RCP

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Van hede D. <i>et al</i> , 2021 [55]	n=16 Ratos machos Wistar	- Matriz de CaP com geometria ortogonal -Matriz CaP+ grânulos Bio-Oss	Grupo com matriz CaP com geometria giroide	4,8 semanas	μ-CT	No grupo com a matriz giróide observou-se maior formação óssea nas 4 e 8 semans	A geometria giróide é promissora para regeneração óssea
Wang M. <i>et al</i> , 2019 [112]	n = 16 coelhos New Zealand	Grupo com enxerto ósseo autólogo (n = 8)	Grupo com matriz β-TCP e dipiridamol (n = 8)	24 semanas	Histologia	O grupo com a matriz experimental demonstrou maior regeneração óssea	A matriz β-TCP e dipiridamol é promissora na regeneração de defeitos ósseos
Wang P. <i>et al</i> , 2021 [88]	n = 72 ratos fêmeas SD	Grupo com matriz PLLA (n = 8)	- Grupo com matriz PLLA condicionada com hidróxido de sódio (n = 8) - Grupo com matriz PLLA com PDA condicionada com hidróxido de sódio (n = 8)	4,8 semanas	μ-CT, histologia	A formação óssea nas semanas 4 e 8 foi superior no grupo com a matriz com PDA, seguido da matriz PLLA condicionada com hidróxido de sódio	A presença de PDA aumenta a osteogénese na matriz
Wang S. <i>et al</i> , 2020 [89]	n = 12 ratos fêmeas BALB/c	Grupo com matriz PCL/Bio-Oss (n = 6)	Grupo com matriz PCL/Bio-Oss/NaOH	8 semanas	Histologia	No grupo com a matriz PCL/Bio-Oss/NaOH observou-se maior formação óssea	O tratamento com NaOH aumentou a hidrofiliçidade da matriz aumentando as propriedades osteogénicas

**Tabela 3.** Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
Won J. <i>et al</i> , 2016 [54]	n = 3 cães <i>beagles</i> machos	Grupo membrana colagénio com de	Grupo com matriz PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP e Bio-Oss	8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	- A formação óssea foi semelhante em ambos os grupos - A matriz do grupo experimental revelou melhores propriedades mecânicas	A matriz PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP promove níveis de regeneração óssea semelhante à membrana de colagénio, mas apresenta melhores propriedades mecânicas
Wu Y. <i>et al</i> , 2019 [43]	Ratos Wistar	Grupo com matriz SC/PCL	Grupo com matriz dECM/SC/PCL	4 semanas	$\mu$ -CT	A regeneração óssea foi superior no grupo dECM/SC/PCL	A descelularização combinada com matrizes 3D pode ser aplicada na regeneração óssea
Xu Z. <i>et al</i> , 2019 [90]	n = 6 ratos BALB/c	Grupo sem matriz	- Grupo com matriz PLGA/ $\beta$ -TCP - Grupo com matriz PLGA/ $\beta$ -TCP/1 mg polidopamina - Grupo com matriz PLGA/ $\beta$ -TCP/2 mg polidopamina	2, 6 semanas	$\mu$ -CT, histologia	Quanto maior a concentração de PDA maior a regeneração óssea, nas 2 e 6 semanas	A adição de PDA permite obter bons resultados, sendo que tem bastante potencial na regeneração óssea
Yu L. <i>et al</i> , 2020 [113]	n = 18 ratos SD	Grupo com matriz de Ti	- Grupo com matriz de Ti e MSC - Grupo com matriz Ti e RA	8 semanas	$\mu$ -CT, histologia	- No grupo de controlo, a formação óssea foi quase nula - A maior regeneração óssea deu-se no grupo com RA	A combinação de células estaminais pluripotentes e matrizes de Ti com RA podem ser utilizadas para reparar defeitos ósseos

**Tabela 3.** Continuação

<b>Autores, Ano</b>	<b>Tamanho da amostra (n)</b>	<b>Grupo de controlo</b>	<b>Grupo experimental</b>	<b>Tempo de avaliação</b>	<b>Método de avaliação da regeneração óssea</b>	<b>Resultados</b>	<b>Conclusão</b>
Yun J. <i>et al</i> , 2019 [51]	n = 12 cães <i>beagles</i>	Grupo sem matriz	- Grupo com matriz PLLA/PLGA/HA - Grupo com matriz PLLA/PLGA/HA/BMP-2	20 semanas	μ-CT, histologia, imagiologia	- A matriz PLLA/PLGA/HA é biodegradável e foi substituída por osso - A regeneração óssea foi significativamente maior no grupo com BMP-2	Os defeitos ósseos podem ser tratados com PLLA/PLGA/HA/BMP-2 com sucesso
Yun S. <i>et al</i> , 2021 [91]	n = 27 ratos SD	Grupo sem matriz (n = 3)	- Grupo com matriz dECM (n = 8) - Grupo com matriz β TCP (n = 8) - Grupo com matriz dECM/ β TCP (n = 8)	4 semanas	μ-CT, histologia	O grupo com a matriz dECM/ β TCP apresentou maior formação óssea	A matriz dECM/ β TCP tem potencial osteogénico ideal para tratar defeitos ósseos
Zhang W. <i>et al</i> , 2017 [114]	n = 38 coelhos machos <i>New Zealand</i>	Grupo com matriz β-TCP (n = 12)	- Grupo com matriz BRT (n = 12) - Grupo com matriz BRT-H (n = 14)	4, 12 semanas	μ-CT	O grupo com a matriz BRT-H promoveu significativamente maior regeneração óssea	A matriz BRT-H é promissora na reparação de grandes defeitos ósseos
Zhang Y. <i>et al</i> , 2019 [49]	n = 24 ratos machos Wistar	Grupo sem matriz (n = 6)	- Grupo com matriz β TCP/ PLGA/ OG /BMP- 2 (n = 6) - Grupo com matriz β TCP/ PLGA/OG (n = 6) - Grupo com matriz β TCP/ PLGA (n = 6)	4, 12 semanas	μ-CT, histologia	No grupo com a matriz β TCP/ PLGA/ OG /BMP- 2 observou-se a maior formação óssea, seguido do grupo com a matriz β TCP/ PLGA/OG e β TCP/ PLGA	O peptídeo BMP-2 e o OG são favoráveis para o crescimento ósseo e aumentam a regeneração óssea, tornando a matriz PTG/P promissora na reparação de defeitos ósseos
Zhang Z. <i>et al</i> , 2021 [36]	n = 12 coelhos <i>New Zealand</i>	Grupo com matriz p-Ta (n=6)	Grupo com matriz p-Ta-nt (n=6)	2 semanas	histologia	A formação óssea foi significativamente superior no grupo experimental	Matrizes de tântalo com nanotubos são promissoras na regeneração óssea

**Tabela 3.** Continuação

Autores, Ano	Tamanho da amostra (n)	Grupo de controlo	Grupo experimental	Tempo de avaliação	Método de avaliação da regeneração óssea	Resultados	Conclusão
Zhong L. <i>et al</i> , 2020 [94]	n = 24 ratos machos SD	Grupo sem matriz (n=6)	- Grupo com matriz PCL (n=6) - Grupo com matriz PCL/DCPD (n=6) - Grupo com matriz PCL/DCPD/nanoZIF-8 (n=6)	12 semanas	μ-CT	O grupo com a matriz PCL/DCPD/nanoZIF-8 induziu uma formação óssea significativamente maior	NanoZIF-8 tem grande potencial no tratamento de defeitos ósseos

ADSC - células estaminais derivadas do tecido adiposo, Asp@Lipo - lipossomas carregados de aspirina, AW – apatite/volastonite, BFP-1 - peptídeo formador de osso 1, Bio-Oss - minerais de osso bovino desproteínizado, BM-MSCs - células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea, BMP-2 - proteína morfogenética óssea-2, BRT - β fosfato tricálcico, silício, magnésio e cálcio, BRT-H - β fosfato tricálcico, silício, magnésio e cálcio com estrutura *hollow pipe*, CaP - fosfato de cálcio, CGRP – hidroxiapatite /alginato de sódio/ peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, CH – quitosano, CS – sulfato de cálcio, DCPD - fosfato de cálcio dihidratado, dECM - matriz extracelular descelularizada, dECM - matriz extracelular descelularizada, ECM - matriz extracelular semelhante à natural, ETG - ácido polilático condicionada com hidróxido de sódio, EV – vesícula extracelular, FP – fósforo preto, Gel/SF - gelatina/fibrina de seda, Gel/SF/0Cu-BG - gelatina/fibrina de seda e vidro bioativo, Gel/SF/10Cu-BG - gelatina/fibrina de seda/vidro bioativo e 15% de cobre, Gel/SF/2Cu-BG - gelatina/fibrina de seda/vidro bioativo e 7% de cobre, Gel/SF/5Cu-BG - gelatina/fibrina de seda/vidro bioativo e 10% de cobre, GTA – glutaraldeído, HA – hidroxiapatite, HCCS-PDA - silicato de cálcio e colagénio de hidroxiapatite com ligação à polidopamina, hGMSCs - células estaminais mesenquimatosas da gengiva humana, hSF-MSCs - células estaminais mesenquimatosas sinoviais, KR-34893 - composto orgânico bioativo, LayFomm - ácido polivinílico + poliuretano, mg – miligrama, Mg- CS - silicato de cálcio, MgO – óxido de magnésio, MgP – fosfato de magnésio, miRNA – microRNA, MSC - células estaminais mesenquimatosas, NG – naringina, OG – óxido de grafeno, PCL – policaprolactona, PCL/T0/B2 – policaprolactona/ proteína óssea recombinante humana tipo 2, PCL/T50 - ratio 1:1 policaprolactona / β fosfato tricálcico, PCL/T50/B2 - policaprolactona/ β fosfato tricálcico / proteína óssea recombinante humana tipo 2, PCLD – policaprolactona imersa em dopamina, PCLDB100 - policaprolactona imersa em dopamina e BFP-1 a 100 ug/ml, PCLDB1000 - policaprolactona imersa em dopamina e BFP-1 a 1000 ug/ml, pDNA - plasmídeo de DNA, PEEK – polietercetona, PEG – polietilenoglicol, PEI-EVs - ácido polilático/ vesícula extracelular com polietilenoimina, PGA - ácido poliglicólico, PLGA- poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), PPG-1.5 - poliacrilamida, poliuretano, PRF - fibrina rica em plaquetas, PRP - plasma rico em plaquetas, p-Ta-nt - tântalo com nanotubos, PTFE – politetrafluoretileno, PTG – ácido polilático com polidopamina condicionada com hidróxido de sódio, qPCR - Reação de cadeia de polimerase em tempo real, RA – ácido retinóico, RCP - peptídeo recombinante colagénio, rhBMP-2 - proteína óssea recombinante humana tipo 2, SA – alginato de sódio, SC - silicato de cálcio, SD- *Sprague Dawley*, SiO<sub>2</sub> – sílica, SrSC - silicato de cálcio e estrôncio, Ti- titânio, β-TCP - β fosfato tricálcico, μ-CT - Tomografia microcomputorizada

	Resumo estruturado	Objetivos/Hipóteses	Base científica e explicação do raciocínio	Definição de outcome	Intervenções em cada grupo	Determinação do tamanho da amostra	Mecanismo utilizado para alocação aleatória	Alocação aleatória	Implementação	Ocultação	Métodos estatísticos	Resultados e precisão	Limitações	Protocolo (se aplicável)	Informações sobre financiamento
Alksne M. <i>et al</i> , 2020	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Bae E. <i>et al</i> , 2018	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Cao Y. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Chen Y. <i>et al</i> , 2018	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Chiu Y. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Cooke M. <i>et al</i> , 2020	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Dai Q. <i>et al</i> , 2021	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Dubey N. <i>et al</i> , 2020	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
Fahimpour F. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Gómez-Cerezo M. <i>et al</i> , 2020	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Han L. <i>et al</i> , 2021	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Huang K. <i>et al</i> , 2021	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Jeong J. <i>et al</i> , 2020	N	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Kao C. <i>et al</i> , 2015	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Ke, D. <i>et al</i> , 2018	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Kim B. <i>et al</i> , 2018	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Kim J. <i>et al</i> , 2017	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Lee S. <i>et al</i> , 2018	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Li J. <i>et al</i> , 2017	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Li Y. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Lin Y. <i>et al</i> , 2019	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
Lin YH. <i>et al</i> , 2017	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Lin YH. <i>et al</i> , 2019	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Martin V. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Miao Y. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Midha S. <i>et al</i> , 2018	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Pan T. <i>et al</i> , 2022	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Park J. <i>et al</i> , 2015	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Park S. <i>et al</i> , 2020	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Ratheesh. G. <i>et al</i> , 2021	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Remy M. <i>et al</i> , 2021	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Roh H. <i>et al</i> , 2016	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Shim J. <i>et al</i> 2017	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Shuai C. <i>et al</i> , 2020	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Tcacencu I. <i>et al</i> , 2018	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
Tsai C. <i>et al</i> , 2019	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Umeyama R. <i>et al</i> , 2020	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Wang P. <i>et al</i> , 2021	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Wang S. <i>et al</i> , 2020	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Weinand C. <i>et al</i> , 2006	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
Wu Y. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Xu Z. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Yun S. <i>et al</i> , 2021	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Zamani Y. <i>et al</i> , 2021	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Zhang Y. <i>et al</i> , 2019	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Zhang Z. <i>et al</i> , 2021	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Zhong L. <i>et al</i> , 2020	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
Zhao N. <i>et al</i> , 2017	S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N

Figura 4. Risco de viés dos estudos *in vitro*. S- sim, N – não

	Sequência de alocação	Características <i>baseline</i>	Ocultação dos investigadores sobre a intervenção	Alojamento aleatório	Ocultação da alocação	Seleção aleatória para avaliação do <i>outcome</i>	Ocultação dos investigadores sobre o <i>outcome</i>	Abordagem dos dados de <i>outcomes</i> incompletos	Selective <i>outcome reporting</i>	Outras fontes de viés
Bae E. <i>et al</i> , 2018	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Bekisz J. <i>et al</i> , 2017	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Bose S. <i>et al</i> , 2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Chang P. <i>et al</i> , 2021	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Chen M. <i>et al</i> , 2021	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Chiu Y. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cooke M. <i>et al</i> , 2020	NE	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Dai Q. <i>et al</i> , 2021	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Diomedede F. <i>et al</i> , 2018	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Dubey N. <i>et al</i> , 2020	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
El-Habashy S. <i>et al</i> , 2021	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Fahimipour F. <i>et al</i> , 2019	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Fama C. <i>et al</i> , 2020	NE	N	N	N	N	N	N	N	N	S
Guéhennecc L. <i>et al</i> , 2019	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Han L. <i>et al</i> , 2021	NE	N	N	N	N	N	N	N	N	N
He M. <i>et al</i> , 2021	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Huang K. <i>et al</i> , 2021	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Ishack S. <i>et al</i> , 2017	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Jeong J. <i>et al</i> , 2020	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Jia L. <i>et al</i> , 2021	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Johnson Z. <i>et al</i> , 2021	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Ke D. <i>et al</i> , 2018	N	N	N	N	N	NE	N	N	N	N
Kim J. <i>et al</i> , 2020	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Kim B. <i>et al</i> , 2018	N	S	N	N	N	N	S	N	N	N
Kim J. <i>et al</i> , 2017	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Lee D. <i>et al</i> , 2018	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Lee J. <i>et al</i> , 2021	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lee S. <i>et al</i> , 2019	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Lee SH. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Liang T. <i>et al</i> , 2020	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Li J. <i>et al</i> , 2017	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Li Y. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lim H. <i>et al</i> , 2020	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Lin YH. <i>et al</i> , 2019	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Lin YH. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Liu A. <i>et al</i> , 2016	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Lopez C. <i>et al</i> , 2019	NE	S	N	N	N	N	S	N	N	N
Miao Y. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Naudot M. <i>et al</i> , 2020	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Pan T. <i>et al</i> , 2022	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N

Figura 5. Risco de viés dos estudos *in vivo*. S- sim, N – não, NE – não especificado

	Sequência de alocação	Características baseline	Ocultação da alocação	Alojamento aleatório	Ocultação dos investigadores sobre a intervenção	Seleção aleatória para avaliação do outcome	Ocultação dos investigadores sobre o outcome	Abordagem dos dados de outcomes incompletos	Selective outcome reporting	Outras fontes de viés
Park S. <i>et al</i> , 2020	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Park J. <i>et al</i> , 2015	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Pae H. <i>et al</i> , 2018	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Qiao S. <i>et al</i> , 2020	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Remy M. <i>et al</i> , 2021	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Rogowska-Tylman J. <i>et al</i> , 2019	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Ryu J. <i>et al</i> , 2021	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Shim J. <i>et al</i> , 2017	NE	N	NE	N	N	N	N	N	N	N
Shim J. <i>et al</i> , 2017	NE	S	N	N	N	N	S	N	N	N
Shuai C. <i>et al</i> , 2021	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Tcacencu I. <i>et al</i> , 2018	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Tovar N. <i>et al</i> , 2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Tsai C. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Umeyama R. <i>et al</i> , 2020	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Van hede D. <i>et al</i> , 2021	NE	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Wang M. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Wang P. <i>et al</i> , 2021	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Wang S. <i>et al</i> , 2020	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Won J. <i>et al</i> , 2016	NE	S	N	N	N	N	S	N	N	N
Wu Y. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Xu Z. <i>et al</i> , 2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Yu L. <i>et al</i> , 2020	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Yun J. <i>et al</i> , 2019	N	S	N	N	N	N	N	N	N	S
Yun S. <i>et al</i> , 2021	NE	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Zhang W. <i>et al</i> , 2017	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Zhang Y. <i>et al</i> , 2019	NE	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Zhang Z. <i>et al</i> , 2021	NE	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Zhong L. <i>et al</i> , 2020	NE	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Figura 5. Continuação

#### 4. Discussão

Esta revisão sistemática teve como objetivo sintetizar a literatura atual sobre estratégias de regeneração óssea com biomateriais impressos tridimensionalmente, avaliando o seu sucesso ou fracasso. Embora a análise quantitativa dos resultados não tenha sido possível devido à heterogeneidade dos estudos incluídos, a análise qualitativa realizada permitiu melhorar a compreensão e a avaliação crítica dos estudos publicados.

Convencionalmente, o enxerto ósseo autólogo com osso esponjoso é considerado o *gold-standard* do enxerto ósseo. [4] Contudo, a oferta limitada de osso doador bem como a reabsorção óssea provocada pela falta de adaptação do enxerto ao local recetor podem aumentar a necessidade de reintervenção, o que acarreta custos. [11,12] No sentido de colmatar estas limitações, novas estratégias que permitam acelerar a formação óssea, reduzir a reabsorção óssea e melhorar a cicatrização dos tecidos moles têm sido estudadas. Os biomateriais impressos tridimensionalmente permitem a correta adaptação do enxerto ao local recetor, o que justifica a investigação realizada nesta área científica, que aumentou substancialmente nos últimos cinco anos. [19,20]

Dos quarenta e oito estudos *in vitro* incluídos, dezassete avaliaram a eficácia da matriz PCL, sendo o biomaterial mais reportado na literatura. A matriz de PCL é altamente biocompatível, sendo extensamente utilizada na regeneração de tecidos devido à sua durabilidade [65]. Apesar de ter baixa taxa de degradação, é limitada em termos de adesão celular e diferenciação osteogénica e, por isso, vários autores [28] [50] [74] [40] [35,82] sugeriram a sua conjugação com diferentes polímeros [65] e moléculas bioativas, tal como rBMP-2, que promove a proliferação e diferenciação das células estaminais mesenquimatosas em osteoblastos, conduzindo à formação óssea. No entanto, uma *umbrella review* publicada recentemente acerca da eficácia das abordagens atuais na regeneração de defeitos ósseos em doentes não síndrômicos com fenda palatina, verificou que a rBMP2 parece fornecer resultados semelhantes em relação ao volume ósseo, preenchimento em altura comparativamente ao enxerto ósseo de crista ilíaca. [115] Outra limitação da matriz de PCL é a sua baixa hidrofiliabilidade [75], que é ultrapassada quando conjugada com um material hidrofílico como o  $\beta$ -TCP [28] [86] [91] ou a polidopamina. [65] Adicionalmente, a adição de grafeno à matriz de PCL demonstrou ser promissora devido à sua capacidade de induzir a secreção de fatores de crescimento que potenciam a angiogénese. [78]

A matriz  $\beta$ -TCP foi reportada em onze estudos *in vitro* e em vinte e nove *in vivo*. Esta é uma biocerâmica de fosfato de cálcio com biocompatibilidade e osteocondutividade ideal. [64] [84] [37] Este material apresenta componentes similares à apatite do tecido ósseo e um bom equilíbrio entre reabsorção e degradação durante a formação óssea. Contudo, as suas capacidades osteogênicas mostraram ser insatisfatórias em defeitos de grandes dimensões [64] [72] [84], tornando-se difícil obter uma regeneração óssea equivalente ao enxerto de osso autólogo. [42]

A matriz de hidroxiapatite é uma das biocerâmicas mais referenciadas nos estudos *in vivo*. Esta matriz apresenta uma elevada biocompatibilidade e osteointegração quando combinada com  $\beta$ -TCP. [95] [52] [47] Contudo, são necessários mais estudos para compreender o *macro-design* que permite otimizar a regeneração óssea. [52] Considerando que a formação óssea é um processo que envolve o sistema imune, este pode ser modulada por biomateriais como por exemplo a esfingosina-1-Fosfato (S1P) que tem sido associada à matriz  $\beta$ -TCP. O esfingolípido demonstrou aumentar a expressão de genes relacionados com a osteogênese, tal como osteopontina, fator de transcrição 2 relacionado a runt (RUNX2) e osteocalcina. [64] Para além disso, a conjugação de  $\beta$ -TCP com óxido de estrôncio (SrO), sílica (SiO<sub>2</sub>), magnésio (MgO) e zinco (ZnO) também demonstrou efetividade na regeneração óssea. Isto acontece, pois estes alteram as propriedades físicas e mecânicas da matriz. [72]

Adicionalmente, a microestrutura das matrizes como a porosidade, tamanho e estrutura dos poros desempenham um papel muito importante na viabilidade celular e no crescimento ósseo. [110] Contrariamente aos métodos tradicionais, o desenvolvimento da impressão tridimensional permite controlar a microestrutura. Deste modo, existe uma grande variedade de materiais e técnicas disponíveis para otimizar a matriz. [116] Shim e colaboradores reportaram que a porosidade afeta a osteogênese, sendo que matrizes com porosidade de 30% mostraram melhor capacidade osteogênica do que os grupos com 50% e 70% de porosidade. [110] Relativamente ao tamanho dos poros, a literatura sugere que o tamanho ideal deve ser entre 400 a 600  $\mu\text{m}$ . [83] Por fim, a configuração do poro também deve ser considerada em termos da estabilidade dinâmica da matriz. Recentemente, matrizes com estruturas hierárquicas têm sido estudadas. Zhang e colaboradores demonstraram que matrizes de tântalo com estrutura hierárquica exibiam uma excelente hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e propriedades osteogênicas. [36] No entanto, são necessários mais futuros estudos *in vivo* para compreender a estrutura que a matriz deve apresentar com o intuito de encontrar um equilíbrio entre a viabilidade celular e propriedades mecânicas do biomaterial, otimizando a regeneração óssea.

Esta revisão sistemática apresenta algumas limitações que podem alterar a interpretação dos resultados, nomeadamente: 1) alguns estudos incluídos apresentam amostras pequenas com apenas três animais; 2) estudos incluídos apresentam alto risco de viés; 3) ausência de avaliação de variáveis que interferem com a regeneração óssea como, por exemplo, a posição dos dentes no enxerto ósseo, a largura do defeito, o volume de osso enxertado e a experiência do clínico; 4) ausência de estudos clínicos; 5) heterogeneidade dos estudos em termos de tipologia de matriz e follow-up utilizado dificulta a comparação dos resultados. Não obstante, a síntese dos materiais impressos 3D permite aos clínicos conhecer os novos biomateriais utilizados.

Estudos futuros devem realizar estudos randomizados cegos com controlo de possíveis fontes de viés nomeadamente, processo de randomização, ocultação dos investigadores dos grupos experimentais e descrição das limitações dos estudos. Além disso, o custo-benefício das novas estratégias regenerativas propostas deve ser avaliado, pois desempenha um papel crucial na tomada de decisões clínicas dos sistemas de saúde, especialmente instituições públicas.

## **5. Conclusão**

Apesar da intensa investigação sobre os novos biomateriais impressos tridimensionalmente na regeneração óssea, o enxerto de osso autólogo continua a ser o método mais efetivo para tratamento de defeitos ósseos, pois permite obter uma maior osteocondução, osteoindução e osteogénese.

## **6. Agradecimentos**

Quero desde já prestar o meu especial agradecimento ao meu orientador e coorientadora.

Ao Professor Doutor Francisco do Vale pelo seu incentivo e motivação constante ao longo deste percurso, bem como pelo permanente fomento do rigor e espírito científico. O seu contributo para o meu crescimento académico foi fundamental.

À Doutora Inês Francisco a quem reconheço o apoio, os ensinamentos e a disponibilidade dados ao longo de todo o ano. Os seus conhecimentos científicos bem como a relação de proximidade e partilha foram inesgotáveis e imprescindíveis.

Agradeço às minhas irmãs e melhores amigas, Helena e Marta, pela amizade, paciência, apoio e motivação.

Ao meu pai e avós, pelo positivismo permanente, sem eles este percurso não teria sido possível.

À minha mãe, pela incomparável riqueza de valores e amor incondicional.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Garland MA, Reynolds K, Zhou CJ. Environmental mechanisms of orofacial clefts. *Birth Defects Research*. 2020;112(19):1660–98.
2. Calzolari E, Bianchi F, Rubini M, Ritvanen A, Neville AJ. Epidemiology of Cleft Palate in Europe: Implications for Genetic Research. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 2004;41(3):244–9.
3. Taib BG, Taib AG, Swift AC, van Eeden S. Cleft lip and palate: diagnosis and management. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2015;76(10):584–5, 588–91.
4. Francisco I. Overview of care in cleft lip and palate for orthodontic treatment. 2021
5. Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ*. 2004;82(3):213–8.
6. Leslie EJ, Marazita ML. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2013;163C(4):246–58.
7. Bezerra B, Pinho J, da Silva L. Tooth Abnormalities In Individuals With Unilateral Alveolar Clefts: A Comparison Between Sides Using Cone-Beam Computed Tomography. *J Clin Exp Dent*. 2017;e1195–200.
8. Vettore MV, Sousa Campos AE. Malocclusion characteristics of patients with cleft lip and/or palate. *The European Journal of Orthodontics*. 2011;33(3):311–7.
9. Stal S, Chebret L, McElroy C. The team approach in the management of congenital and acquired deformities. *Clin Plast Surg*. 1998;25(4):485–91, vii.
10. Vig KWL, Mercado AM. The orthodontist's role in a cleft palate-craniofacial team. In: Graber T, Vanarsdall R, Vig K. *Orthodontics Current Principles & Techniques*. Fourth edition. St. Louis: Elsevier Mosby, 2005: 1097-1121.
11. Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary Alveolar Bone Grafting: the Dilemma of Donor Site Selection and Morbidity. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2008;46(8):665–70.
12. Francisco I, Fernandes MH, Vale F. Platelet-Rich Fibrin in Bone Regenerative Strategies in Orthodontics: A Systematic Review. *Materials*. 2020;13(8):1866.

13. Al-Ahmady HH, Abd Elazeem AF, Bellah Ahmed NEM, Shawkat WM, Elmasry M, Abdelrahman MA, et al. Combining autologous bone marrow mononuclear cells seeded on collagen sponge with Nano Hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin: Reporting a novel strategy for alveolar cleft bone regeneration. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46(9):1593–600.
14. Ahn G, Lee JS, Yun WS, Shim JH, Lee UL. Cleft Alveolus Reconstruction Using a Three-Dimensional Printed Bioresorbable Scaffold With Human Bone Marrow Cells. *J Craniofac Surg.* 2018;29(7):1880–3.
15. Pradel W, Lauer G. Tissue-engineered bone grafts for osteoplasty in patients with cleft alveolus. *Ann Anat.* 2012;194(6):545–8.
16. Luaces-Rey R, Arenaz-Búa J, Lopez-Cedrún-Cembranos JL, Herrero-Patiño S, Sironvalle-Soliva S, Iglesias-Candal E, et al. Is PRP useful in alveolar cleft reconstruction? Platelet-rich plasma in secondary alveoloplasty. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(4):e619-623.
17. Morad G, Kheiri L, Khojasteh A. Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature. *Arch Oral Biol.* 2013;58(12):1818–27.
18. Zumarán C, Parra M, Olate S, Fernández E, Muñoz F, Haidar Z. The 3 R's for Platelet-Rich Fibrin: A “Super” Tri-Dimensional Biomaterial for Contemporary Naturally-Guided Oro-Maxillo-Facial Soft and Hard Tissue Repair, Reconstruction and Regeneration. *Materials.* 2018;11(8):1293.
19. Thirvikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertasconi LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dental Clinics of North America.* 2017;61(4):835–56.
20. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia.* 2019;84:16–33.
21. Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005;74(2):782–8.
22. Kunjalukkal Padmanabhan S, Gervaso F, Carrozzo M, Scalera F, Sannino A, Licciulli A. Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical,

- bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. *Ceramics International*. 2013;39(1):619–27.
23. Piotrowski G, Hench LL, Allen WC, Miller GJ. Mechanical studies of the bone bioglass interfacial bond. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1975;9(4):47–61.
  24. Do AV, Khorsand B, Geary SM, Salem AK. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(12):1742–62.
  25. Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med*. 2010;5(1):107–20.
  26. Lin KF, He S, Song Y, Wang CM, Gao Y, Li JQ, et al. Low-Temperature Additive Manufacturing of Biomimic Three-Dimensional Hydroxyapatite/Collagen Scaffolds for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(11):6905–16.
  27. Shuai C, Yang W, Feng P, Peng S, Pan H. Accelerated degradation of HAP/PLLA bone scaffold by PGA blending facilitates bioactivity and osteoconductivity. *Bioact Mater*. 2021;6(2):490–502.
  28. Bae EB, Park KH, Shim JH, Chung HY, Choi JW, Lee JJ, et al. Efficacy of rhBMP-2 Loaded PCL/ $\beta$ -TCP/bdECM Scaffold Fabricated by 3D Printing Technology on Bone Regeneration. *Biomed Res Int*. 2018;2018:2876135.
  29. Lim HK, Hong SJ, Byeon SJ, Chung SM, On SW, Yang BE, et al. 3D-Printed Ceramic Bone Scaffolds with Variable Pore Architectures. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):E6942.
  30. Wan DC, Nacamuli RP, Longaker MT. Craniofacial bone tissue engineering. *Dent Clin North Am*. 2006;50(2):175–90, vii.
  31. Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, Kelly JP, Graeve OA, Schwarz EM, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials*. 2014;35(13):4026–34.
  32. Spoerke E, Murray N. Titanium with aligned, elongated pores for orthopedic tissue engineering applications. 2008.
  33. Faggion CMJ. Guidelines for reporting pre-clinical in vitro studies on dental materials. *J Evid Based Dent Pract*. 2012;12(4):182–9.

34. Weinand C, Pomerantseva I, Neville CM, Gupta R, Weinberg E, Madisch I, et al. Hydrogel B-scaffolds. *Bone*. 2006;38(4):555–63.
35. Park JY, Shim JH, Choi SA, Jang J, Kim M, Lee SH, et al. 3D printing technology to control BMP-2 and VEGF delivery spatially and temporally to promote large-volume bone regeneration. *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY B*. 2015;3(27):5415–25.
36. Zhang Z, Li Y, He P, Liu F, Li L, Zhang H, et al. Nanotube-decorated hierarchical tantalum scaffold promoted early osseointegration. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2021;35
37. Bose S, Sarkar N, Banerjee D. Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration. *MATERIALS TODAY CHEMISTRY*. 2018;8:110–20.
38. Chiu YC, Shie MY, Lin YH, Lee AKX, Chen YW. Effect of strontium substitution on the physicochemical properties and bone regeneration potential of 3D printed calcium silicate scaffolds. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11).
39. Lee SH, Lee KG, Hwang JH, Cho YS, Lee KS, Jeong HJ, et al. Evaluation of mechanical strength and bone regeneration ability of 3D printed kagome-structure scaffold using rabbit calvarial defect model. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;98:949–59.
40. Li Y, Li Q, Li H, Xu X, Fu X, Pan J, et al. An effective dual-factor modified 3D-printed PCL scaffold for bone defect repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(5):2167–79.
41. Miao Y, Shi X, Li Q, Hao L, Liu L, Liu X, et al. Engineering natural matrices with black phosphorus nanosheets to generate multi-functional therapeutic nanocomposite hydrogels. *Biomater Sci*. 2019;7(10):4046–59.
42. Umeyama R, Yamawaki T, Liu D, Kanazawa S, Takato T, Hoshi K, et al. Optimization of culture duration of bone marrow cells before transplantation with a b-tricalcium phosphate/recombinant collagen peptide hybrid scaffold. *Regen Ther*. 2020;14
43. Wu YHA, Chiu YC, Lin YH, Ho CC, Shie MY, Chen YW. 3D-Printed Bioactive Calcium Silicate/Poly-epsilon-Caprolactone Bioscaffolds Modified with Biomimetic

Extracellular Matrices for Bone Regeneration. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES. 2019;20(4).

44. Lee JS, Park TH, Ryu JY, Kim DK, Oh EJ, Kim HM, et al. Osteogenesis of 3D-Printed PCL/TCP/bdECM Scaffold Using Adipose-Derived Stem Cells Aggregates; An Experimental Study in the Canine Mandible. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5409.
45. Huang KH, Wang CY, Chen CY, Hsu TT, Lin CP. Incorporation of Calcium Sulfate Dihydrate into a Mesoporous Calcium Silicate/Poly-epsilon-Caprolactone Scaffold to Regulate the Release of Bone Morphogenetic Protein-2 and Accelerate Bone Regeneration. *BIOMEDICINES.* 2021;9(2).
46. Fahimipour F, Dashtimoghadam E, Hasani-Sadrabadi MM, Vargas J, Vashae D, Lobner DC, et al. Enhancing cell seeding and osteogenesis of MSCs on 3D printed scaffolds through injectable BMP2 immobilized ECM-Mimetic gel. *DENTAL MATERIALS.* 2019;35(7):990–1006.
47. Ishack S, Mediero A, Wilder T, Ricci JL, Cronstein BN. Bone regeneration in critical bone defects using three-dimensionally printed  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffolds is enhanced by coating scaffolds with either dipyrindamole or BMP-2. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2017;105(2):366–75.
48. Yun JW, Heo SY, Lee MH, Lee HB. Evaluation of a poly(lactic-acid) scaffold filled with poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibres for reconstruction of a segmental bone defect in a canine model. *Vet Med.* 2019;64(12):531–8.
49. Zhang Y, Wang C, Fu L, Ye S, Wang M, Zhou Y. Fabrication and Application of Novel Porous Scaffold in Situ-Loaded Graphene Oxide and Osteogenic Peptide by Cryogenic 3D Printing for Repairing Critical-Sized Bone Defect. *Molecules.* 2019;24(9):E1669.
50. Kim BS, Yang SS, Kim CS. Incorporation of BMP-2 nanoparticles on the surface of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold using an  $\epsilon$ -polycaprolactone polymer emulsion coating method for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018;170:421–9.

51. Yun JW, Heo SY, Lee MH, Lee HB. Evaluation of a poly(lactic-acid) scaffold filled with poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibres for reconstruction of a segmental bone defect in a canine model. *Vet Med.* 2019;64(12):531–8.
52. Le Guehennec L, Dorien VH, Plougonven E, Nolens G, Verlee B, De Pauw MC, et al. In vitro and in vivo biocompatibility of calcium-phosphate scaffolds three-dimensional printed by stereolithography for bone regeneration. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A.* 2020;108(3):412–25.
53. Ryu JI, Yang BE, Yi SM, Choi HG, On SW, Hong SJ, et al. Bone regeneration of a 3d-printed alloplastic and particulate xenogenic graft with rhbmp-2. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22).
54. Won JY, Park CY, Bae JH, Ahn G, Kim C, Lim DH, et al. Evaluation of 3D printed PCL/PLGA/ $\beta$ -TCP versus collagen membranes for guided bone regeneration in a beagle implant model. *Biomed Mater.* 2016;11(5).
55. Van Hede D, Liang B, Anania S, Barzegari M, Verlee B, Nolens G, et al. 3D-Printed Synthetic Hydroxyapatite Scaffold With In Silico Optimized Macrostructure Enhances Bone Formation In Vivo. *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS.* 2022
56. Chang PC, Lin ZJ, Luo HT, Tu CC, Tai WC, Chang CH, et al. Degradable RGD-Functionalized 3D-Printed Scaffold Promotes Osteogenesis. *JOURNAL OF DENTAL RESEARCH.* 2021;100(10):1109–17.
57. Dubey N, Ferreira JA, Malda J, Bhaduri SB, Bottino MC. Extracellular Matrix/Amorphous Magnesium Phosphate Bioink for 3D Bioprinting of Craniomaxillofacial Bone Tissue. *ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES.* 2020;12(21):23752–63.
58. Lin Y, Umebayashi M, Abdallah MN, Dong G, Roskies MG, Zhao YF, et al. Combination of polyetherketoneketone scaffold and human mesenchymal stem cells from temporomandibular joint synovial fluid enhances bone regeneration. *SCIENTIFIC REPORTS.* 2019;9.
59. Tcacencu I, Rodrigues N, Alharbi N, Benning M, Toumpaniari S, Mancuso E, et al. Osseointegration of porous apatite-wollastonite and poly(lactic acid) composite structures created using 3D printing techniques. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;90:1–7.

60. Zhao N, Wang Y, Qin L, Guo Z, Li D. Effect of composition and macropore percentage on mechanical and in vitro cell proliferation and differentiation properties of 3D printed HA/beta-TCP scaffolds. *RSC ADVANCES*. 2017;7(68):43186–96.
61. Lopez CD, Diaz-Siso JR, Witek L, Bekisz JM, Gil LF, Cronstein BN, et al. Dipyridamole Augments Three-Dimensionally Printed Bioactive Ceramic Scaffolds to Regenerate Craniofacial Bone. *Plast Reconstr Surg*. 2019;143(5):1408–19.
62. Fama C, Kaye GJ, Flores R, Lopez CD, Bekisz JM, Torroni A, et al. Three-Dimensionally-Printed Bioactive Ceramic Scaffolds: Construct Effects on Bone Regeneration. *J Craniofac Surg*. 2021;32(3):1177–81.
63. Alksne M, Kalvaityte M, Simoliunas E, Rinkunaite I, Gendviliene I, Locs J, et al. In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration. *JOURNAL OF THE MECHANICAL BEHAVIOR OF BIOMEDICAL MATERIALS*. 2020;104.
64. Cao Y, Xiao L, Cao Y, Nanda A, Xu C, Ye Q. 3D printed  $\beta$ -TCP scaffold with sphingosine 1-phosphate coating promotes osteogenesis and inhibits inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;512(4):889–95.
65. Chen YW, Shen YF, Ho CC, Yu J, Wu YHA, Wang K, et al. Osteogenic and angiogenic potentials of the cell-laden hydrogel/mussel-inspired calcium silicate complex hierarchical porous scaffold fabricated by 3D bioprinting. *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS*. 2018;91:679–87.
66. Cooke ME, Ramirez-GarciaLuna JL, Rangel-Berridi K, Park H, Nazhat SN, Weber MH, et al. 3D Printed Polyurethane Scaffolds for the Repair of Bone Defects. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*. 2020;8.
67. Dai Q, Li Q, Gao H, Yao L, Lin Z, Li D, et al. 3D printing of Cu-doped bioactive glass composite scaffolds promotes bone regeneration through activating the HIF-1 alpha and TNF-alpha pathway of hUVECs. *BIOMATERIALS SCIENCE*. 2021;9(16):5519–32.

68. Gómez-Cerezo MN, Lozano D, Arcos D, Vallet-Regí M, Vaquette C. The effect of biomimetic mineralization of 3D-printed mesoporous bioglass scaffolds on physical properties and in vitro osteogenicity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;109
69. Han L, Guo Y, Jia L, Zhang Q, Sun L, Yang Z, et al. 3D magnetic nanocomposite scaffolds enhanced the osteogenic capacities of rat bone mesenchymal stem cells in vitro and in a rat calvarial bone defect model by promoting cell adhesion. *J Biomed Mater Res Part A*. 2021;109(9):1670–80.
70. Jeong JE, Park SY, Shin JY, Seok JM, Byun JH, Oh SH, et al. 3D Printing of Bone-Mimetic Scaffold Composed of Gelatin/ $\beta$ -Tri-Calcium Phosphate for Bone Tissue Engineering. *Macromol Biosci*. 2020;20(12):e2000256.
71. Kao CT, Lin CC, Chen YW, Yeh CH, Fang HY, Shie MY. Poly(dopamine) coating of 3D printed poly(lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS*. 2015;56:165–73.
72. Ke D, Tarafder S, Vahabzadeh S, Bose S. Effects of MgO, ZnO, SrO, and SiO<sub>2</sub> in tricalcium phosphate scaffolds on in vitro gene expression and in vivo osteogenesis. *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS*. 2019;96:10–9.
73. Kim JA, Yun HS, Choi YA, Kim JE, Choi SY, Kwon TG, et al. Magnesium phosphate ceramics incorporating a novel indene compound promote osteoblast differentiation in vitro and bone regeneration in vivo. *Biomaterials*. 2018.
74. Lee SJ, Won JE, Han C, Yin XY, Kim HK, Nah H, et al. Development of a three-dimensionally printed scaffold grafted with bone forming peptide-1 for enhanced bone regeneration with in vitro and in vivo evaluations. *J Colloid Interface Sci*. 2019;539:468–80.
75. Li J, Chen M, Wei X, Hao Y, Wang J. Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds Coated with Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma for Bone Regeneration. *MATERIALS*. 2017;10(7).
76. Lin Y, Umebayashi M, Abdallah MN, Dong G, Roskies MG, Zhao YF, et al. Combination of polyetherketoneketone scaffold and human mesenchymal stem

- cells from temporomandibular joint synovial fluid enhances bone regeneration. SCIENTIFIC REPORTS. 2019;9.
77. Lin YH, Chiu YC, Shen YF, Wu YHA, Shie MY. Bioactive calcium silicate/poly-epsilon-caprolactone composite scaffolds 3D printed under mild conditions for bone tissue engineering. JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE. 2018;29(1).
  78. Lin YH, Chuang TY, Chiang WH, Chen IWP, Wang K, Shie MY, et al. The synergistic effects of graphene-contained 3D-printed calcium silicate/poly-epsilon-caprolactone scaffolds promote FGFR-induced osteogenic/angiogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019.
  79. Martin V, Ribeiro IA, Alves MM, Gonçalves L, Claudio RA, Grenho L, et al. Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocycline-nanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;101:15–26.
  80. Midha S, Kumar S, Sharma A, Kaur K, Shi X, Naruphontjirakul P, et al. Silk fibroin-bioactive glass based advanced biomaterials: towards patient-specific bone grafts. BIOMEDICAL MATERIALS. 2018;13(5).
  81. Pan T, Song W, Xin H, Yu H, Wang H, Ma D, et al. MicroRNA-activated hydrogel scaffold generated by 3D printing accelerates bone regeneration. Bioact Mater. 2022;10
  82. Park SA, Lee HJ, Kim SY, Kim KS, Jo DW, Park SY. Three-dimensionally printed polycaprolactone/beta-tricalcium phosphate scaffold was more effective as an rhBMP-2 carrier for new bone formation than polycaprolactone alone. J Biomed Mater Res Part A. 2021;109(6):840–8.
  83. Ratheesh G, Shi M, Lau P, Xiao Y, Vaquette C. Effect of Dual Pore Size Architecture on in Vitro Osteogenic Differentiation in Additively Manufactured Hierarchical Scaffolds. ACS Biomater Sci Eng. 2021;7(6):2615–26.
  84. Remy MT, Akkouch A, He L, Eliason S, Sweat ME, Krongbamee T, et al. Rat Calvarial Bone Regeneration by 3D-Printed  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Incorporating MicroRNA-200c. ACS Biomater Sci Eng. 2021;7(9):4521–34.

85. Roh HS, Lee CM, Hwang YH, Kook MS, Yang SW, Lee D, et al. Addition of MgO nanoparticles and plasma surface treatment of three-dimensional printed polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds for improving bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;74:525–35.
86. Shim JH, Won JY, Park JH, Bae JH, Ahn G, Kim CH, et al. Effects of 3D-Printed Polycaprolactone/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Membranes on Guided Bone Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):E899.
87. Tsai CH, Hung CH, Kuo CN, Chen CY, Peng YN, Shie MY. Improved Bioactivity of 3D Printed Porous Titanium Alloy Scaffold with Chitosan/Magnesium-Calcium Silicate Composite for Orthopaedic Applications. *MATERIALS.* 2019;12(2).
88. Wang P, Yin HM, Li X, Liu W, Chu YX, Wang Y, et al. Simultaneously constructing nanotopographical and chemical cues in 3D-printed polylactic acid scaffolds to promote bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;118:111457.
89. Wang S, Li R, Xu Y, Xia D, Zhu Y, Yoon J, et al. Fabrication and Application of a 3D-Printed Poly- $\epsilon$ -Caprolactone Cage Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Biomed Res Int.* 2020;2020:2087475.
90. Xu Z, Wang N, Liu P, Sun Y, Wang Y, Fei F, et al. Poly(Dopamine) Coating on 3D-Printed Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Molecules.* 2019;24(23):E4397.
91. Yun S, Choi D, Choi DJ, Jin S, Yun WS, Huh JB, et al. Bone Fracture-Treatment Method: Fixing 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds with Hydrogel Type Bone-Derived Extracellular Matrix and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate as an Osteogenic Promoter. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):9084.
92. Zamani Y, Amoabediny G, Mohammadi J, Zandieh-Doulabi B, Klein-Nulend J, Helder MN. Increased Osteogenic Potential of Pre-Osteoblasts on Three-Dimensional Printed Scaffolds Compared to Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *Iran Biomed J.* 2021;25(2):78–87.
93. Zhao N, Wang Y, Qin L, Guo Z. Effect of composition and macropore percentage on mechanical and in vitro cell proliferation and differentiation properties of 3D printed HA/beta-TCP scaffolds. *RSC ADVANCES.* 2017;7(68):43186–96.

94. Zhong L, Chen J, Ma Z, Feng H, Chen S, Cai H, et al. 3D printing of metal-organic framework incorporated porous scaffolds to promote osteogenic differentiation and bone regeneration. *Nanoscale*. 2020;12(48):24437–49.
95. Bekisz JM, Flores RL, Witek L, Lopez CD, Runyan CM, Torroni A, et al. Dipyridamole enhances osteogenesis of three-dimensionally printed bioactive ceramic scaffolds in calvarial defects. *J Cranio-Maxillofac Surg*. 2018;46(2):237–44.
96. Chen MC, Chiu HC, Kuo PJ, Chiang CY, Fu MM, Fu E. Bone formation with functionalized 3D printed poly-epsilon-caprolactone scaffold with plasma-rich-fibrin implanted in critical-sized calvaria defect of rat. *JOURNAL OF DENTAL SCIENCES*. 2021;16(4):1214–21.
97. Diomede F, Gugliandolo A, Cardelli P, Merciaro I, Ettorre V, Traini T, et al. Three-dimensional printed PLA scaffold and human gingival stem cell-derived extracellular vesicles: a new tool for bone defect repair. *STEM CELL RESEARCH & THERAPY*. 2018;9.
98. El-Habashy SE, El-Kamel AH, Essawy MM, Abdelfattah EZA, Eltahir HM. Engineering 3D-printed core-shell hydrogel scaffolds reinforced with hybrid hydroxyapatite/polycaprolactone nanoparticles for in vivo bone regeneration. *Biomater Sci*. 2021;9(11):4019–39.
99. He M, Hou Y, Zhu C, He M, Jiang Y, Feng G, et al. 3D-Printing Biodegradable PU/PAAM/Gel Hydrogel Scaffold with High Flexibility and Self-Adaptability to Irregular Defects for Nonload-Bearing Bone Regeneration. *Bioconjugate Chem*. 2021.
100. Jia L, Yang Z, Sun L, Zhang Q, Guo Y, Chen Y, et al. A three-dimensional-printed SPION/PLGA scaffold for enhanced palate-bone regeneration and concurrent alteration of the oral microbiota in rats. *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS*. 2021;126.
101. Johnson ZM, Yuan Y, Li X, Jashashvili T, Jamieson M, Urata M, et al. Mesenchymal stem cells and three-dimensional-osteoconductive scaffold regenerate calvarial bone in critical size defects in swine. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE*. 2021;10(8):1170–83.

102. Kim JW, Yang BE, Hong SJ, Choi HG, Byeon SJ, Lim HK, et al. Bone Regeneration Capability of 3D Printed Ceramic Scaffolds. *Int J Mol Sci.* 8 2020;21(14):E4837.
103. Lee DJ, Kwon J, Kim YI, Wang X, Wu TJ, Lee YT, et al. Effect of pore size in bone regeneration using polydopamine-laced hydroxyapatite collagen calcium silicate scaffolds fabricated by 3D mould printing technology. *Orthod Craniofac Res.* 2019;22 Suppl 1:127–33.
104. Liang T, Wu J, Li F, Huang Z, Pi Y, Miao G, et al. Drug-loading three-dimensional scaffolds based on hydroxyapatite-sodium alginate for bone regeneration. *J Biomed Mater Res Part A.* 2021;109(2):219–31.
105. Liu A, Sun M, Yang X, Ma C, Liu Y, Yang X, et al. Three-dimensional printing akermanite porous scaffolds for load-bearing bone defect repair: An investigation of osteogenic capability and mechanical evolution. *J Biomater Appl.* 2016;31(5):650–60.
106. Naudot M, Garcia Garcia A, Jankovsky N, Barre A, Zabijak L, Azdad SZ, et al. The combination of a poly-caprolactone/nano-hydroxyapatite honeycomb scaffold and mesenchymal stem cells promotes bone regeneration in rat calvarial defects. *J Tissue Eng Regen Med.* 2020;14(11):1570–80.
107. Pae HC, Kang JH, Cha JK, Lee JS, Paik JW, Jung UW, et al. 3D-printed polycaprolactone scaffold mixed with  $\beta$ -tricalcium phosphate as a bone regenerative material in rabbit calvarial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2019;107(4):1254–63.
108. Qiao S, Wu D, Li Z, Zhu Y, Zhan F, Lai H, et al. The combination of multi-functional ingredients-loaded hydrogels and three-dimensional printed porous titanium alloys for infective bone defect treatment. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING.* 2020;11.
109. Rogowska-Tylman J, Locs J, Salma I, Woźniak B, Pilmane M, Zalite V, et al. In vivo and in vitro study of a novel nanohydroxyapatite sonocoated scaffolds for enhanced bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;99:669–84.
110. Shim JH, Jeong JH, Won JY, Bae JH, Ahn G, Jeon H, et al. Porosity effect of 3D-printed polycaprolactone membranes on calvarial defect model for guided bone regeneration. *Biomed Mater.* 2018;13(1). D

111. Tovar N, Witek L, Atria P, Sobieraj M, Bowers M, Lopez CD, et al. Form and functional repair of long bone using 3D-printed bioactive scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(9):1986–99.
112. Wang MM, Flores RL, Witek L, Torroni A, Ibrahim A, Wang Z, et al. Dipyridamole-loaded 3D-printed bioceramic scaffolds stimulate pediatric bone regeneration in vivo without disruption of craniofacial growth through facial maturity. *SCIENTIFIC REPORTS.* 2019;9.
113. Yu L, Yang Y, Zhang B, Bai X, Fei Q, Zhang L. Rapid human-derived iPSC osteogenesis combined with three-dimensionally printed Ti6Al4V scaffolds for the repair of bone defects. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY.* 2020;235(12):9763–72.
114. Zhang W, Feng C, Yang G, Li G, Ding X, Wang S, et al. 3D-printed scaffolds with synergistic effect of hollow-pipe structure and bioactive ions for vascularized bone regeneration. *Biomaterials.* 2017;135:85–95.
115. Francisco I, Paula AB, Oliveiros B, Fernandes MH, Carrilho E, Marto CM, et al. Regenerative Strategies in Cleft Palate: An Umbrella Review. *Bioengineering (Basel).* 2021;8(6):76.
116. Ghayor C, Chen TH, Bhattacharya I, Özcan M, Weber FE. Microporosities in 3D-Printed Tricalcium-Phosphate-Based Bone Substitutes Enhance Osteoconduction and Affect Osteoclastic Resorption. *Int J Mol Sci.* 4e 2020;21(23):E9270.