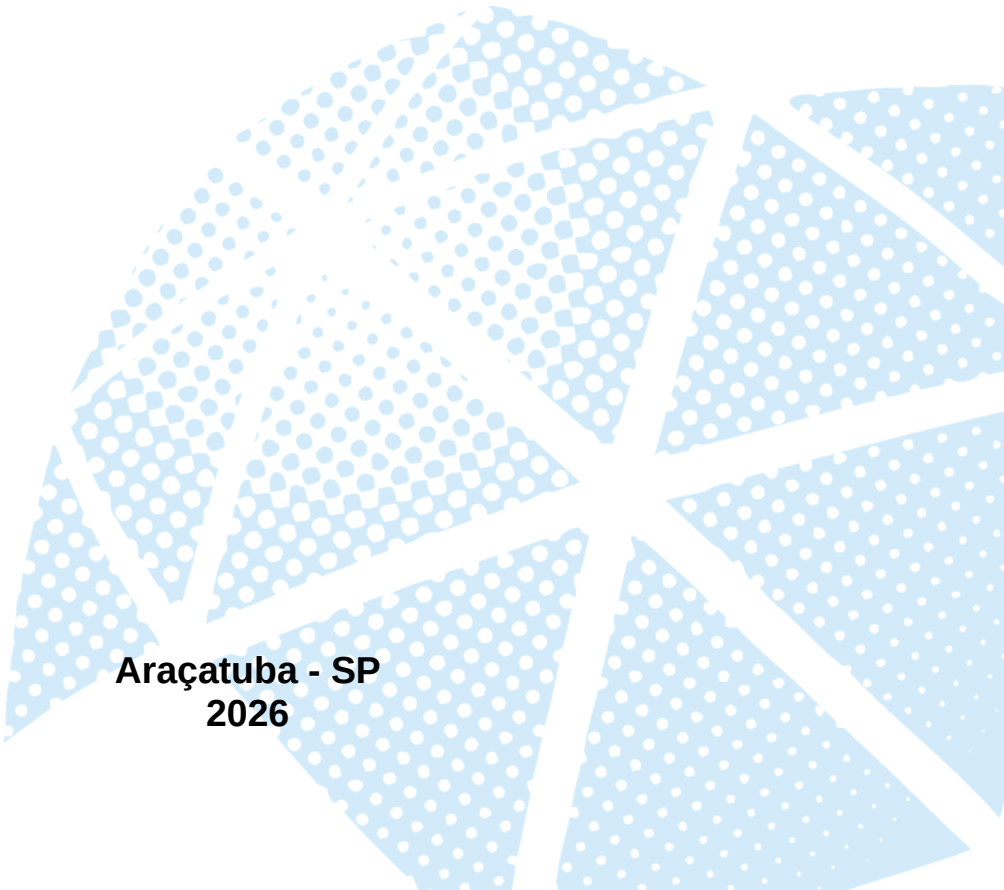
RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 3/09/2028

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba - Faculdade de Odontologia

JAQUELINE SILVA DOS SANTOS

FUNCIONALIZAÇÃO DE IMPLANTES PRODUZIDOS POR MANUFATURA ADITIVA COM VITAMINA K2:
reparo ósseo peri-implantar em modelo pré-clínico de deficiência de estrogênio



Araçatuba - SP
2026

JAQUELINE SILVA DOS SANTOS

FUNCIONALIZAÇÃO DE IMPLANTES PRODUZIDOS POR MANUFATURA ADITIVA COM VITAMINA K2:
reparo ósseo peri-implantar em modelo pré-clínico de deficiência de estrogênio

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Doutora.
Área de Concentração: Biomateriais

Orientadora: Prof. Dra. Aimée Maria Guiotti
Coorientadores: Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri e Prof. Dr. Victor Eduardo de Souza Batista

Araçatuba - SP
2026

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Santos, Jaqueline Silva dos.
S237f Funcionalização de implantes produzidos por manufatura aditiva com vitamina K2 : reparo ósseo peri-implantar em modelo pré-clínico de deficiência de estrogênio / Jaqueline Silva dos Santos. – Araçatuba, 2026
45 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti
Coorientador: Prof. Fellippo Ramos Verri
Coorientador: Prof. Victor Eduardo de Souza Batista

1. Implantes dentários 2. Osseointegração 3. Estrogênios 4. Vitamina K 2 I. T.

Black D15
CDD 617.695

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

À minha família, base de tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor, por serem meu alicerce e por me apoiarem em todas as minhas escolhas.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FOA-UNESP), por proporcionar, ao longo da minha trajetória acadêmica, um ambiente de excelência para formação, crescimento profissional e desenvolvimento científico.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa do Prof. Ass. Rogério de Castilho Jacinto, pela condução do Programa e pelo constante incentivo à pesquisa.

À Profa. Dra. Roberta Okamoto, por me permitir trilhar o caminho da pesquisa desde a minha iniciação científica. Obrigada pela oportunidade em poder desenvolver com a senhora a minha formação acadêmica e pessoal ao longo destes 10 anos, professora!

À Profa. Dra. Aimée Maria Guiotti, minha orientadora, pela confiança, orientação e por ser sempre tão solícita.

Ao Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri, meu coorientador, por me acolher no Programa de Pós-Graduação em Ciências, e por instituir uma parceria com a Profa. Dra. Roberta Okamoto, o que viabilizou a minha continuidade em seu grupo de pesquisa. Obrigada por toda a orientação e paciência.

Ao Prof. Dr. Victor Eduardo de Souza Batista, meu coorientador, pelas contribuições científicas, disponibilidade e apoio durante o desenvolvimento deste estudo.

À Profa. Dra. Débora de Barros Barbosa, por aceitar, novamente, o convite em participar da minha banca avaliadora. Sua engenhosidade, com certeza, irá contribuir para o refinamento deste trabalho.

À Profa. Dra. Bruna de Oliveira Reis, pela amizade e por me receber com tanto carinho quando cheguei em Araçatuba. Sua tamanha generosidade e acolhimento fazem parte da minha história até a pós-graduação

À Profa. Dra. Christine Men Martins Batista, pela amizade e por ter compartilhado parte do dia a dia comigo.

Aos colegas do Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados (LSMT), coordenado pela Profa. Dra. Roberta Okamoto, pela convivência, parceria, troca de experiências e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À McMaster University, na pessoa da Profa. Dra. Kathryn Grandfield, pela parceria científica estabelecida com a Profa. Dra. Roberta Okamoto, essencial para o desenvolvimento dos implantes utilizados nesta pesquisa.

À Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru, na pessoa do Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho, pela colaboração científica e supervisão dos procedimentos de funcionalização dos discos de titânio pela técnica de *layer by layer* (LbL).

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, campus de São José dos Campos, na pessoa da Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, pela colaboração científica e disponibilização da infraestrutura laboratorial para a realização dos experimentos de cultura celular.

À empresa Kappa Bioscience, pelo fornecimento da biomolécula de Vitamina K2 para a execução deste trabalho.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2021/13026-4, pelo Auxílio à Pesquisa, em nome da Professora Titular Dra. Roberta Okamoto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Auxílio Universal, Processo nº 404998/2023-2, em nome da minha orientadora, Professora Titular Dra. Roberta Okamoto, que apoiou financeiramente este estudo.

Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia MUBIO da FOA-UNESP e à FINEP (FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP:01.22.0385.00 – PROINFRA 0233/22) e à Natália Yoshie Ikegam por todo auxílio técnico.

“Não me assente o senhor por beócio. Uma coisa é pôr ideias arranjadas, outra é lidar com país de pessoas, de carne e sangue, de mil-e-tantas misérias”

João Guimarães Rosa, 1956

RESUMO

SANTOS, J. S. **Funcionalização de implantes produzidos por manufatura aditiva com Vitamina K2:** reparo ósseo peri-implantar em modelo pré-clínico de deficiência de estrogênio. 2026. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2026.

A deficiência de estrogênio compromete o metabolismo e a microarquitetura óssea, podendo prejudicar o reparo peri-implantar e a osseointegração. O presente estudo avaliou a resposta do tecido ósseo peri-implantar a implantes de titânio produzidos por manufatura aditiva, sólido ou com câmara oca de osseointegração, funcionalizados com Vitamina K2, em modelo experimental de deficiência estrogênica. A pesquisa compreendeu etapas *in vitro* e *in vivo*. Na etapa *in vitro*, células osteoblásticas obtidas da medula óssea femoral de ratas (n = 9) foram cultivadas para avaliação da viabilidade celular, conteúdo de proteína total, atividade de fosfatase alcalina, formação de nódulos de mineralização e morfologia celular. Na etapa *in vivo*, foram utilizadas 64 ratas Wistar, distribuídas em oito grupos experimentais (n = 8 por grupo), de acordo com a combinação de três fatores: condição sistêmica, controle (SHAM) ou ovariectomizada (OVX); tipo de implante, sólido (SO) ou com câmara oca de osseointegração (CO); e tratamento de superfície, convencional (CONV) ou funcionalizado com Vitamina K2 (VK2). Dessa forma, foram constituídos os grupos SHAM SO CONV, SHAM SO VK2, SHAM CO CONV, SHAM CO VK2, OVX SO CONV, OVX SO VK2, OVX CO CONV e OVX CO VK2. Os implantes foram instalados nas tíbias, com avaliações aos 14 e 28 dias pós-operatórios, por meio de torque reverso, PCR em tempo real e microtomografia computadorizada. A análise molecular contemplou fosfatase alcalina, osteocalcina, fator de crescimento do endotélio vascular, osteoprotegerina e ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B. A avaliação microtomográfica compreendeu percentual de volume ósseo, número, espessura e separação trabecular, além da superfície de intersecção. Na etapa *in vitro*, a Vitamina K2 promoveu maior atividade metabólica celular aos 7 dias, sem aumento correspondente da diferenciação osteoblástica ou mineralização. Na etapa *in vivo*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no torque reverso aos 14 dias. A análise molecular evidenciou alterações na relação entre osteoprotegerina e seu ligante nos animais

ovariectomizados, enquanto os implantes com câmara oca funcionalizados com vitamina K2 apresentaram alterações na expressão de fosfatase alcalina e fator de crescimento do endotélio vascular. A microtomografia demonstrou maiores valores de volume ósseo e número de trabéculas aos 28 dias nos animais controle com implantes sólidos convencionais, enquanto os animais ovariectomizados com implantes de câmara oca funcionalizados apresentaram maiores valores absolutos de espessura e número trabecular aos 14 dias em comparação aos 28 dias. Concluiu-se que a deficiência de estrogênio modificou a resposta molecular e a microarquitetura óssea peri-implantar, enquanto a funcionalização com Vitamina K2 esteve associada a alterações celulares e moleculares nas fases iniciais do reparo, sem demonstrar superioridade na mineralização ou estabilidade biomecânica dos implantes.

Palavras-chave: implantes dentários; osseointegração; estrogênios; vitamina K 2.

ABSTRACT

SANTOS, J. S. **Functionalization of additively manufactured implants with Vitamin K2:** peri-implant bone healing in a preclinical model of estrogen deficiency. 2026. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2026.

Estrogen deficiency compromises bone metabolism and microarchitecture, potentially impairing peri-implant bone healing and osseointegration. The present study evaluated the peri-implant bone tissue response to additively manufactured titanium implants, either solid or featuring a hollow osseointegration chamber, functionalized with Vitamin K2, in an experimental model of estrogen deficiency. The research comprised in vitro and in vivo phases. In the in vitro phase, osteoblastic cells obtained from the femoral bone marrow of rats (n = 9) were cultured to assess cell viability, total protein content, alkaline phosphatase activity, mineralized nodule formation, and cell morphology. In the in vivo phase, 64 female Wistar rats were allocated into eight experimental groups (n = 8 per group), according to the combination of three factors: systemic condition, sham-operated control (SHAM) or ovariectomized (OVX); implant design, solid (SO) or with a hollow osseointegration chamber (CO); and surface treatment, conventional (CONV) or functionalized with Vitamin K2 (VK2). Accordingly, the following groups were established: SHAM SO CONV, SHAM SO VK2, SHAM CO CONV, SHAM CO VK2, OVX SO CONV, OVX SO VK2, OVX CO CONV, and OVX CO VK2. The implants were placed in the tibiae, with evaluations performed at 14 and 28 postoperative days using reverse torque testing, real-time polymerase chain reaction, and microcomputed tomography. Molecular analysis included alkaline phosphatase, osteocalcin, vascular endothelial growth factor, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. Microtomographic evaluation included bone volume fraction, trabecular number, thickness, and separation, as well as intersection surface. In the in vitro phase, Vitamin K2 promoted greater cellular metabolic activity at 7 days, without a corresponding increase in osteoblastic differentiation or mineralization. In the in vivo phase, no statistically significant differences in reverse torque were observed at 14 days. Molecular analysis revealed alterations in the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand ratio in ovariectomized animals, whereas implants with hollow osseointegration chambers functionalized with Vitamin K2

exhibited changes in alkaline phosphatase and vascular endothelial growth factor expression. Microcomputed tomography demonstrated higher bone volume fraction and trabecular number at 28 days in control animals receiving conventional solid implants, whereas ovariectomized animals receiving functionalized hollow-chamber implants exhibited higher absolute values of trabecular thickness and number at 14 days compared with 28 days. It was concluded that estrogen deficiency altered the molecular response and peri-implant bone microarchitecture, whereas Vitamin K2 functionalization was associated with cellular and molecular changes during the early stages of bone healing, without demonstrating superior mineralization or biomechanical implant stability.

Keywords: osseointegration; dental implants; estrogens; vitamin K 2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Implante com câmara oca de osseointegração 21
Figura 2 – Viabilidade celular 27
Figura 3 – Conteúdo de proteína total 27
Figura 4 – Fosfatase alcalina 28
Figura 5 – Quantificação de cálcio 28
Figura 6 – Nódulos de mineralização 29
Figura 7 – Micrografias obtidas por MEV 29
Figura 8 – Torque reverso 30
Figura 9 – PCR para superfície convencional 30
Figura 10 – PCR para superfície funcionalizada com VK2 31
Figura 11 – Microtomografia computadorizada 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase Alcalina
BV/TV	Volume ósseo
FE-MEV	Field Emission Microscopia Eletrônica de Varredura
i.S	Superfície de intersecção
LbL	Layer by Layer
MK-7	Menaquinona
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomizadas
RANK-L	Receptor Nuclear Kappa B ligante
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação de trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 MATERIAL E MÉTODOS 16
2.1 Validação da superfície 16
2.1.1 Preparo dos discos de titânio 16
2.1.2 Funcionalização da superfície dos discos de titânio com a biomolécula de Vitamina K2 16
2.1.3 Obtenção, cultura e condições de crescimento celular 17
2.1.4 Análise da viabilidade celular – MTT 18
2.1.5 Quantificação de proteínas pelo método de Lowry 18
2.1.6 Análise da atividade de fosfatase alcalina 18
2.1.7 Análise da formação de nódulos de mineralização 19
2.1.8 Análise morfológica da adesão celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 20
2.1.9 Análise estatística 20
2.2 Etapa *in vivo* 20
2.2.1 Obtenção dos implantes 20
2.2.2 Funcionalização da superfície dos implantes 21
2.2.3 Animais 22
2.2.3.1 Cirurgia de ovariectomia 22
2.2.3.2 Cirurgia de instalação de implantes 23
2.2.3.3 Divisão de grupos 24
2.3 Análises 24
2.3.1 Análise do torque reverso 24
2.3.2 PCR em tempo real 24
2.3.3 Microtomografia computadorizada 25
2.3.4 Estatística 26
3 RESULTADOS 27
3.1 Etapa *in vitro* 27
3.2 Etapa *in vivo* 30
4 DISCUSSÃO 33
5 CONCLUSÃO 38
REFERÊNCIAS 39

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença metabólica caracterizada pela redução da massa óssea e pela deterioração da microarquitetura óssea, decorrente do desequilíbrio entre a formação e a reabsorção do tecido ósseo, resultando em maior suscetibilidade a fraturas[1]. Sua elevada prevalência, especialmente entre mulheres na pós-menopausa, reflete a relevância clínica e epidemiológica desta alteração sistêmica[2]. Dentre as diferentes formas, a osteoporose pós-menopáusica é a mais frequente, sendo a deficiência de estrogênio o principal fator desencadeante da perda óssea e da deterioração da qualidade do tecido ósseo[3].

Nesse contexto, o comprometimento da qualidade óssea decorrente da deficiência estrogênica representa um desafio para a previsibilidade do reparo peri-implantar, reforçando a necessidade de estratégias capazes de favorecer a resposta do tecido ósseo frente a condições sistêmicas desfavoráveis. Assim, diferentes abordagens voltadas à modificação das propriedades físico-químicas e estruturais dos implantes têm sido investigadas com o objetivo de otimizar a osseointegração[4-6]. Entre essas estratégias, a manufatura aditiva permite a produção de diferentes arquiteturas tridimensionais e a incorporação de características estruturais que podem favorecer a interação entre o implante e o tecido ósseo[4,6].

A produção tridimensional de implantes pode oferecer a personalização de geometrias complexas, como a porosidade e rugosidade superficial, que por sua vez, podem influenciar a performance biológica do reparo peri-implantar e, consequentemente, a osseointegração[4,6]. A alteração topográfica estrutural de um implante dentário fornece um efeito bioativo para manutenção do coágulo sanguíneo e aos receptores do processo de mineralização, reorganizando a formação das fases iniciais matriz mineral óssea[4,6,7].

Para a fabricação de implantes com câmara oca de osseointegração, a tesselação de Voronoi tem se mostrado eficaz frente a criação de *scaffolds* biomiméticos de tecido ósseo[8-10]. O desenvolvimento de novas topografias poderia mimetizar condições sistêmicas que afetam o metabolismo ósseo e que afetam diretamente sua macroarquitetura, o que forneceria uma melhor compreensão de como essas mudanças afetariam os estágios iniciais da osseointegração, bem como

a elucidação das viabilidades de associação de técnicas, como a de substâncias químicas pró-osteogênicas em *drug delivery* na superfície de implantar[6,7,9].

A Vitamina K2, especialmente na forma de menaquinona-7 (MK-7), é relatada na literatura como agente modulador do metabolismo ósseo devido à sua biodisponibilidade e maior meia-vida plasmática em comparação com outras isoformas[11,12]. Seu principal mecanismo de ação envolve a ativação de proteínas dependentes de Vitamina K por meio da γ-carboxilação, especialmente da osteocalcina, proteína sintetizada pelos osteoblastos cuja forma carboxilada apresenta afinidade pela hidroxiapatita, favorecendo a incorporação de cálcio à matriz óssea e a adequada mineralização do tecido ósseo[11,13]. Além disso, a Vitamina K2 estimula a produção de matriz óssea e a síntese de colágeno, reduz a remodelação óssea exacerbada e preserva a resistência mecânica do tecido ósseo, efeitos que se mostram particularmente relevantes em condições de deficiência estrogênica, nas quais o aumento da reabsorção óssea compromete a arquitetura e a qualidade trabecular[11,12].

Desta forma, a incorporação de Vitamina K2 em implantes produzidos por manufatura aditiva representa uma estratégia benéfica para potencializar a regeneração óssea em condições sistêmicas desfavoráveis, como a osteoporose induzida pela deficiência de estrógeno. Considerando os efeitos da Vitamina K2 sobre a mineralização da matriz óssea, a síntese de matriz extracelular e a modulação da remodelação óssea[11-13], sua liberação diretamente no sítio peri-implantar pode favorecer a osseointegração e aprimorar a estabilidade biológica e mecânica dos implantes.

Isso posto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento do tecido ósseo peri-implantar em resposta a implantes produzidos por manufatura aditiva e funcionalizados com Vitamina K2, em modelo pré-clínico de deficiência estrogênica, por meio das análises de torque reverso, análise molecular (PCR em tempo real) e microtomografia computadorizada.

5 CONCLUSÃO

Com relação ao modelo de deficiência estrogênica e à utilização de implantes sólidos ou com câmara oca de osseointegração funcionalizados com Vitamina K2, a ovariectomia promoveu alterações na resposta molecular e na microarquitetura óssea peri-implantar, corroborando a aplicabilidade do modelo experimental para avaliar o reparo ósseo sob comprometimento sistêmico. A funcionalização com Vitamina K2 esteve associada a respostas celulares e moleculares mais evidentes nas fases iniciais do reparo, particularmente nos implantes com câmara oca de osseointegração, embora não tenham sido observados efeitos superiores sobre diferenciação e mineralização *in vitro* ou sobre o torque reverso.

REFERÊNCIAS

1. Wang LT, Chen LR, Chen KH. Hormone-related and drug-induced osteoporosis: a cellular and molecular overview. Int J Mol Sci. 2023 Mar;24(6):5814. doi: 10.3390/ijms24065814.

2. Zhang Z, Li Y, Li J, Yuan Y, Liu K, Shi X. The effect of vitamin K2 supplementation on bone turnover biochemical markers in postmenopausal osteoporosis patients: a systematic review and meta-analysis. Front Endocrinol. 2025 Nov;16:1703116. doi: 10.3389/fendo.2025.1703116.

3. Yao Y, Cai X, Chen Y, Zhang M, Zheng C. Estrogen deficiency-mediated osteoimmunity in postmenopausal osteoporosis. Med Res Rev. 2025 Mar;45(2):561-75. doi: 10.1002/med.22081.

4. Khorsandi D, Fahimipour A, Abasian P, Saber SS, Seyedi M, Ghanavati S, Ahmad A, De Stephanis AA, Taghavinezhaddilami F, Leonova A, Mohammadinejad R, Shabani M, Mazzolai B, Mattoli V, Tay FR, Makvandi P. 3D and 4D printing in dentistry and maxillofacial surgery: printing techniques, materials, and applications. Acta Biomater. 2021 Mar;122:26-49. doi: 10.1016/j.actbio.2020.12.044.

5. Pandey C, Rokaya D, Bhattarai BP. Contemporary concepts in osseointegration of dental implants: a review. Biomed Res Int. 2022 Jun;2022:6170452. doi: 10.1155/2022/6170452.

6. Sun XD, Liu TT, Wang QQ, Zhang J, Cao MS. Surface modification and functionalities for titanium dental implants. ACS Biomater Sci Eng. 2023 Aug;9(8):4442-61. doi: 10.1021/acsbiomaterials.3c00183.

7. Bose S, Banerjee D, Shivaram A, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Calcium phosphate coated 3D printed porous titanium with nanoscale surface modification for orthopedic and dental applications. Mater Des. 2018 Aug;151:102-12. doi: 10.1016/j.matdes.2018.04.049.

8. Fantini M, Curto M. Interactive design and manufacturing of a Voronoi-based biomimetic bone scaffold for morphological characterization. Int J Interact Des Manuf Ijidem. 2018;12(2):585-96. doi: 10.1007/s12008-017-0416-x.

9. Deering J, Dowling KI, DiCecco LA, McLean GD, Yu B, Grandfield K. Selective Voronoi tessellation as a method to design anisotropic and biomimetic implants. J Mech Behav Biomed Mater. 2021 Apr;116:104361. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104361.

10. Bregoli C, Mohajerani S, Fiocchi J, Mehrpouya M, Elahinia M, Tuissi A, Vergani LM, Biffi CA. Impact of surface finishing on Ti6Al4V voronoi additively manufactured structures: morphology, dimensional deviation, and mechanical behavior. *Materials*. 2024;17(19):4879. doi: 10.3390/ma17194879.

11. Chiang HJ, Hsu SY, Leu S. Comparable protective effects of low- and high-dose MK-7 on bone structure and remodeling in a rat model of osteoporosis induced by estrogen deficiency and glucocorticoid exposure. Nutrients. 2026 May;18(10):1605. doi: 10.3390/nu18101605.

12. Jecan A, Tomoaia G, Gherman LM, Rus V, Pop RM, Popa C, Melinte RM, Jecan-Toader D, Apostu D, Simionescu L, Blănaru V, Oltean-Dan D. Effects of Menaquinone-7 on bone turnover markers, femoral mechanical resistance, and histology in young ovariectomized rats. Nutrients. 2026 May;18(10):1510. doi: 10.3390/nu18101510.

13. Ma ML, Ma ZJ, He YL, Sun H, Yang B, Ruan BJ, Zhan WD, Li SX, Dong H, Wang YX. Efficacy of vitamin K2 in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Front Public Health. 2022 Aug;10:979649. doi: 10.3389/fpubh.2022.979649.

14. 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.

15. Binkley DM, Deering J, Yuan H, Gourrier A, Grandfield K. Ellipsoidal mesoscale mineralization pattern in human cortical bone revealed in 3D by plasma focused ion beam serial sectioning. J Struct Biol. 2020 Nov;212(2):107615. doi: 10.1016/j.jsb.2020.107615.

16. Iwamoto D, Masaki C, Shibata Y, Watanabe C, Nodai T, Munemasa T, Mukaibo T, Kondo Y, Hosokawa R. Microstructural and mechanical recovery of bone in ovariectomized rats: The effects of menaquinone-7. J Mech Behav Biomed Mater. 2021 Aug;120:104571. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104571.

17. Silva ACE, Batista FRS, Hassumi JS, Pitol Palin L, Monteiro NG, Frigério PB, Okamoto R. Improvement of peri-implant repair in estrogen-deficient rats fed a cafeteria diet and treated with risedronate sodium. Biology. 2022 Apr;11(4):578. doi: 10.3390/biology11040578.

18. Pitol-Palin L, Frigério PB, Moura J, Pilatti L, Oliveira LMJ, Matsubara EY, Tunchel S, Shibli JA, Blay A, Saska S, Okamoto R. Performance of polydioxanone-based membrane in association with 3D-printed bioceramic scaffolds in bone regeneration. Polymers. 2022 Dec;15(1):31. doi: 10.3390/polym15010031.

19. Mulinari-Santos G, Santos JS, Kitagawa IL, Batista FRS, Botacin PR, Antoniali C, Lisboa-Filho PN, Okamoto R. Estrogen deficiency impairs osseointegration in hypertensive rats even treated with alendronate coated on the implant surface. J Funct Biomater. 2023 Sep;14(9):471. doi: 10.3390/jfb14090471.

20. Santos JSD, Mulinari-Santos G, DE Souza Batista FR, Gomes-Ferreira PHS, Palin LP, Antoniali C, Okamoto R. Analysis of peri-implant bone tissue between hydrophilic and rough implant surfaces in spontaneously hypertensive rats treated with losartan. J Appl Oral Sci. 2024 Jun;32:e20230374. doi: 10.1590/1678-7757-2023-0374.

21. Inoue BKN, Paludetto LV, Monteiro NG, Batista FRS, Kitagawa IL, Silva RS, Antoniali C, Lisboa Filho PN, Okamoto R. Synergic action of systemic risedronate and local rutherpy in peri-implantar repair of ovariectomized rats: biomechanical and molecular analysis. Int J Mol Sci. 2023 Nov;24(22):16153. doi: 10.3390/ijms242216153.

22. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.

23. Mandatori D, Pelusi L, Schiavone V, Pipino C, Di Pietro N, Pandolfi A. The dual role of vitamin K2 in "Bone-Vascular Crosstalk": opposite effects on bone loss and vascular calcification. Nutrients. 2021 Apr;13(4):1222. doi: 10.3390/nu13041222.

24. Villa JKD, Mishima MDV, Brum MF, Pizziolo VR, Diaz-Muñoz G, Martino HSD, Diaz MAN. Effect of vitamin K and calcium in bone loss in ovariectomized rats. An

Acad Bras Cienc. 2026 Jan;97(suppl 4):e20250214. doi: 10.1590/0001-3765202520250214.

25. Merra G, Dominici F, Gualtieri P, Capacci A, Cenname G, Esposito E, Dri M, Di Renzo L, Marchetti M. Role of vitamin K2 in bone-vascular crosstalk. Int J Vitam Nutr Res. 2024 Apr;94(2):143-52. doi: 10.1024/0300-9831/a000761.