

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 25/02/2027.



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

MARÍLIA NANNI VIEIRA

**HIDROGEL COMO SISTEMA *DRUG DELIVERY* DE RANELATO DE
ESTRÔNCIO E RALOXIFENO, IMPRESSO EM 3D, PARA REPARO
ÓSSEO EM RATAS OVARIECTOMIZADAS: estudo *in vitro* e *in vivo*.**

MARÍLIA NANNI VIEIRA

**HIDROGEL COMO SISTEMA *DRUG DELIVERY* DE RANELATO DE ESTRÔNCIO E
RALOXIFENO, IMPRESSO EM 3D, PARA REPARO ÓSSEO EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS:
estudo *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 CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

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

Orientadora: Profa. Titular Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

São José dos Campos

2025

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. 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).

Vieira, Marília Nanni

Hidrogel como sistema drug delivery de ranelato de estrôncio e raloxifeno, impresso em 3D, para reparo ósseo em ratas ovariectomizadas: estudo in vitro e in vivo. / Marília Nanni Vieira. - São José dos Campos : [s.n.], 2025.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2025.

Orientador: Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Drug Delivery. 2. Ovariectomia. 3. Impressão em 3D. 4. Regeneração óssea. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de, orient. II. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. IV. Universidade Estadual Paulista (UNESP). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Visando atender as demandas de novos tratamentos para a osteoporose, o desenvolvimento, a caracterização e testes biológicos *in vitro* e *in vivo* de um novo biomaterial, com ação local, objetiva preencher as lacunas existentes nos tratamentos convencionais, a fim de otimizar o reparo ósseo. Material esse, produzido a base de hidrogel de alginato foi incorporado com partículas de vidro bioativo funcionalizado com medicamentos, já utilizados para o tratamento sistêmico da osteoporose, impresso em 3D e poderá contribuir com novas perspectivas de tratamento local para a osteoporose. Dessa forma, este biomaterial visa diminuir os efeitos colaterais da medicação sistêmica, a fim de melhorar a qualidade de vida desse perfil de pacientes. Espera-se também que esta pesquisa contribua para novos trabalhos relacionados com o tema.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Aiming to meet the demands for new treatments for osteoporosis, the development, characterization, and *in vitro* and *in vivo* biological testing of a new biomaterial with local action objectives fill the gaps in conventional treatments, to optimize bone repair. This material, produced based on alginate hydrogel, was incorporated with bioactive glass particles functionalized with medications already used for the systemic treatment of osteoporosis. When 3D-printed, it may contribute to new perspectives for local osteoporosis treatment. Thus, this biomaterial aims to reduce the side effects of systemic medication to improve the quality of life of this patient profile. It is also expected that this research will contribute to new studies related to the topic.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Camilla Magnoni Moretto Nunes

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Elis Andrade de Lima Zutin

Universidade de Mogi das Cruzes

Instituto Central da Saúde

Campus Mogi das Cruzes

São José dos Campos, 25 de fevereiro de 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista primeiramente a Deus. Nos momentos mais difíceis, nas vitórias mais gratificantes e no dia a dia Ele se faz presente em tudo.

Dedico também a Nossa Senhora Mãe de Deus e a Santa Terezinha do Menino Jesus que através de tamanha ternura, guiam meus passos em direção ao caminho certo.

Aos meus pais Adriana e Miguel, não tenho palavras que resumam o quanto dedico essa vitória, e o quanto sou grata por todo o apoio, todo amor, paciência na convivência e em momentos que me ausentei de reuniões familiares enquanto estava me dedicando a esse sonho que estou prestes a realizar. Vocês são a minha vida, meu porto seguro, minha inspiração.

Ao meu irmão, que está iniciando sua vida acadêmica, dedico essa conquista a você.

Dedico essa vitória a mim, ao meu esforço, aos passos que venho dado ao longo desses 10 anos desde que entrei no ICT UNESP. Durante as noites mal dormidas ou não dormidas, sempre tive a certeza de que tudo isso valeria a pena.

Aos meus avôs Acyr e Paulo que não estão mais presentes de corpo, mas sim em meu coração; e as minhas avós Elzira e Maria com as quais tenho a sorte de aprender tanto, dedico a vocês.

Dedico aos meus primos e amigos, é muito bom compartilhar os momentos difíceis, os de glória, e caminhar junto de vocês.

Por último, mas não menos importante, essa dedicatória vai para os cientistas e professores que vieram, aos atuais, e aos que virão.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos sinceros e carinhosos à minha orientadora Luana Marotta Reis de Vasconcellos, que acompanha e guia a minha carreira acadêmica há quase dez anos, desde a graduação em odontologia. Obrigada não apenas por todos os conhecimentos técnicos, mas também aos relacionados à vida. Além disso, sou grata pela paciência, por todo o amparo, palavras de incentivo, por ser um exemplo a ser seguido. Me sinto privilegiada em poder contar com uma orientadora tão completa.

Agradeço aos meus colegas de trabalho integrantes atuais do nosso grupo de pesquisa e também aos que seguiram outros caminhos. Um agradecimento especial a Letícia e Juliani. Obrigada a todos pela parceria, pelos conhecimentos divididos, pelo apoio do dia a dia.

Um muito obrigada aos amigos que fiz no mestrado: Thaís, Adriane, Letícia, Victória, Yan, Michele, Gieyse, Natália, Bruna e Mateus que dividiram comigo tantos momentos de contextos variados ao longo desses dois anos. Com vocês tudo se tornou mais leve.

Obrigada professora Marianne por tantas oportunidades de aprendizado no estágio docência, disciplina de didática e nos projetos sob sua responsabilidade que pude participar de diversas formas.

Agradeço as professoras da estomatologia, Estela, Janete e Mônica das quais tive a felicidade de me aproximar e aprender tanto ao longo desses dois anos.

Agradeço também a todos os técnicos, e demais funcionários que contribuem para o funcionamento do ICT UNESP e que estiveram presentes direta ou indiretamente nesse trabalho.

Finalmente agradeço ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT UNESP), ao curso de mestrado de Ciências Aplicadas a Saúde Bucal (CASB), ao Ministério da educação (MEC) do Brasil, pelo financiamento e regulamentação do curso e às bolsas concedidas pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo número 2023/08439-3.

" Já faz um tempo que não escuto o medo. Vi ele impedir a morte poucas vezes,
mas a vida, o tempo todo."

Fernando Machado

RESUMO

Vieira MN. Hidrogel como sistema *drug delivery* de ranelato de estrôncio e raloxifeno, impresso em 3d, para reparo ósseo em ratas ovariectomizadas: estudo *in vitro* e *in vivo*. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

Este estudo investigou a influência de novos sistemas *drug delivery* utilizando hidrogéis incorporados com partículas de biovidro funcionalizadas com medicamentos na regeneração de defeitos ósseos críticos em fêmures de ratas ovariectomizadas. Os fármacos utilizados para funcionalizar as partículas do biovidro foram o raloxifeno e o ranelato de estrôncio. Inicialmente foi realizada a síntese e caracterização do biovidro, seguida da sua funcionalização com os fármacos, por meio da rota sonoquímica. Sequencialmente foi realizada a produção dos hidrogéis incorporados com biovidro funcionalizado, por meio da técnica de impressão 3D; e a seguir foi realizada sua caracterização. Para o teste *in vitro* de viabilidade celular inicialmente oito ratas *Wistar* foram divididas em 2 grupos: SHAM- submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia bilateral, OVX- submetidas à ovariectomia bilateral. Após 8 semanas as ratas foram eutanasiadas para o isolamento das células mesenquimais a partir da medula óssea dos fêmures, as quais foram diferenciadas em osteoblastos. Posteriormente, foi realizado o plaqueamento celular para a realização do teste de viabilidade nos diferentes hidrogéis. Finalmente, foi realizado o experimento *in vivo*, em que as ratas *Wistar* novamente foram divididas a partir das cirurgias SHAM e OVX realizadas e a seguir distribuídas para cada subgrupo. Após 8 semanas das cirurgias, todos os animais foram submetidos à confecção do defeito ósseo crítico na epífise distal dos fêmures direitos, os quais foram preenchidos com as amostras de hidrogéis 3D com tamanho de 3x3mm dos grupos: hidrogel puro, hidrogel incorporado com partículas de biovidro e hidrogel incorporado com partículas de biovidro funcionalizadas com os fármacos raloxifeno ou ranelato de estrôncio. No grupo controle os defeitos foram preenchidos apenas com coágulo. A eutanásia dos animais foi realizada 4 semanas após o procedimento cirúrgico e os fêmures foram coletados para a realização das análises de microtomografia computadorizada, além das avaliações histológica, histomorfométrica e imunoistoquímica, para avaliar a qualidade e a quantidade de tecido ósseo neoformado na área do defeito, bem como a presença de marcadores TRAP, osteocalcina e osteoprotegerina e Rank-L. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade e teste estatístico apropriado (paramétrico anova dois fatores e não paramétrico *Kruskal Wallis*), com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a técnica foi eficiente para produzir os diferentes hidrogéis, que não foram citotóxicos ($p>0,05$) e que foi possível preencher os defeitos com os materiais confeccionados. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os grupos na neoformação óssea e os marcadores para remodelação óssea das reações de imunoistoquímica estiveram presentes em todos os grupos analisados. Apesar dos resultados promissores, novos estudos precisam ser realizados para comprovar a eficácia do hidrogel.

Palavras-chave: *drug delivery*, ovariectomia, impressão em 3D, regeneração óssea.

ABSTRACT

Hydrogel as a drug delivery system of strontium ranelate and raloxifene, 3d printed, for bone repair in ovariectomized rat: in vitro and in vivo study. dissertation. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2025.

This study investigated the influence of drug delivery systems using hydrogels incorporated with bioactive glass particles functionalized with drugs on the regeneration of critical bone defects in the femurs of ovariectomized rats. The medications used to functionalize the bioactive glass particles were raloxifene and strontium ranelate. Initially, the synthesis and characterization of the bioactive glass were performed, followed by its functionalization with the drugs using the sonochemical route. Subsequently, hydrogels incorporated with the functionalized bioactive glass were produced using 3D printing techniques, and their characterization was conducted. For the in vitro cell viability test, eight Wistar rats were initially divided into two groups: SHAM—undergoing a sham surgery of bilateral ovariectomy, and OVX—undergoing bilateral ovariectomy. After 8 weeks, the rats were euthanized for the isolation of mesenchymal cells from the bone marrow of their femurs, which were then differentiated into osteoblasts. Cell plating was then performed to assess viability in the different hydrogels. Finally, an in vivo experiment was conducted in which young Wistar rats were again divided based on the SHAM and OVX surgeries and subsequently distributed into subgroups. Nine weeks after the surgeries, all animals underwent the creation of a critical bone defect in the distal epiphysis of the right femurs, which were filled with coagulum or 3D hydrogel samples measuring 3x3 mm from the following groups: pure hydrogel, hydrogel incorporated with bioactive glass particles, and hydrogel incorporated with bioactive glass particles functionalized with raloxifene or strontium ranelate. Euthanasia was performed four weeks after the surgical procedure, and the femurs were collected for micro-computed tomography analyses to evaluate the morphometry of the bone formed in the critical defect area, as well as histological, histomorphometric, and immunohistochemical evaluations to assess the quality and quantity of newly formed bone tissue in the defect area. Additionally, the presence of TRAP, osteocalcin, osteoprotegerin, and Rank-L markers was analyzed. Quantitative data were subjected to the Kolmogorov-Smirnov normality test to select the appropriate statistical test (two-way ANOVA for parametric data and Kruskal-Wallis for non-parametric data), with a significance level of 5%. The results showed that the technique was efficient in producing the different hydrogels, the hydrogels were not cytotoxic, and the defects could be filled with the manufactured hydrogels. No statistically significant difference was found in bone neoformation across the tested groups, and markers for bone remodeling from the immunohistochemical reactions were present in all analyzed groups. Despite the promising results, further studies are needed to confirm the material's efficacy.

Keywords: drug delivery; ovariectomy; 3D printing; bone regeneration

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Osteoporose.....	17
2.2 Raloxifeno e Ranelato de estrôncio.....	18
2.3 <i>Drug delivery</i> e impressão 3D.....	19
3 PROPOSIÇÃO.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Síntese e caracterização do hidrogel incorporado com biovidro funcionalizado com os medicamentos	22
4.1.1 Síntese do biovidro.....	22
4.1.2 Funcionalização do biovidro com o medicamento	23
4.1.3 Caracterização do biovidro antes e após funcionalização	24
4.1.4 Síntese e hidrogel	25
4.1.5 Caracterização dos hidrogéis	28
4.2 Ensaios <i>in vitro</i>	29
4.2.1 Análise da viabilidade celular	29
4.3 Experimentos <i>in vivo</i> com o modelo experimental proposto	32
4.3.1 Delineamento experimental.....	32
4.3.2 Animais.....	34
4.3.2.1 Ciclo estral.....	34
4.3.2.2 Análise das alterações nos animais	35
4.3.2.3 Cirurgias de ovariectomia e Sham	35
4.3.2.4 Cirurgias de confecção dos defeitos ósseos	36
4.3.3 Metodologia de análises.....	38
4.3.3.1 Análise da neoformação óssea por meio da microtomografia (micro- Ct).....	38
4.3.3.2 Análise histológica e histomorfométrica.....	39
4.3.3.3 Análise imunoistoquímica	42
4.4 Análise Estatística	43

5 RESULTADOS	44
5.1 Caracterização	44
5.1.1 Análise de amostras vidro bioativo 45S5 antes e após funcionalização ...	44
5.1.1.1 Difração de raios-X	44
5.1.1.2 Análise da topografia superficial das amostras por MEV	45
5.1.1.3 Espectroscopia por dispersão de energia (EDS)	46
5.1.2 Caracterização dos hidrogéis	47
5.1.2.1 Análise da topografia superficial dos hidrogéis por MEV	47
5.1.2.2 Análise de molhabilidade	49
5.1.2.3 Intumescimento e degradação.....	50
5.2 Ensaio <i>in vitro</i>	52
5.2.1 Análise da viabilidade celular	52
5.3 Ensaio <i>in vivo</i>.....	53
5.3.1 Avaliação do ciclo estral do animal.....	53
5.3.2 Análise das alterações nos animais.....	54
5.3.3 Análise da neoformação óssea por meio da microtomografia.....	56
5.3.4 Análise histológica e histomorfométrica	58
5.3.4.1 Análise histológica.....	58
5.3.4.2 Análise histomorfométrica	60
5.3.5 Análise imunoistoquímica.....	61
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose pode ser 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 (Lirani-Galvão, Lazaretti-Castro, 2010; McNamara, 2010). Dados epidemiológicos revelaram que o perfil de pacientes mais afetados são mulheres acima de 50 anos, sendo que uma em cada três experimentará uma fratura decorrente de fragilidade óssea durante sua vida, resultado da atenuada produção estrogênica após o período menopáusico (Li,Wang, 2018). Essa deficiência compromete o metabolismo ósseo, principalmente, em fases tardias de diferenciação e maturação de osteoblastos, exercendo um efeito direto nessas células (Kubota et al., 2018). Acrescenta-se ainda 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 favorecido (Manolagas, 2000).

O reparo ósseo é didaticamente dividido em três fases, são elas: inflamação, reparo propriamente dito e remodelação óssea, sendo o reparo ósseo amplamente influenciado pela fase inflamatória que terá um papel importante no processo de cura que se propagará a seguir (Maruyama et al., 2020). Em condições de normalidade, a interação do biomaterial com o sangue resulta na liberação de fatores quimiotáticos específicos que direcionaram os macrófagos para o sítio da ferida cirúrgica (Broughton et al., 2006). Através de uma série de fatores, o estrógeno inibe a formação de osteoclastos (Pacifi,1996); e após a ovariectomia, ocorre aumento de RANKL (ligante ativador de osteoclastos) (Cenci et al., 2000).

Além disso, macrófagos secretam mediadores pró-inflamatórios e quimiotáticos, que iniciarão o recrutamento de células inflamatórias e células mesenquimais (MSC) (Pajarinen et al., 2019). Já a interleucina 10 (IL-10) aumenta sua produção quando o estímulo do processo inflamatório é eliminado, iniciando a

fase de produção de mediadores anti-inflamatórios (Maruyama et al., 2020). Nesse contexto, pacientes que sofrem de osteoporose, exibem um processo de cicatrização óssea prejudicado (Rusow et al., 2018), tornando desafiador o tratamento de defeitos ósseos ou fraturas nos ossos nestes organismos comprometidos (Van Houdt et al., 2018). Assim, devido a modificação no processo normal de remodelação óssea, por vezes é necessária a implantação de biomateriais capazes de auxiliar no tratamento cirúrgico de pacientes que apresentam fraturas osteoporóticas.

A perda óssea em pacientes com osteopenia ou osteoporose reduz a qualidade de vida destes indivíduos e a administração de medicamentos estimula a formação de tecido ósseo nestas áreas de baixa densidade óssea (Costa, Reagan, 2019). A terapia farmacológica pode ser dividida em duas classes de agentes, aqueles com ação anti-reabsortiva representados pelos bifosfonatos, moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS) e denosumabe e o grupo com ação anabólica, constituído pelo paratormônio (PTH) e o ranelato de estrôncio que favorecem a neoformação óssea (Tella et al., 2014). Tanto os medicamentos anti-reabsortivos como os anabólicos podem ser utilizados como tratamentos auxiliares para estas condições sistêmicas.

As medicações classificadas como anti-reabsortivas, da classe dos bifosfonatos ainda se mantém como a primeira escolha para a terapia anti-osteoporose (Baccaro et al., 2015), entretanto há ressalvas quanto a sua utilização sistêmica, especialmente pela ocorrência das osteonecrose dos maxilares (Ruggiero et al., 2014), conduzindo por vezes a opção do tratamento com medicamentos moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS) como o raloxifeno que apresenta poucos efeitos colaterais e comprovada eficácia clínica (Rey et al., 2009). Outro medicamento correlacionado com efeitos colaterais sistêmicos é o ranelato de estrôncio, que promove alterações cardiovasculares consideráveis (Martin-Merino et al., 2018).

O raloxifeno aumenta a densidade óssea mineral pela alteração da taxa RANKL/OPG e também age diminuindo o número de osteoclastos por meio da redução da interleucina 6 (IL-6) e produção da interleucina 1 beta (IL-1 β) que regulam o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Rey et al., 2009). Na formação óssea o raloxifeno age por meio do aumento da proliferação de

osteoblastos (Taranta et al., 2002). Estudos clínicos comprovaram a eficácia do uso do medicamento raloxifeno para o tratamento de osteoporose em mulheres no período da pós-menopausa (Rey et al., 2009). Diversos estudos *in vivo* com animais também observaram resultados positivos deste medicamento (Ramalho-Ferreira et al., 2015; Ramalho-Ferreira et al., 2017; Yogui et al., 2018). Lisboa-Filho et al. (2018) estudaram o potencial da combinação do biovidro incorporado com raloxifeno a 20% por meio do método sonoquímico para reparo de defeitos críticos em calvária de ratos, concluindo que a combinação pode favorecer à formação óssea favorável. No presente estudo essa técnica já comprovadamente eficaz, foi utilizada para a funcionalização das partículas do biovidro com os medicamentos (Lisboa-Filho et al., 2018).

O ranelato de estrôncio, é uma droga de efeito duplo no turnover ósseo, que age simultaneamente sobre os osteoblastos na formação óssea e na diminuição da reabsorção pelos osteoclastos. Assim atua tanto como medicamento anabólico como modulador seletivo de receptores de estrógeno, com especificidade para os receptores presentes em osteoblastos (Almeida et al., 2016; Querido et al., 2014; Tian et al., 2014; Silva et al., 2018). Por outro lado, este medicamento tem apresentado efeitos adversos sobre a atividade cardiovascular/hemodinâmica dos pacientes quando administrado sistemicamente (Martin-Merino et al., 2018).

Grande ênfase tem sido dada ao tratamento da osteoporose utilizando agentes sistêmicos, enquanto poucas pesquisas avaliaram o efeito destes medicamentos usados localmente (Cheng et al., 2013; Van Houdt et al., 2018). Os sistemas de *drug delivery* são eficazes e permitem a liberação controlada e gradual de componentes ativos presentes em matrizes como polímeros (Calori et al., 2020) ou hidrogel (Wang et al., 2014; Olov N , 2022) ou ainda presentes em partículas funcionalizadas nestas matrizes relatado no estudo prévio do nosso grupo Lisboa-Filho et al., (2018). A proposta neste presente estudo é associar as partículas funcionalizadas com o medicamento no hidrogel. Os hidrogéis vêm se destacando porque são matrizes tri-dimensionais capazes de reter grande quantidade de água e permanecer edemaciados similarmente aos tecidos corpóreos. As ligações físicas e químicas presentes nesta matriz são fundamentais para a construção de uma rede hidrofílica, que também pode ser incorporada com agentes químicos (medicamentos) e/ou partículas como o biovidro, dando origem aos sistemas *drug*

delivery (Del Valle et al., 2017). Há diferentes técnicas de produção de hidrogel, como por exemplo a metodologia da impressão 3D, onde o hidrogel é impresso já no formato do defeito (Wang et al., 2014) ou como cimentos injetáveis (Liu et al., 2017) que são utilizados em situações de defeitos irregulares e são pouco invasivos devido a sua metodologia de aplicação (Sivashanmugam et al., 2015). O desenvolvimento de sistema *drug delivery* em hidrogéis que possam melhorar o desempenho local das células ósseas presentes na área da lesão, quando o paciente apresenta situações sistêmicas comprometidas, se faz importante visando melhorar a qualidade de vida de pacientes.

Esses sistemas *drug delivery*, como citado anteriormente, podem estar associados apenas a matrizes poliméricas ou de hidrogel ou ainda podem estar combinados com partículas ativas que tornarão o sistema mais funcional. Neste contexto, os biovidros surgem como uma opção de otimizar o hidrogel *drug delivery*, uma vez que formam na sua superfície a hidroxicarbonato apatita, um material capaz de induzir a adesão e proliferação de células osteogênicas para o local do defeito ósseo (Rizwan et al., 2017). O biovidro mais utilizado é o 45S5 devido a sua bioatividade, osteoestimulação, osteocondução entre outras propriedades importantes para a regeneração óssea (Albulescu et al., 2019; Aguilar-Reyes et al., 2012; Ioannou et al., 2015). Além disso, é capaz de induzir a liberação de íons específicos para promover uma resposta intra e extra-celular que conduziu a acelerada reparação óssea (Sharifi et al., 2016). Recentemente, a utilização do biovidro e biocerâmicas no sistema de *drug delivery* vem se tornando uma opção para estimular a neoformação óssea (Lisboa-Filho et al., 2018; Van Houdt et al., 2018) como a proposta deste estudo.

Neste estudo foi proposto o uso de hidrogel incorporado com biovidro funcionalizado com fármacos que foram aplicados localmente no tecido ósseo, visando minimizar os efeitos colaterais. A funcionalização das partículas de biovidro presentes no hidrogel visa otimizar as condições para a neoformação óssea em defeitos ósseos críticos. Foram avaliados dois medicamentos nas funcionalizações, buscando-se verificar qual dos medicamentos localmente estimula melhores respostas no reparo ósseo. Portanto, neste projeto, investigou-se a ação de biomateriais no reparo ósseo de ratas Sham e ovariectomizadas, a fim de simular alterações sofridas no período pós menopausa devido a deficiência do estrógeno.

7 CONCLUSÃO

Pôde-se concluir que a técnica foi eficiente para produzir os diferentes hidrogéis, que responderam satisfatoriamente aos testes de caracterização propostos, exibindo um adequado tamanho e formato das partículas do biovidro, arquitetura porosa do hidrogel impresso em 3D, além de exibirem capacidade hidrofílica comprovada pelos testes de molhabilidade e de intumescimento.

Com relação a segurança, nenhum dos hidrogéis avaliados foi considerado citotóxico. Apesar do parâmetro espaçamento entre as trabéculas avaliado pela microtomografia ter apresentado valores estatisticamente maiores para o grupo coágulo OVX, que pode estar relacionado com aumento da fragilidade óssea desse grupo em relação aos animais experimentais, no entanto, nos demais parâmetros e na mensuração da neoformação óssea pela histomorfometria os grupos não apresentaram diferença estatística. Os imunomarcadores relacionados com a remodelação óssea foram expressos em todos os grupos.

Apesar dos resultados promissores, o estudo sobre a liberação do material, se faz necessário para entender melhor sobre seu funcionamento, e melhorar suas propriedades almejando uma resposta positiva no reparo ósseo. O desenvolvimento de um novo biomaterial e aplicação de combinação de técnicas de engenharia tecidual é fundamental para evolução e embasamento de futuros estudos de tratamentos alternativos para osteoporose.

REFERÊNCIAS

Aguilar-Reyes EA, León-Patiño CA, Jacinto-Diaz B, Lefebvre L-P. Structural Characterization and Mechanical Evaluation of Bioactive Glass 45S5 Foams Obtained by a Powder Technology Approach. *J Am Ceram Soc.* 2012;95(12):3776–80. doi: 10.1111/j.1551-2916.2012.05465.x.

Albulescu R, Popa AC, Enciu AM, Albulescu L, Dudau M, Popescu ID, Mihai S, Codrici E, Pop S, Lupu AR, Stan GE, Manda G, Tanase C. Comprehensive In Vitro Testing of Calcium Phosphate Based Bioceramics with Orthopedic and Dentistry Applications. *Materials (Basel).* 2019 Nov 10;12(22):3704. doi: 10.3390/ma12223704.

Almeida MM, Nani EP, Teixeira LN, Peruzzo DC, Joly JC, Napimoga MH, Martinez EF. Strontium ranelate increases osteoblast activity. *Tissue Cell.* 2016 Jun;48(3):183-8. doi: 10.1016/j.tice.2016.03.009.

Athirasala A, Lins F, Tahayeri A, Hinds M, Smith AJ, Sedgley C, Ferracane J, Bertassoni LE. A Novel Strategy to Engineer Pre-Vascularized Full-Length Dental Pulp-like Tissue Constructs. *Sci Rep.* 2017 Jun 12;7(1):3323. doi: 10.1038/s41598-017-02532-3.

Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging.* 2015 Mar 20;10:583-91. doi: 10.2147/CIA.S54614.

Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, Klein-Nulend J. Strontium Ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts. *Bone* 53 (2013) 112–119.

Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., Ralph Muller, R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010;25(7):1468–1486. DOI: 10.1002/jbmr.141.

Broughton II G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(Suppl. 7):12S–34S.

Calori IR, Braga G, Jesus PCC, Bi H, Tedesco AC. Polymer scaffolds as drug delivery systems. *European Polymer Journal.* 2020;129(15):April,109621 <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109621>

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- α . *J Clin Invest.* 2000;106:1229-37.

Chang CH, Yang SJ, Young TH, Yao WC. Effect of co-loaded vitamin D3 on intravenous injectable raloxifene delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2025

Feb;246:114379. doi: 10.1016/j.colsurfb.2024.114379. Epub 2024 Nov 12. PMID: 39566355.

Cheng, N., Dai, J., Cheng, X. et al. Porous CaP/silk composite scaffolds to repair femur defects in an osteoporotic model. *J Mater Sci: Mater Med* 24, 1963–1975 (2013). doi: 10.1007/s10856-013-4945

Costa S, Reagan MR. Therapeutic Irradiation: Consequences for Bone and Bone Marrow Adipose Tissue. *Frontiers in Endocrinology*. 2019; 10: 587 doi: 10.3389/fendo.2019.00587.

Da Cruz Vegian MR, Costa BCA, Santana-Melo GF, Godoi FHC, Kaminagakura E, Tango RN, Prado RF, Oliveira LD, Federico CA, Avelino SOM*, Neves RM*, de Vasconcellos LMR. Systemic and local effects of radiotherapy: an experimental study on implants placed in rats. *Clin Oral Investig*. 2020;24(2):785–797. doi:10.1007/s00784-019-02946-5

De Araújo, Juliani Caroline Ribeiro; Sobral Silva, Leonardo Alvares ; De Barros Lima, Vinicius Almeida ; Bastos Campos, Tiago Moreira ; Lisboa Filho, Paulo Noronha ; Okamoto, Roberta ; De Vasconcellos, Luana Marotta Reis . The Local Release of Teriparatide Incorporated in 45S5 Bioglass Promotes a Beneficial Effect on Osteogenic Cells and Bone Repair in Calvarial Defects in Ovariectomized Rats. *Journal Of Functional Biomaterials* , v. 14, p. 93, 2023.

Dec P, Modrzejewski A, Pawlik A. Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 28;24(1):529. doi: 10.3390/ijms24010529. PMID: 36613972; PMCID: PMC9820083.)

Del Valle LJ, Díaz A, Puiggalí J. Hydrogels for Biomedical Applications: Cellulose Chitosan, and Protein/Peptide Derivatives. *Gels*. 2017 Jul 17;3(3):27. doi 10.3390/gels3030027.

Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol*. 2014 Nov 29;9:221. doi: 10.1186/s13000-014-0221-9. PMID: 25432701; PMCID: PMC4260254.

Formosa MM, Christou MA, Mäkitie O. Bone fragility and osteoporosis in children and young adults. *J Endocrinol Invest*. 2024 Feb;47(2):285-298. doi: 10.1007/s40618-023-02179-0. Epub 2023 Sep 5. PMID: 37668887; PMCID: PMC10859323.

Gomes-Ferreira PHS, Lisboa-Filho PN, da Silva AC, Bim-Júnior O, de Souza Batista FR, Ervolino-Silva AC, Garcia-Junior IR, Okamoto R. Sonochemical time standardization for bioactive materials used in periimplantar defects filling. *Ultrason Sonochem*. 2019 Sep;56:437-446. doi: 10.1016/j.ultsonch.2019.04.032. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31101282.

Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, Freire AR, Faverani LP, Okamoto R. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci.* 2018 Jun 18;26:e20170326. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0326.

Hakimi F, Jafari H, Hashemikia S, Shabani S, Ramazani A. Chitosan-polyethylene oxide/clay-alginate nanofiber hydrogel scaffold for bone tissue engineering: Preparation, physical characterization, and biomimetic mineralization. *Int J Biol Macromol.* 2023 Apr 1;233:123453. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123453. Epub 2023 Jan 26. PMID: 36709816.

Ho TC, Chang CC, Chan HP, Chung TW, Shu CW, Chuang KP, Duh TH, Yang MH, Tyan YC. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules.* 2022 May 2;27(9):2902. doi: 10.3390/molecules27092902. PMID: 35566251; PMCID: PMC9104731.

Ioannou AL, Kotsakis GA, Kumar T, Hinrichs JE, Romanos G. Evaluation of the bone regeneration potential of bioactive glass in implant site development surgeries: a systematic review of the literature. *Clin Oral Investig.* 2015;19(2):181–91. doi: 10.1007/s00784-014-1376-1. PMID: 25471690.

Johnston CB, Dagar M. Osteoporosis in Older Adults. *Med Clin North Am.* 2020 Sep;104(5):873-884. doi: 10.1016/j.mcna.2020.06.004. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32773051.

Krivega ES, Kotova SL, Timashev PS, Efremov YM. Mechanical characterization of soft biomaterials: which time and spatial scale to choose? *Soft Matter.* 2024 Jul 3;20(26):5095-5104. doi: 10.1039/d4sm00530a. PMID: 38888165.

Kubota T, Hasuike A, Tsukune N, Ozawa Y, Yamamoto T, Min S, Naito Masako, Sato Shuichi. 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):206-213. doi:10.1111/eos.12415

Koblenzer et al., 2022 Koblenzer M, Weiler M, Fragoulis A, Rütten S, Pufe T, Jahr H. Physiological Mineralization during In Vitro Osteogenesis in a Biomimetic Spheroid Culture Model. *Cells.* 2022 Aug 30;11(17):2702. doi: 10.3390/cells11172702. PMID: 36078105; PMCID: PMC9454617.

LeBoff MS, Greenspan SL, Insogna KL, Lewiecki EM, Saag KG, Singer AJ, Siris ES. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2022 Oct;33(10):2049-2102. doi: 10.1007/s00198-021-05900-y. Epub 2022 Apr 28. Erratum in: *Osteoporos Int.* 2022 Oct;33(10):2243. doi: 10.1007/s00198-022-06479-8. PMID: 35478046; PMCID: PMC9546973.

Li D, Chen K, Duan L, Fu T, Li J, Mu Z, Wang S, Zou W, Chen L, Feng Y, Li Y, Zhang H, Wang H, Chen T, Ji P. Strontium Ranelate Incorporated Enzyme-CrossLinked Gelatin Nanoparticle/Silk Fibroin Aerogel for Osteogenesis in OVX-Induced Osteoporosis. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, 5, 1440–1451.

Li L, Wang Z. Ovarian Aging and Osteoporosis. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1086:199-215. doi:10.1007/978-981-13-1117-8_13

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

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;59(sup1):97-101. doi:10.1080/03008207.2018.1430143

Long J.A.; Evans H.M. The estrus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem. Univer. Calif.*, v. 6, p. 1-148, 1922.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000Apr; 21(2):115-137. doi:10.1210/edrv.21.2.0395

Martin-Merino E, Petersen I, Hawley S, Álvarez-Gutierrez A, Khalid S, LlorenteGarcia A, Delmestri A, Javaid MK, Van Staa TP, Judge A, Cooper C, PrietoAlhambra D. Risk of venous thromboembolism among users of different antiosteoporosis drugs: a population-based cohort analysis including over 200,000 participants from Spain and the UK. *Osteoporos Int.* 2018 Feb;29(2):467-478. doi: 10.1007/s00198-017-4308-5. Epub 2017 Dec 3. PubMed PMID: 29199359.

Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, Goodman SB. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Jun 11;11:386. doi: 10.3389/fendo.2020.00386. PMID: 32655495; PMCID: PMC7325942.

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;7(44):353-72. doi: 10.1098/rsif.2009.0282

Olov N, Bagheri-Khoulenjani S, Mirzadeh H. Injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering: a review. *Prog Biomater.* 2022 Jun;11(2):113-135. doi: 10.1007/s40204-022-00185-8. Epub 2022 Apr 14. PMID: 35420394; PMCID: PMC9156638.

Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, Lu L, Yao Z, Goodman SB. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials.* 2019 Mar;196:80-89. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.025. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29329642; PMCID: PMC6028312.

Palo M, Holländer J, Suominen J, Yliruusi J, Sandler N. 3D printed drug delivery devices: perspectives and technical challenges. *Expert Rev Med Devices.* 2017 Sep;14(9):685-696. doi: 10.1080/17434440.2017.1363647. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28774216.

Percie Du Sert et al., The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Br J Pharmacol.* 2020 Aug;177(16):3617-3624. doi:10.1111/bph.15193.

Querido W, Campos AP, Martins Ferreira EH, San Gil RA, Rossi AM, Farina M. Strontium ranelate changes the composition and crystal structure of the biological bone-like apatite produced in osteoblast cell cultures. *Cell Tissue Res.* 2014 Sep;357(3):793-801. doi: . Epub 2014 May 24. Erratum in: *Cell Tissue Res.* 2014 Sep;357(3):835. PubMed PMID: 24859219.

Quan H, Ren C, He Y, Wang F, Dong S, Jiang H. Application of biomaterials in treating early osteonecrosis of the femoral head: Research progress and future perspectives. *Acta Biomater.* 2023 Jul 1;164:15-73. doi: 10.1016/j.actbio.2023.04.005. Epub 2023 Apr 18. PMID: 37080444.

Ramalho-Ferreira, G., Faverani, L. P., Momesso, G., Luvizuto, E. R., de Oliveira Puttini, I., & Okamoto, R. (2017). Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clinical oral investigations*, 2016. 21(5), 1485–1494. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1909-x>

Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt.* 2015;20(3):038003. doi:10.1117/1.JBO.20.3.038003

Rey JR, Cervino EV, Rentero ML, Crespo EC, Alvaro AO, Casillas M. Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. *The Open Orthopaedics Journal.* 2009;3;14–21.

Rizwan, M., M. Hamdi, and W. Basirun, Bioglass® 45S5-Based Composites for Bone Tissue Engineering and Functional Applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2017; 105(11): 3197-3223.

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Oct;72(10):1938-56. doi: 10.1016/j.joms.2014.04.031. Epub 2014 May 5. Erratum in: *J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Sep;73(9):1879. Erratum in: *J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Jul;73(7):1440. PubMed PMID: 25234529.

Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: A review. *Dent Mater.* 2018 Jan;34(1):40-57. doi: 10.1016/j.dental.2017.09.007. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29029850

Sartori EM, Magro-Filho O, Mendonça DBS, Li X, Fu J, Mendonça G. Modulation of Micro RNA Expression and Osteoblast Differentiation by Nanotopography. 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. PMID: 30587780; PMCID: PMC6337474.

Sharifi E , Ebrahimi-Barough S , Panahi M, Azami M, Ai A, Barabadi Z, Kajbafzadeh A-M, Ai J. In vitro evaluation of human endometrial stem cell-derived osteoblast-like cells' behavior on gelatin/collagen/bioglass nanofibers' scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A*: 104A: 2210–2219, 2016. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35748>

Silva GAB, Bertassoli BM, Sousa CA, Albergaria JD, de Paula RS, Jorge EC. Effects of strontium ranelate treatment on osteoblasts cultivated onto scaffolds of trabeculae bovine bone. *J Bone Miner Metab*. 2018 Jan;36(1):73-86. doi: 10.1007/s00774-017-0822-y. Epub 2017 Mar 20.

Sivashanmugam, R. Arun Kumar, M. Vishnu Priya, Shantikumar V. Nair, R. Jayakumar. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*. Volume 72. 2015. Pages 543-565. ISSN 0014-3057. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.05.014>.

Spirandeli BR, Campos TMB, Ribas RG, Thim GP, Trichês E de S. Evaluation of colloidal and polymeric routes in sol-gel synthesis of a bioactive glass-ceramic derived from 45S5 bioglass. *Ceram Int*. 2020;46(12):20264–71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.05.108>. Sonstevold T, Johannessen A, Stühr L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. *Radiat. Oncol*. 2015;10:129.

Shen J, Ke Z, Dong S, Lv M, Yuan Y, Song L, Wu K, Xu K, Hu Y. Pharmacological Therapies for Osteoporosis: A Bayesian Network Meta-Analysis. *Med Sci Monit*. 2022 Apr 17;28:e935491. doi: 10.12659/MSM.935491. PMID: 35430576; PMCID: PMC9022483.

Shin S, Hong N, Rhee Y. A randomized controlled trial of the effect of raloxifene plus cholecalciferol versus cholecalciferol alone on bone mineral density in postmenopausal women with osteopenia. *JBMR Plus*. 2024 May 30;8(7):ziae073. doi: 10.1093/jbmrpl/ziae073. PMID: 38939828; PMCID: PMC11208723

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80209-3. PMID: 9108485.

Taranta A, Brama M, Teti A, De luca V, Scandurra R, Spera G, Agnusdei D, Termine JD; Migliaccio, S. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. *Bone*. 2002;30:368–76. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of*

steroid biochemistry and molecular biology. 2014;142:155-70.

Tian A, Zhai JJ, Peng Y, Zhang L, Teng MH, Liao J, Sun X, Liang X. Osteoblast response to titanium surfaces coated with strontium ranelate-loaded chitosan film. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Nov Dec;29(6):1446-53. doi: 10.11607/jomi.3806. PubMed PMID: 25397808.

Van Houdt CIA, Gabbai-Armelin PR, Lopez-Perez PM, 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

Vasconcellos LMR, Barbara MAM, Deco CP, Rovai ES, França MO, Ebrhaim ZF; et al.. Titanium scaffolds osteogenesis in healthy and osteoporotic rats is improved by the use of low-level laser therapy (GaAlAs). *Lasers Med Sci*. 2016 jul; 31(5):899-905.

Vasconcellos LMR, Camporês KL, de Alcântara JMA, Vieira MN, Oliveira IR. Biological and microbiological behavior of calcium aluminate cement-based blend for filling of bone defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2020 31(1):10. doi: 10.1007/s10856-019-6348-1.

Wang X, Tolba E, Schröder HC, Neufurth M, Feng Q, Diehl-Seifert B et al.. Effect of bioglass on growth and biomineralization of SaOS-2 cells in hydrogel after 3D cell bioprinting. *PLoS One*. 2014 Nov 10;9(11):e112497. doi:10.1371/journal.pone.0112497. PMID: 25383549; PMCID: PMC4226565.

Yogui FC, Momesso GAC, Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Okamoto R. A SERM increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model of osteoporosis. *Journal App Oral Science*. 2018;26:e20170329.

Yong EL, Logan S. Menopausal osteoporosis: screening, prevention and treatment. *Singapore Med J*. 2021 Apr;62(4):159-166. doi: 10.11622/smedj.2021036. PMID: 33948669; PMCID: PMC8801823.

Xiao PL, Cui AY, Hsu CJ, Peng R, Jiang N, Xu X et al. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2022 Oct;33(10):2137-2153. doi: 10.1007/s00198-022-06454-3. Epub 2022 Jun 10. PMID: 35687123.

Wu D, Sun X, Zhao Y, Liu Y, Gan Z, Zhang Z et al. Strontium Ranelate Inhibits Osteoclastogenesis through NF- κ B-Pathway-Dependent Autophagy. *Bioengineering (Basel)*. 2023 Mar 16;10(3):365. doi:0.3390/bioengineering10030365. PMID: 36978756; PMCID: PMC10045081.

Yang SY, Zhou YN, Yu XG, Fu ZY, Zhao CC, Hu Y, Lin KL, Xu YJ. A xonotlite

nanofiber bioactive 3D-printed hydrogel scaffold based on osteo-/angiogenesis and osteoimmune microenvironment remodeling accelerates vascularized bone regeneration. *J Nanobiotechnology*. 2024 Feb 12;22(1):59. doi: 10.1186/s12951-024-02323-9. PMID: 38347563; PMCID: PMC10863132.

Zhou Z, Zhou A, Jalil AT, Saleh MM, Huang C. Carbon nanoparticles-based hydrogel nanocomposite induces bone repair in vivo. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2023 Apr;46(4):577-588. doi: 10.1007/s00449-022-02843-4. Epub 2022 Dec 29. PMID: 36580135.