

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/03/2028.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Nathalia Caetano Marques**

**Avaliação das propriedades biológicas do Osteoglass®: estudo *in vivo***

**Araraquara**

**2024**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Nathalia Caetano Marques**

**Avaliação das propriedades biológicas do Osteoglass®: estudo *in vivo***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na área de Diagnóstico e Cirurgia

**Orientador: Prof. Assis. Valfrido Antonio Pereira Filho**

**Araraquara**

**2024**

M357a Marques, Nathalia Caetano  
Avaliação das propriedades biológicas do  
Osteoglass®: estudo in vivo / Nathalia Caetano  
Marques. -- Araraquara, 2024  
59 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia,  
Araraquara  
Orientador: Valfrido Antonio Pereira Filho

1. Substitutos ósseos. 2. Materiais biocompatíveis.  
3. Modelos animais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.  
Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de  
Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Nathalia Caetano Marques**

**Avaliação das propriedades biológicas do Osteoglass®: estudo *in vivo***

**Comissão Julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Odontológicas**

Presidente e Orientador: Valfrido Antonio Pereira Filho

2º Examinador: Ana Paula Farnezi Bassi

3º Examinador: Andreia Bufalino

Araraquara, 01 de março de 2024.

## **DADOS CURRICULARES**

**Nathalia Caetano Marques**

Nascimento: 04 de setembro de 1999 – Rio Grande – Rio Grande do Sul

Filiação: Arlete da Silva Caetano  
Marco Antônio Antiqueira Marques

2017/2021: Graduação em Odontologia, Universidade Católica de Pelotas – UCPel, Pelotas, Rio Grande do Sul.

2022/2024: Mestrado em andamento no Programa de Pós-Graduação de Ciências Odontológicas, área de Diagnóstico e Cirurgia (Conceito CAPES 5) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Orientador: Valfrido Antonio Pereira Filho. Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil.

Dedico este trabalho a todos àqueles que estiveram genuinamente comigo durante sua elaboração, seja fisicamente presente ou não. À Deus, minha família, amigos, colegas e professores: muito obrigada.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me dado forças e amparo durante todo esse tempo.

Aos meus pais, Arlete da Silva Caetano e Almir Santos dos Passos, por todo amor, cuidado, proteção, apoio e incentivo.

Aos meus padrinhos, Edgar da Silva Castro (em memória) e Lenira Antiqueira Castro, por todo amor, zelo, incentivo, por sempre acreditarem em mim e nunca medirem esforços para que eu tivesse uma formação de excelência e fosse feliz com toda e qualquer escolha que eu tivesse. Se sou o que sou hoje, devo tudo a eles.

À minha irmã, Vanessa Caetano Marques, por estar comigo em todos os momentos, sendo eles difíceis ou não. Obrigada pelo apoio de sempre, pelo incentivo, pelos conselhos e ajudas no âmbito acadêmico e principalmente, por sempre confiar e acreditar em mim.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, e a todos os seus funcionários, por terem me recebido e acolhido tão bem, por todos os ensinamentos, pelas amizades cultivadas, e pelas vivências.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, por toda ajuda e auxílio prestados durante a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Andreia Bufalino, juntamente aos docentes do programa.

Às minhas amigas Eduarda Silveira, Eduarda Perazzo, Lívia da Costa, Fabiana Sá, Tainá Gautério, Carolina Godoy, Daniela Godoy, Júlia Collares, Gabriela Canova e Natasha Bermudez; por se fazerem presentes na minha vida, mesmo que não tenha sido fisicamente. Obrigada por todo apoio, incentivo e amor de sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valfrido Pereira Filho, por todo suporte, orientação e paciência durante todo esse período.

À Profa. Dra. Ana Paula Farnezi Bassi, por todo apoio, compreensão e suporte durante esse tempo. Sempre disposta a explicar e sanar minhas dúvidas, mesmo de longe. Sem ela, este trabalho não seria possível.

À Profa. Dra. Roberta Okamoto por todo suporte na parte de análise imunoistoquímica, por esclarecer minhas dúvidas e sempre se mostrar disposta a ajudar, com a maior paciência sempre.

Ao Prof.Dr. Cléverton Roberto Andrade, por toda ajuda que me deu durante a reta final. Mesmo não sendo do departamento de cirurgia, sempre esteve disposto a me ajudar, com todo carinho e paciência.

Aos meus orientadores da graduação, Lucas Borin Moura, Pedro Henrique de Azambuja Carvalho e Otacílio Chagas Júnior, por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, e por sempre me apoiarem e incentivarem a buscar o que há de melhor na cirurgia.

Aos meus amigos, colegas e anjos da Unesp de Araçatuba, Vinícius Bizelli, Ana Maira Baggio, Stéfani Ferriolli, Murilo Carvalho e, em especial, à Izabela Delamura, por terem me dado suporte durante toda a pesquisa, pelos ensinamentos, paciência e toda a disponibilidade para ajudar, sempre. A academia precisa de mais pessoas com a empatia de vocês.

Ao Cristiano Afonso Lamounier, por todas as orientações desde o princípio, pela ajuda de sempre, e pela paciência que teve comigo durante todo esse tempo. Sei que não foi fácil.

À Thelma Aparecida Gonçalves e ao Antônio Medeiros Filho, carinhosamente Thelminha e Toninho. Obrigada pelo suporte técnico, pelas conversas na copa, e pelas risadas.

À Priscila Consoralo e Isabella Manzolli, por toda ajuda (principalmente nas clínicas da graduação), conversas e trocas do dia-a-dia.

À Suleima Ferreira, por todo o suporte dado sobre o funcionamento do laboratório, por todas as risadas, e pelos bolos maravilhosos que deixavam todos do departamento mais felizes.

Ao Pedro Sérgio Simões, por todo o suporte técnico histológico.

Aos meus amigos de pós-graduação, Luiz Henrique Marola, Renato Torres, Luiz Henrique Soares Torres, Héric Camargo, Elaine Vedana, Naiara Marega, Débora, Miguel da Matta, Lucas Mafra e Lélío Soares, aos quais eu já recorri diversas vezes em momentos difíceis e que sempre estiveram dispostos a ajudar, independente de como. Obrigada pela companhia, conversas e boas risadas durante os cansativos períodos de clínica.

À Beatriz Marinho, por ter sido sinônimo de amizade, conforto, carinho, apoio e casa durante esse tempo.

A empresa Bionnovation®, pelo apoio na execução deste trabalho.

A empresa OrthoTrauma®, pela confiança e apoio durante a execução de todo o trabalho, provendo todo material e insumos necessários.

Aos animais utilizados nesse trabalho, por darem sua vida pela pesquisa.

Agradeço a mim. Pela minha coragem, força de vontade e dedicação. Foram dois anos de muito aprendizado acadêmico, mas principalmente, pessoal.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2022/05618-1) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

“A vida me fez de vez em quando pertencer, como se fosse para me dar a medida do  
que eu perco não pertencendo. E então eu soube: pertencer é viver.”  
Clarice Lispector\*

---

\* Lispector C. A descoberta do mundo. Rio de Janeiro: Rocco; 1999.

Marques NC. Avaliação das propriedades biológicas do Osteoglass®: estudo in vivo [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

## RESUMO

Diante dos desafios da reconstrução de defeito ósseos extensos, o uso de enxertia óssea ou biomateriais é indicado, sendo necessário o estudo de materiais sintéticos que possibilitem a viabilidade dos processos regenerativos e reparadores, a fim de compreender seu mecanismo no processo de reparo ósseo. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos biológicos de um biovidro nacional (Osteoglass-OrthoTrauma®) no reparo de defeitos ósseos críticos, criados na calvária de ratos, por meio de análise histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica. Para tanto, foram utilizados 54 ratos machos adultos da espécie *Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar, com idade de 3 a 4 meses, divididos em 3 grupos: OG (grupo Osteoglass-OrthoTrauma®), BO (grupo Bio-Oss®) e CO (grupo coágulo). Foi realizado defeitos ósseos críticos, com 8mm de diâmetro interno, e posteriormente preenchidos com coágulo ou com os biomateriais. Os grupos foram subdivididos em 3 grupos contendo 6 animais cada um, de acordo com o período de eutanásia: 7, 15 e 30 dias. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados e a calvaria foi removida para realização das análises. Os dados histomorfométricos foram submetidos a análise por ANOVA Two-Way, complementado com pós-teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%. A análise histomorfométrica demonstrou potencial de neoformação óssea semelhante para os biomateriais em todos os períodos de tempo avaliados, mas sem diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ). Na análise imunoistoquímica, aos 7 dias: o grupo CO foi o único a apresentar marcação para RUNX2 (fator de transcrição run-related), de forma discreta; a proteína PECAM (molécula de adesão celular endotelial plaquetária) marcou de forma discreta somente para CO e BO; OPN (osteopontina) marcou de forma discreta para CO e BO, e moderada para OG. Aos 15 dias: a proteína PECAM marcou de forma moderada para o CO, discreta para BO e de discreta a moderada para o grupo OG; OPN marcou apresentou marcação discreta nos 3 grupos; por fim, aos 30 dias, OCN (osteocalcina) apresentou marcação somente para BO e OG, de forma moderada; uma vez que a TRAP (fosfatase ácida resistente em tartarato) marcou de forma discreta no grupo OG e BO. Portanto, o Osteoglass® demonstrou comportamento osteocondutor no reparo ósseo de defeitos críticos.

**Palavras – chave:** Substitutos ósseos. Materiais biocompatíveis. Modelos animais.

Marques NC. Assessment of the biological properties of Osteoglass®: in vivo study [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

## **ABSTRACT**

Given the challenges of reconstructing extensive bone defects, the use of bone grafting or biomaterials is recommended, requiring the study of synthetic materials that enable the viability of regenerative and reparative processes, in order to understand their mechanism in the bone repair process. This study aimed to evaluate the biological effects of a national bioglass (Osteoglass-OrthoTrauma®) in the repair of critical bone defects, created in the calvaria of rats, through histological, histomorphometric and immunohistochemical analysis. To this end, 54 adult male rats of the species *Rattus norvegicus*, albinus variation, Wistar, aged 3 to 4 months, were used, divided into 3 groups: OG (Osteoglass-OrthoTrauma® group), BO (Bio-Oss® group) and CO (clot group). Critical bone defects, measuring 8mm in internal diameter, were created and subsequently filled with clot or biomaterials. The groups were subdivided into 3 groups containing 6 animals each, according to the euthanasia period: 7, 15 and 30 days. After the experimental periods, the animals were euthanized and the calvaria was removed for analysis. Histomorphometric data were analyzed using Two-Way ANOVA, complemented with Tukey's post-test. The significance level was 5%. The histomorphometric analysis demonstrated similar bone neoformation potential for the biomaterials in all time periods evaluated, but without a statistically significant difference ( $p>0.05$ ). In the immunohistochemical analysis, at 7 days: the CO group was the only one to show discrete labeling for RUNX2 (run-related transcription factor); the protein PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule) marked discreetly only for CO and BO; OPN (osteopontin) marked mildly for CO and BO, and moderately for OG. At 15 days: PECAM protein was moderately marked for CO, mild for BO and mild to moderate for the OG group; OPN marked showed discrete marking in the 3 groups; finally, at 30 days, OCN (osteocalcin) showed moderate staining only for BO and OG; since TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) was slightly marked in the OG and BO groups. Therefore, Osteoglass® has demonstrated osteoconductive behavior in the bone repair of critical defects

**Keywords:** Bone substitutes. Biocompatible materials. Models, animals.

## Lista de Figuras

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Apresentação clínica do Osteoglass®.....                                 | 27 |
| Figura 2 – Marcação longitudinal do centro da calvária .....                        | 29 |
| Figura 3 – Procedimento cirúrgico experimental .....                                | 30 |
| Figura 4 – Espécimes histológicos .....                                             | 31 |
| Figura 5 – Corte representativo do defeito ósseo crítico .....                      | 33 |
| Figura 6 – Corte representativo dos blocos de parafina .....                        | 33 |
| Figura 7 – Fotomicrografia da reconstrução panorâmica de<br>corte histológico ..... | 34 |
| Figura 8 – Corte histológico no software ImageJ.....                                | 35 |
| Figura 9 – Reconstrução panorâmica das fotomicrografias dos<br>grupos.....          | 37 |
| Figura 10 - Cortes histológicos dos grupos no aumento de 40X.....                   | 40 |
| Figura 11 – Imunomarcação da proteína Runx2 .....                                   | 45 |
| Figura 12 - Imunomarcação da proteína OPN.....                                      | 46 |
| Figura 13 – Imunomarcação da proteína PECAM .....                                   | 47 |
| Figura 14 – Imunomarcação da proteína OCN.....                                      | 48 |
| Figura 15 - Imunomarcação da proteína TRAP .....                                    | 48 |

## **Lista de Tabelas e Quadros**

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Distribuição amostral segundo grupo e período de eutanásia..... | 22 |
| Tabela 1 – Escores de imunomarcção do grupo Osteoglass® .....              | 33 |
| Tabela 2 – Escores de imunomarcção do grupo Bio-oss® .....                 | 33 |
| Tabela 3 – Escores de imunomarcção do grupo Coágulo.....                   | 34 |

## **Lista de Gráficos**

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1 – Análise de osso neoformado.....              | 58 |
| Gráfico 2 – Análise de partículas residuais.....         | 58 |
| Gráfico 3 – Análise de contagem de células.....          | 60 |
| Gráfico 4 – Análise de contagem de vasos sanguíneos..... | 60 |

## Lista de abreviaturas

*ad libitum* – expressão em latim que significa “à vontade”

BO – grupo bio-oss®

BV – biovidro

Ca – cálcio

CaO – óxido de cálcio

CEUA – comissão de ética no uso de animais

CO – grupo coágulo

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

H/E – hematoxilina e Eosina

HTR – material polimérico microporoso

MGP – proteína Gla da matriz

Na – sódio

Na<sub>2</sub>O – óxido de sódio

OCN – osteocalcina

OG – grupo osteoglass®

OPN – osteopontina

P – fósforo

PECAM – molécula de adesão celular endotelial plaquetária

P205 – pentóxido de fósforo

RPM – rotações por minuto

RUNX2 – fator de transcrição 2 relacionado a runt

Si – silício

SiO<sub>2</sub> – dióxido de silício

TRAP – fosfatase ácida resistente ao tartarato

## SUMÁRIO

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                      | 17 |
| 2 PROPOSIÇÃO.....                                       | 19 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA.....                            | 20 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO .....                               | 26 |
| 4.1 Material .....                                      | 26 |
| 4.2 Biomateriais .....                                  | 27 |
| 4.2.1 Osteoglass® .....                                 | 27 |
| 4.2.2 Bio-Oss® .....                                    | 27 |
| 4.3 Procedimento Cirúrgico .....                        | 28 |
| 4.4 Manipulação das Amostras .....                      | 30 |
| 4.4.1 Processamento histológico e imunoistoquímico..... | 31 |
| 4.4.1.1 Análise histológica e histométrica .....        | 34 |
| 4.4.1.2 Análise imunoistoquímica .....                  | 35 |
| 4.5 Análise Estatística .....                           | 36 |
| 5 RESULTADO .....                                       | 37 |
| 5.1 Análise Histológica.....                            | 37 |
| 5.1.1 Grupo Osteoglass® .....                           | 37 |
| 5.1.2 Grupo Bio-Oss® .....                              | 38 |
| 5.1.3 Grupo Coágulo .....                               | 39 |
| 5.2 Análise Histométrica .....                          | 41 |
| 5.2.1 Osso neoformado e partículas residuais .....      | 41 |
| 5.2.2 Contagem de células e vasos .....                 | 42 |
| 5.3 Análise Imunoistoquímica .....                      | 43 |
| 6 DISCUSSÃO .....                                       | 49 |
| 7 CONCLUSÃO .....                                       | 53 |
| REFERÊNCIAS .....                                       | 54 |
| ANEXO .....                                             | 59 |

## 1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista a necessidade de estratégias terapêuticas para auxiliar o tratamento de defeitos ósseos, isso foi possível com o advento da engenharia de tecidos, que permite a substituição e reconstrução tecidual. Assim, são adotadas abordagens condutivas, que consiste no uso de biomateriais afim de facilitar o crescimento ou regeneração tecidual, além de abordagens indutoras, que consiste na ativação celular através de sinais biológicos, próximas da região de defeito<sup>1</sup>. Dessa maneira, a fim de auxiliar no reparo de grandes defeitos, uma variedade de enxertos ósseos e materiais sintéticos têm sido empregada, como por exemplo: enxertos ósseos autógenos, homógenos, heterógenos, e também, substitutos ósseos sintéticos<sup>2</sup>.

Para reabilitar defeitos ósseos, o material ideal deveria possuir propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutivas; estimular angiogênese; não causar reação de corpo estranho; ser reabsorvido ao longo do tempo de modo que seja substituído por osso neoformado; estabilidade mecânica adequada; livre de complicações, além de disponibilidade, fácil manuseio e baixo custo<sup>3</sup>.

O substituto ósseo heterógeno atualmente mais utilizado clinicamente para reabilitar defeitos ósseos é o Bio-Oss®, obtido da parte mineral do osso bovino. Esse material possui características estruturais e morfológicas que favorece a angiogênese e migração de células osteogênicas, além de ser biocompatível e possui propriedade osteocondutora<sup>2</sup>.

Uma alternativa de material para a reparação óssea, é o uso de substitutos ósseos sintéticos (ou chamados de aloplásticos). Em geral, os materiais sintéticos absorvíveis para reparação óssea são os materiais de escolha, visto que estes funcionam como uma matriz tanto para o aumento de volume/reconstrução do tecido ósseo quanto para a manutenção do espaço, e gradualmente são substituídos por osso neoformado<sup>4</sup>.

Nesse sentido, o biovidro (BV) é um dos diversos biomateriais desenvolvidos com intuito de ser um arcabouço mineralizado para proliferação de células progenitoras ósseas, composto por hidroxiapatita carbonada, possui composição quimicamente e estruturalmente equivalente ao tecido ósseo<sup>5</sup>. O BV é um material bioativo à base de sílica sintética, com capacidade de formar ligações duráveis com os tecidos vivos por meio da formação de uma camada de apatita semelhante ao osso

biologicamente ativo em sua superfície, apresentando um dos maiores índices de bioatividade, sendo capaz de estimular o crescimento ósseo<sup>6,7</sup>.

Assim, os biovidros se apresentam como alternativa devido a sua composição química inorgânica osteoindutora e capacidade osteocondutivas<sup>4</sup>. No entanto, a introdução de novos biomateriais no mercado deve ser precedida por pesquisas bem delineadas e, preferencialmente, em modelo animal a fim de determinar sua previsibilidade e segurança.

## **7 CONCLUSÃO**

A partir desses resultados, foi possível concluir que o Osteoglass® possui propriedades osteocondutora, osteoindutoras e uma boa permeabilidade vascular durante o reparo de defeitos ósseos, além de apresentar adequada reabsorção ao longo do tempo, tornando-se uma opção terapêutica para tratamento de defeitos ósseos.

## REFERÊNCIAS\*

1. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ.* 2001; 65(5): 456–62.
  2. André SB, Tavares PMH, Silva MP da, Jesus LK de, Hadad H, Bizelli VF et al. Microscopic analysis of the repair of critical bone defects in rabbits calvaria after the use of particulated autogenous bone or particulate autogenous bone associated with inorganic biomaterial. *Res Soc Dev.* 2022; 11(5): e55211526709.
  3. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury.* 2011; 42(Suppl. 2): S77-S81.
  4. Saska S, Mendes LS, Gaspar AMM, de Oliveira Capote TS. Bone substitute materials in implant dentistry. *In: Turkeyilmaz I. Current concepts in dental implantology. [S.l.]: InTech; 2015. p. 25-57.*
  5. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002; 295(5557): 1014-7.
  6. Hench LL. The story of Bioglass®. *In: Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2006. p. 967–78.
  7. Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials.* 2010; 3(7): 3867–910.
  8. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *In: Annals of the New York Academy of Sciences.* Blackwell Publishing Inc.; 2006. p. 385–96.
  9. Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001; 10(SUPPL. 2): S86-S95.
  10. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008; 61(5): 577-87.
  11. Legeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates list of abbreviations used BMP bone morphogenetic protein ECM extracellular matrix MSC mesenchymal stem cell. Vol. 395, *Clin Orthop Relat Res.* 2002; 2 (395): 81-98.
  12. Amler MH, York N. Exodontia the time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969; 27(3): 309-18.
  13. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. Vol. 59, *Clinical Biochemistry.* Elsevier Inc.; 2018. p. 17–24.
  14. Mckee MD, Nanci A. Osteopontin: An Interfacial Extracellular Matrix Protein in Mineralized Tissues. Vol. 3. 1995.
-

15. Bonucci E. Bone mineralization. Vol. 17, *Frontiers in Bioscience*. 2012; 17(1): 100-28.
16. Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Okamoto R et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 2010; 46(4): 1021–9.
17. Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Rev Rep*. 2012; 8(3): 891-7.
18. Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(9): 1659-63.
19. Fabris ALDS, Faverani LP, Gomes-Ferreira PHS, Polo TOB, Santiago-Júnior JF, Okamoto R. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects: study on rat calvaria. *J Appl Oral Sci*. 2018; 15; 26: e20160531.
20. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis*. 2008; 14(5): 457–64.
21. Nasr HF, Elizabeth Aichelmann-Reidy M, Yukna RA. *Periodontol 2000*. Bone and bone substitutes. 1999; 19: 74–86.
22. Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000; 21(23): 2347-59.
23. Borden M, Westerlund LE, Lovric V, Walsh W. Controlling the bone regeneration properties of bioactive glass: Effect of particle shape and size. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2022; 1;110(4): 910–22.
24. Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, Capra P, Calamelli C, Shehu A, Giannini S. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res*. 2013; 25 Suppl 1:S101-3.
25. Precheur HV. Bone graft materials. *Dent Clin North Am*. 2007; 51(3): 729-46.
26. Grossi-Oliveira G, Faverani LP, Mendes BC, Braga Polo TO, Batista Mendes GC, de Lima VN, Ribeiro Júnior PD, Okamoto R, Magro-Filho O. Comparative evaluation of bone repair with four different bone substitutes in critical size defects. *Int J Biomater*. 2020; 23; 2020: 5182845.
27. Titsinides S, Agrogiannis G, Karatzas T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Jpn Dent Sci Rev*. 2019; 55(1): 26-32.
28. Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine bone mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res*. 2003; 14(6): 775-83.
29. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A. *et al*. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 9, 18 (2014).
30. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014; 14(1): 15-56.

31. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011; 42 Suppl 2: S16-21.
32. Açıl Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. *J Biomed Mater Res*. 2000; 15; 51(4): 703-10.
33. Hoon-Sang, Jong-Keon Oh. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res*. 2019; 23: 9.
34. Bone Graft Materials. *International Journal of Novel Research in Healthcare and Nursing*. Vol. 3, Issue 1, pp: 99-103. 2016.
35. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; 36 Suppl 3 :S20-7.
36. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater*. 1991; 2(3): 187-208.
37. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011 ;32(11): 2757-74.
38. Jones JR, Lin S, Yue S, Lee PD, Hanna JV, Smith ME, Newport RJ. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010; 224(12): 1373-87.
39. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res*. 2001; 55(2): 151-7.
40. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 276(2): 461-5.
41. 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; 67(4): 321-9.
42. Sawant K, Pawar A. Bioactive glass in dentistry: A systematic review. *S J Oral Sci*. 2020; 7(1): 3.
43. 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; 16(2): 199-207.
44. Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, Tomsia AP. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011; 7(6): 2355-73.
45. National Research Council. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. Washington, DC: The National Academies Press.
46. du Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020; 1;18(7).

47. Baino F, Novajra G, Miguez-Pacheco V, Boccaccini AR, Vitale-Brovarone C. Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system. Vol. 432, *Journal of Non-Crystalline Solids*. Elsevier; 2016. p. 15–30.
48. Kim D, Hong H, Lin J, Nevins M. Evaluation of the bone-regenerating effects of two anorganic bovine bone grafts in a critical-sized alveolar ridge defect model. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2017; 37(4): e234–44.
49. Owen-Woods C, Kusumbe A. Fundamentals of bone vasculature: Specialization, interactions and functions. *Semin Cell Dev Biol*. 2022; 123: 36–47.
50. Bizelli VF, Ramos EU, Veras ASC, Teixeira GR, Faverani LP, Bassi APF. Calvaria critical size defects regeneration using collagen membranes to assess the osteopromotive principle: An animal study. *Membranes (Basel)*. 2022; 1;12(5).
51. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat*. 2015; 16; 3(3): 95–104.
52. Souza EQM, Costa Klaus AE, Espósito Santos BF, Carvalho da Costa M, Ervolino E, Coelho de Lima D et al. Evaluations of hydroxyapatite and bioactive glass in the repair of critical size bone defects in rat calvaria. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2020; 1;10(4): 422–9.
53. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014; 25(8): 879–93.
54. Furlaneto FAC, Nagata MJH, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messori MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: A histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(3): 311–8.
55. De Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH, Tadjoeidin E. Ette S. Tadjoeidin High concentrations of bioactive glass material (BioGranA) vs. autogenous bone for sinus floor elevation Histomorphometrical observations on three split mouth clinical cases. *Clin Oral Impl Res*. 2002; 13: 428–36.
56. Nagata MJH, Furlaneto FAC, Moretti AJ, Bouquot JE, Ahn CW, Messori MR, et al. Bone healing in critical-size defects treated with new bioactive glass/calcium sulfate: A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 95 B(2): 269–75.
57. Bi L, Jung S, Day D, Neidig K, Dusevich V, Eick D et al. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2012; 100 A(12): 3267–75.
58. Bassi AP, Carvalho PS. Repair of bone cavities in dog's mandible filled with inorganic bovine bone and bioactive glass associated with platelet rich plasma. *Braz Dent J*. 2011; 22(1): 14–20.

59. Cancian DC, Hochuli-Vieira E, Marcantonio RA, Garcia Júnior IR. Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in *Cebus apella* monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19(1): 73-9.
60. 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. *International Journal of Artificial Organs*. 2016; 1;39(10): 524–33.
61. Menezes JD, Pereira RDS, Bonardi JP, Griza GL, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Bioactive glass added to autogenous bone graft in maxillary sinus augmentation: a prospective histomorphometric, immunohistochemical, and bone graft resorption assessment. *J Appl Oral Sci*. 2018; 11;26: e20170296.