

## RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor  
(a), o texto completo desta tese será  
disponibilizado a partir de

06/04/2023



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

**JULIANI CAROLINE RIBEIRO DE ARAÚJO SOUTO**

**INFLUÊNCIA DA FUNCIONALIZAÇÃO DO BIOVIDRO, PREPARADO  
PELA ROTA SONOQUÍMICA, COM FÁRMACO TERIPARATIDA 10%  
NA RESPOSTA CELULAR *IN VITRO* E *IN VIVO***

**JULIANI CAROLINE RIBEIRO DE ARAÚJO SOUTO**

**INFLUÊNCIA DA FUNCIONALIZAÇÃO DO BIOVIDRO, PREPARADO PELA  
ROTA SONOQUÍMICA, COM FÁRMACO TERIPARATIDA 10% NA RESPOSTA  
CELULAR *IN VITRO* E *IN VIVO***

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

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparo tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Prof. Assoc. Roberta Okamoto

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Souto, Juliani Caroline Ribeiro de Araújo

Influência da funcionalização do biovidro, preparado pela rota sonoquímica, com o fármaco teriparatida 10% na resposta celular in vitro e in vivo / Juliani Caroline Ribeiro de Araújo Souto. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.

99 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Roberta Okamoto

1. Diferenciação celular. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Regeneração óssea. 4. Osteoporose. 5. Teriparatida. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Okamoto, Roberta, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

**Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira**

Universidade do Vale do Paraíba

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

São José dos Campos

**Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de Abril de 2021.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, assim como toda a minha trajetória profissional e pessoal a minha amada avó **Aurea Martins Ribeiro** (in memoriam). Ela sempre será o meu maior exemplo na vida e sem ela nada disso seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus e Nossa Senhora Aparecida que me acolheram e aparam em todos os momentos.*

*À Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"-UNESP, na pessoa do diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Profª Adj. Rebeca Di Nicoló** e vice-diretor **Prof. Adj. Cláudio Antônio Talge de Carvalho**.*

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

*A minha querida orientadora **Profª Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos** por ser essa professora incrível e inspiradora, que além de ser essa excelente profissional é uma pessoa maravilhosa e que ao longo desses anos de trabalho em conjunto se tornou uma grande amiga.*

*A minha coorientadora **Profª Adj. Roberta Okamoto** da Faculdade de Odontologia da Unesp- Campus Araçatuba por estar sempre à disposição e contribuir tanto com esta pesquisa.*

*Ao **Prof. Assoc. Paulo Noronha Lisboa Filho** da Faculdade de Ciências físicas da Unesp- Campus Bauru pela recepção, parceria e toda a ajuda despendida para que fosse possível este trabalho.*

*A **Profª Dra. Ivone Regina de Oliveira** da Universidade do Vale do Paraíba (Univap) pelo aceite na banca de defesa e disponibilizar o laboratório de sua coordenação para a realização de parte dos testes de caracterização do material.*

*A **Profª Dra. Andrea Carvalho de Marco** pelo aceite na banca de defesa e por ter sido a primeira professora a me orientar na Unesp no meu primeiro ano de faculdade.*

*Ao Pesquisador **Tiago Moreira Bastos Campos** por toda a contribuição durante todo o desenvolvimento da pesquisa, assim como por todo o auxílio em todos os testes de caracterização do material.*

*Ao **Prof. Assoc. Alexandre Luiz Borges Souto** e **Profª Assoc. Ana Lia Anbinder**, pelas críticas construtivas realizadas no Exame Geral de Qualificação.*

*A minha mãe **Andrea Paula Ribeiro**, que sempre me incentivou a estudar e que com muito trabalho fez com que fosse possível a minha formação em uma universidade pública. Me aconselhando, me acolhendo e sendo sempre meu exemplo profissional. Meu amor eterno por você.*

*Ao meu avô **Sidnei Ribeiro** (in memorian), por cada momento em que o senhor me impulsionou, me ensinou e teve a paciência em lidar com meus momentos mais difíceis.*

*A **minha família**, especialmente minha irmã **Marcela Ribeiro Braga**, minha prima **Camila Fernanda de Souza** e meus sogros, por me amarem incondicionalmente e valorizarem todas as minhas escolhas, vibrando sempre com as minhas vitórias e não me deixando desistir nas minhas derrotas.*



Ao meu marido **Rodrigo Borges Souto**, em toda minha caminhada eu agradeço por ter você ao meu lado, me incentivando, me motivando e sempre sempre um parceiro com quem posso contar. Obrigada por me amar e embarcar comigo em todos os meus projetos.

Aos **parceiros da equipe**, que se tornaram grandes amigos, Leonardo Alvares Sobral Silva, Sarah Avelino de Marco, Suelen Simões Amaral, Carla Silveira Oliveira e Bronze, Karen Julie Santos Grancianinov Costa, Marina Fernandes, Lais Morandini Carvalho, Daphne Mello Reis Camargo e Vinicius Barros Lima Almeida. A presença única de cada um de vocês tornou minha jornada mais leve e muito mais prazerosa.

Aos **amigos que o mestrado me proporcionou**, Renata Mendonça Moraes, Jaqueline Lemes Ribeiro, Rayana Duarte Khoury, Giovanna Bignoto Minhoto, Bruna Fernandes do Carmo Carvalho, Nayara de Sá, Noala Vicensoto, Mariana Vegian, Aline Sampaio, Keila Miranda, Sabrina Liberato, Thais Christine, Lucas de Paula e Leticia Torquato. Durante esses anos, vocês foram essenciais para que desse tudo certo. Agradeço pela amizade de cada um.

As **minhas amigas**, Mariana de Sá Alves, Elisa Kukulka Camargo e Joyce Rodrigues de Souza, que me acompanham desde a graduação e estiveram comigo em momentos muito importantes, gratidão por cada ajuda, por cada risada, por todo companheirismo de vocês.

A **Paula Buzo Frigério** da Faculdade de Odontologia da Unesp- Campus Araçatuba por toda a ajuda e suporte durante esta pesquisa.

*A todos os professores do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp- Campus São José dos Campos, em especial **Profª Dra. Renata Falchete do Prado, Profª Tit. Janete Dias Almeida, Profª Dra. Symone Teixeira, Profª Assoc. Mônica Fernandes Gomes** por todas as oportunidades ofertadas, pela paciência e disposição em ajudar em todas as etapas.*

*A **todos os funcionários** do Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp- Campus São José dos Campos, em especial **aos técnicos: Ana Lourdes da Silva Machado, Maria Salete Faria, Walter Cruz, Sérgio Giovanni Alves, Carla Tavares, Carlos Albero Guedes e Thaís Cachuté Paradella.***

*Aos funcionários do biotério **Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e André Luiz Ortiz**, pela colaboração e atenção durante os procedimentos de experimentação animal.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**Fapesp**) pelo apoio financeiro (Processo 2019/04185-1).*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capex**), pela Concessão de Bolsa CAPES (02/2019 a 08/2019).*

*À **equipe da biblioteca** pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.*

***A todos os animais** utilizados nesta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.*

*“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”*

*(Mario Sergio Cortella)*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE QUADROS .....	14
LISTA DE TABELAS .....	15
RESUMO .....	16
ABSTRACT .....	17
1 INTRODUÇÃO .....	18
2 PROPOSIÇÃO .....	24
2.1 Geral .....	24
2.2 Específicos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Biomaterial .....	25
3.1.1 Produção do biovidro.....	25
3.1.2 Redução à escala subnanométrica do PTH 1-34 e do Biovidro para a técnica sonoquímica .....	26
3.2 Caracterização do material .....	27
3.2.1 Análise das partículas com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG) .....	27
3.2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformação de <i>Fourier</i> (FTIR) .....	28
3.2.3 Potencial Zeta .....	28
3.2.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	29
3.3 Comitê de ética .....	29
3.4 Ensaio biológico <i>in vitro</i> .....	29
3.4.1 Adesão celular .....	31
3.4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade) .....	32
3.4.3 Conteúdo de Proteína Total.....	32
3.4.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	33
3.4.5 Formação e quantificação de cálcio nos nódulos de mineralização .....	33
3.5 Ensaio biológico <i>in vivo</i> .....	34
3.5.1 Ovariectomia bilateral .....	35

3.5.2 Citologia esfoliativa.....	37
3.5.3 Confeção de defeito ósseo crítico .....	37
3.5.4 Análise histológica.....	40
3.5.5 Análise histomorfométrica .....	41
3.5.6 Análise imuno-histoquímica.....	41
3.5.6.1 Atividade de Osteocalcina (OC) e anti-RANKL .....	42
3.6 Análise Estatística.....	43
4 RESULTADO .....	45
4.1 Caracterização dos materiais .....	45
4.1.1 Microscopia Eletrônica por emissão de campo (MEV-FEG).....	45
4.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformação de <i>Fourier</i> (FTIR).....	46
4.1.3 Potencial zeta.....	48
4.1.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS).....	50
4.2 Análise <i>in vitro</i> .....	52
4.2.1 Adesão celular .....	52
4.2.2 Determinação da viabilidade celular (MTT).....	53
4.2.3 Conteúdo de proteína total .....	54
4.2.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	55
4.2.5 Formação e quantificação de cálcio nos nódulos de mineralização .....	56
4.3 Análise <i>in vivo</i> .....	58
4.3.1 Citologia Esfoliativa .....	58
4.3.2 Análise histológica .....	60
4.3.3 Análise histomorfométrica .....	66
4.3.4 Análise imuno-histoquímica.....	68
5 DISCUSSÃO .....	75
6 CONCLUSÃO .....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXO.....	100

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Redução à escala nanométrica .....	27
Figura 2- Procedimento de isolamento celular .....	30
Figura 3- Fluxograma dos grupos experimentais .....	35
Figura 4- Procedimento cirúrgico de ovariectomia .....	36
Figura 5- Procedimento cirúrgico na calvária .....	39
Figura 6- Efeito macroscópico das tubas uterinas após a realização do procedimento cirúrgico de ovariectomia .....	40
Figura 7- Micrografias obtidas por FEG com aumento de 10.000, 20.000 e 50.000 vezes, respectivamente .....	46
Figura 8- Representação de ligações encontradas na análise por espectroscopia de infravermelho por transformação de <i>Fourier</i> das partículas .....	48
Figura 9- Valores de média e desvio padrão do Potencial Zeta (mV) .....	49
Figura 10- Difratoograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia .....	50
Figura 11- Fotomicrografia de MEV da adesão celular nas amostras .....	53
Figura 12- Teste ANOVA-dois fatores para os dados de viabilidade celular, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) do teste de viabilidade celular estão representados no gráfico.....	54

Figura 13- Teste ANOVA-dois fatores para os dados de proteína total, tendo como variáveis os grupos analisados e os períodos. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) do conteúdo de proteína total estão representados no gráfico .....	55
Figura 14- Teste ANOVA- dois fatores para os dados da atividade de fosfatase alcalina, tendo como variáveis os grupos analisados e os períodos. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) da atividade de fosfatase alcalina estão representados no gráfico.....	56
Figura 15- Representação da formação de nódulos de mineralização.....	57
Figura 16- Teste 1-fator ANOVA para os dados da quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização, tendo como variável os grupos analisados. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) da quantificação no período de 12 dias estão representados no gráfico.....	58
Figura 17- Fotomicrografias dos esfragaços vaginais dos grupos Sham e OVX..	59
Figura 18- Fotomicrografias em microscopia óptica referente ao período de 2 semanas.....	61
Figura 19- Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito, aumento original de 10x no período de 2 semanas.....	62
Figura 20- Fotomicrografia do corte histológico na área do limite do defeito em todos os grupos, no aumento original de 5x no período de 2 semanas .....	63
Figura 21- Fotomicrografias em microscopia óptica referente ao período de 6 semanas.....	64
Figura 22- Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito, aumento original de 10x no período de 6 semanas.....	65

Figura 23- Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito, aumento original de 20x no período de 6 semanas.....	66
Figura 24- Teste ANOVA dois fatores para os dados de neoformação óssea, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) da neoformação óssea de todos os grupos estão representados no gráfico.....	68
Figura 25- Teste ANOVA dois fatores para o biomarcador osteocalcina, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) de todos os grupos estão representados no gráfico .....	70
Figura 26-Fotomicrografias dos cortes histológicos com marcações positivas para o anticorpo policlonal osteocalcina (OC) referente a todos os grupos analisados	71
Figura 27- Teste ANOVA dois fatores para o biomarcador RANKL, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ) de todos os grupos estão representados no gráfico .....	73
Figura 28- Fotomicrografias dos cortes histológicos com marcações positivas para o anticorpo policlonal RANKL referente a todos os grupos analisados .....	74



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Divisão dos grupos .....	36
Quadro 2- Diluição, incubação e recuperação antigênica .....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Representativa do Potencial Zeta das amostras, com média e desvio padrão ( $\pm$ ) .....	49
Tabela 2- Valores das médias obtidas em cada amostra .....	52
Tabela 3- Valor de desvio padrão ( $\sigma$ ) .....	52
Tabela 4- Estatística descritiva dos valores referentes a área neoformada por grupos no período de 2 semanas .....	67
Tabela 5- Estística descritiva dos valores referentes a área neoformada por grupos no período de 6 semanas .....	67

Souto JCRA. Influência da funcionalização do biovidro, preparado pela rotasonoquímica, com o fármaco teriparatida 10% na resposta celular *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

## RESUMO

O objetivo neste estudo foi avaliar a influência do biovidro 45S5 funcionalizado com teriparatida 10% na diferenciação e atividade de células mesenquimais, e no reparo ósseo em defeitos críticos realizados em ratas ovariectomizadas. Primeiramente, o biomaterial foi produzido e caracterizado antes e após a funcionalização. Para o estudo *in vitro*, foram diferenciados osteoblastos obtidos a partir de células mesenquimais, isoladas de fêmures de ratas ovariectomizadas. Após diferenciação, as células foram submetidas ao MEV, MTT, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de nódulos de mineralização. No estudo *in vivo*, foram utilizadas 40 ratas Wistar, as quais foram inicialmente divididas em dois grupos (n=20), grupo submetido à ovariectomia bilateral (OVX) e grupo submetido à cirurgia simulada de ovariectomia (Sham). Após 60 dias destes procedimentos, independente do grupo, todas as ratas foram submetidas à confecção de defeitos ósseos críticos de 5,0 mm, na calvária. No lado direito foram preenchidos com coágulo (controle), enquanto que do lado esquerdo metade dos animais receberam preenchimento no defeito ósseo de biovidro (BG) e a outra metade recebeu como material de preenchimento o biovidro funcionalizado com teriparatida 10% (BGT). Após 2 e 6 semanas, os animais foram eutanasiados (n=10). A caracterização por MEV, espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* (FTIR) e o potencial Zeta demonstraram que as amostras após a funcionalização apresentaram características morfológicas topográficas e químicas modificadas, indicativas de que a superfície foi quimicamente alterada pelo processo de funcionalização. Na análise *in vitro*, observou-se que os grupos experimentais não foram citotóxicos, propiciaram um ambiente adequado à atividade e diferenciação celular, e ainda permitiram o espraiamento celular sobre as amostras. Na análise histológica descritiva os grupos experimentais, demonstraram neoformação óssea na região do defeito em ambos grupos e períodos. Na análise histomorfométrica, somente o grupo biovidro funcionalizado com o fármaco no grupo OVX no período de 6 semanas diferiu estatisticamente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ) no período de 2 semanas. Conclui-se que estudos de longo prazo devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre o desempenho biológico da ação sinérgica entre os biovidros e a liberação do fármaco teriparatida.

Palavras-chave: Diferenciação celular. Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea. Osteoporose. Teriparatida.

Souto JCRA. Influence of bioglass functionalization, prepared by the sonochemistry route, with the 10% therapeutic drug in the cell response in vitro and in vivo [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the influence of the 45S5 bioglass functionalized with 10% teriparatide on the differentiation and activity of mesenchymal cells, and on bone repair in critical defects performed in ovariectomized rats. First, the biomaterial was produced and characterized before and after functionalization. For the in vitro study, osteoblasts obtained from mesenchymal cells, isolated from femurs of ovariectomized rats, were differentiated. After differentiation, the cells were submitted to SEM, MTT, total protein content, alkaline phosphatase activity (ALP), formation of mineralization nodules. In the in vivo study, 40 Wistar rats were used, which were initially divided into two groups (n = 20), a group undergoing bilateral ovariectomy (OVX) and a group undergoing simulated ovariectomy surgery (Sham). After 60 days of these procedures, regardless of the group, all rats were subjected to the making of 5.0 mm critical bone defects at calvaria, which were filled on the right side with a clot (control) and on the left side half of the animals received filling in the bone defect of bioglass (BG) and the other half received as functional filler the bioglass functionalized with 10% teriparatide (BGT). After 2 and 6 weeks, the animals were euthanized. SEM characterization, dispersive energy spectroscopy (EDS), Fourier transformation infrared spectroscopy (FTIR) and analysis of the Zeta potential demonstrated that the samples after functionalization showed modified topographic and chemical morphological characteristics, indicating that the surface was chemically altered by the functionalization process. The experimental groups were not cytotoxic and provided an adequate environment for cell adhesion and differentiation. Additionally, the analysis performed by SEM showed that all samples allowed cell spreading. In the descriptive histological analysis, the experimental groups demonstrated characteristics of bone neoformation with the presence of bone tissue in both periods. In the histomorphometric analysis, only the bioglass group functionalized with the drug in the OVX group differed statistically from the other groups ( $p < 0.05$ ) in both periods. It is concluded that long-term studies must be carried out to provide additional information on the biological performance of the synergistic action between bio-glasses and the release of the drug teriparatide. Concluded that long-term studies should be carried out to provide additional information on the mechanisms necessary to evaluate the biological performance of the synergistic action between bioglasses and the release of the drug teriparatide.

**Keywords:** Biocompatible materials. Bone regeneration. Cell differentiation. Osteoporosis. Teriparatide.

## 1 INTRODUÇÃO

Com os grandes avanços tecnológicos na área da saúde, o mundo enfrenta uma mudança populacional demográfica, cuja expectativa de vida das populações, principalmente em países desenvolvidos, tende a aumentar. Nesse cenário, estima-se uma elevação na incidência de doenças relacionadas ao aumento da longevidade dos indivíduos (Sozen et al., 2016), entre elas as doenças ósseo-metabólicas.

A osteoporose é definida como uma doença sistêmica esquelética caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura desse tecido com consequente aumento na fragilidade do osso e suscetibilidade às fraturas (Consensus, 1993; Lerner, 2006; Lirani-Galvão, Lazaretti-Castro, 2010; McNamara, 2010). Segundo a Fundação Internacional de Osteoporose, esta doença é muito comum em idosos, sendo que uma em cada três mulheres acima de 50 anos experimentará uma fratura decorrente de fragilidade óssea durante sua vida (Foundation IO, 2018). Isso ocorre porque a produção estrogênica é atenuada após o período menopáusico (Li, Wang, 2018) e essa deficiência inibe, principalmente, em fases tardias a diferenciação e maturação de osteoblastos, exercendo um efeito direto nessas células (Kubota et al., 2018a). Em 1940, o endocrinologista Fuller Albright sugeriu que a deficiência de estrógeno pós-menopausa promovia a diminuição na formação do tecido ósseo (Albright et al., 1940). Manolagas (2000) em revisão, corroborou que a diminuição de hormônios esteroides sexuais, principalmente o estrógeno, promove aumento na vida útil de osteoclastos, devido a diminuição no processo de apoptose dessas células e influência no tempo de vida útil de osteoblastos e osteócitos, ocasionando um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação do tecido ósseo, sendo o primeiro mais prevalente.

Cabe ressaltar que apesar da deficiência de esteroides sexuais agirem demasiadamente em osso esponjoso, no qual as trabéculas ósseas se tornam mais separadas e desconectadas, a perda simultânea de osso cortical acontece devido à coalescência dos espaços subendocorticais, por causa da penetração mais profunda dos osteoclastos endocorticais (Manolagas, 2000). Anatomicamente, na osteoporose observa-se diminuição na espessura do osso cortical, redução no número e tamanho das trabéculas do osso esponjoso, resultando em alargamento dos espaços

medulares (Brasileiro Filho, 2000). Nesse contexto, em pacientes que sofrem de osteoporose, a cicatrização óssea é um processo afetado negativamente (Russow et al., 2018), tornando desafiador o tratamento de defeitos ósseos ou fraturas nos ossos nestes organismos comprometidos (Van Houdt et al., 2018). Portanto, devido a modificação no processo normal de remodelação óssea, por vezes é necessária a implantação de biomateriais que possam auxiliar no tratamento cirúrgico de pacientes que apresentam fraturas osteoporóticas. Nestes casos, deve-se considerar não apenas as propriedades do biomaterial, como também as características e capacidade regenerativa do osso hospedeiro (Mori et al., 1997).

Atualmente, o osso autógeno é considerado o padrão ouro na substituição de defeitos ósseos (Yang LS et al., 2018), porém as desvantagens associadas ao osso autógeno, como a necessidade de mais de um sítio cirúrgico, disponibilidade limitada e possibilidade de complicações no pós-operatório (Banwart et al., 1995; Mazzone et al., 2012; laquinta et al., 2019) motivaram o desenvolvimento de novos biomateriais utilizados no reparo ósseo (Vasconcellos et al., 2021; dos Santos Silva et al., 2019), entre eles destacam-se os biovidros, que apresentam excelentes propriedades físico-químicas e uma longa história de aplicações como preenchedores biomédicos, o que estimulou diversos pesquisadores a testarem o uso desses materiais em engenharia de tecidos e estratégias de regeneração (Duracan et al., 2001; Fernandes et al., 2018; Johari et al., 2016; Khoshakhlagh et al., 2017; Lee et al., 2019; Pazarceveren et al., 2019; Rizwan et al., 2017; Zhang et al., 2017). Além disso, a descoberta dos biovidros como os primeiros materiais artificiais com evidente capacidade de formar uma ligação integrada com os ossos estimulou o interesse de cientistas e clínicos desde longa data (Hench, Paschall, 1973).

Estudos prévios comprovaram que a formação de uma camada superficial de hidróxido de apatita (HCA) após trocas iônicas entre o vidro e o fluido corporal é responsável pelo mecanismo de ligação óssea desses materiais (Cerruti et al., 2005; Slosarczyk et al., 2005), isso torna também o papel da superfície dos biovidros importante nos estudos de bioatividade (Anderson et al., 2004). O biovidro é um material biocompatível, bioativo, que induz a vascularização e a liberação de cristais de hidroxiapatita (Rodrigues et al., 2019). A capacidade de estimular o crescimento e diferenciação celular osteogênica torna a aplicação desses

biomateriais interessante na formação de tecido ósseo (Rahaman et al., 2001; Rizwan et al., 2017; Tsigkou et al., 2009; Westhauser et al., 2019; Xynos et al., 2000).

Para comprovar a ação positiva do biovidro em meio celular, Detsch et al. (2015) avaliaram a influência de *scaffolds* porosos de 45S5 Bioglass® em duas diferentes linhagens celulares, investigando a adesão, crescimento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteogênicas. Com os testes propostos, constataram que os poros do material foram preenchidos por células, as quais apresentaram diferenciação, viabilidade, proliferação e aderência ao biomaterial independente do tipo celular analisado. Em estratégias de regeneração tecidual outros materiais tais como metais, biocerâmicas e polímeros biodegradáveis podem ser associados ao 45S5 Bioglass® com o objetivo de aumentar o potencial de aplicação em engenharia de tecidos (Rizwan et al., 2017). Além disso, o PerioGlas®, que é o 45S5 Bioglass® particulado comercial demonstrou influência benéfica no processo osteogênico de cicatrização óssea alveolar em ratas com osteoporose (Teófilo et al., 2004). Outros trabalhos abordaram a utilização do biovidro em animais osteopênicos (Li Y et al., 2013; Mosbahi et al., 2019), tornando este material atraente para ser avaliado como um substituto ósseo em situações adversas.

O 45S5 Bioglass® apresenta grande versatilidade nos campos da biomedicina, ortopedia e até mesmo odontologia, sendo utilizados para reparações ósseas nos campos da periodontia (Zamet et al., 1997), da cirurgia maxilo-facial (Tadjoedin et al., 2002) e até mesmo para reparação de tecidos moles (Baino et al., 2016). Além disso, a capacidade dos biovidros incorporarem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em suas estruturas resultaram no desenvolvimento destes em associação com agentes terapêuticos (Domingues et al., 2004, Lisboa-Filho et al., 2018; Mosqueira et al., 2020; Rivadeneira et al., 2016).

Uma das novas perspectivas no campo de pesquisa da engenharia tecidual é a utilização de biomateriais associados a fármacos que promovam uma ação conjunta para atuarem no reparo ósseo (Lisboa-Filho et al., 2018; Ning et al., 2019; Wang CW et al., 2020). Tella e Gallagher (2014) realizaram um levantamento sobre os tipos de tratamentos referentes à osteoporose e sugeriram que a terapia farmacológica pode ser classificada devido à presença de agentes anti-reabsortivos

e/ou anabólicos, sendo que os bisfosfonatos, os moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS) e denosumabe constituem o grupo de anti-reabsortivos. Já o paratormônio (PTH) e o ranelato de estrôncio pertencem ao grupo de agentes anabólicos, ou seja, que favorecem a neoformação óssea. Os bisfosfonatos são os medicamentos mais utilizados para o tratamento da osteoporose (Black, Rosen, 2016), embora seu uso a longo prazo apresente como desvantagem a possibilidade de induzirem a osteonecrose no pós-operatório de cirurgias envolvendo ossos mandibulares, como implantes e extrações dentárias (Bliuc et al., 2019). Em contrapartida, a teriparatida, (PTH 1-34), um fármaco análogo ao paratormônio (PTH 1-84), ao ser administrada sistemicamente demonstrou ser eficaz na diminuição da área osseonecrótica em mandíbulas de animais que receberam doses de ácido zoledrônico, um fármaco do grupo dos bisfosfonatos, e foram submetidos à extração dentária em comparação ao grupo que não foi tratado com teriparatida (Ersan et al., 2014). Além disso, a teriparatida estimula a formação óssea cortical e trabecular, bem como eleva a força e volume ósseo (Mazziotti et al., 2012), isso se deve ao fato de que esse medicamento apresenta um mecanismo de ação diferente das medicações atualmente disponíveis para o tratamento da osteoporose, apresentando melhora na quantidade e qualidade do osso em animais osteopênicos (Kubota et al., 2018b; de Oliveira et al., 2018; Putinni et al., 2019). Não existe apenas um mecanismo que explique como o tratamento com teriparatida intermitente aumenta a massa óssea e a formação do tecido (Wein, Kronenberg, 2017). Contudo, sabe-se que o paratormônio (PTH 1-84) apresenta um papel paradoxal na modulação da remodelação óssea, pois pode apresentar efeitos anabólicos ou catabólicos, sendo que eles ocorrem concomitantemente (Goltzman, 2018). As células de linhagem osteoblástica, como osteócitos, células de revestimento do tecido ósseo e osteoblastos apresentam receptor para o paratormônio em sua superfície (Yang D et al., 2007) e quando há ligação entre o hormônio e o seu receptor nas superfícies pode ocorrer a formação óssea, que também está relacionada com o aumento no número de osteoblastos por meio da diminuição da apoptose, proliferação de precursores osteoblásticos, deposição da matriz mineralizada, e ativação das células de revestimento (Jilka, 2007).



Estudos recentes corroboram que o fármaco teriparatida utilizado localmente intensifica o processo de formação óssea, devido ao aumento do volume do osso, maior renovação tecidual e elevação da força óssea na região cirúrgica em relação ao grupo que não foi tratado com o fármaco (Gomes-Ferreira et al., 2020; Tao et al., 2019). Devido a isso, apesar da literatura não apresentar muitos relatos da associação entre partículas de biovidro com medicamentos locais para osteoporose na resposta *in vivo*, a escolha deste fármaco deu-se em função de seus efeitos favoráveis quanto ao metabolismo do tecido ósseo (de Oliveira et al., 2018; Ozer et al., 2019; Puttini et al., 2019; Tao et al., 2019) e evidências na literatura sobre o seu efeito em culturas de células (Bakker et al., 2012; Wang J et al., 2017).

O processo de incorporação do fármaco na superfície dos biomateriais pode ocorrer de diferentes maneiras, dentre eles se destaca o processamento sonoquímico (Lisboa-Filho et al., 2018), pois nessa técnica o equipamento de ultrassom gera a formação de cavitações bolhosas por meio de contato da radiação com o material (Bang, Kenneth, 2010), promovendo alterações nas características físicas e estruturais do biomaterial, como redução, homogeneização das partículas e ocasionalmente a formação de uma camada amorfa superficial (Arruda et al., 2013) que é necessária para a incorporação do medicamento. Em um recente trabalho de Gonzalo-Juan et al. (2020) os autores utilizaram a técnica de sonoquímica para produzir nanopartículas de prata e incorporá-las na superfície do biovidro e comprovaram que essa técnica não interfere nos mecanismos de bioatividade do vidro, pois não altera significativamente a estrutura de rede do vidro, considerando essa rota fácil e rápida.

A partir desse contexto, as investigações de novos biomateriais que possam acelerar ou promover a regeneração óssea em pacientes que apresentem osteoporose e necessitem de procedimentos cirúrgicos é de suma importância e tem sido abordada em estudos atuais (Fernandes et al., 2018; Johari et al., 2016; Khoshakhlagh et al., 2017; Lee et al., 2019; Pazarceviren et al., 2019; Rizwan et al., 2017; Zhang et al., 2017). Portanto, o desenvolvimento de um biomaterial que favoreça o processo de regeneração óssea e possa contribuir positivamente para o campo da bioengenharia tecidual, promovendo uma combinação das vantagens da medicação teriparatida, que demonstra ser um fármaco inovador e anabolizante

ósseo, com o biovidro que apresenta propriedades positivas em relação ao reparo ósseo torna-se de extrema necessidade.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e dentro das condições experimentais desta pesquisa pôde-se concluir que biovidros funcionalizados com o fármaco teriparatida 10% exercem influência positiva sobre o comportamento celular *in vitro* e neoformação óssea *in vivo*. Adicionalmente, este estudo contribuiu para o conhecimento das interações de osteoblastos com as superfícies dos biovidros funcionalizados contribuindo assim para maior segurança na utilização dos biovidros associados a fármacos na área da saúde.

Embora esses resultados iniciais sejam promissores, mais estudos são necessários para avaliar a eficácia da teriparatida associado a esses biomateriais em novas estratégias de regeneração, com o intuito de fornecer informações adicionais sobre os mecanismos necessários para avaliar o desempenho biológico de ação sinérgica entre os biovidros e liberação do fármaco teriparatida.

## REFERÊNCIAS\*

Albright F, Bloomberg E, Smith PH. Postmenopausal osteoporosis. *Trans Assoc Am Physicians*. 1940; 55:298-305.

Aldini NN, Fini M, Giavaresi G, Giardino R, Greggi T, Parisini P. Pedicular fixation in the osteoporotic spine: a pilot in vivo study on long-term ovariectomized sheep. *J Orthop Res*. 2002 Nov;20(6):1217-24. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00069-4. PubMed PMID: 12472232.

Aleksyniene R, Thomsen JS, Eckardt H, Bundgaard KG, Lind M, Hvid I. Threedimensional microstructural properties of regenerated mineralizing tissue after PTH (1-34) treatment in a rabbit tibial lengthening model. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009 Oct-Dec;9(4):268e277. PubMed PMID: 19949285.

Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, et al. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2017 Jan; 97(1):135-87. doi:10.1152/physrev.00033.2015. PubMed PMID: 27807202

Anderson AB, Dallmier AW, Chudzik SJ, Duran LW, Guire PE, Hergenrother RW, et al. Technologies for the surface modification of biomaterials. In: Yaszemski MJ, Trantolo DJ, Lewandrowski KU, Hasirci V, Altobelli DE, Wise DL. *Biomaterials in orthopedics 2ed*. New York: Marcel Dekker Inc; 2004. p. 93-148.

Andersson OH, Kangasniemi I. Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass in vivo. *J Non-Cryst Solids*. 1990 May; 119(3):290-6. doi.org/10.1016/0022-3093(90)90301-2.

Andersson OH, Kangasniemi I. Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1991 Aug; 25(8):1019-30. doi: 10.1002/jbm.820250808. PubMed PMID: 1918106.

Anti-sRANKL antibody (ab62516). Abcam: product datasheet.[Internet].[ cited 2021 Mar 09 Mar 2021]. Available from://www.abcam.com/srankl-antibody-ab62516.html.

Arruda LB, Orlandi MO, Lisboa-Filho PN. Morphological modifications and surface amorphization in ZnO sonochemically treated nanoparticles. *Ultrason Sonochem*. 2013 May;20(3):799-804. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.11.013. Epub 2012 Dec 7. PubMed PMID: 23274054.

Auersvald CM, Santos FR, Nakano MM, Leoni GB, de Sousa Neto MD, Scariot R, et al. The local administration of parathyroid hormone encourages the healing of bone defects in the rat calvaria: micro-computed tomography, histological and histomorphometric evaluation. *Arch Oral Biol*. 2017 Jul; 79:14-19. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.016. Epub 2017 Mar 6. PubMed PMID: 28282513.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive Glasses: Where are we and where are we going? *J Funct Biomater*. 2018 Mar 19;9(1):25. doi: 10.3390/jfb9010025. PubMed PMID: 29562680; PubMed Central PMCID: PMC5872111.

Baino F, Novajra G, Miguez-Pacheco V, Boccaccini AR, Vitale-Brovarone C. Bioactive glasses: special applications outside the skeletal system. *J Non-Cryst Solids*. 2016; 432 (Part A):15–30. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2015.02.015.

Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, Klein-Nulend J. Strontium ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts. *Bone*. 2013 Mar;53(1):112-9. doi: 10.1016/j.bone.2012.11.044. PubMed PMID: 23234812.

Bang JH, Suslick KS. Applications of ultrasound to the synthesis of nanostructured materials. *Adv Mater*. 2010 Mar 12;22(10):1039-59. doi: 10.1002/adma.200904093. PubMed PMID: 20401929.

Bahari Javan N, Rezaie Shirmard L, Jafary Omid N, Akbari Javar H, Rafiee Tehrani M, Abedin Dorkoosh F. Preparation, statistical optimisation and in vitro characterisation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly (lactic-co-glycolic acid) blend nanoparticles for prolonged delivery of teriparatide. *J Microencapsul*. 2016 Aug;33(5):460-74. doi: 10.1080/02652048.2016.1208296. PubMed PMID: 27424890.

Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995 May 1;20(9):1055-60. doi: 10.1097/00007632-199505000-00012. PubMed PMID: 7631235.

Black DM, Rosen CJ. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2016 May 26;374(21):2096-7. doi: 10.1056/NEJMc1602599. PubMed PMID: 27223157.

Blick SK, Dhillon S, Keam SJ. Teriparatide: a review of its use in osteoporosis. *Drugs*. 2008;68(18):2709-37. doi: 10.2165/0003495-200868180-00012. PubMed PMID: 19093708.

Bliuc D, Tran T, van Geel T, Adachi JD, Berger C, van der Bergh J, et al. Reduced bone loss is associated with reduced mortality risk in subjects exposed to nitrogen bisphosphonates: a mediation analysis. *J Bone Miner Res*. 2019 Nov;34(11):2001-11. Epub 2019 Aug 12. doi: 10.1002/jbmr.3816. PubMed PMID: 31402509.

Bogliolo L, Brasileiro Filho G. *Patologia*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.1328p,xiv il. ISBN: 8527732866

Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*. 1998 Sep;23(3):187-96. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00092-1. PubMed PMID: 9737340.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42. doi: 10.1038/nature01658. PubMed PMID: 12748652.

Buduneli E, Vardar-Şengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5  $\gamma$ 2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol*. 2007 Jan;78(1):127-34. doi: 10.1902/jop.2007.050451. PubMed PMID: 29539192.

Cai K, Frant M, Bossert J, Hildebrand G, Liefelth K, Jandt KD. Surface functionalized titanium thin films: zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006 Jun 1;50(1):1-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.016. Epub 2006 Mar 28. PubMed PMID: 16679008

Cenci S, Toraldo G, Weitzmann MN, Roggia C, Gao Y, Qian WP, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10405-10. doi: 10.1073/pnas.1533207100. Epub 2003 Aug 15. PubMed PMID: 12923292; PubMed CentralPMCID: PMC193574.

Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest*. 2000 Nov;106(10):1229-37. doi: 10.1172/JCI11066. PubMed PMID: 11086024; PubMed Central PMCID: PMC381439

Cerruti M, Greenspan D, Powers K. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):1665-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.009. PubMed PMID: 15576140.

Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018 Mar;59(2):99-107. doi: 10.1080/03008207.2017.1290085. Epub 2017 Mar 21. PubMed PMID: 28324674; PubMed Central PMCID: PMC5612831.

Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*. 1993 Jun;94(6):646-50. doi: 10.1016/0002-9343(93)90218-e. PubMed PMID: 8506892.

D'Amelio P. The immune system and postmenopausal osteoporosis. *Immunol Invest*. 2013;42(7):544-54. doi: 10.3109/08820139.2013.822764. PubMed PMID: 24004058.

da Cruz Vegian MR, Costa BCA, de Fátima Santana-Melo G, Godoi FHC, Kaminagakura E, Tango RN, et al. Systemic and local effects of radiotherapy: an experimental study on implants placed in rats. *Clin Oral Investig*. 2020 Feb;24(2):785-97. doi: 10.1007/s00784-019-02946-5. Epub 2019 Jun 1. PubMed PMID: 31154539.

Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2004 Dec;25(27):5857-66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.01.043. PubMed PMID: 15172498.

de Oliveira D, de Oliveira Puttini I, Silva Gomes-Ferreira PH, Palin LP, Matsumoto MA, Okamoto R. Effect of intermittent teriparatide (PTH 1-34) on the alveolar healing process in orchietomized rats. *Clin Oral Investig*. 2019 May;23(5):2313-22. doi: 10.1007/s00784-018-2672-y. Epub 2018 Oct 6. PubMed PMID: 30291494.

Detsch R, Alles S, Hum J, Westenberger P, Sieker F, Heusinger D, et al. Osteogenic differentiation of umbilical cord and adipose derived stem cells onto highly porous 45S5 Bioglass®-based scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Mar;103(3):1029-37. doi: 10.1002/jbm.a.35238. Epub 2014 Jun 14. PubMed PMID: 24853477.

Di Munno O, Ferro F. The effect of biologic agents on bone homeostasis in chronic inflammatory rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 May-Jun; 37(3):502-7. Epub 2018 Nov 19. PubMed PMID: 30557124.

dos Santos PL, Queiroz TP, Margonar R, Gomes de Souza Carvalho AC, Okamoto R, de Souza Faloni AP, et al. Guided implant surgery: what is the influence of this new technique on bone cell viability? *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Mar;71(3):505-12. doi: 10.1016/j.joms.2012.10.017. Epub 2013 Jan 5. PubMed PMID: 23298799.

dos Santos PL, de Molon RS, Queiroz TP, Okamoto R, de Souza Faloni AP, Gulinelli JL, et al. Evaluation of bone substitutes for treatment of peri-implant bone defects: biomechanical, histological, and immunohistochemical analyses in the rabbit tibia. *J Periodontal Implant Sci*. 2016 Jun;46(3):176-96. doi: 10.5051/jpis.2016.46.3.176. Epub 2016 Jun 28. PubMed PMID: 27382506; PubMed Central PMCID: PMC4928206.

dos Santos Silva A, Rodrigues BVM, Oliveira FC, Carvalho JO, Vasconcellos LMR, Araújo JCR, et al. Characterization and in vitro and in vivo assessment of poly(butylene adipate-co-terephthalate)/nano-hydroxyapatite composites as scaffolds for bone tissue engineering. *J Polym Res*. 2019 ;26:53.doi.org/10.1007/s10965-019-1706-8.

Downing JR, Rettenmier CW, Sherr CJ. Ligand-induced tyrosine kinase activity of the colony-stimulating factor 1 receptor in a murine macrophage cell line. *Mol Cell Biol*. 1988 Apr;8(4):1795-9. doi: 10.1128/mcb.8.4.1795. PubMed PMID: 2837654; PubMed Central PMCID: PMC363340.

Duracan C, Brown PW. Biodegradable hydroxyapatite-polymer composites. *Adv Eng Mater*. 2001; 3(4): 227–31.doi.org/10.1002/1527-2648(200104)3:4<227::AID-ADEM227>3.0.CO;2-1.

Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2005 Mar;16 Suppl 2:S129-S38. doi:10.1007/s00198-005-1859-7

Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*. 1988 Jul 1;241(4861):84-6. doi: 10.1126/science.3388021. PubMed PMID: 3388021.

Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M. Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: A histomorphometric study in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 1999 Jul;14(7):1217-21. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1217. PubMed PMID: 10404024.

Ersan N, van Ruijven LJ, Bronckers AL, Olgaç V, Ilgüy D, Everts V. Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model. *Dentomaxillofac Radiol*. 2014;43(1):20130144. doi: 10.1259/dmfr.20130144. Epub 2013 Oct 29. PubMed PMID: 24170800; PubMed Central PMCID: PMC3887480.

Esteves JC, Marcantonio E Jr, de Souza Faloni AP, Rocha FR, Marcantonio RA, Wilk K, et al. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med*. 2013 Sep 23;11:221. doi: 10.1186/1479-5876-11-221. PubMed PMID: 24053147; PubMed Central PMCID: PMC3868312.

Faienza MF, Ventura A, Marzano F, Cavallo L. Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:575936. doi: 10.1155/2013/575936. Epub 2013 May 23. PubMed PMID: 23762093; PubMed Central PMCID: PMC3677008.

Fernandes HR, Gaddam A, Rebelo A, Brazete D, Stan GE, Ferreira JMF. Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering. *Materials (Basel)*. 2018 Dec 12;11(12):2530. doi: 10.3390/ma11122530. PubMed PMID: 30545136; PubMed Central PMCID: PMC6316906.

Fiume E, Barberi J, Verné E, Baino F. Bioactive glasses: from parent 45S5 composition to scaffold-assisted tissue-healing therapies. *J Funct Biomater*. 2018 Mar 16;9(1):24. doi: 10.3390/jfb9010024. PubMed PMID: 29547544; PubMed Central PMCID: PMC5872110.

Fortéo® Colter: Pen- Solução - 250 mcg/mL [bula]. Márcia A. Preda - CRF-SP nº 19189. Fegersheim –França: Lilly France S.A.S;2007.

Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec*. 1990 Apr;226(4):414-22. doi: 10.1002/ar.1092260403. PubMed PMID: 2184696.

Goltzman D. Physiology of parathyroid hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2018 Dec;47(4):743-58. doi:10.1016/j.ecl.2018.07.003.

Gomes-Ferreira PHS, de Oliveira D, Frigério PB, de Souza Batista FR, Grandfield K, Okamoto R. Teriparatide improves microarchitectural characteristics of peri-implant



bone in orchietomized rats. *Osteoporos Int.* 2020 Sep;31(9):1807-15. doi: 10.1007/s00198-020-05431-y. Epub 2020 May 7. PubMed PMID: 32383065.

Gonzalo-Juan I, Xie F, Becker M, Tulyaganov DU, Ionescu E, Lauterbach S, et al. Synthesis of silver modified bioactive glassy materials with antibacterial properties via facile and low-temperature route. *Materials (Basel)*. 2020 Nov 13;13(22):5115. doi: 10.3390/ma13225115. PubMed PMID: 33202741; PubMed Central PMCID: PMC7696528.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004 Jun 1;329(1):77-84. doi: 10.1016/j.ab.2004.02.002. PubMed PMID: 15136169.

Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Apr;16(2):199-207. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0416. PubMed PMID: 19831556.

Hao F, Gu Y, Tan X, Deng Y, Wu ZT, Xu MJ, et al. Estrogen replacement reduces oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla of ovariectomized rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016:2158971. doi: 10.1155/2016/2158971. Epub 2015 Nov 10. PubMed PMID: 26640612; PubMed Central PMCID: PMC4657113.

Hauschka PV, Frenkel J, DeMuth R, Gundberg CM. Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem.* 1983 Jan 10;258(1):176-82. PMID: 6600233.

Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res.* 1973;7(3):25-42. doi: 10.1002/jbm.820070304. PubMed PMID: 4123968.

Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998;81:1705–28. doi:10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x.

Hench LL. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.* 2006 Nov;17(11):967-78. doi: 10.1007/s10856-006-0432-z. Epub 2006 Nov 22. PubMed PMID: 17122907.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials.* 2011 Apr;32(11):2757-74. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004. Epub 2011 Feb 2. PubMed PMID: 21292319.

Hu Q, Li Y, Miao G, Zhao N, Chen X. Size control and biological properties of monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres. *RSC Adv.* 2014;4(4):22678-87. doi:10.1039/C4RA01276C.

Huebsch N, Mooney DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*. 2009 Nov 26;462(7272):426-32. doi: 10.1038/nature08601. PubMed PMID: 19940912; PubMed Central PMCID: PMC2848528.

Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, et al. Innovative biomaterials for bone regrowth. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 31;20(3):618. doi: 10.3390/ijms20030618. PubMed PMID: 30709008; PubMed Central PMCID: PMC6387157.

International Organization for Standardization-ISO. ISO 10993: Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: In vitro methods. Switzerland, ISO; 1993.

International Osteoporosis Foundation- IOF [internet]. Nyon:IOF [cited 2019 Dez 09]. Broken bones, broken lives: a roadmap to solve the fragility fracture crisis in Europe. Available from: <https://www.osteoporosis.foundation/what-we-do/science-and-research/latest-projects--broken-bones-broken-lives>.

Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1434-46. doi: 10.1016/j.bone.2007.03.017. Epub 2007 Apr 6. PubMed PMID: 17517365; PubMed Central PMCID: PMC1995599.

Johari B, Kadivar M, Lak S, Gholipourmalekabadi M, Urbanska AM, Mozafari M, et al. Osteoblast-seeded bioglass/gelatin nanocomposite: a promising bone substitute in critical-size calvarial defect repair in rat. *Int J Artif Organs*. 2016 Nov 29;39(10):524-33. doi: 10.5301/ijao.5000533. Epub 2016 Nov 28. PubMed PMID: 27901555.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991 Dec;15(3):175-91. doi: 10.1016/0169-6009(91)90124-i. PubMed PMID: 1773131.

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):155-92. doi: 10.1210/er.2007-0014. Epub 2007 Dec 5. PubMed PMID: 18057140; PubMed Central PMCID: PMC2528846.

Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem*. 2018 May;55(3):308-27. doi: 10.1177/0004563218759371. Epub 2018 Mar 4. PubMed PMID: 29368538.

Khoshakhlagh P, Rabiee SM, Kiaee G, Heidari P, Miri AK, Moradi R, Moztarzadeh F, Ravarian R. Development and characterization of a bioglass/chitosan composite as an injectable bone substitute. *Carbohydr Polym*. 2017 Feb 10;157:1261-71. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.003. Epub 2016 Nov 13. PubMed PMID: 27987831.

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy

and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Mar;68(5-6):197-02. doi: 10.1016/s0960-0760(99)00032-1. PubMed PMID: 10416834.

Kubota T, Hasuike A, Tsukune N, Ozawa Y, Yamamoto T, Min S, et al. Influence of estrogen deficiency on guided bone augmentation: investigation of rat calvarial model and osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Eur J Oral Sci.* 2018a Jun;126(3):206-13. doi: 10.1111/eos.12415. Epub 2018 Apr 20. PubMed PMID: 29676477

Kubota T, Hasuike A, Naito M, Tsunori K, Min S, Sato S. Enhancement of bone augmentation in osteoporotic conditions by the intermittent parathyroid hormone: an animal study in the calvarium of ovariectomized rat. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2018b Sep/Oct;33(5):1003-10. doi: 10.11607/jomi.6326. PMID: 30231085..

Kyllönen L, D'Este M, Alini M, Eglin D. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. *Acta Biomater.* 2015 Jan;11:412-34. doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.006. Epub 2014 Sep 16. PubMed PMID: 25218339.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):165-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x. PubMed PMID: 9568710.

Lee EMR, Borges R, Marchi J, de Paula Eduardo C, Marques MM. Bioactive glass and high-intensity lasers as a promising treatment for dentin hypersensitivity: An in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020 Apr;108(3):939-47. doi: 10.1002/jbm.b.34446. Epub 2019 Aug 5. PubMed PMID: 31381257.

Lee S, Matsugaki A, Kasuga T, Nakano T. Development of bifunctional oriented bioactive glass/poly(lactic acid) composite scaffolds to control osteoblast alignment and proliferation. *J Biomed Mater Res A.* 2019 May;107(5):1031-41. doi: 10.1002/jbm.a.36619. Epub 2019 Feb 6. PubMed PMID: 30675975; PubMed Central PMCID: PMC6593822.

Leesungbok R, Ahn SJ, Lee SW, Park GH, Kang JS, Choi JJ, et al. The effects of a static magnetic field on bone formation around a sandblasted, large-grit, acid-etched–treated titanium implant. *J Oral Implant.* 2013; 39(S1):248–55. doi:10.1563/aaid-joi-d-11-00101..

Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 Jul;85(7):584-95. doi: 10.1177/154405910608500703. PubMed PMID: 16798857.

Li L, Wang Z. Ovarian aging and osteoporosis. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1086:199-15. doi: 10.1007/978-981-13-1117-8\_13. PubMed PMID: 30232761.

Li Y, Cheng H, Liu ZC, Wu JW, Yu L, Zang Y, et al. In vivo study of pedicle screw augmentation using bioactive glass in osteoporosis sheep. *J Spinal Disord Tech.* 2013 Jun;26(4):118-23. doi: 10.1097/BSD.0b013e31827695e2. PubMed PMID: 23079719.

Lin S, Van den Bergh W, Baker S, Jones JR. Protein interactions with nanoporous sol-gel derived bioactive glasses. *Acta Biomater.* 2011 Oct;7(10):3606-15. doi: 10.1016/j.actbio.2011.06.042. Epub 2011 Jun 30. PubMed PMID: 21757036.

Lirani-Galvão AP, Lazaretti-Castro M. Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010 Mar;54(2):171-8. doi: 10.1590/s0004-27302010000200013. PubMed PMID: 20485906.

Lisboa-Filho PN, Gomes-Ferreira PHS, Batista FRS, Momesso GAC, Faverani LP, Okamoto R. Bone repair with raloxifene and bioglass nanoceramic composite in animal experiment. *Connect Tissue Res.* 2018 Dec;59(sup1):97-101. doi: 10.1080/03008207.2018.1430143. PMID: 29745810.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR Jr, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010a Jan;55(1):52-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.001. Epub 2009 Nov 30. PubMed PMID: 19948337.

Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR Jr, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone.* 2010b Apr;46(4):1021-29. doi: 10.1016/j.bone.2009.12.016. Epub 2009 Dec 28. PubMed PMID: 20036346.

Macluskey M, Ogden GR. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: 2. Markers of value in tumour diagnosis. *Dent Update.* 2000 Apr;27(3):148-52. doi: 10.12968/denu.2000.27.3.148. PubMed PMID: 11218286.

Malik DK, Baboota S, Ahuja A, Hasan S, Ali J. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. *Curr Drug Deliv.* 2007 Apr;4(2):141-51. doi: 10.2174/156720107780362339. PubMed PMID: 17456033.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000 Apr;21(2):115-37. doi: 10.1210/edrv.21.2.0395. PubMed PMID: 10782361.

Mazziotti G, Bilezikian J, Canalis E, Cocchi D, Giustina A. New understanding and treatments for osteoporosis. *Endocrine.* 2012 Feb;41(1):58-69. doi: 10.1007/s12020-011-9570-2. PubMed PMID: 22180055.

Mazzonetto R, Netto HD, Nascimento FF. *Enxertos ósseos em implantodontia.* São Paulo: Editora Napoleão; 2012. ISBN: 978-85-60842-32.

McNamara LM. Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to

whole bone fractures. *J R Soc Interface*. 2010 Mar 6;7(44):353-72. doi: 10.1098/rsif.2009.0282. Epub 2009 Oct 21. PubMed PMID: 19846441; PubMed Central PMCID: PMC2842799.

Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997 Apr;55(4):351-61; discussion. doi: 10.1016/s0278-2391(97)90124-5. PubMed PMID: 9120698.

Moore AE, Blake GM, Taylor KA, Rana AE, Wong M, Chen P, et al. Assessment of regional changes in skeletal metabolism following 3 and 18 months of teriparatide treatment. *J Bone Miner Res*. 2010 May;25(5):960-7. doi: 10.1359/jbmr.091108. PubMed PMID: 19929434.

Mosbahi S, Oudadesse H, Roiland C, Lefeuvre B, Slimani L, Keskes H. Risedronate effects on the in vivo bioactive glass behavior: nuclear magnetic resonance and histopathological studies. *Biomed Res Int*. 2019 Dec 12;2019:2175731. doi: 10.1155/2019/2175731. PubMed PMID: 31915685; PubMed Central PMCID: PMC6935465.

Mosqueira L, Barrioni BR, Martins T, Ocarino NM, Serakides R, Pereira MM. In vitro effects of the co-release of icariin and strontium from bioactive glass submicron spheres on the reduced osteogenic potential of rat osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Mater*. 2020 Sep 4;15(5):055023. doi: 10.1088/1748-605X/ab9095. PubMed PMID: 32375130.

Ning Z, Tan B, Chen B, Lau DSA, Wong TM, Sun T, et al. Precisely controlled delivery of abaloparatide through injectable hydrogel to promote bone regeneration. *Macromol Biosci*. 2019 Jun;19(6):e1900020. doi: 10.1002/mabi.201900020. Epub 2019 May 8. PubMed PMID: 31066995.

Ohata T, Maruno H, Ichimura S. Changes over time in callus formation caused by intermittently administering PTH in rabbit distraction osteogenesis models. *J Orthop Surg Res*. 2015 Jun 3;10:88. doi: 10.1186/s13018-015-0228-2. PubMed PMID: 26037517; PubMed Central PMCID: PMC4464237.

Özer T, Başlarlı Ö, Aktaş A, Barış E, Çelik HH, Ocak M. Locally administrated single-dose teriparatide affects critical-size rabbit calvarial defects: a histological, histomorphometric and micro-CT study. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2019 Nov; 53(6):478-84. doi: 10.1016/j.aott.2019.08.007. Epub 2019 Sep 14. PubMed PMID: 31530436; PubMed Central PMCID: PMC6938999.

Pazarçeviren AE, Evis Z, Keskin D, Tezcaner A. Resorbable PCEC/gelatin-bismuth doped bioglass-graphene oxide bilayer membranes for guided bone regeneration. *Biomed Mater*. 2019 Apr 15;14(3):035018. doi: 10.1088/1748-605X/ab007b. PubMed PMID: 30665204.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *Br J*

Pharmacol. 2020 Aug;177(16):3617-24. doi: 10.1111/bph.15193. Epub 2020 Jul 14. PubMed PMID: 32662519; PubMed Central PMCID: PMC7393194.

Puttini IO, Poli PP, Maiorana C, Vasconcelos IR, Schmidt E, Colombo LT, et al. Evaluation of osteoconduction of biphasic calcium phosphate ceramic in the calvaria of rats: microscopic and histometric analysis. *J Funct Biomater*. 2019 Jan 17;10(1):7. doi: 10.3390/jfb10010007. PubMed PMID: 30658427; PubMed Central PMCID: PMC6462940.

Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Júnior IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Jun;66(6):1233-40. doi: 10.1016/j.joms.2007.12.037. PubMed PMID: 18486789.

Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011 Jun;7(6):2355-73. doi: 10.1016/j.actbio.2011.03.016. Epub 2011 Mar 21. PubMed PMID: 21421084; PubMed Central PMCID: PMC3085647.

Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 2005 Dec;115(12):3318-25. doi: 10.1172/JCI27071. PubMed PMID: 16322775; PubMed Central PMCID: PMC1297264.

Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Momesso GAC, Luvizuto ER, de Oliveira Puttini I, Okamoto R. Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing: a histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clin Oral Investig*. 2017 Jun;21(5):1485-94. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x. Epub 2016 Jul 27. PubMed PMID: 27460567.

Reible B, Schmidmaier G, Prokscha M, Moghaddam A, Westhauser F. Continuous stimulation with differentiation factors is necessary to enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in-vitro. *Growth Factors*. 2017; 35(04–06):179–88. <https://doi.org/10.1080/08977194.2017>. PubMed PMID: 29228886

Reible B, Schmidmaier G, Moghaddam A, Westhauser F. Insulin-like growth factor-1 as a possible alternative to bone morphogenetic protein-7 to induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 5;19(6):1674. doi: 10.3390/ijms19061674. PubMed PMID: 29874864; PubMed Central PMCID: PMC6032281.

Rivadeneira, J, Di Virgilio AL, Audisio MC, Boccacini AR, Gorustovich AA. 45S5 Bioglass® concentrations modulate the release of vancomycin hydrochloride from gelatin–starch films: evaluation of antibacterial and cytotoxic effects. *J Mater Sci*. 2017; 52: 9091–102 [doi.org/10.1007/s10853-016-0512-5](https://doi.org/10.1007/s10853-016-0512-5).

Rizwan M, Hamdi M, Basirun WJ. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. *J Biomed Mater Res A*. 2017

Nov;105(11):3197-223. doi: 10.1002/jbm.a.36156. Epub 2017 Aug 9. PubMed PMID: 28686004.

Rodrigues C, Naasani LIS, Zanatelli C, Paim TC, Azevedo JG, de Lima JC, et al. Bioglass 45S5: Structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Oct;103:109781. doi: 10.1016/j.msec.2019.109781. Epub 2019 May 23. PubMed PMID: 31349402.

Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13960-5. doi: 10.1073/pnas.251534698. PubMed PMID: 11717453; PubMed Central PMCID: PMC61149.

Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, Taba M Jr, Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res*. 2009 May;20(5):472-81. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01662.x. Epub 2009 Feb 25. PubMed PMID: 19250245.

Russow G, Jahn D, Appelt J, Märdian S, Tsitsilonis S, Keller J. Anabolic therapies in osteoporosis and bone regeneration. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 26;20(1):83. doi: 10.3390/ijms20010083. PubMed PMID: 30587780; PubMed Central PMCID: PMC6337474.

Slosarczyk A, Paszkiewicz Z, Paluszkiwicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J Mol Struct*. 2005; 744-747:657-61. doi: 10.1016/j.molstruc.2004.11.078.

Sözen T, Özışık L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017 Mar;4(1):46-56. doi: 10.5152/eurjrheum.2016.048. Epub 2016 Dec 30. PubMed PMID: 28293453; PubMed Central PMCID: PMC5335887.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012 Oct;7(10):1918-29. doi: 10.1038/nprot.2012.113. Epub 2012 Sep 27. PubMed PMID: 23018195; PubMed Central PMCID: PMC3513397.

Spirandeli BR, Campos TMB, Ribas RG, Thim GP, Trichês ES. Evaluation of colloidal and polymeric routes in sol-gel synthesis of a bioactive glass-ceramic derived from 45S5 bioglass. *Ceramics International*. 2020; 46(12):20264-71. doi: 10.1016/j.ceramint.2020.05.108.

Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1-6. doi: 10.1007/978-1-61779-108-6\_1. PubMed PMID: 21468961.

Tadjoedin ES, de Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH. High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation.

Clin Oral Implants Res. 2002 Aug;13(4):428-36. doi: 10.1034/j.1600-0501.2002.130412.x. PubMed PMID: 12175381.

Tao ZS, Zhou WS, Wu XJ, Wang L, Yang M, Xie JB, et al. Single-dose local administration of parathyroid hormone (1-34, PTH) with  $\beta$ -tricalcium phosphate/collagen ( $\beta$ -TCP/COL) enhances bone defect healing in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2019 Jan;37(1):28-35. doi: 10.1007/s00774-018-0906-3. Epub 2018 Feb 1. PubMed PMID: 29392472.

Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Jul;142:155-70. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.09.008. Epub 2013 Oct 29. PubMed PMID: 24176761; PubMed Central PMCID: PMC4187361.

Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol*. 2004 Sep;49(9):755-62. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.02.013. PubMed PMID: 15275863.

Tera Tde M, Prado RF, De Marco AC, Santamaria MP, Jardini MA. The RANK/RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res*. 2014;28. doi: 10.1590/1807-3107bor-2014.vol28.0054. Epub 2014 Sep 15. PubMed PMID: 25229791.

Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials*. 2009 Jul;30(21):3542-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.019. Epub 2009 Mar 31. PubMed PMID: 19339047.

Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, Trivedi R, Chattopadhyay N, Singh D. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One*. 2012;7(9):e44552. doi: 10.1371/journal.pone.0044552. Epub 2012 Sep 10. PubMed PMID: 22970248; PubMed Central PMCID: PMC3438183.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. *Bone*. 1999 Nov;25(5):517-23. doi: 10.1016/s8756-3282(99)00210-0. PubMed PMID: 10574571.

van Houdt CIA, Gabbai-Armelin PR, Lopez-Perez PM, Ulrich DJO, Jansen JA, Renno ACM, et al. Alendronate release from calcium phosphate cement for bone regeneration in osteoporotic conditions. *Sci Rep*. 2018 Oct 18;8(1):15398. doi: 10.1038/s41598-018-33692-5. PubMed PMID: 30337567; PubMed Central PMCID: PMC6194021.

Vasconcellos LMR, Santana-Melo GF, Silva E, Pereira VF, Araújo JCR, Silva ADR, et al. Electrospun poly(butylene-adipate-co-terephthalate)/nano-hydroxyapatite/graphene nanoribbon scaffolds improved the in vivo osteogenesis of



the neoformed bone. *J Funct Biomater*. 2021 Feb 5;12(1):11. doi: 10.3390/jfb12010011. PubMed PMID: 33562592.

Wang CW, Yu SH, Fretwurst T, Larsson L, Sugai JV, Oh J, et al. Maresin 1 promotes wound healing and socket bone regeneration for alveolar ridge preservation. *J Dent Res*. 2020 Jul;99(8):930-7. doi: 10.1177/0022034520917903. Epub 2020 May 8. PubMed PMID: 32384864; PubMed Central PMCID: PMC7338694.

Wang J, Li J, Yang L, Zhou Y, Wang Y. Dose-dependence of PTH-related peptide-1 on the osteogenic induction of MC3T3-E1 cells in vitro. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr;96(17):e6637. doi: 10.1097/MD.0000000000006637. PubMed PMID: 28445262; PubMed Central PMCID: PMC5413227.

Wein MN, Kronenberg HM. Regulation of bone remodeling by parathyroid hormone. *cold spring harb perspect med*. 2018 Aug 1;8(8):a031237. doi: 10.1101/cshperspect.a031237. PubMed PMID: 29358318; PubMed Central PMCID: PMC6071549.

Weitzmann MN, Roggia C, Toraldo G, Weitzmann L, Pacifici R. Increased production of IL-7 uncouples bone formation from bone resorption during estrogen deficiency. *J Clin Invest*. 2002 Dec;110(11):1643-50. doi: 10.1172/JCI15687. PubMed PMID: 12464669; PubMed Central PMCID: PMC151629.

Weitzmann MN, Pacifici R. Role of the immune system in postmenopausal bone loss. *Curr Osteoporos Rep*. 2005 Sep;3(3):92-7. doi: 10.1007/s11914-005-0016-8. PubMed PMID: 16131428.

Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1186-94. doi: 10.1172/JCI28550. PMID: 16670759; PMCID: PMC1451218.

Weitzmann MN. Bone and the immune system. *Toxicol Pathol*. 2017 Oct;45(7):911-24. doi: 10.1177/0192623317735316. Epub 2017 Oct 18. PubMed PMID: 29046115; PubMed Central PMCID: PMC5749254.

Weng SJ, Yan DY, Tang JH, Shen ZJ, Wu ZY, Xie ZJ, et al. Combined treatment with cinnamaldehyde and  $\beta$ -TCP had an additive effect on bone formation and angiogenesis in critical size calvarial defect in ovariectomized rats. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jan;109:573-81. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.085. Epub 2018 Nov 3. PubMed PMID: 30399593.

Westhauser F, Karadjian M, Essers C, Sanger AS, Hagmann S, Schmidmaier G, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is enhanced in a 45S5-supplemented  $\beta$ -TCP composite scaffold: an in-vitro comparison of Vitoss and Vitoss BA. *PLoS One*. 2019 Feb 27;14(2):e0212799. doi: 10.1371/journal.pone.0212799. PubMed PMID: 30811492; PubMed Central PMCID: PMC6392320.

Wu X, Pang L, Lei W, Lu W, Li J, Li Z, et al. Inhibition of sca-1-positive skeletal stem cell recruitment by alendronate blunts the anabolic effects of parathyroid hormone on

bone remodeling. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):571-80. doi: 10.1016/j.stem.2010.09.012. PubMed PMID: 21040899; PubMed Central PMCID: PMC4084813.

Xynos ID, Hukkanen MV, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int*. 2000 Oct;67(4):321-9. doi: 10.1007/s002230001134. PubMed PMID: 11000347.

Yang C, Wu H, Chen S, Kang G. Three-dimensional bioglass-collagen-phosphatidylserine scaffolds designed with functionally graded structure and mechanical features. *Biomed Tech (Berl)*. 2018 Jun 27;63(3):255-9. doi: 10.1515/bmt-2017-0185. PubMed PMID: 29648991.

Yang D, Singh R, Divieti P, Guo J, Bouxsein ML, Bringhurst FR. Contributions of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling pathways to the anabolic effect of PTH on bone. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1453-61. doi: 10.1016/j.bone.2007.02.001. Epub 2007 Feb 16. PubMed PMID: 17376756; PubMed Central PMCID: PMC1976286.

Yang LS, Yan JW, Zheng H, Ni R, Han XK, Chang X. Comparative study of processed autogenous tooth bone and xenogeneic bovine bone in repairing an alveolar bone defect. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2018 Aug 1;36(4):372-7. doi: 10.7518/hxkq.2018.04.005. PubMed PMID: 30182563; PubMed Central PMCID: PMC7048246.Chinese.

Zamet JS, Darbar UR, Griffiths GS, Bulman JS, Brägger U, Bürgin W, et al. Particulate bioglass as a grafting material in the treatment of periodontal intrabony defects. *J Clin Periodontol*. 1997 Jun;24(6):410-8. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00205.x. PubMed PMID: 9205920.

Zerbini CAF, Clark P, Mendez-Sanchez L, Pereira RMR, Messina OD, Uña CR, et al. IOF chronic inflammation and bone structure (CIBS) working group: biologic therapies and bone loss in rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int*. 2017 Feb;28(2):429-46. doi: 10.1007/s00198-016-3769-2. Epub 2016 Oct 31. PubMed PMID: 27796445.

Zhang L, Ke X, Lin L, Xiao J, Yang X, Wang J, et al. Systematic evaluation of the osteogenic capacity of low-melting bioactive glass-reinforced 45S5 Bioglass porous scaffolds in rabbit femoral defects. *Biomed Mater*. 2017 Jun 7;12(3):035010. doi: 10.1088/1748-605X/aa6b5c. PubMed PMID: 28589920.

Zhou J, Chen S, Guo H, Xia L, Liu H, Qin Y, et al. Pulsed electromagnetic field stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in ovariectomized rats. *Rheumatol Int*. 2013 May;33(5):1135-41. doi: 10.1007/s00296-012-2499-9. Epub 2012 Sep 5. PubMed PMID: 22948539.