



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

JULIANI CAROLINE RIBEIRO DE ARAÚJO SOUTO

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

JULIANI CAROLINE RIBEIRO DE ARAÚJO SOUTO

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

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

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

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Prof. Assoc. Roberta Okamoto

São José dos Campos

2021

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

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

Souto, Juliani Caroline Ribeiro de Araújo

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

99 f. : il.

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

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Roberta Okamoto

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientador)
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos

Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira
Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
São José dos Campos

Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de Abril de 2021.

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(Mario Sergio Cortella)

SUMÁRIO

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE TABELAS

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

O objetivo geral neste estudo foi avaliar a influência do biovidro funcionalizado com o fármaco teriparatida 10% na diferenciação e atividade de células mesenquimais, bem como no reparo ósseo em defeitos críticos realizados em ratas ovariectomizadas, visando aplicação ortopédica e odontológica.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) produzir biovidro funcionalizado com o fármaco teriparatida 10% visando a regeneração tecidual;
- b) avaliar a atividade e a diferenciação celular influenciadas pelo biomaterial;
- c) quantificar e analisar o tecido ósseo neoformado no defeito crítico;
- d) avaliar a marcação imunohistoquímica para RANKL e osteocalcina;
- e) correlacionar os resultados da etapa *in vitro* com a etapa *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biomaterial

3.1.1 Produção do biovidro

Para obtenção do biovidro 45S5 foi utilizada a metodologia descrita por Spirandeli et al. (2020) que baseia-se nos processos de preparo da vidrocerâmica por sol-gel seguida de fusão/resfriamento. Esse método envolve a fusão de uma mistura dos materiais de partida, no caso do biovidro 45S5, correspondente a 45% dióxido de silício (SiO_2), 24,5% óxido de cálcio (CaO), 24,5% óxido de sódio (Na_2O) e 6,0% pentóxido de fósforo (P_2O_5) em massa (Hench, 1998). Os óxidos Na_2O e CaO empregados na síntese foram obtidos a partir de seus respectivos carbonatos. Em uma etapa prévia à fusão, os reagentes SiO_2 , carbonato de cálcio (CaCO_3) e carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram misturados e em seguida, essa mistura foi levada ao forno para descarbonatação (separação do carbonato de cálcio em óxido de cálcio e dióxido de carbono). A mistura dos óxidos obtida foi armazenada em frascos plásticos em dessecador até o momento do preparo do biovidro. O P_2O_5 foi acrescentado à mistura somente momentos antes do processo de fundição do biovidro, devido sua higroscopicidade (Spirandeli et al., 2020). A fusão do biovidro 45S5 foi realizada em forno a $1350^\circ\text{C}/15$ min, em cadinho ZAS (zircônia-alumina-silício). Posteriormente, o vidro fundido foi vertido em água. O vidro, em forma de fritas, foi recolhido, seco e posteriormente moído em almofariz mecânico por 3 horas e posteriormente foi peneirado em peneira de 200 mesh. O biovidro 45S5 foi produzido pelo Pesquisador Tiago Moreira Bastos Campos, pós-doutorando na área de Física e Química dos Materiais Aeroespaciais no Instituto Tecnológico da Aeronáutica (ITA).

Após a produção do biovidro 45S5, o material foi submetido à funcionalização pela técnica sonoquímica descrita no próximo item.

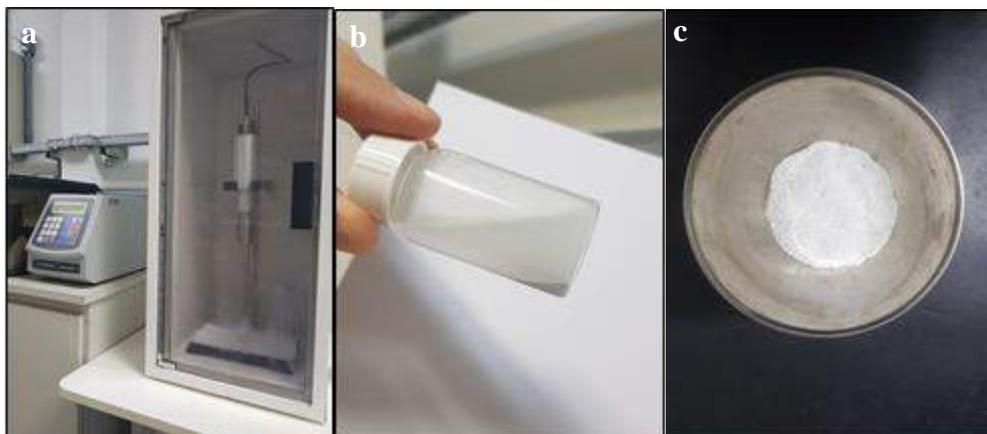
3.1.2 Redução à escala subnanométrica do PTH 1-34 e do Biovidro para a técnica sonoquímica

A mistura e a homogeneização dos materiais foram realizadas no Laboratório de Materiais Avançados do Centro para Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais Funcionais- Divisão de Saúde - CEPID/FAPESP sob a supervisão do Prof. Assoc. Paulo Noronha Lisboa Filho. As amostras de Biovidro 45S5 e de teriparatida (PTH 1-34) (*Parathyroid Hormone Fragment 1-34 human*, Lilly France S.A.S) foram tratadas pela técnica sonoquímica utilizando água Milli-Q. ultrapure como meio para obter uma umidade homogênea e para diminuir o tamanho da partícula de biovidro. A água Milli-Q. ultrapure faz com que as bolhas de cavitação tenham maior vapor *solute* e, assim acelere o efeito da cavitação acústica. A marca Fórteo® Colter Pen do PTH 1-34 (*Parathyroid Hormone Fragment 1-34 human*, Lilly France S.A.S) foi eleita, por apresentar-se na forma líquida, possibilitando a mistura de forma homogênea ao biovidro após o processamento sonoquímico das partículas.

Todas as amostras foram submetidas ao processamento ultrassônico em um modelo de marca *Sonics VCX-750*, com potência de 750W e frequência de 20kHz, com pulsos de 5 min e amplitude variável até 70% da amplitude nominal do equipamento *Sonics* (450W/cm²), na qual foi fixada (Figura 1a). As amostras do biovidro 45S5 foram divididas em partes iguais, sendo uma parte constituída por biovidro funcionalizado na ausência do fármaco, que foi denominado como grupo BG e a outra parte constituída por biovidro submetido ao processamento de funcionalização associado ao fármaco teriparatida que foi identificado como grupo BGT. Na câmara de síntese, foi utilizada a condição de ar atmosférico e o recipiente com as amostras e a ponta ultrassônica foram arrefecidos em temperatura ambiente (Figura 1b). Ambos os grupos foram subsequentemente secos em estufa a 60°C (Figura 1c).

A concentração relativa em massa foi de 55g/L, sendo utilizado 50 microlitros (µL) do hormônio PTH 1-34 e 500 miligramas (mg) de biovidro 45S5 na forma de pó com 10 mililitros (mL) de água Milli-Q, determinada nas etapas iniciais do processo.

Figura 1- Redução à escala nanométrica



Legenda: a) Ultrassônico (marca *Sonics VCX-750*); b) Amostra imediatamente após o processo de funcionalização pela rota sonoquímica; c) Aspecto final do biovidro associado com o fármaco teriparatida 10% (BGT).

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Caracterização do material

A caracterização de todos os materiais foi realizada visando observar as características das superfícies das partículas de biovidro antes e após a funcionalização.

3.2.1 Análise das partículas com Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Para analisar a topografia superficial das amostras (biovidro 45S5, BG e BGT), foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL/JSM-5310, Tóquio, Japão) com canhão de emissão de campo “*Field Emission Gun*” (FEG) (Tescan/Vega 3, Brno, República Tcheca) instalados no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE). O biovidro 45S5 também foi avaliado por ser o material base para a produção dos materiais experimentais. Para isso, as amostras foram posicionadas em uma

plataforma de alumínio (*stub*), auxiliado por uma fita dupla face de carbono (3M, Sumaré SP, Brasil) e metalizadas com uma camada fina de ouro (80 Å), que foi depositado por meio de vaporização iônica (*sputtering*) na máquina metalizadora (Emitech SC 7620, Sputter Coater, Quorum Technologies, Newhaven, Reino Unido) por 130 s com uma corrente de 10-15 miliâmpères (mA) em vácuo de 130 mTorr e à uma taxa de metalização de 3.5 nm/min. As imagens foram obtidas no MEV com detector de elétrons secundários (ES), projetados sobre a superfície da amostra. As ampliações utilizadas foram de 10.000 x, 20.000 x, 50.000 x.

3.2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* (FTIR)

A composição química da superfície das partículas foi analisada utilizando o espectrômetro de infravermelho por transformação de *Fourier* (FT-IR) (Parkin Elmer, modelo Spectrum GX) no modo UATR, instalado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE), na região do médio 500-4000 cm^{-1} , 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} utilizando o programa *Spectrum Saurch Plus*.

3.2.3 Potencial Zeta

Os valores do potencial zeta dos biovidros foram obtidos usando o equipamento de espalhamento dinâmico de luz, *Stabino Control 2.00.23*, (Particle Metrix GmbH, Meerbusch) instalado no Instituto de Pesquisa e desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Os pós dos biovidros foram dispersos em água deionizada (pH 5,0), e as medidas foram realizadas a 25°C em um ângulo de 15°. Para calcular o potencial zeta a partir dos valores de mobilidade, foi utilizada a equação de *Smoluchowski*, com valores de índice de refração, constante dielétrica e viscosidade da água a 25°C.

3.2.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Para realização da análise semi-qualitativa da composição química dos elementos químicos das amostras, foi utilizado um espectrômetro por dispersão de energia (EDS) (Bruker Nano GmbH 410, Berlin, Alemanha) associado ao *software Spirit 1.9* (Bruker, Berlin, Alemanha) no MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca) instalado no Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LAS/INPE).

3.3 Comitê de ética

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos/UNESP sob o nº10/2019/CEUA/ICT-CSJC-UNESP (Anexo A) e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho também seguiu as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (*Animal Research Reporting of In Vivo Experiments*) (Percie Du Sertid et al., 2020).

3.4 Ensaio biológico *in vitro*

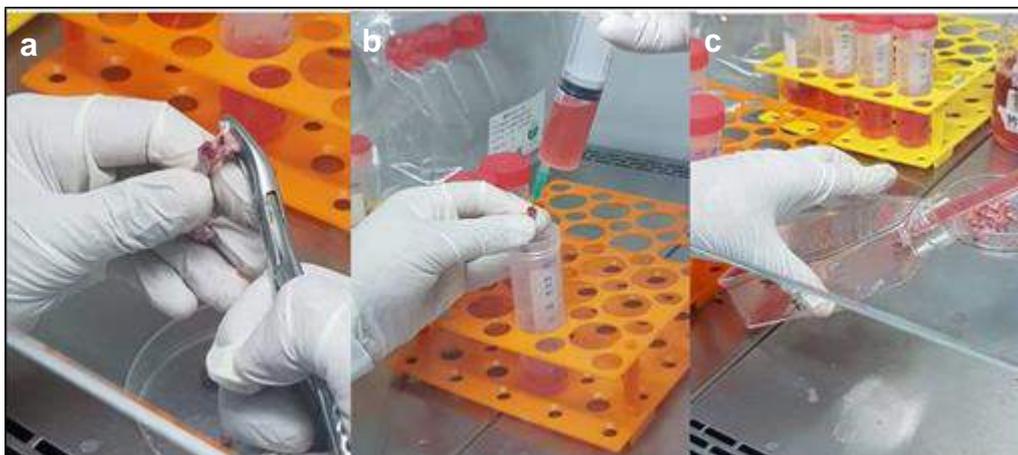
Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC) localizado no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de São José dos Campos.

Nove ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) e após 60 dias da cirurgia foram eutanasiadas com dose excessiva de anestésico utilizando uma

solução intramuscular de Anasedan / Dopalen. As células foram obtidas dos fêmures dessas ratas *Wistar* ovariectomizadas.

Após a limpeza dos fêmures, no fluxo laminar, as células da medula óssea foram isoladas e inseridas em frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm² (TPP, *Biosystems*, Curitiba, Brasil) com meio de cultura essencial mínimo alfa MEM (Gibco) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (LGC Tenchology, Campinas Brasil) e gentamicina (500 µg/mL) (Gibco) e foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) (Figura 2). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio *Carl Zeiss – Axiovert 40C*, *Germany*). Após a confluência (aproximadamente sete dias), as células foram liberadas enzimaticamente (Rosa et al., 2008) e plaqueadas na densidade de 1x10⁴ células viáveis em cada poço da microplaca de 96 poços (*Transwell, Corning/Costar*, Nova Iorque, EUA).

Figura 2- Procedimento de isolamento celular



Legenda: a) Remoção da epífase do fêmur; b) Lavagem do canal medular do fêmur com meio suplementado; e) Garrafa com meio suplementado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Previamente ao plaqueamento, foram pesados em balança de precisão semi-analítica (BEL *Engin Mark*, modelo 210A) 0,022g das amostras de biovidro

(BG) e do biovidro funcionalizado com o fármaco teriparatida 10% (BGT). Posteriormente as amostras foram esterilizadas em luz UV e colocadas no interior dos poços. Nos poços do grupo controle permaneceu o plaqueamento apenas das células. A seguir, foi acrescentado meio de cultura osteogênico na placa, contendo 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon) e 2,16g de β glicerol-fosfato (*Sigma-Aldrich*) na solução de 500 mL de meio suplementado. O volume final do meio osteogênico foi de 250 μ L por poço, o qual foi trocado a cada 48 horas.

Após estes procedimentos, todas as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e mantidas até o momento dos testes. Todos os testes foram realizados de acordo com a ISO 10993-5 e em triplicata, sendo que cada isolamento foi um *pool* de células provenientes dos fêmures dos três animais.

3.4.1 Adesão celular

Especificamente, para a avaliação da adesão celular, no plaqueamento celular as amostras foram colocadas no interior de poços contendo lamínulas (Sarstedt, USA), as quais foram posicionadas no fundo destes. Após 3 e 5 dias de cultivo, a morfologia celular foi avaliada por FE-MEV (*Field Emission Microscopia Eletrônica de Varredura*) (Zeiss - EVO MA10, São Paulo, Brasil) no laboratório de Pesquisa em Materiais Odontológicos e Prótese do ICT/Unesp .

Para tal, as amostras foram lavadas três vezes com PBS para remover as células não aderentes e, em seguida, fixadas quimicamente com glutaraldeído a 2,5 % à temperatura ambiente. A seguir as amostras, foram desidratadas por meio de uma série ascendente de etanol e o conjunto da lamínula com as amostras na sua superfície foi retirado do poço antes da análise. As amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro usando um sistema *sputter*-revestimento.

3.4.2 Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Após os períodos de 3 e 7 dias, foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)carbazol] (Sigma Aldrich) e análise espectrofotométrica do corante incorporado. O grupo controle utilizado foi o fundo da placa. Alíquotas de MTT a 0,5 mg/mL em meio suplementado osteogênico foram preparadas, em seguida as culturas de células foram incubadas com esta solução durante 4 horas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após esse período, a solução de MTT foi removida e foi adicionado em cada poço 150 µL de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) e a placa foi colocada sob agitação. Em seguida, alíquotas de 100 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para a medida colorimétrica no espectrofotômetro com comprimento de onda 570 nm (Micronal AJX 1900). Os dados foram aferidos como porcentagem a partir do grupo controle.

3.4.3 Conteúdo de Proteína Total

O conteúdo de proteína total foi calculado em dois períodos distintos, 3 e 7 dias, a fim de avaliar se o biomaterial acelera ou não a produção de proteínas celulares. Esta mensuração foi realizada de acordo com o método modificado de Lowry (1951). Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados com PBS e preenchidos com 150 µL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma Aldrich) para extração das proteínas. Em seguida, foi adicionado em cada poço 100 µL de Lowry (Sigma Aldrich) e a esta mistura acrescentou-se 100 µL de Folin e Ciocalteu (Sigma Aldrich) por poço. Ao final do teste, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente a 680 nm (Micronal AJX 1900). Os dados foram aferidos como absorbância.

3.4.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleínamonofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (*Labtest* Diagnóstica), nos mesmos períodos da proteína total, utilizando os mesmos lisados. Às soluções do *kit* foram acrescentadas às alíquotas de 50 µL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C em banho-maria. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900) utilizando comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram aferidos como absorbância.

3.4.5 Formação e quantificação de cálcio nos nódulos de mineralização

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 12 dias de cultura por meio da coloração de vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Brasil), pH 4,2. Especificamente para este teste foi utilizado microplacas com a presença de uma rede Transwell (Transwell, Corning/Costar, Nova Iorque, EUA), pois a quantificação e formação da matriz mineralizada corada se confundiram com o grão do pó, que pela presença de cálcio em sua composição apresentou coloração semelhante. A quantificação de cálcio presente nos nódulos mineralizados foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Em cada um dos poços, foi adicionado ácido acético 10 % e incubados a temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Toda a solução foi transferida para microtubos de centrífuga e agitados em vórtex (Vórtex QL – 901) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA095/CF) e aquecidos por 10 minutos, a 87, 5 °C sendo posteriormente transferidos para uma caixa com gelo e levado ao freezer por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K) por 20 minutos e 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para placa de 96 poços. Em cada poço foram acrescentados 40 µL de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido. A leitura foi realizada em

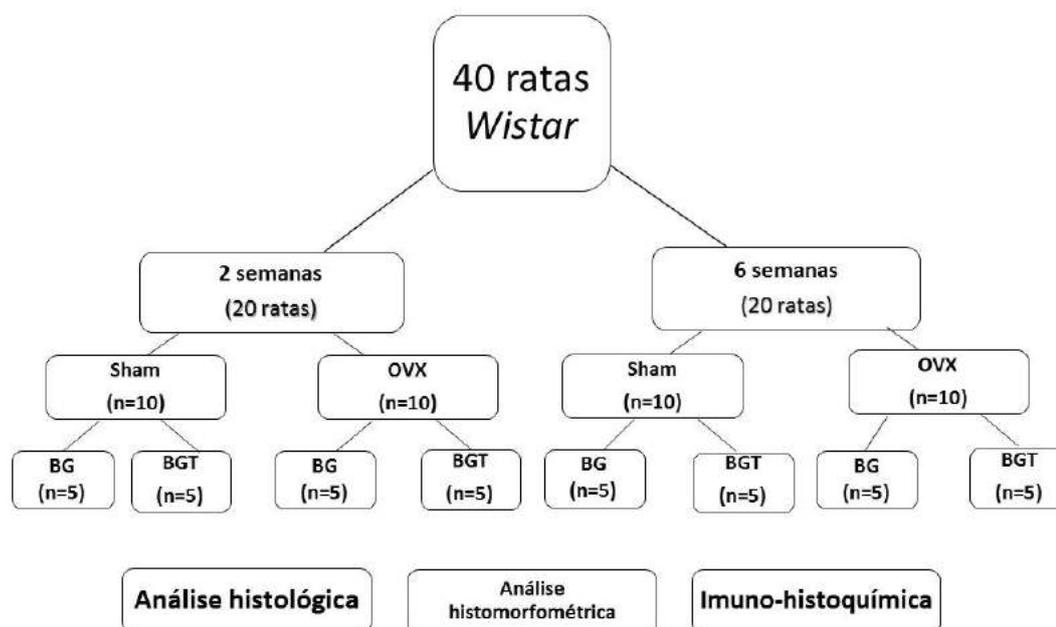
espectrofotômetro (Micronal AJX 1900), sob o comprimento de onda de 405 nm. Os dados foram aferidos como absorbância.

3.5 Ensaio biológico *in vivo*

Quarenta ratas foram submetidas à confecção de defeitos ósseos críticos na calvária. Previamente ao defeito, as ratas foram divididas em dois grupos, sendo que 20 ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) e 20 ratas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia simulada (Sham). Assim, o modelo experimental adotado no presente projeto consistiu em animais deficientes de estrógeno no grupo OVX. Em ambos os grupos, OVX e Sham, foram confeccionados dois defeitos ósseos críticos de 5,0 milímetros (mm) nas calvárias direita e esquerda. Os defeitos do lado esquerdo foram preenchidos aleatoriamente com material experimental (biovidro funcionalizado- BG ou biovidro funcionalizado com teriparatida 10%- BGT), enquanto os defeitos ósseos direitos sempre foram preenchidos com coágulo. Esta distribuição visou evitar possível influência de um material sobre o outro, resultando em n= 5 para cada subgrupo.

Após 2 e 6 semanas, os animais foram eutanasiados e a área do reparo ósseo foi avaliada por meio de análise histológica, histomorfométrica e imunohistoquímica (Figura 3).

Figura 3- Fluxograma dos grupos experimentais



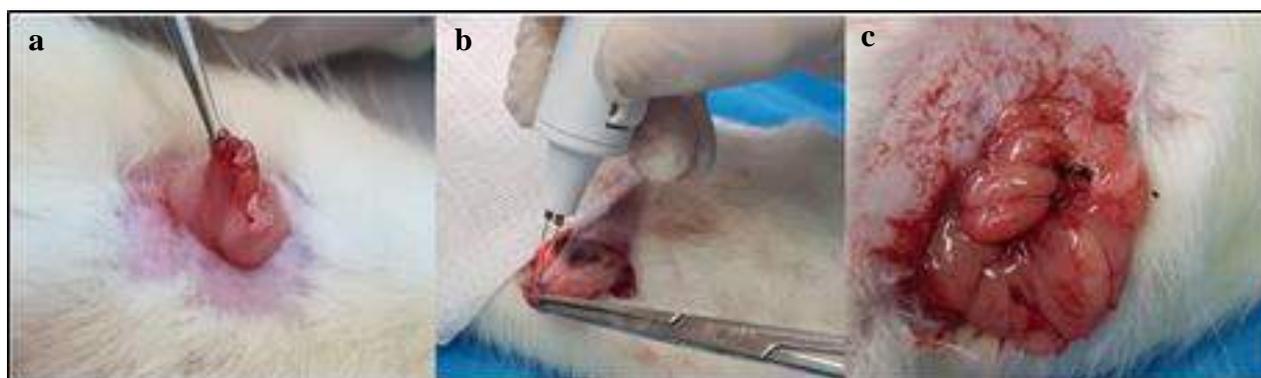
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.1 Ovariectomia bilateral

Vinte ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) e a mesma quantidade de animais foi submetida à cirurgia de ovariectomia simulada (Sham). As ratas foram anestesiadas com Cloridrato de Xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e, a seguir foram colocadas em decúbito lateral para realização de uma incisão de 1 centímetro (cm) nos flancos, foi realizada a divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Posteriormente, foram localizados os ovários e os cornos uterinos, os quais foram cauterizados utilizando o cauterizador (Cautermax- Fabinject®) (Figura 4). Posteriormente, foi realizada a sutura por planos, todos utilizando fio de seda nº 3 (Ethicon/Johnson & Johnson).

As ratas do grupo cirurgia simulada (Sham) passaram pelo mesmo procedimento, porém foi realizada apenas a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários, sem suas respectivas cauterizações. As divisões dos grupos estão descritas no Quadro 1.

Figura 4- Procedimento cirúrgico de ovariectomia



Legenda: a) Exposição do ovário; b) Cauterização do ovário; c) Ovário e corno uterino cauterizados.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 1- Divisão dos grupos

Tratamento	Tempo de Sacrício	Número de animais	Grupo
Sham+Biovidro	2 semanas	5	BGS2
Sham+Biovidro+Teriparatida 10%	2 semanas	5	BGTS2
OVX+Biovidro	2 semanas	5	BGO2
OVX+Biovidro+Teriparatida 10%	2 semanas	5	BGTO2
Coágulo-Sham	2 semanas	5	CS2
Coágulo-OVX	2 semanas	5	CO2
Sham+Biovidro	6 semanas	5	BGS6
Sham+Biovidro+Teriparatida 10%	6 semanas	5	BGTS6
OVX+Biovidro	6 semanas	5	BGO6
OVX+Biovidro+Teriparatida 10%	6 semanas	5	BGTO6
Coágulo-Sham	6 semanas	5	CS6
Coágulo-OVX	6 semanas	5	CO6

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.2 Citologia Esfoliativa

A citologia esfoliativa é definida como o estudo morfológico e morfométrico de células descamadas da mucosa, principalmente das camadas suprabasais, observadas por meio de microscópio óptico (Macluskey, 2000). Após o 14º dia da realização do procedimento cirúrgico para cauterização dos ovários, foram realizadas coletas de secreções vaginais de 5 animais de cada um dos dois grupos experimentais (Sham e OVX), escolhidos aleatoriamente. Estas coletas foram realizadas durante quatro dias consecutivos, no período da manhã (período de duração média no ciclo das fêmeas), para confirmação do estado hormonal. Neste procedimento, utilizou-se a pipeta de *Pasteur* preenchida com 10 µL de solução salina (NaCl a 0,9%), a qual teve sua ponta levemente inserida no canal vaginal dos animais. O fluido vaginal coletado foi despejado em uma lâmina de vidro utilizada para microscopia. Atentou-se para a troca da pipeta em cada animal.

O lavado vaginal foi corado por Papanicolau e as lâminas obtidas foram fotografadas com microscópio de luz *Zeiss Axioskop 40* (*Carl Zeiss* do Brasil), com câmera digital acoplada *Canon*, modelo *Power Shot A640* em aumento original de 5x, 10x, 20x e 40x. As imagens obtidas foram usadas para análise descritiva da morfologia celular.

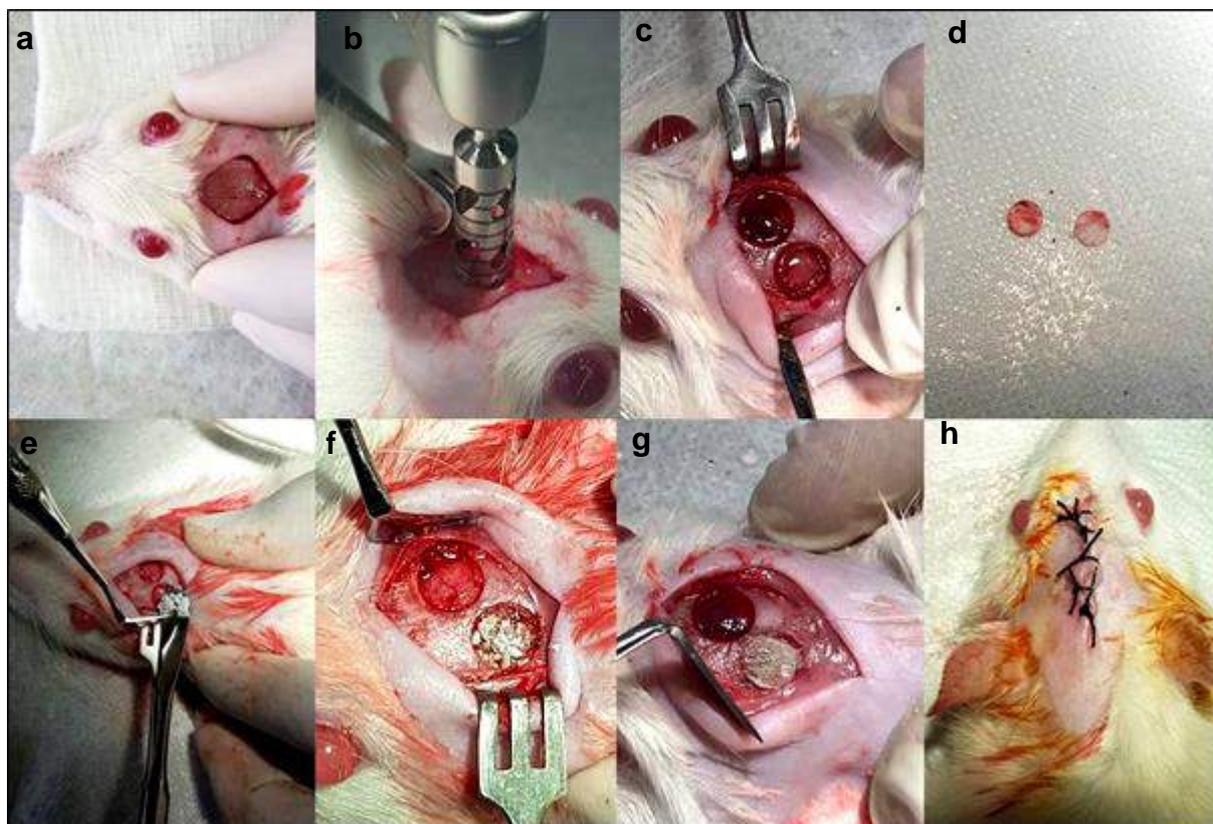
3.5.3 Confeção de defeito ósseo crítico

Após 60 dias da realização dos procedimentos de ovariectomia (OVX) e ovariectomia simulada (Sham) as ratas foram submetidas à confecção dos defeitos ósseos críticos na calvária. Os animais foram pesados e anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina 2,3 g/ 100 mL (*Anasedan®* - Vetbrands, Jacareí - Brasil) e Cloridrato de Ketamina 1,16 g/ 10 mL (*Dopalen®* – Vetbrands, Jacareí - Brasil).

Após a anestesia dos animais, os locais cirúrgicos foram submetidos à tricotomia e à anti-sepsia com solução de álcool iodado. A incisão linear de

aproximadamente 3,5 mm foi realizada com lâmina de bisturi número 15 na região correspondente à face medial da calvária (Figura 5a). Os tecidos foram divulsionados para expor as corticais da calvária, na qual foram confeccionados os defeitos de 5,0 mm no osso parietal direito e esquerdo, sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica, para evitar o aquecimento decorrente do atrito da broca com o osso. Para a obtenção do defeito crítico, foi utilizada uma broca trefina com o diâmetro de 5,0 mm (Figura 5b). Após a confecção dos defeitos ósseos (Figura 5c,d), no lado direito foi aguardada estabilização do coágulo (grupo controle). Enquanto, nos defeitos confeccionados no lado esquerdo foi realizado o preenchimento aleatório com o material experimental: a) biovidro (BG) ou b) biovidro associado com teriparatida 10% (BGT) (Figura 5e,f). Para a estabilização do material na loja cirúrgica do defeito, foi posicionada no local do defeito ósseo uma membrana biológica (GenDerm®) de maior diâmetro (Figura 5g). Em todos os defeitos, os tecidos foram reposicionados e as camadas foram suturadas com fio de seda nº 3 (Ethicon/Johnson & Johnson) (Figura 5h). Novamente foi realizada anti-sepsia com álcool iodado. Após a cirurgia, as ratas foram colocadas em gaiolas contendo 03 e 02 animais em cada mini-isolar do *rack* ventilado e monitoradas até o prazo da eutanásia.

Figura 5- Procedimento cirúrgico na calvária

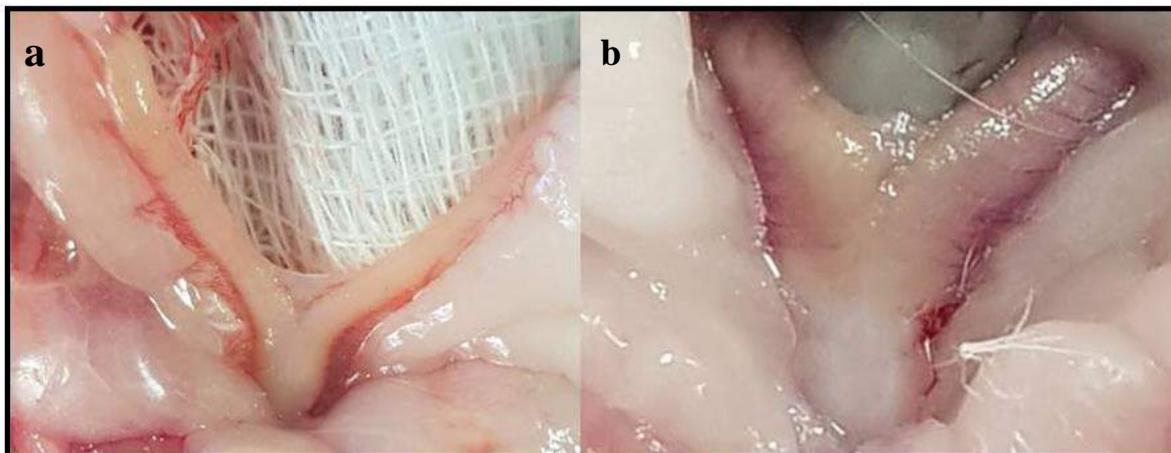


Legenda: a) Sítio cirúrgico na calvária; b) Perfuração com broca trefina de 5mm; c) Procedimento cirúrgico propriamente dito; d) Fragmentos ósseos removidos das lojas cirúrgicas; e) Preenchimento com o material pré-selecionado; f) Biomaterial estabilizado na loja cirúrgica; g) Posicionamento da Membrana Biológica (GenDerm®); h) Sutura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após os procedimentos, as eutanásias foram realizadas no prazo de 2 e 6 semanas com sobredosagem dos medicamentos utilizados para anestesia, por via intramuscular. Foram utilizadas sobredoses 4 vezes maiores para garantir que o animal não retornasse ao estágio de consciência. Neste momento, para a comprovação do efeito da ovariectomia foram observados e comparados os aspectos macroscópicos das tubas uterinas das ratas do grupo Sham e das ratas do grupo OVX (Figura 6).

Figura 6- Efeito macroscópico das tubas uterinas após a realização do procedimento cirúrgico de ovariectomia



Legenda: a) tuba uterina de uma rata do grupo OVX atrofiada; b) tuba uterina de uma rata do grupo Sham.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.4 Análise histológica

Após a eutanásia, as calvárias foram removidas, limpas e colocadas em solução de formol a 10% por 48 horas. A seguir, as amostras foram colocadas em solução de ácido etilendiaminotetracético (EDTA Titriplex III, EMD Millipore, EUA) para a desmineralização por cerca de 60 dias. As peças foram verificadas regularmente e quando constatada a desmineralização, foi realizado o processamento histológico.

Após a desmineralização, as peças foram seccionadas longitudinalmente no centro do defeito ósseo da calvária, inseridas em cassetes plásticos e colocadas em um processador de tecidos (Leica TP1020, Wetzlar, Alemanha) para posterior inclusão em parafina. A seguir, foram obtidos cortes semi-seriados de 5,0 micrometros (μm) de espessura que foram corados com hematoxilina e eosina (HE), e cortes de 3,5 μm que foram estendidos em lâminas silanizadas, para as reações de imuno-histoquímicas.

Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a formação do tecido de

granulação, a neoformação óssea, o arranjo de trabéculas ósseas imaturas e a maturação óssea até a remodelação final.

3.5.5 Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, cinco cortes de cada defeito foram selecionados em microscópio de luz *Zeiss Axioskop 40* (Carl Zeiss do Brasil), e avaliados quanto a área de neoformação óssea. Em cada um dos 05 cortes, dois campos situados na extremidade do defeito foram digitalizados, no aumento de 5x, representando a interface do sítio cirúrgico (coto cirúrgico). Como padronização, as imagens para análise histomorfométrica foram captadas sempre na mesma posição determinada por meio de referências na tela do computador. A seguir, as imagens foram transferidas para um computador no formato JPEG para análise morfométrica das estruturas selecionadas.

A taxa de neoformação óssea foi quantificada por meio do programa *software Image J (Image Processing and Analysis in Java, NIH, EUA)*. O parâmetro histomorfométrico calculado foi a área de neoformação óssea por campo em μm^2 .

3.5.6 Análise imuno-histoquímica

Os mesmos espécimes preparados para a análise histológica convencional foram utilizados para a análise imuno-histoquímica, porém os cortes histológicos foram obtidos com 3,5 μm na região em que o biomaterial estava inserido, e as secções foram estendidas em lâminas sinalizadas e submetidas ao procedimento de imuno-histoquímica de rotina.

3.5.6.1 Atividade de Osteocalcina (OC) e anti-RANKL

Os marcadores imuno-histoquímicos utilizados para analisar a atividade celular foram anti-Rank-L (Abcam,USA) e osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). A diluição, temperatura/tempo de incubação e recuperação antigênica, que foi utilizado no presente experimento, encontram-se listados no Quadro 2.

Quadro 2- Diluição, incubação e recuperação antigênica

Anticorpo	Diluição	Incubação	Recuperação antigênica
Anti-RANKL	1:3000	4° C durante 18 horas	Ácido cítrico
Osteocalcina	1:100	4° C durante 18 horas	Ácido cítrico

Fonte: Elaborado pelo autor.

As lâminas foram preparadas para as reações imuno-histoquímicas mediante o bloqueio da peroxidase endógena tecidual por meio da incubação com peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. A recuperação antigênica para osteocalcina foi realizada por meio do aquecimento em uma cuba de vidro contendo ácido cítrico a 10 mMph 6,0 no micro-ondas (700w) por 2 minutos, após o aquecimento, as lâminas foram colocadas na cuba com o ácido cítrico aquecido por 40 min; para o anti-RANKL a recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 98 °C com ácido cítrico a 10 mMph 6,0 por 30 minutos. Apenas para a osteocalcina foi realizado o bloqueio da enzima endógena biotina com leite desnatado em pó e água destilada por 20 min. A seguir, foi realizada incubação dos anticorpos primários, que ocorreu de acordo com a diluição, tempo e temperatura listados no Quadro 2. Posteriormente, ocorreu a incubação com o anticorpo secundário, (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat - DAKO) por 30 minutos à temperatura ambiente, para a RANK-L foi realizada a exposição ao complexo terciário estreptavidina-peroxidase (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat - DAKO) por 30 minutos à temperatura

ambiente e para a osteocalcina foi utilizado o complexo AB (Adivina-Biotina). O cromógeno utilizado para ambos foi a solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB), por 2 minutos. Posteriormente, foi realizada a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer, desidratação em etanol, clareamento em xilol e montagem com Permount. Os controles negativos foram feitos com a substituição do anticorpo primário por soro-albumina bovina (BSA) e os controles positivos foram realizados conforme sugestões dos fabricantes dos anticorpos primários.

Para as análises foram realizadas uma foto padronizada de cada lâmina, com um aumento de 40 vezes, da região da interface entre o defeito ósseo e o osso pré-existente, para observação da expressão dos biomarcadores osteocalcina (OC) e anti-RANKL pelas células. Para ambos os biomarcadores foram realizadas avaliações nas bordas dos defeitos em ambos os períodos, por meio de avaliação visual e foram realizadas pelo mesmo avaliador em condições cegas. Para análise qualitativa foi considerada as imunomarcações para as células: (da Cruz Vegian et al., 2021; dos Santos PL et al., 2013, 2016; Esteves et al., 2013; Queiroz et al., 2008):

- a) (-)= negativo
- b) (+)= positivo
- c) (++)= superpositivo
- d) (+++)= hiperpositivo

Após a análise qualitativa, foi realizada a análise semi-quantitativa por meio das conversões das pontuações em porcentagens: 0% para negativo, 20% para positivo, 60% para superpositivo e 90% para hiperpositivo. A porcentagem mais alta refletiu um aumento no número de células que expressaram positivamente o marcador diaminobenzidina na área.

3.6 Análise Estatística

Baseado no G*Power (version 3.1.9.2.) obtivemos o tamanho amostral dos ensaios biológicos *in vivo* de 5 animais por grupo assegurando o poder do teste em

80% e alfa de 0,05% (Leesongbuk et al., 2013).

Todos os dados obtidos nos testes *in vitro* (MTT, fosfatase Alcalina, conteúdo de proteína total) foram plotados e inicialmente analisados pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk* ($p=0,05$) seguido por teste paramétrico de análise de variância ANOVA- dois fatores ($p=0,05$), considerando como variáveis os grupos e os períodos analisados. Quando necessário, foram submetidos ao teste *pos-hoc* de *Tukey*. Somente para a quantificação de cálcio nos nódulos de mineralização foi realizado o teste de variância 1-fator ANOVA ($p=0,05$) seguido do teste *pos-hoc* de *Tukey*.

Para análise histomorfométrica e imuno-histoquímica, os dados foram plotados e analisados por teste de normalidade *Shapiro-Wilk* ($p=0,05$). Posteriormente, foram obtidos os dados da média e desvio padrão (\pm) da neoformação óssea dos grupos, seguido por teste paramétrico de análise de variância ANOVA- dois fatores ($p=0,05$) considerando como variáveis os grupos e os períodos de eutanásia. Quando necessário, foram submetidos ao teste *pos-hoc* de *Tukey*.

Todos os testes foram realizados com o auxílio do software *GraphPad Prism* 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e para todos os testes estatísticos foi adotado nível de significância de 5%.

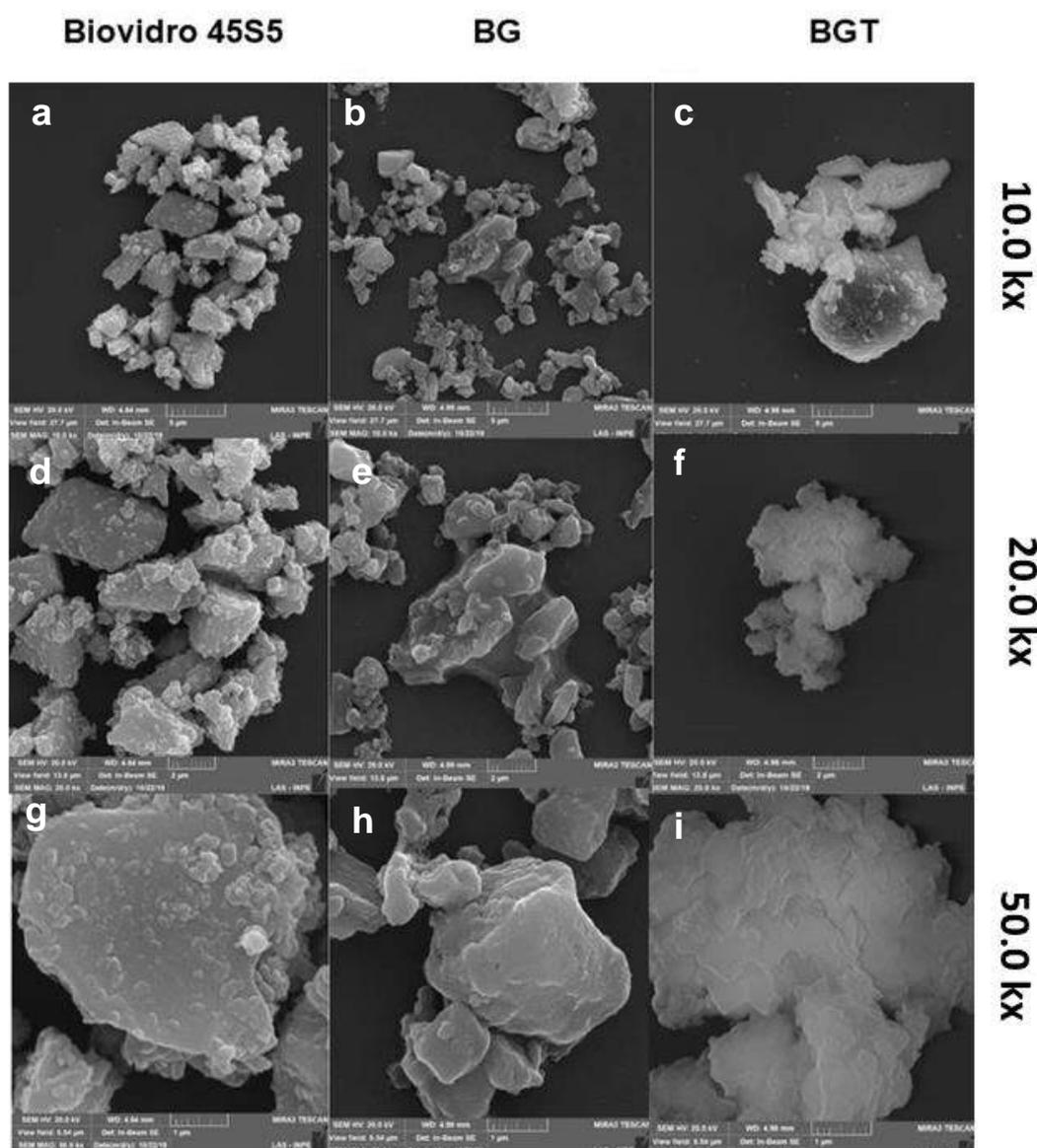
4 RESULTADO

4.1 Caracterização dos materiais

4.1.1 Microscopia Eletrônica por emissão de campo (MEV-FEG)

Nas micrografias obtidas por MEV- FEG foi possível observar na figura 7 que a superfície do biovidro 45S5 sem a funcionalização apresentou partículas de formatos geométricos e ângulos retos compatíveis com características morfológicas de materiais vítreos. Por outro lado, os grupos BG e BGT também descritos na figura 7 e que foram submetidos a funcionalização, exibiram partículas com ângulos arredondados e mais solubilizadas. A aglomeração das partículas de vidro também pôde ser observada nos grupos funcionalizados e sugere-se que seja devido a menor energia de superfície.

Figura 7- Micrografias obtidas por FEG com aumento de 10.000, 20.000 e 50.000 vezes, respectivamente



Legenda: a,d,g) biovidro 45S5; b,e,h) biovidro (BG); c,f,i) biovidro associado com teriparatida 10 % (BGT).

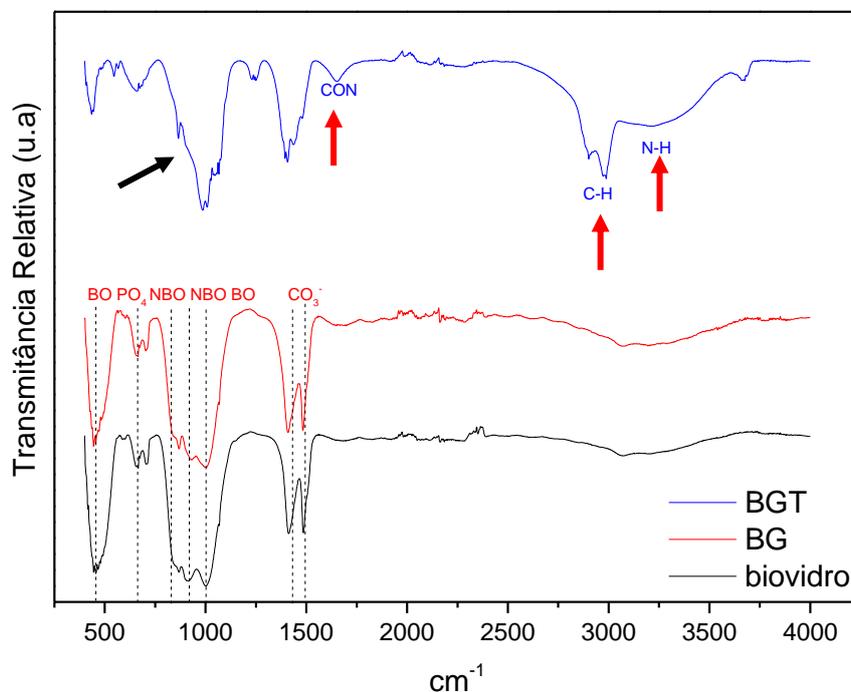
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2 Espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* (FTIR)

Na figura 8 observam-se três espectros de FTIR correspondentes aos

grupos biovidro 45S5, biovidro funcionalizado (BG) e do biovidro funcionalizado associado à teriparatida 10% (BGT). A composição da amostra antes e após a funcionalização do biovidro na ausência do fármaco apresentam ligações químicas que formaram redes características do biovidro. Pode-se, então confirmar, por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho, a presença de bandas que representam os grupamentos de ligações de pontes de oxigênio BO (Si-O-Si), fosfato (PO_4) e carbonato (CO_3^-) e ligações não ponte de oxigênio NBO (SiO-Ca²⁺O—Si e SiO-Na⁺O--Si) em todos os grupos. Observou-se que houve uma pequena redução na intensidade relativa das bandas NBO no material funcionalizado na presença do fármaco teriparatida (BGT) quando comparado às outras amostras e a presença de bandas do grupo amida (C=O) constituído de ligações entre carbono e hidrogênio (C-H), nitrogênio e hidrogênio (N-H) e carbono, oxigênio e nitrogênio (C-O-N) (1660 cm^{-1}) nesse grupo. As mudanças no controle de bandas por volta de 1000 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} ocorreram por sobreposição das bandas da medicação com as do biovidro. O grupo carbonato (CO_3^-) não apresentou alteração significativa em nenhum dos grupos.

Figura 8- Representação de ligações encontradas na análise por espectroscopia de infravermelho por transformação de *Fourier* das partículas



Legenda: (—→) indica diminuição da banda NBO do grupo BGT. (—→) indica a presença dos grupos amida no grupo BGT.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Potencial Zeta

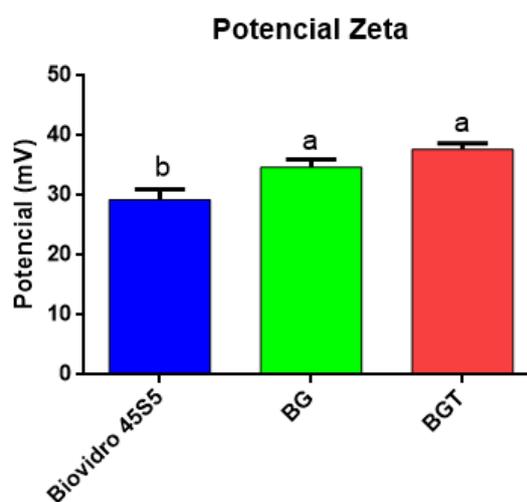
Todas as amostras demonstraram reatividade na superfície das partículas (Tabela 1). Os valores obtidos nas partículas de biovidro funcionalizado com a presença de teriparatida 10% (BGT) evidenciaram maior valor em módulo (Figura 9). O biovidro 45S5 exibiu menos grupos funcionais, sendo observada diferença estatística ($p < 0,05$) com os grupos funcionalizados, entretanto entre os grupos BG e BGT não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

Tabela 1- Representativa do Potencial Zeta das amostras, com média e desvio padrão (\pm)

Potencial Zeta (mV)		
Biovidro 45S5	BG	BGT
29,3	36,2	38,3
27,5	33,7	38,2
31	34,2	36,5
$29,27 \pm 1,750$	$34,70 \pm 1,323$	$37,67 \pm 1,012$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9- Valores de média e desvio padrão do Potencial Zeta (mV)



Legenda: letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

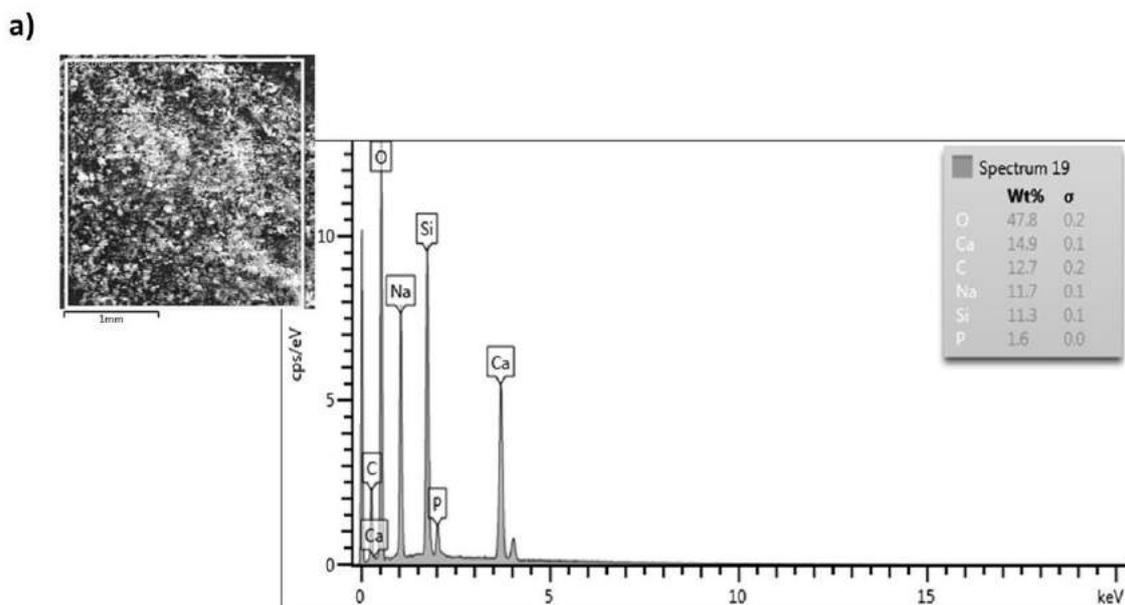
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

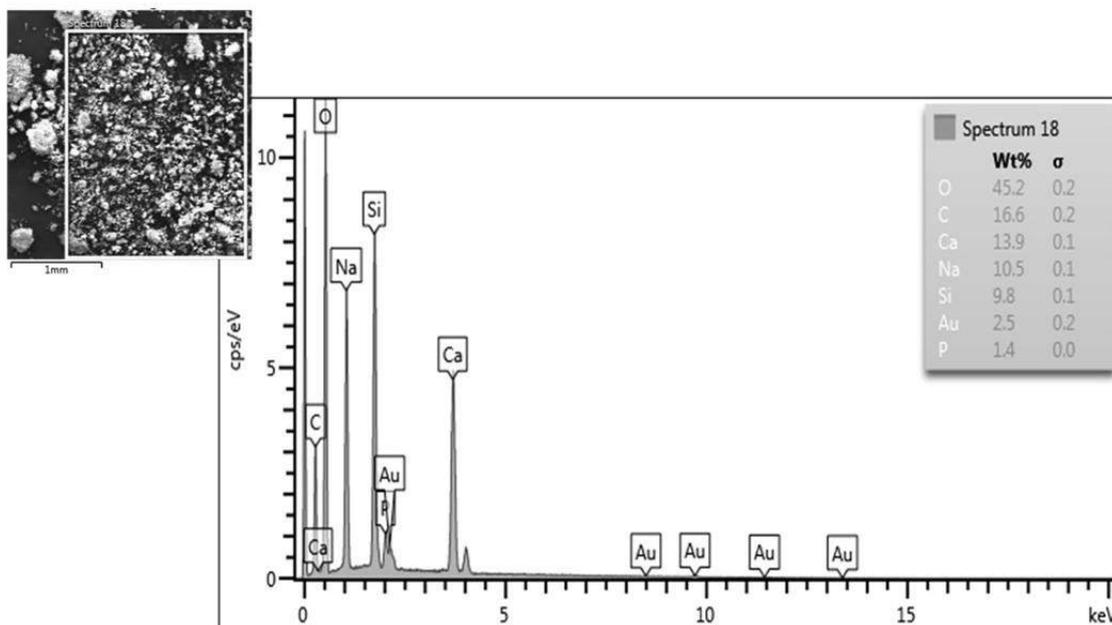
Na espectroscopia por dispersão de energia (EDS) uma amostra de cada grupo foi analisada para verificar os elementos químicos presentes na superfície dos biomateriais.

As amostras quando avaliadas por EDS, evidenciaram a presença de elementos químicos que compõem o biovidro 45S5. Foram principalmente observados picos de energia característicos dos elementos cálcio (Ca), silício (Si) e oxigênio (O) nos grupos biovidro 45S5 e BG (Figura 10a, b). Enquanto, as amostras que foram funcionalizadas com o fármaco teriparatida exibiram picos de sódio (Na) como elemento principal (Figura 10c). Além disso não foi observada a presença do elemento químico ouro (Au) nas partículas do grupo biovidro 45S5.

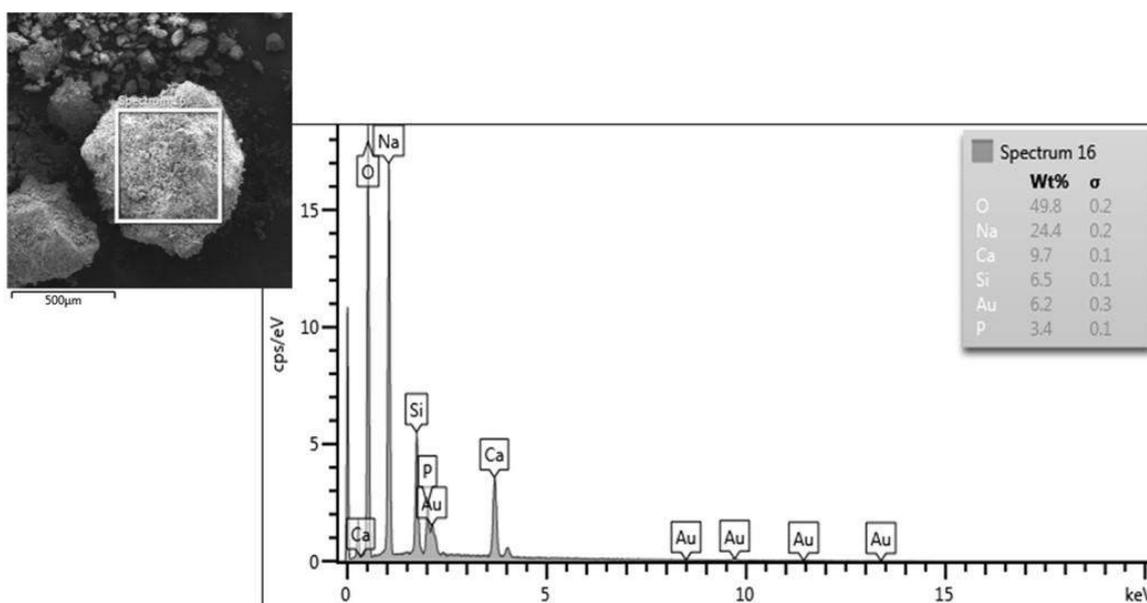
Figura 10- Difratoograma da microanálise por espectroscopia por dispersão de energia



b)



c)



Legenda: Espectro EDS das amostras a) Grupo biovidro 45S5 b) Grupo biovidro funcionalizado c) Grupo biovidro funcionalizado na presença do fármaco teriparatida.
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados da estatística descritiva (média \pm desvio-padrão) obtidos a partir da mensuração dos elementos químicos no EDS estão ilustrados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2- Valores das médias obtidas em cada amostra

Biomaterial	Wt%						
	O	Na	Ca	Si	Au	P	C
Biovidro 45S5	47.8	11.7	12.7	11.3	0	1.6	0
BG	45.2	10.5	13.9	9.8	2.5	1.4	16.6
BGT	49.8	24.4	9.7	6.5	6.2	3.4	0

Legenda: Wt%- Porcentagem de massa; O-Oxigênio; Na- Sódio; Ca- Cálcio; Si-Sílicio, Au- Ouro, P- Fósforo; C- Carbono.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3- Valor de desvio padrão (σ)

Biomaterial	σ						
	O	Na	Ca	Si	Au	P	C
Biovidro 45S5	0.2	0.1	0.1	0.1	0	0	0.2
BG	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0	0.2
BGT	0.2	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1	0

Legenda: σ - Desvio padrão; O-Oxigênio; Na- Sódio; Ca- Cálcio; Si-Sílicio, Au- Ouro, P-Fósforo; C- Carbono.

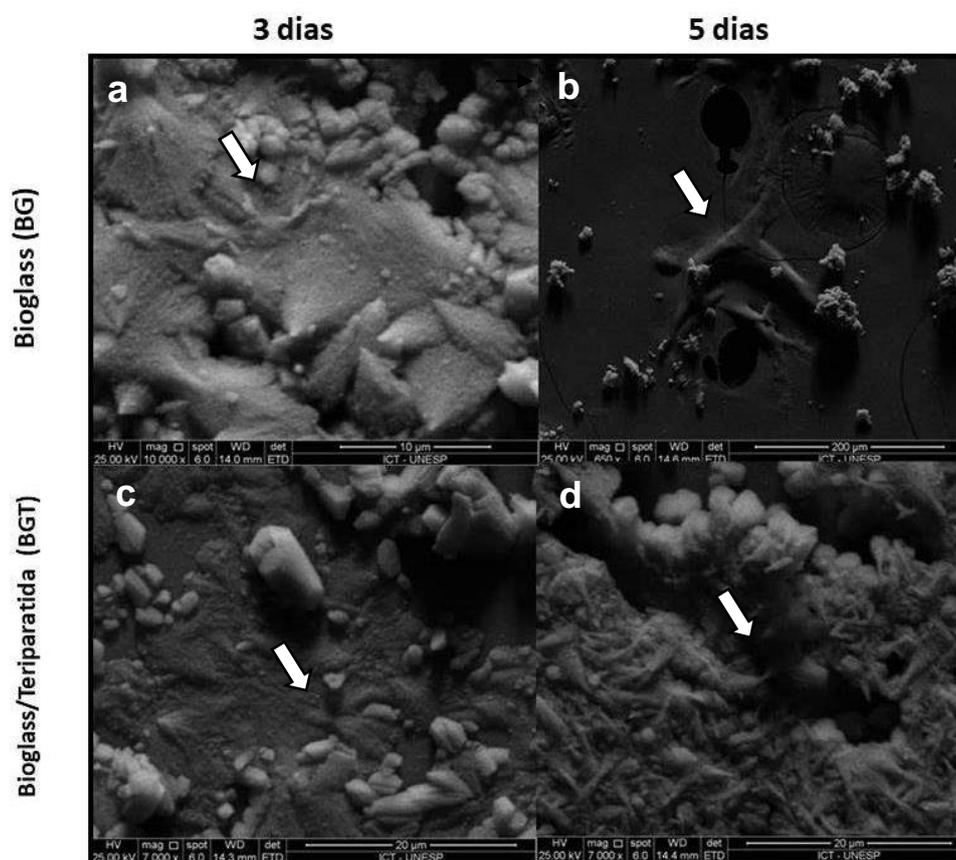
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise *in vitro*

4.2.1 Adesão celular

Após 3 e 5 dias de cultura, as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para evidenciação da interação celular sobre os materiais (Figura 11). Nesta análise evidenciou-se que todas as amostras permitiram espraiamento celular. Apesar dos materiais exibirem macroestruturas irregulares e revelarem uma superfície rugosa com grande quantidade de poros e reduzida coalescência entre as partículas, foi possível observar prolongamentos celulares permeando as partículas do material.

Figura 11- Fotomicrografia de MEV da adesão celular nas amostras



Legenda: a) Grupo BG no período de 3 dias com aumento de 10.000 x; b) Grupo BG no período de 5 dias com aumento de 650 x; c) Grupo BGT no período de 3 dias com aumento de 7.000 x; d) Grupo BGT no período de 5 dias com aumento de 7.000 x. (→) indicam células espalhadas que indicam adesão celular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

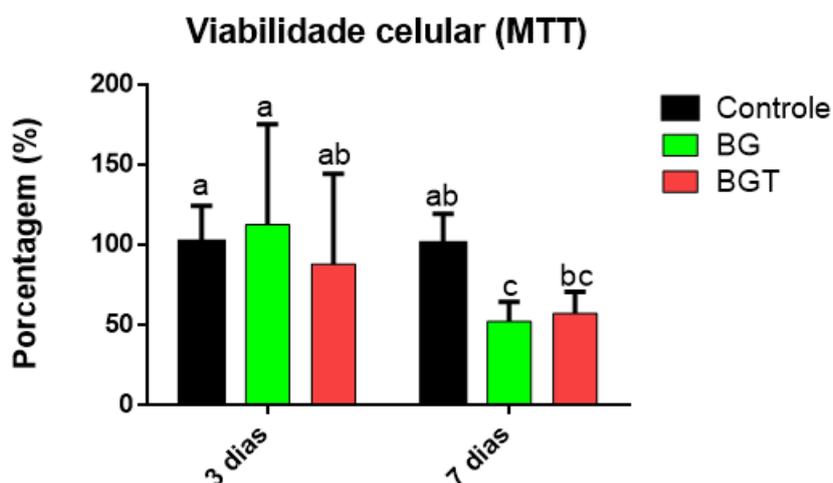
4.2.2 Determinação da viabilidade celular (MTT)

No período de 3 dias, o grupo biovidro funcionalizado (BG) foi aquele que exibiu a maior porcentagem de viabilidade celular, porém não foi estatisticamente diferente dos demais grupos no mesmo período ($p > 0,05$). Entretanto, no período de 7 dias, pôde-se observar que o grupo controle (fundo da placa) exibiu o maior valor de células viáveis, diferindo estatisticamente do grupo BG ($p < 0,05$).

Na análise entre os períodos verificou-se que o grupo controle no período de 3 dias diferiu estatisticamente dos grupo experimentais BG e BGT no período 7 dias

($p < 0,05$). Os valores de viabilidade celular dos grupos experimentais no período de 7 dias também diferiram estatisticamente dos grupos controle e BG no período de 3 dias ($p < 0,05$). Além disso, o grupo BG 7 dias diferiu estatisticamente do grupo controle 7 dias ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo BGT 7 dias não apresentou diferença estatisticamente significativa com os grupos controle 7 dias e com o grupo BG 7 dias ($p < 0,05$). Os resultados estão representados na figura 12.

Figura 12- Teste ANOVA- dois fatores para os dados de viabilidade celular, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão (\pm) do teste de viabilidade celular estão representados no gráfico



Legenda: letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

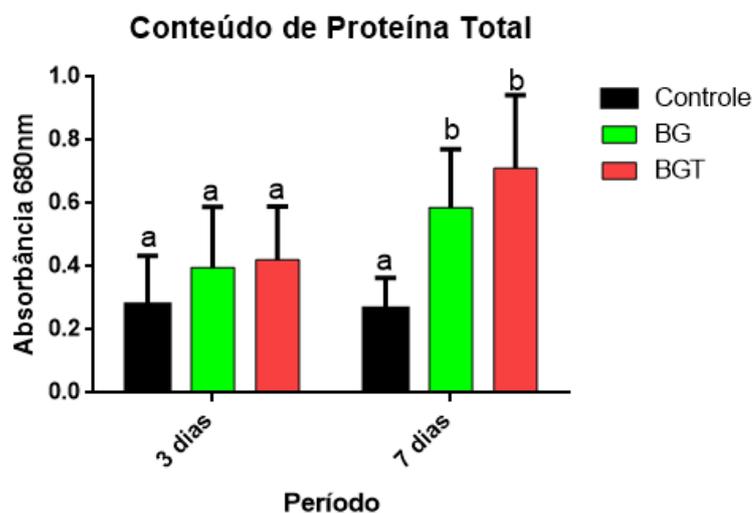
4.2.3 Conteúdo de proteína total

Dentro dos períodos avaliados foi verificada a atividade metabólica celular em todos os grupos. Em ambos os períodos, os grupos experimentais apresentaram valores médios maiores do conteúdo de proteína total do que o grupo controle (fundo da placa), sendo observada diferença estatística no período de 7 dias ($p < 0,05$). No período de 3 dias, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos analisados. Enquanto no período de 7 dias, a maior

quantidade de proteínas totais foi observada no grupo biovidro associado ao fármaco teriparatida 10% (BGT), porém não diferiu do grupo BG ($p>0,05$) e houve diferença estatística entre o este grupo e o grupo controle (fundo da placa) ($p<0,05$).

Quando o efeito interação foi analisado (materiais versus períodos), foi possível observar que nos grupos experimentais (BG e BGT) houve um aumento estatisticamente significativo no período de análise mais longo, diferindo dos demais grupos, em ambos os períodos ($p<0,05$). Enquanto os grupos controles não apresentaram diferenças estatísticas significantes ($p<0,05$) entre os períodos analisados. Os resultados estão representados na figura 13.

Figura 13- Teste ANOVA-dois fatores para os dados de proteína total, tendo como variáveis os grupos analisados e os períodos. Valores de média e desvio padrão (\pm) do conteúdo de proteína total estão representados no gráfico



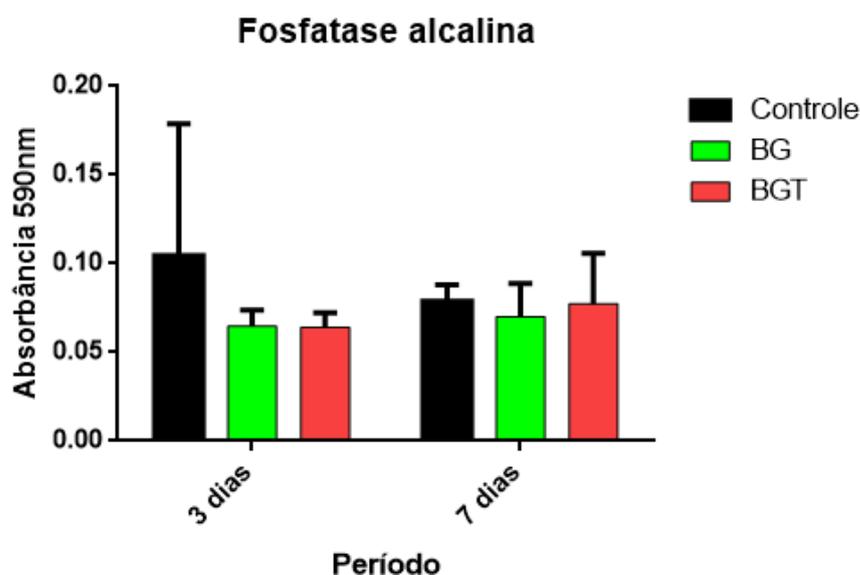
Legenda: letras distintas indicam diferença estatística ($p<0,05$).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Nos mesmos lisados da análise do conteúdo de proteína total, foi mensurada a ALP. No período de 3 dias, a atividade de fosfatase alcalina foi maior no grupo

controle, mas sem apresentar diferença estatística dos demais grupos ($p>0,05$). Verificou-se que no período de 7 dias os grupos experimentais e o grupo controle, também não diferiram estatisticamente ($p>0,05$). Entre os períodos avaliados, não houve diferenças estatisticamente significantes entre nenhum grupo ($p>0,05$). Entretanto, foi possível observar uma diminuição da atividade de fosfatase alcalina no grupo controle e um aumento nos grupos experimentais quando comparados os períodos de 3 dias e 7 dias. Os resultados estão apresentados na figura 14.

Figura 14- Teste ANOVA- dois fatores para os dados da atividade de fosfatase alcalina, tendo como variáveis os grupos analisados e os períodos. Valores de média e desvio padrão (\pm) da atividade de fosfatase alcalina estão representados no gráfico

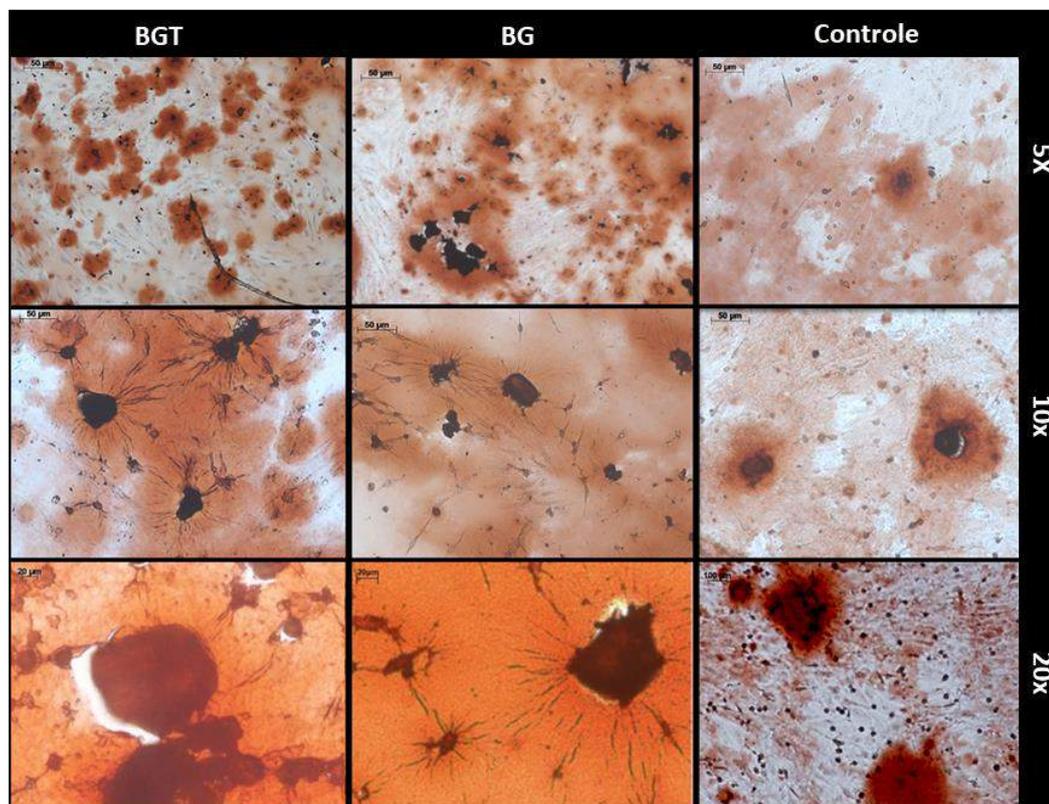


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.5 Formação e quantificação de cálcio nos nódulos de mineralização

Após 12 dias de cultivo celular foi observada a formação de nódulos de mineralização nos grupos experimentais e controle. A figura 15 representa os nódulos formados nos poços dos grupos experimentais e do controle.

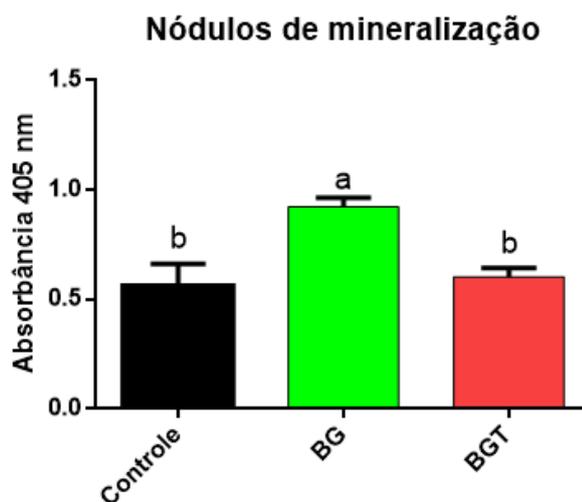
Figura 15- Representação da formação de nódulos de mineralização



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a quantificação, observou-se maior quantidade de cálcio presente nos nódulos do grupo biovidro (BG), diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos controle e BGT não diferiram entre si ($p > 0,05$). Os resultados estão apresentados na figura 16.

Figura 16- Teste 1-fator ANOVA para os dados da quantificação de cálcio presente nos nódulos de mineralização, tendo como variável os grupos analisados. Valores de média e desvio padrão (\pm) da quantificação no período de 12 dias estão representados no gráfico



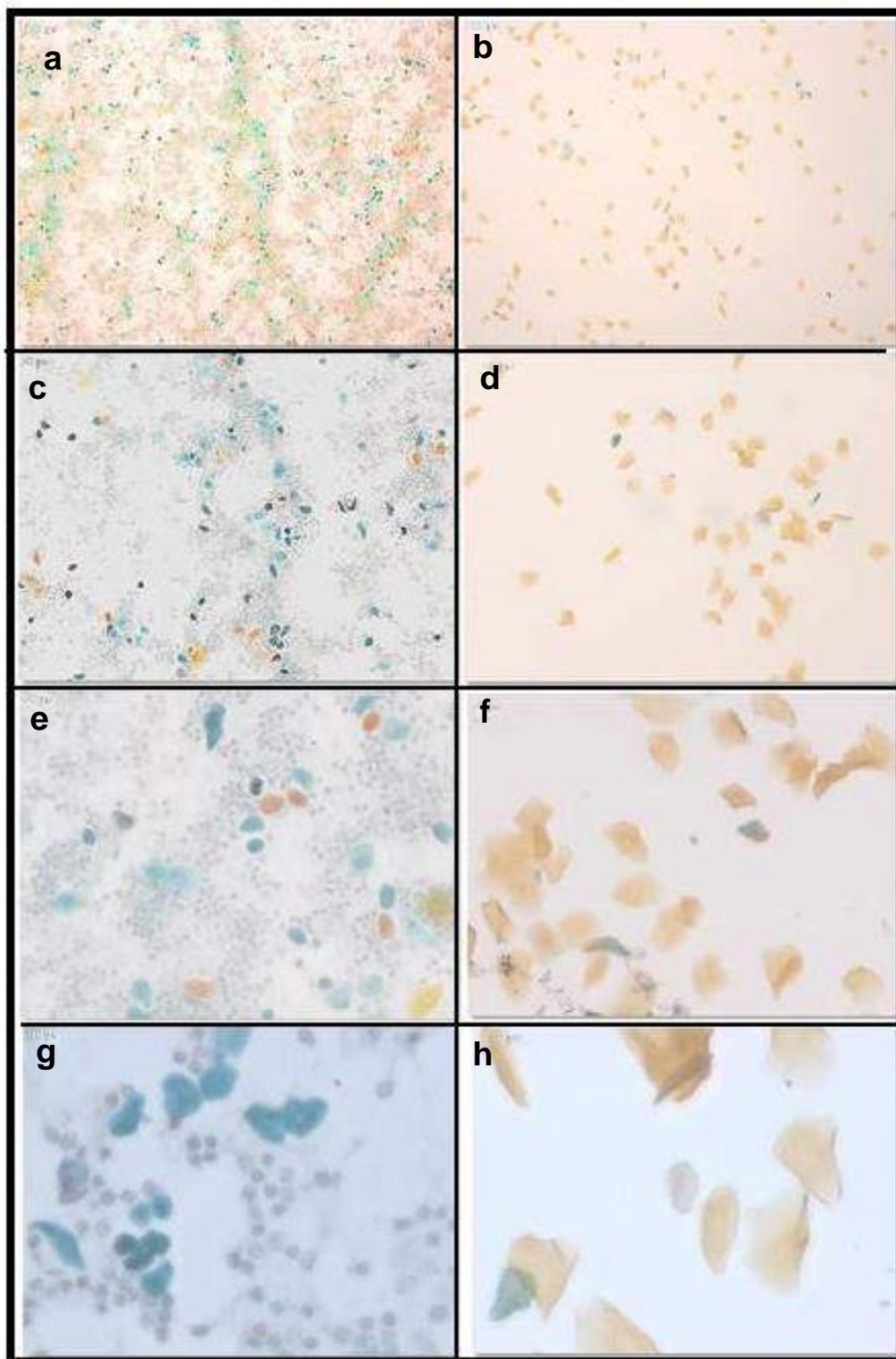
Legenda: letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Análise *in vivo*

4.3.1 Citologia Esfoliativa

Nos esfregaços vaginais realizados foi possível observar que todas as ratas ovariectomizadas permaneceram em fase diestro. Nesta fase, observou-se esfregaço praticamente constituído apenas por leucócitos, que são células pequenas e arredondas e a presença de poucas células epiteliais (Figura 17a, c, e, g). Por outro lado, as ratas do grupo Sham apresentaram os quatro estágios regulares do ciclo estral (diestro, proestro, estro e maestro) e no esfregaço vaginal deste grupo houve presença de células cornificadas anucleares (Figura 17b, d, f, h).

Figura 17- Fotomicrografias dos esfregaços vaginais dos grupos Sham e OVX



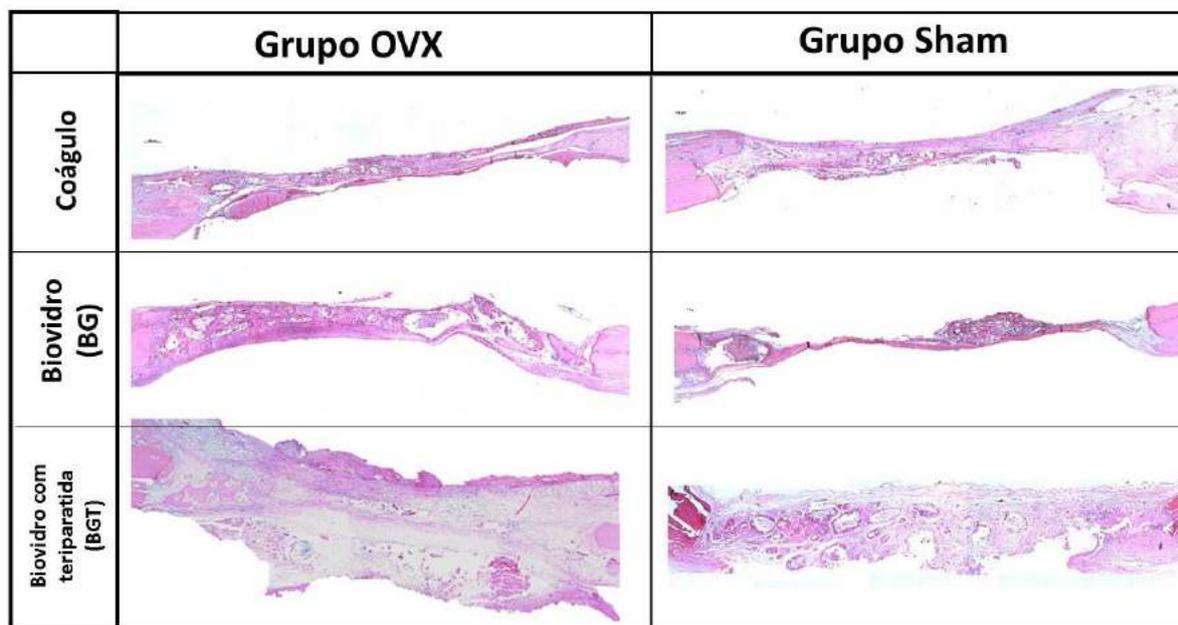
Legenda: Esfregaços vaginais dos grupos Sham e OVX : Nos aumentos originais de 5x, 10x, 20x e 40x respectivamente nos grupos OVX (a,c,e,g) e Sham (b,d,f,h).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Análise histológica

No período pós-operatório de 2 semanas não foi observada nenhuma evidência de inflamação ou infecção nos sítios cirúrgicos. Microscopicamente, as peças avaliadas apresentavam secções longitudinais das calvárias das ratas onde foram inseridos os biomateriais (Figura 18). As extremidades dos sítios cirúrgicos apresentavam tecido ósseo neoformado exibindo osteócitos volumosos e tecido conjuntivo com a presença de células fusiformes (Figura 19).

No período de 2 semanas observou-se sinais de remodelação do tecido ósseo com a proliferação de trabéculas ósseas a partir das extremidades das corticais ósseas pré-existentes, próxima a região onde o material foi posicionado. O osso neoformado apresentou-se imaturo, exibindo osteócitos volumosos dentro de lacunas amplas e osteoblastos, arranjados em fileiras contornando as trabéculas desorganizadas, ademais foi possível verificar ainda a presença do biomaterial nas áreas que continham tecido conjuntivo mais espesso (Figura 19). Nos grupos experimentais incorporados com o fármaco teriparatida (BGT) destaca-se na área do defeito ósseo, a presença de um de tecido conjuntivo mais espesso exibindo grande quantidade de vasos sanguíneos, enquanto nos demais grupos observou-se a presença de tecido conjuntivo frouxo (Figura 20).

Figura 18- Fotomicrografias em microscopia óptica referente ao período de 2 semanas

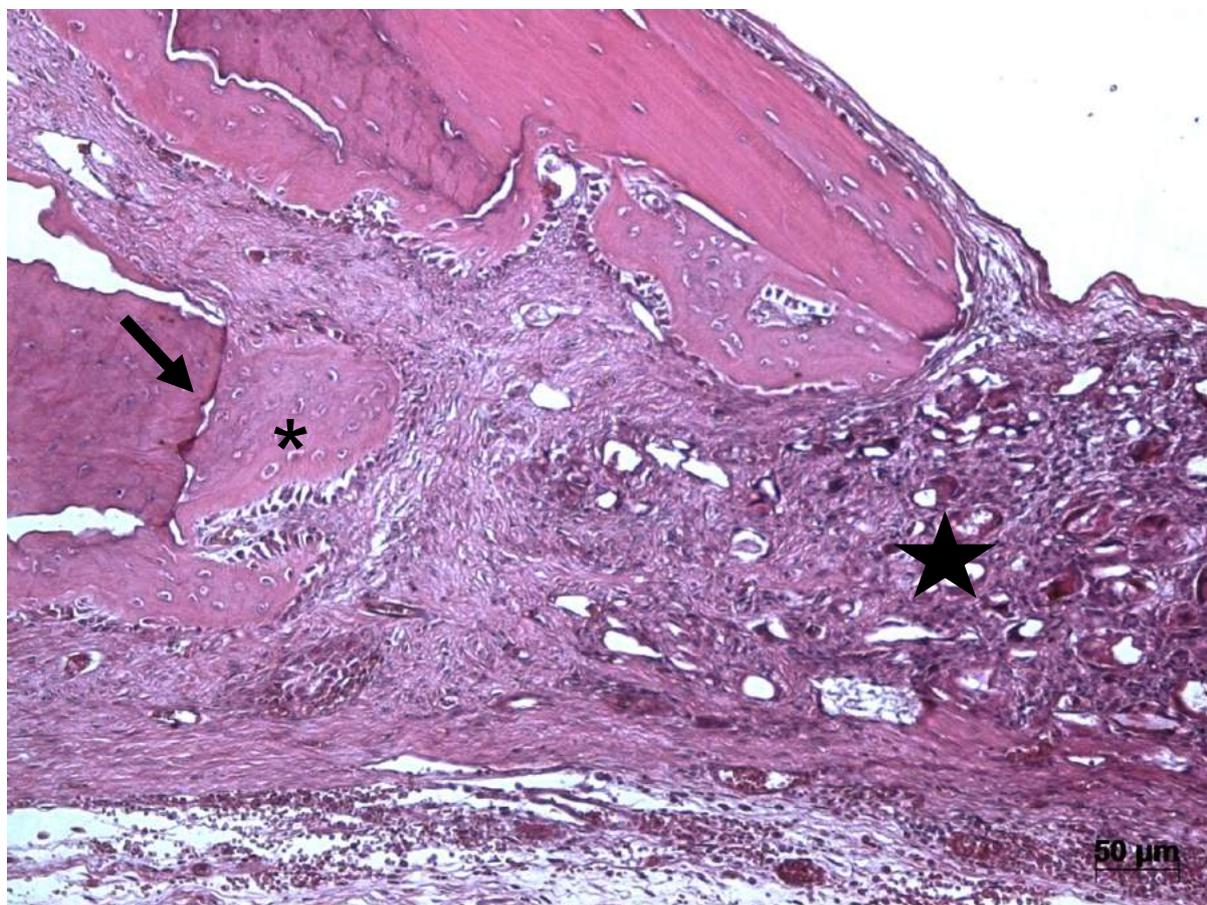


Legenda: Visão panorâmica do sítio do defeito crítico em secção longitudinal no aumento de 2.5x (HE) de todos os grupos no período de 2 semanas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

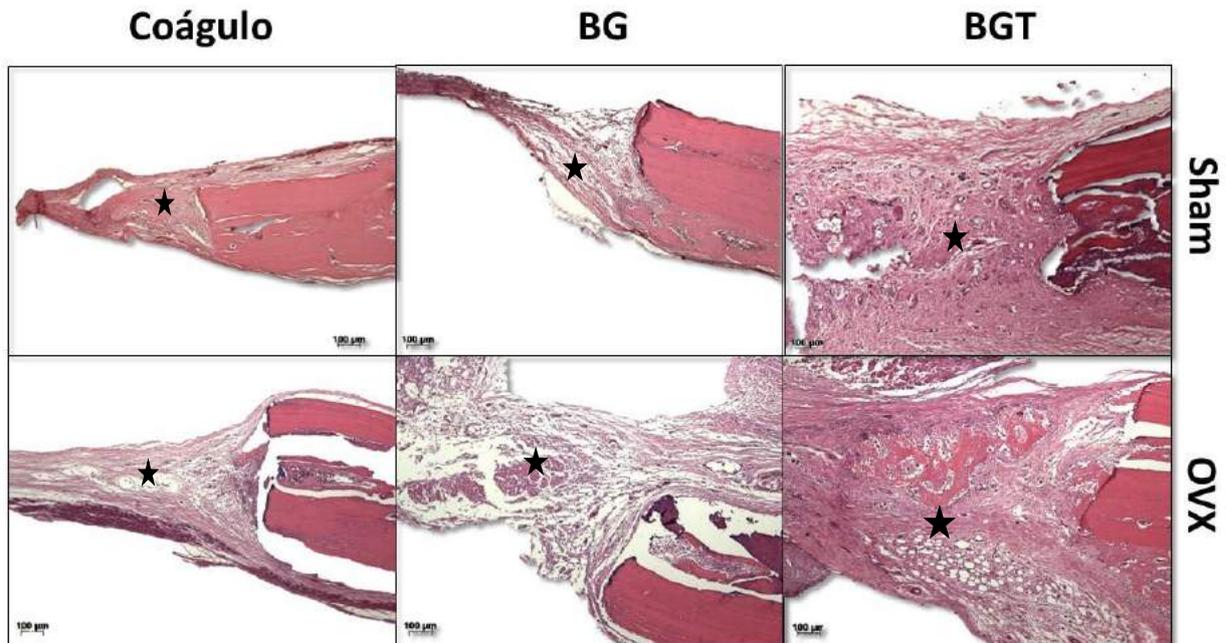
Nos cortes histológicos, os grupos apresentaram neoformação óssea apenas na extremidade do defeito crítico, sendo possível identificar nitidamente o limite entre o tecido ósseo neoformado e a cortical óssea pré-existente (Figura 19). Além disso, o tecido ósseo ficou bem evidente devido a imaturidade e disposição das fibras nesse período mais curto.

Figura 19- Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito, aumento original de 10x no período de 2 semanas



Legenda: Corte histológico no aumento original de 10x (HE) do grupo BGO2.(*) na área neoformada. (→) na delimitação do defeito crítico.(★) na área do defeito com presença do biomaterial.
Fonte: Elaborado pelo autor.

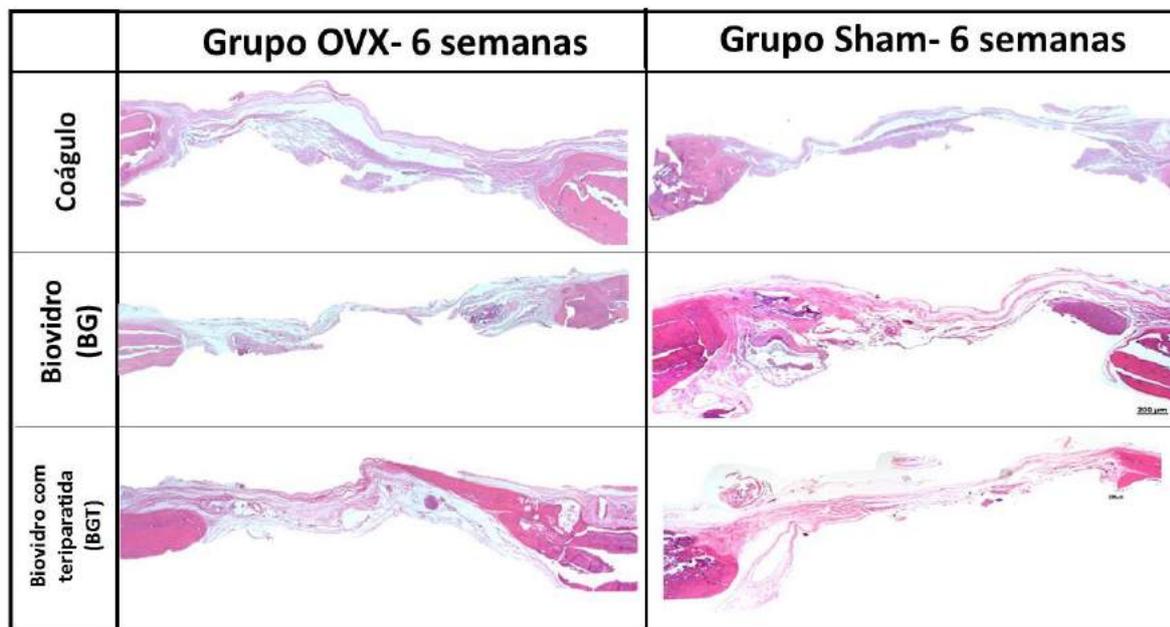
Figura 20- Fotomicrografia do corte histológico na área do limite do defeito em todos os grupos, no aumento original de 5x no período de 2 semanas



Legenda: Corte histológico no aumento original de 5x (HE) de todos os grupos(★) tecido conjuntivo demonstrando a presença de um tecido mais espesso nos grupos com a presença do fármaco.
Fonte: Elaborado pelo autor.

No período de 6 semanas, foi possível notar que ainda não houve o fechamento do defeito com tecido ósseo em nenhum grupo avaliado, coágulo e experimentais. Além disso observou-se que a maior parte do biomaterial já havia sido reabsorvido, e verificou-se a presença de osso neformado nas áreas do coto do defeito (Figura 21). Nessas áreas, ocorreu a presença de tecido ósseo mais maduro, com canais de Havers evidente e lamelas que continham lacunas de osteócitos, também dispostas em anéis concêntricos (Figura 22). Foi possível observar a presença de osso compacto junto ao biomaterial residual (Figura 23). O tecido conjuntivo apresenta-se mais denso e observa-se grande quantidade fibras colágenas mais espessas próximas a região da extremidade do defeito. Nas áreas centrais do defeito observou-se a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas delgadas e dispersas com pouca presença de células.

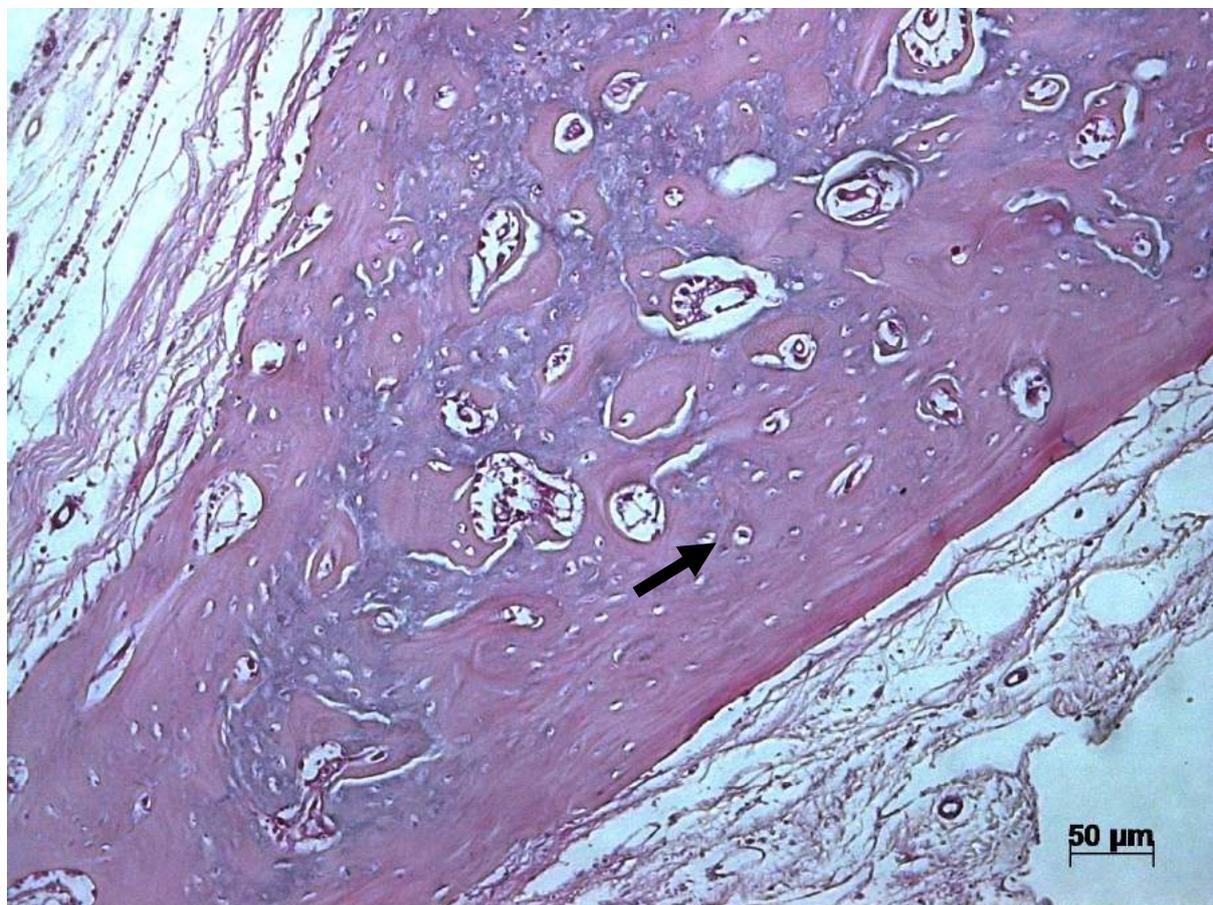
Figura 21- Fotomicrografias em microscopia óptica referente ao período de 6 semanas



Legenda: Visão panorâmica do sítio do defeito crítico em secção longitudinal no aumento original de 2.5x (HE) de todos os grupos no período de 6 semanas.

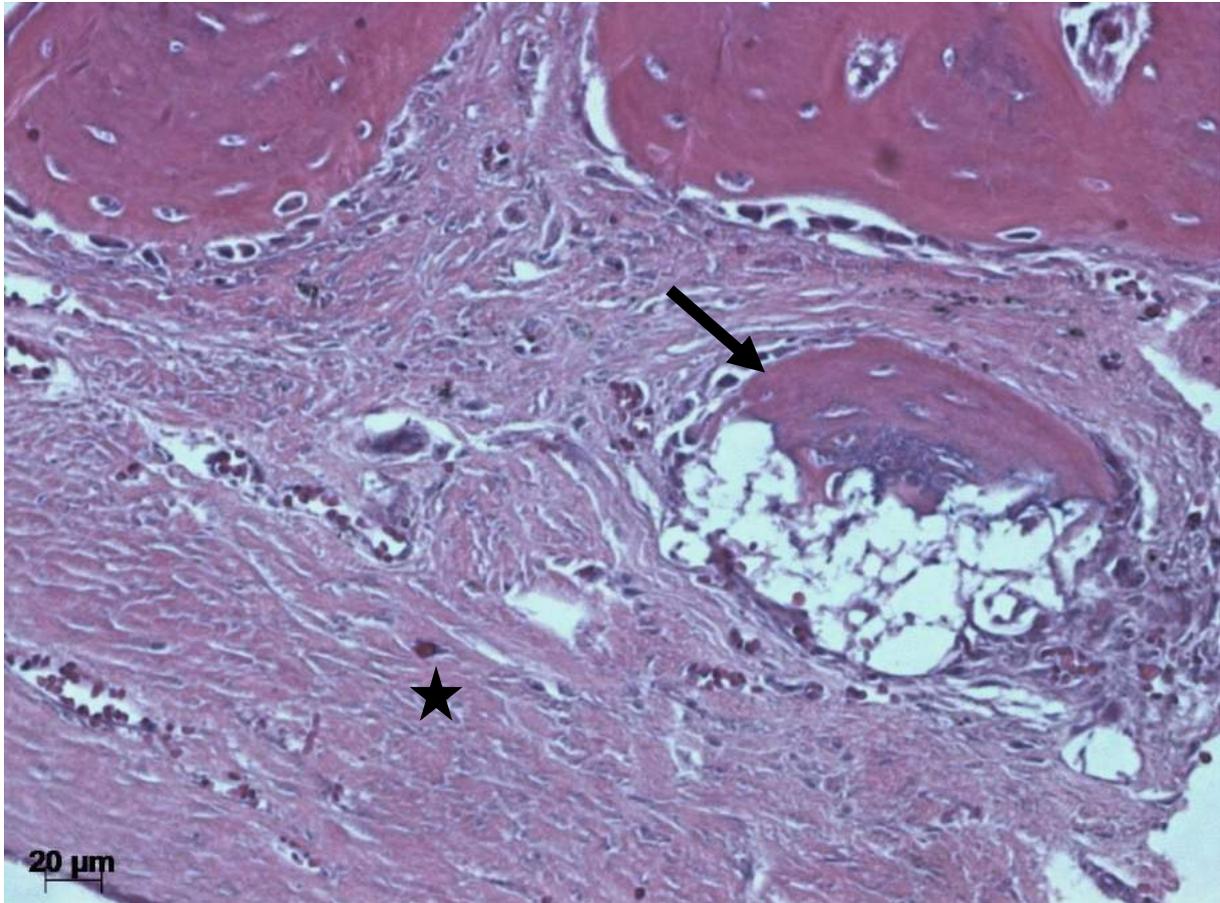
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22- Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito, aumento original de 10x no período de 6 semanas



Legenda: Corte histológico no aumento original de 10x (HE) do grupo BGTO6. Observa-se a presença de osso compacto com matriz extracelular mineralizada e a presença de vasos sanguíneos. (→) indicando lacuna com osteócito.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23- Fotomicrografia do corte histológico na área do defeito, aumento original de 20x no período de 6 semanas



Legenda: Corte histológico no aumento original de 20x (HE) do grupo BGO6.(→): Tecido ósseo neoformado próximo ao biomaterial. Ao redor, observa-se a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas espessas e dispersas em direções variadas (★).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.3 Análise histomorfométrica

Baseado nos dados da estatística descritiva (Tabela 4 e 5), quando se considera a influência dos materiais de preenchimento do defeito crítico e os períodos, foi realizado o teste de variância ANOVA- dois fatores seguido do teste de comparação múltipla de *Tukey* ($n=5$). Os resultados comparando os valores mensurados da área neoformada entre os grupos e períodos analisados estão representados na figura 24.

Em cada período quando se comparou os grupos controles e experimentais observou-se que tanto no período de 2 semanas quanto no de 6 semanas não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Entretanto, ao se comparar os períodos analisados observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos BGS2, BGTS2, BGTO2, BGO2 que diferiram de CS6 e BGTO6; os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$). Foi observado aumento no valor da área neoformada no grupo BGTO6 quando comparado aos grupos experimentais no período de 2 semanas.

Tabela 4- Estatística descritiva dos valores referentes a área neoformada por grupos no período de 2 semanas

Tratamento	N	Média	Desvio Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo
CS2	5	19175	8184	10903	18158	32416
CO2	5	19055	6651	7246	22262	22840
BGS2	5	11694	7807	3308	12165	21377
BGTS2	5	6976	2206	4745	6956	10237
BGO2	5	4381	2951	1651	4275	8897
BGTO2	5	4811	3013	219,2	5178	8554

Legenda: N= número de amostras

Fonte:Elaborado pelo autor.

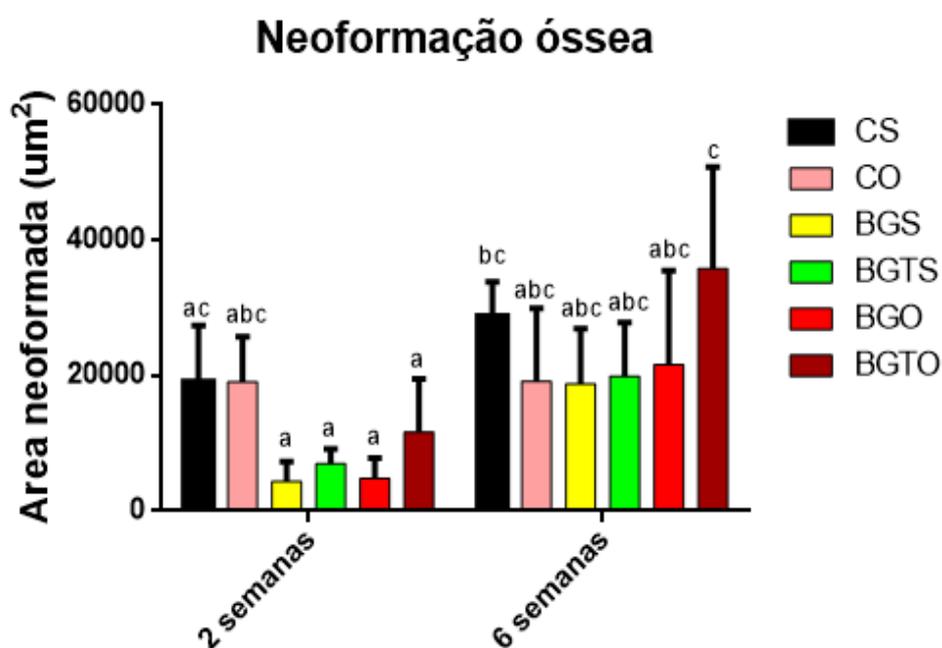
Tabela 5- Estística descritiva dos valores referentes a área neoformada por grupos no período de 6 semanas

Tratamento	N	Média	Desvio Padrão	Valor mínimo	Mediana	Valor máximo
CS6	5	28845	5005	24384	28845	37163
CO6	5	19177	10800	11525	19177	37771
BGS6	5	18779	8174	9954	18779	30481
BGTS6	5	19918	7965	10330	19918	32251
BGO6	5	21616	13931	10133	21616	39899
BGTO6	5	35834	14985	20494	35834	56607

Legenda: N= número de amostras

Fonte:Elaborado pelo autor.

Figura 24- Teste ANOVA dois fatores para os dados de neoformação óssea, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão (\pm) da neoformação óssea de todos os grupos estão representados no gráfico



Lengada: letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
 Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.4 Análise imuno-histoquímica

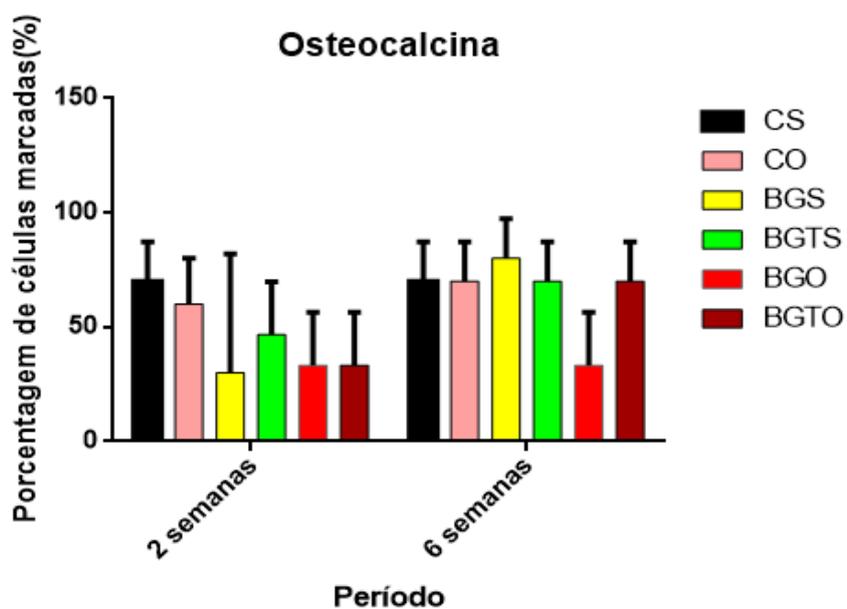
O resultado da imuno-histoquímica foi baseado na avaliação de dois anticorpos RANKL e osteocalcina (OC). Para ambos os biomarcadores foram realizadas avaliações nas bordas dos defeitos em ambos os períodos ($n=3$).

Em todos os grupos analisados foram observadas imunomarcações de osteocalcina junto à matriz óssea mineralizada (Figura 25), sendo mais evidente no período tardio (6 semanas) da neoformação óssea (Figura 26). Na análise qualitativa foi possível observar que a osteocalcina (OC) foi considerada superpositiva nos grupos CS e positiva no grupo CO no período de 2 semanas, sendo observada marcação nas trabéculas ósseas neoformadas, osteócitos e na matriz extracelular.

Enquanto, os grupos experimentais expressaram marcação para osteocalcina (OC) positiva e por vezes negativa. O padrão de marcação da osteocalcina indicou que o tecido ósseo no período de 2 semanas nos grupos BGO, BGTO, BGS e BGTS era imaturo quando comparados os grupos CS e CO. No período de 6 semanas, observou-se que os grupos CS e CO apresentaram marcação superpositiva para as células osteoblásticas e osteócitos na matriz. Assim como os grupos experimentais que apresentaram-se superpositivos e positivos, apresentando áreas da matriz extracelular expressando osteocalcina, assim como osteoblastos e osteócitos.

Os valores médios de células imunomarcadas convertidos em porcentagem para a osteocalcina demonstraram que no período de 2 semanas não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Observou-se ainda que neste período os grupos coágulos Sham e OVX apresentaram os maiores valores médios, os quais exibiram pouca elevação no período de 6 semanas quando comparados aos demais grupos. Já nos grupos experimentais, com exceção do grupo BGO, verificou-se aumento no número de células imunomarcadas por osteocalcina no período de 6 semanas quando comparados aos valores médios do período de 2 semanas, mas sem apresentar diferenças estatísticas ($p > 0,05$). Ressalta-se que a presença do fármaco nos animais ovariectomizados em 6 semanas (BGTO6) promoveu aumento na quantidade de células imunomarcadas para OC, tornando-o semelhante aos valores médio obtido no grupo BGTS.

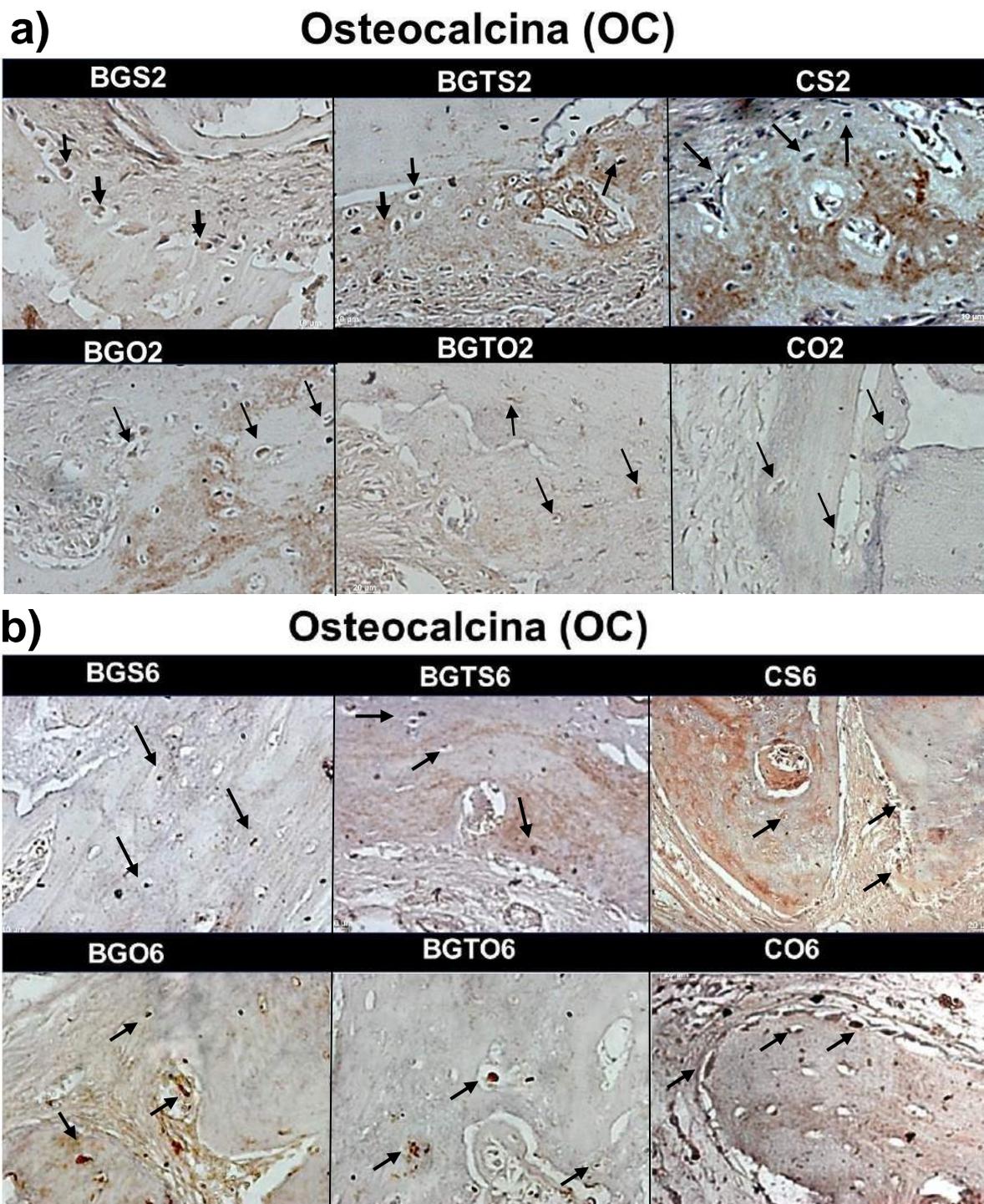
Figura 25- Teste ANOVA dois fatores para o biomarcador osteocalcina, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão (\pm) de todos os grupos estão representados no gráfico



Legenda:Imunomarcção para OC: Gráfico demonstrando os valores em porcentagem da média e desvio padrão referente ao padrão de imunomarcção para o biomarcador OC no período de 2 semanas e 6 semanas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 26-Fotomicrografias dos cortes histológicos com marcações positivas para o anticorpo policlonal osteocalcina (OC) referente a todos os grupos analisados

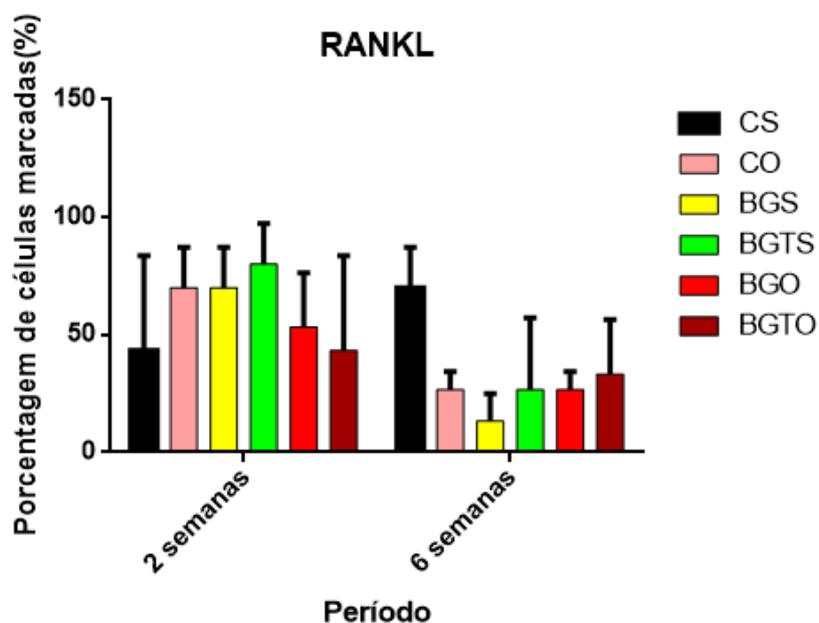


Legenda: Imunomarcção de Osteocalcina para os grupos a) no período de 2 semanas b) no período de 6 semanas pela análise imuno-histoquímica (Imunomarcações indicadas pelas setas). Aumento original de 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise qualitativa, no período de 2 semanas foi observada a imunomarcção no núcleo de osteócitos recém aprisionados na matriz óssea neoformada, em osteoblastos na periferia do osso neoformado e em fibroblastos presentes no tecido conjuntivo. Foi possível observar que a imunomarcção de células para RANKL foi considerada superpositiva nos grupos CO, BGS e BGTS no período de 2 semanas. Enquanto os grupos CS, BGTO e BGO apresentaram marcações menos evidentes. Observou-se nesses grupos houve uma redução de células imunomarcadas no tecido conjuntivo. No período de 6 semanas, pode-se observar a presença de tecido ósseo mais maduro, com lacunas menores de osteócitos apresentando imunomarcção em osteoblastos presentes na rima osteoblástica do osso neoformado, assim como em algumas células do tecido conjuntivo para todos os grupos, apresentando para todos os grupos experimentais e grupo CO imunomarcção positiva na escala para RANKL. Já o grupo CS no período de 6 semanas apresentou imunomarcção hiperpositiva para RANKL, porém sendo observado marcações mais evidentes no tecido conjuntivo e pouca marcação em osteócitos e osteoblastos presentes na matriz e na periferia do osso neoformado, respectivamente. O resultado da análise semi-quantitativa do biomarcador RANKL evidenciou que os grupos experimentais CO, BGS e BGTS apresentaram maiores valores médios de células imunomarcadas em porcentagem no período de 2 semanas. Assim como o coágulo OVX que apresentou valor médio elevado no período mais curto de análise, entretanto sem apresentar diferença estatisticamente significantes ($p > 0,05$) com os demais grupos. No período de 6 semanas, novamente, não observou-se diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$), porém grupo CS apresentou o maior valor médio de células imunomarcadas, enquanto os demais grupos apresentaram diminuição do número de células marcadas para RANKL nesse período (Figura 27) (Figura 28).

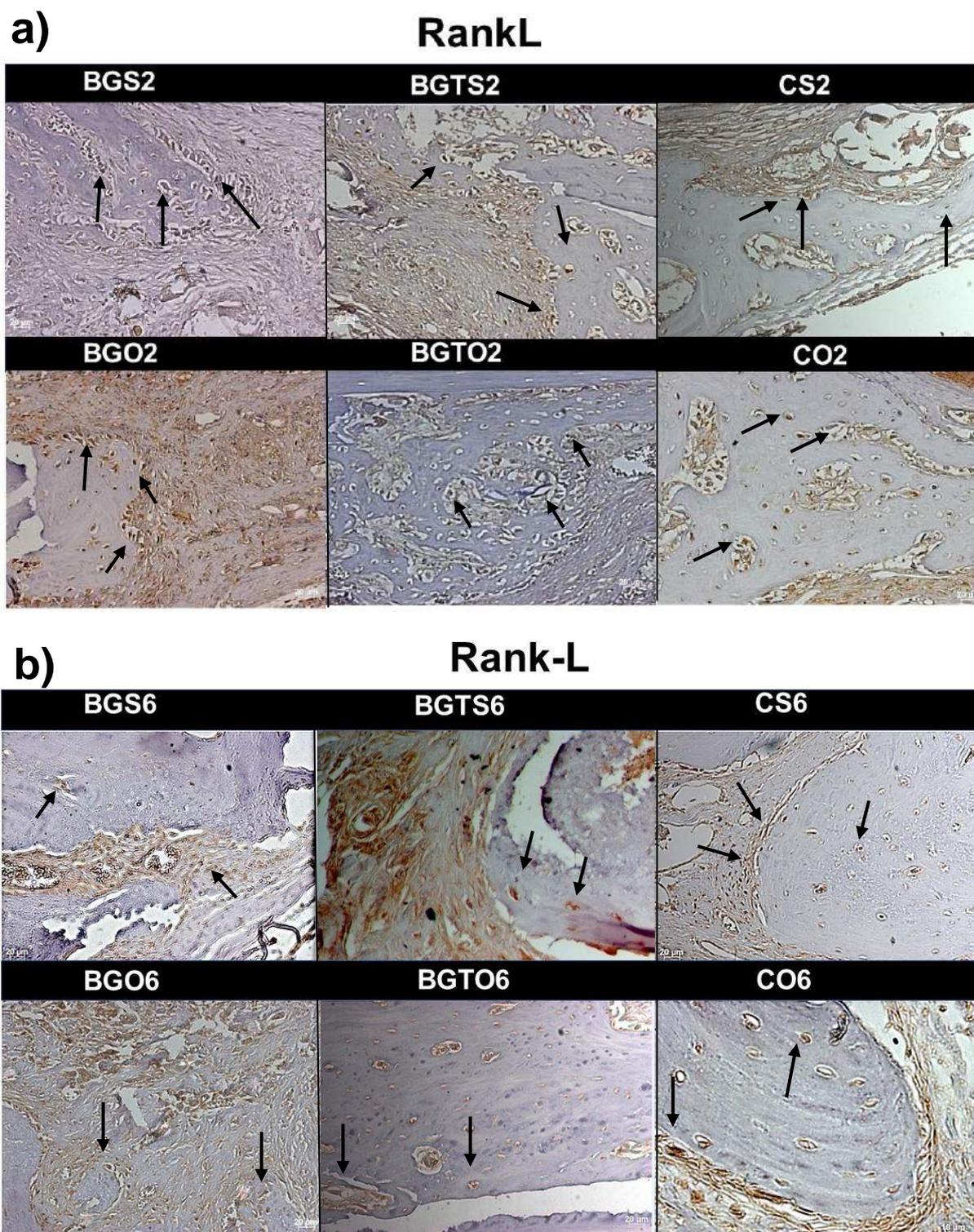
Figura 27- Teste ANOVA dois fatores para o biomarcador RANKL, tendo como variáveis os grupos analisados e o períodos. Valores de média e desvio padrão (\pm) de todos os grupos estão representados no gráfico



Legenda:Imunomarcção para RANKL: Gráfico demonstrando os valores em porcentagem da média e desvio padrão referente ao padrão de imunomarcção para o biomarcador RANKL no período de 2 semanas e 6 semanas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28- Fotomicrografias dos cortes histológicos com marcações positivas para o anticorpo policlonal RANKL referente a todos os grupos analisados



Legenda: Imunomarcção de RANK-L para os grupos a) no período de 2 semanas b) no período de 6 semanas pela análise imuno-histoquímica. Aumento original de 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A demanda por biomateriais que apresentem adequadas propriedades com relação ao tecido ósseo e que possam influenciar positivamente a regeneração deste, melhorando as propriedades biomecânicas e acelerando o processo de osteogênese tem sido cada vez maior. Isso se deve ao aumento da expectativa de vida na população mundial, bem como aos agravos de saúde relacionados a população senil. Os reparos ósseos podem sofrer a interferência de doenças crônicas associadas, o que dificulta a regeneração do tecido em diversas situações (Di Munno, Ferro, 2018; Zerbini et al., 2017). Uma das doenças pós-menopausa de maior prevalência no mundo é a osteoporose, sendo considerada um problema de saúde pública. Em grande parte, esta doença ocorre devido a deficiência de estrógeno (Raisz, 2005) acarretando um aumento na perda óssea (Li, Wang, 2018).

Um dos desafios mais importantes para o tratamento de lesões decorrentes da osteoporose é a baixa disponibilidade de fármacos com ação local, devido a isso os avanços recentes estimulam a combinação de biomateriais e drogas como uma estratégia para liberação dos fármacos localmente (Lisboa-Filho et al., 2018; Pilar et al., 2010). De acordo com Kyllonen et al. (2014) para a liberação e transporte da droga ativa pode-se usar partículas de tamanhos variados, sendo, portanto, a droga embutida, absorvida ou associada nessas partículas e assim ficando protegida da degradação do meio até a sua liberação. Em uma recente pesquisa de Mosqueira et al. (2020) os autores concluíram que a eficiência do carregamento do agente terapêutico Icariin em esferas de biovidro incorporado com íons estrôncio (Sr), bem como as taxas de liberação da medicação foram influenciadas principalmente pelo tamanho dos poros das partículas do biovidro, melhorando assim o potencial osteogênico das células mesenquimais da medula óssea obtidas de ratas com osteoporose.

Os biovidros são biomateriais interessantes para utilização em reparos ósseos, uma vez que são capazes de estimular a osteogênese e a angiogênese (Baino et al., 2018; Hoppe et al., 2001; Gorustovich et al., 2009), melhorar a adesão, proliferação, diferenciação de células tronco-mesenquimais em células osteoprogenitoras e aumentar a taxa de mineralização (Xynos et al., 2000). Além

disso, o biovidro tem como principal vantagem a capacidade de ligar-se ao tecido ósseo devido a formação de uma camada interfacial de fosfato de cálcio (Anderson et al., 1990,1991; Hench, 2006).

Como a compreensão da estrutura do biovidro está diretamente associada aos mecanismos de interação do material com o tecido, a investigação estrutural das partículas foi realizada por meio de diferentes testes de caracterização das amostras. Os resultados no MEV-FEG demonstraram alterações nas características físicas das partículas, nas quais os grupos funcionalizados apresentaram ângulos arredondados e tamanhos reduzidos em comparação a amostra de biovidro anterior ao processo de sonicação, sendo essas alterações resultantes do processo de funcionalização das amostras (Gomes-Ferreira et al., 2019). Enquanto, as análises de FTIR indicaram uma grande similaridade estrutural entre os grupos biovidro 45S5 e BG (Lee et al., 2020), o grupo BGT apresentou-se diferente, uma vez que exibiu bandas do grupo amida (1660 cm^{-1}), que é padrão da molécula do fármaco teriparatida (Bahari Javan et al., 2016) e diminuição na banda do grupo ligação não ponte de oxigênio (NBO). A formação da camada de hidroxicarbonato de apatita (HCA) na superfície do biovidro quando em contato com fluídos corporais ou meio aquoso deve ocorrer com a diminuição na quantidade de ligações NBO, devido à hidrólise do biovidro, processo que acarreta a formação de uma rede de sílica na área topográfica do material. As bandas NBO são necessárias para a dissolução do biovidro que resultará na formação de camada de hidroxicarbonato de apatita (HCA) na superfície do biovidro. Com o alto valor do pH local devido a dissolução do material, ocorre uma quebra das ligações ponte de oxigênio (BO), que causam a quebra da rede de sílica, a partir disso os grupos silanol ficam expostos na superfície do material (Fiume et al., 2018), nesse momento no processo sonoquímico, ocorre a incorporação do fármaco teriparatida na superfície do biomaterial, a qual é comprovada pela presença de bandas dos grupos amida nesse grupo, que substituem em parte as ligações NBO presentes na superfície do biovidro, sendo indicadores da incorporação do fármaco aos grupos silanol do biovidro (Mosqueira et al., 2020). Ao analisar os resultados do EDS pôde-se verificar que todos os grupos apresentaram a presença de Ca e P nessas amostras sugerindo a formação das fases de fosfato de cálcio. As amostras que foram funcionalizadas com o fármaco teriparatida exibiram picos de sódio (Na) como elemento principal, o hidróxido de

sódio é utilizado na fabricação do fármaco Fórtéo® para ajuste do pH (Fortéo® Colter Pen). Destaca-se ainda que partículas maiores tendem a formar áreas de heterogenicidade, podendo ocasionar falhas durante o processo de metalização para o EDS, que resultam em áreas com a ausência do metal ouro (Au), devido a esta característica das partículas do grupo biovidro 45S5 não foi observado o elemento químico ouro (Au) neste grupo.

De acordo com Cai et al. (2006) a carga elétrica e a adsorção de proteínas estão intimamente associadas à compreensão dos mecanismos de interação biológica dos biomateriais com o tecido. A análise do potencial zeta neste presente estudo foi realizada com o objetivo de verificar as propriedades elétricas superficiais dos biomateriais. Quanto maior o valor do potencial Zeta em módulo, maior é a estabilidade das partículas no meio. Neste estudo, o biovidro 45S5 e os grupos funcionalizados exibiram superfícies com diferentes propriedades de carga superficial, sendo que os grupos funcionalizados apresentaram maiores quantidades de grupos funcionais quando comparados ao grupo biovidro 45S5. Esta característica é importante porque fornece uma superfície propícia para a adesão celular resultando em maior adsorção de proteínas (Cai et al., 2006; Lin et al., 2011).

Ademais, para o desenvolvimento de um novo biomaterial a ser usado para regeneração tecidual deve-se garantir que ele não apresente potenciais efeitos tóxicos quando implantado no corpo e estimule a atividade e diferenciação celular. Neste presente estudo, foi utilizado o biovidro funcionalizado pela rota sonoquímica associado ou não ao fármaco teriparatida 10% para verificar o comportamento de osteoblastos quando em contato com amostras desses biomateriais, por meio de testes de citotoxicidade (MTT), conteúdo de proteínas totais, atividade de fosfatase alcalina, adesão celular e formação de nódulos de mineralização verificando a influência destes materiais nas células.

Os testes de citotoxicidade testam os efeitos das amostras na viabilidade das células cultivadas, sendo um preditor dos potenciais efeitos tóxicos ou não dos biomateriais (Stoddart, 2011). Os resultados do teste de MTT mostraram que todas as amostras foram biocompatíveis apresentando valores acima de 70% para as células viáveis nos dois períodos analisados baseado nas diretrizes da organização de padrões internacionais ISO-10993-5. Neste presente estudo, no período mais longo de cultura celular os grupos experimentais exibiram médias mais atenuadas

de viabilidade celular, estando de acordo com o recente estudo de Westhauser et al. (2019) no qual os autores avaliaram o biovidro 45S5 associado a *scaffolds* em células mesenquimais (MSC) e observaram diminuição na viabilidade celular em períodos mais longos.

Também foi possível observar que os grupos BG e BGT apresentaram maiores valores médios do conteúdo de proteínas totais em ambos os períodos quando comparados com o grupo controle. Já na quantificação de fosfatase alcalina (ALP), não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) intergrupo independente do período analisado. Baseado nestes resultados sugere-se que as células em contato com os materiais experimentais sintetizam diversas proteínas que compõem a matriz extracelular e não apenas a enzima fosfatase alcalina (ALP). Apesar da mensuração da ALP ser importante em estudos com células osteogênicas, já que é um dos marcadores mais confiáveis para diferenciação osteogênica (Reible et al., 2017). Tsigkou et al. (2009) demonstraram *in vitro* que as células-tronco-embrionárias de linhagem osteoblástica produzem e maturaram diversas proteínas importantes para a formação da matriz, como as proteínas extracelulares: fosfatase alcalina (ALP), sialoproteínas, colagenase I, osteopontina e osteocalcina, após a sua diferenciação celular.

A confirmação da diferenciação das células mesenquimais (MSCs) em células osteoblásticas nas amostras dos grupos experimentais e no grupo controle foi realizada por meio da quantificação de cálcio nos nódulos mineralizados, utilizando o corante vermelho de Alizarina S devido sua afinidade por áreas ricas em cálcio. Neste teste foi avaliado se houve ou não aceleração no processo de produção e calcificação da matriz celular, além de confirmada a diferenciação das células tronco-mesenquimais em osteoblastos, devido à produção de matriz mineralizada (Reible et al., 2017, 2018). No presente estudo o grupo BG apresentou maiores valores médios, diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$). Este resultado corrobora com o estudo de Rodrigues et al. (2019) no qual houve confirmação de que as células MSCs, na presença de Biovidro 45S5®, se diferenciaram em células osteoblásticas e produziram nódulos mineralizados. Também foi possível observar que grupo BGT apresentou menores valores médios na quantificação da formação dos nódulos de mineralização quando comparado ao grupo BG. A partir desse resultado pôde-se sugerir que devido a atuação do fármaco

teriparatida, um análogo do paratohormônio, envolver receptores celulares específicos em osteoblastos (Blick et al., 2008), a reprodução de estudos apenas *in vitro* foi dificultada (Roggia et al., 2001; Weitzmann, 2006).

Com o objetivo de investigar a capacidade de reparo do defeito crítico em calvária preenchido com biovidro 45S5 funcionalizado com teriparatida 10%, considerando que o biomaterial possa atuar positivamente na reparação óssea em condições de lesão óssea osteoporótica, para a análise *in vivo* foi realizado o procedimento de ovariectomia visando a supressão do hormônio estrógeno nestes animais. Esta metodologia já está estabelecida e resulta no aumento da perda óssea (Tao et al., 2017; Livizuto et al., 2010a; Weitzmann et al., 2002). Este resultado é devido à produção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) de células T e a produção de citocinas pró-osteoclásticas que induzem ao desacoplamento da formação óssea frente à reabsorção, isto é, a formação do osso não acompanha o ritmo abundante da reabsorção do mesmo (Weitzmann et al., 2002; Weitzman, Pacifi, 2005). Em estudos *in vivo*, o sucesso da ovariectomia pode ser confirmado por alterações no ciclo estral do animal (Hao et al., 2016), utilizando-se a citologia esfoliativa como método de detecção na alteração da morfologia celular durante esse ciclo no animal ovariectomizado (Livizuto et al., 2010a; Ramalho-Ferreira et al., 2016). Neste presente estudo, o ciclo estral foi avaliado e foi possível observar nos esfregaços vaginais realizados que todas as ratas ovariectomizadas permaneceram em fase diestro, confirmando a alteração hormonal. De acordo com Livizuto et al. (2010a) a permanência do animal nessa fase caracteriza a presença de um estado hormonal compatível com hipostrogenismo. O modelo de rata ovariectomizada é um modelo de perda óssea induzida, que ocorre precocemente nessas condições, sendo assim este modelo de ratas castradas induz um quadro osteopênico (Kalu, 1991). A calvária foi o local de eleição para a confecção do defeito crítico, devido à possibilidade de implantação e retenção de biomateriais em pó, sem o uso de fixadores adicionais (Egerman et al., 2005; Spicer et al., 2012).

Na análise histológica descritiva no período de 2 semanas não foi observado o fechamento do defeito crítico em nenhum grupo, também foi possível observar a presença de poucas células inflamatórias e nos animais que receberam o grupo BGT observou-se grande quantidade de tecido de granulação, sugerindo que

os produtos de dissolução do biovidro e a influência de teriparatida no defeito crítico foram capazes de aumentar o recrutamento celular. Contudo, para um material se tornar promissor para ser indicado para a regeneração de tecido espera-se que após esse recrutamento ocorra uma degradação gradual do biomaterial com a substituição pelo tecido de origem (Huebsch, Mooney, 2009). Nos cortes histológicos obtidos observou-se também a presença do biomaterial principalmente nas áreas de extremidade do defeito. Além disso, no período de 2 semanas, a presença de tecido ósseo neoformado também ocorreu principalmente nas regiões do coto do defeito, observando grande quantidade de vasos sanguíneos e fibroblastos jovens nos grupos experimentais. Estes resultados estão de acordo com o estudo prévio de Day et al. (2004) no qual os autores relataram que o 45S5 Bioglass® promoveu aumento da secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) *in vitro* e aumento da vascularização *in vivo*, sugerindo que *scaffolds* contendo Bioglass® podem estimular a neovascularização, gerando efeitos benéficos para grandes construções de engenharia de tecidos. No período de 6 semanas, nos cortes histológicos foi possível observar que grande parte do biomaterial já havia sido reabsorvido. Entretanto, o defeito crítico não havia regenerado por completo e as áreas de neoformação permaneceram evidentes nas extremidades dos defeitos em todos os grupos. Esse resultado é semelhante ao relatado no estudo de Auersvald et al. (2017) no qual foram realizados defeitos críticos em calvária de ratos, utilizando como biomaterial de preenchimento esponjas de colágeno embebidas com 20 µm de teriparatida para a avaliação da atuação local do fármaco por meio de análises de microtomografia computadorizada, histologia e histomorfometria, avaliando dois períodos de eutanásia, de 15 e 60 dias. Em ambos os períodos, os autores relataram que o osso neoformado ficou restrito aos limites do defeito, não apresentando fechamento do mesmo.

Na análise histomorfométrica intergrupo no período de 2 semanas, os grupos não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Contudo, ressalta-se que o grupo BGTO e BGTS apresentaram valores médios mais elevados quando comparados aos grupos BGO e BGS, embora sem diferença estatística ($p > 0,05$). Estudos demonstraram que o uso local da teriparatida de forma intermitente e subcutânea, resultou no aumento da quantidade de tecido ósseo neoformado (Kubota et al., 2018b; Gomes-Ferreira et al., 2020). Ozer et al. (2019) também abordaram o uso

local de teriparatida com xenoenxertos em coelhos nos períodos de 4 e 8 semanas, Os autores verificaram que em ambos períodos, o grupo com a presença do fármaco apresentou maiores valores médios de neoformação óssea, porém, sendo maior no período de 8 semanas. No período de 4 semanas na área do defeito observava-se material com o fármaco e regiões de interconectividade das trabéculas ósseas principalmente nas bordas do defeito, sendo o tecido conjuntivo frouxamente colagenizado, semelhante ao que foi observado em nosso estudo. É de inferir que o osso calvarial apresenta um processo de cicatrização mais lento quando comparado ao osso esponjoso, isso se deve ao fato de que a calvária apresenta menor suprimento sanguíneo e menor quantidade de osso medular (Kadiroğlu et al., 2019). No presente estudo, no período de eutanásia de 2 semanas também sugere-se que devido ao alto peso molecular do fármaco teriparatida ocorreu um atraso em sua liberação total e isso pode ter prejudicado a farmacocinética. (Kyllönen et al., 2014; Malik et al., 2007). Na análise histomorfométrica intergrupo no período de 6 semanas, a área neoformada foi maior no grupo BGTO6, mas não diferiu estatisticamente dos demais grupos do mesmo período ($p>0,05$). Quando foi realizada a comparação intergrupo nos períodos de 2 semanas e 6 semanas, observou-se que o grupo BGTO6 diferiu estatisticamente de todos os grupos experimentais no período de 2 semanas ($p<0,05$), apresentando um aumento significativo na formação óssea na área do defeito, confirmando assim que os ossos de calvária osteoporóticos são altamente responsivos metabolicamente ao tratamento com teriparatida (Moore et al., 2010). Diante disso, é possível sugerir que ao avaliar a neoformação do tecido em períodos mais longos é possível observar a liberação total do fármaco e maior tempo de atuação deste no local do reparo. Essa liberação lenta e intermitente que ocorre devido a funcionalização do fármaco no biovidro é interessante, uma vez que estudos prévios demonstraram que doses intermitentes são eficazes para a função anabólica do fármaco (Gomes Ferreira et al., 2020; Ohata et al., 2015; Aleksyniene et al., 2009).

Para investigar a participação de citocinas e proteínas no processo de reparo ósseo foram realizadas as análises imuno-histoquímicas de RANKL e osteocalcina (OC). Vale ressaltar que a interação de RANKL com RANK em células precursoras de osteoclastos aumenta o recrutamento e ativação de dessas células (Zhou et al., 2013), sendo o RANKL promotor da diferenciação de precursores de

osteoclastos em osteoclastos multinucleados (D'Amelio, 2013). Essa avaliação foi realizada devido aos efeitos da deficiência do estrógeno no metabolismo do osso, que além de envolverem o estímulo e repressão de genes, como interleucina 7 (IL-7), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento de colônias de macrófagos (M-CSF) (Almeida et al., 2017; Tyagi et al., 2012; Weitzmann, 2006, 2017), também implica no aumento significativo de fator de necrose tumoral (TNF) na medula óssea (Cenci et al., 2000). O TNF aumenta a reabsorção óssea induzida por RANKL, acarretando conseqüentemente no aumento da perda óssea (Weitzmann, Pacifici, 2006). O biomarcador anti-RANKL reconhece a forma solúvel e a forma transmembrana não clivada da molécula de RANKL, portanto houve a marcação de células de revestimento do tecido ósseo, de osteoblastos e osteócitos positivos para RANKL (Abcam). Os resultados deste trabalho indicam que as células presentes nos defeitos ósseos calvariais de todos os grupos foram positivas para RANKL, sendo que o grupo CO2 apresentou valores médios maiores que o grupo CS2. Isso era esperado uma vez que ossos osteoporóticos sofrem maior reabsorção óssea quando comparados a ossos de animais normais (Aldini et al., 2002; Puttini et al., 2018; Weng et al., 2018). No período de 6 semanas observou-se que todos os grupos apresentaram diminuição dos valores médios da porcentagem de células marcadas por RANKL em comparação ao período de 2 semanas, com exceção do grupo CS6, isso pode estar relacionado com o fato de que a expressão de marcadores ósseos pode não ser alterada pela deficiência de estrógeno, apresentando interferência apenas do biomaterial avaliado (Tera et al., 2014).

A imunoexpressão de osteocalcina (OC) foi em geral mais evidente no período mais tardio (6 semanas) de neoformação óssea em todos os grupos. A OC é uma proteína não colágena que participa da maturação da parte mineral do osso e estabelece um estudo de maturidade das células osteoblásticas, sendo um marcador dos estágios tardios da diferenciação dos osteoblastos (Boskey, 1998; Hauschka et al., 1983; Tsigkou et al., 2009). Esse resultado está de acordo com o estudo recente de Oliveira et al. (2018) que apresentou resultados semelhantes com imunomarcação mais evidente em períodos mais tardios da reparação tecidual óssea. A atuação do fármaco na resposta celular nos grupos OVX foi favorável, pois no período de 6 semanas observou-se semelhança nos valores médios de

porcentagem de células imunomarcadas para OC no grupo BGTO quando comparado ao grupo com o mesmo biomaterial no grupo Sham (BGTS), considerando que o grupo OVX apresenta deficiência no reparo ósseo, houve um aumento na marcação de células relacionadas a mineralização da matriz quando comparado o grupo BGTO6 aos grupos CO6 e BGO6, evidenciando que o tratamento com o fármaco foi capaz de aumentar a secreção dessa proteína não-colágena pelos osteoblastos melhorando assim a atividade osteogênica. Embora, resultados favoráveis para os grupos BGT foram observados tanto nos grupos Sham quanto ovariectomizados, o grupo Sham apresentou resultados médios maiores em todos os grupos quando comparados ao grupo OVX. Esse resultado pode ser comparável ao observado no estudo de Luvizuto et al. (2010b) no qual a avaliação do reparo ósseo em alvéolo de ratas ovariectomizadas apresentaram valores médios inferiores aos observados no grupo Sham mesmo nos animais tratados com raloxifeno e estrogênio. Outro aspecto importante foi a correlação com os resultados das análises histomorfométricas e histológicas, que sugeriram maior neoformação óssea nos grupos experimentais contendo o fármaco nos animais ovariectomizados, isso é confirmado pelo aumento de marcação de OC nesse grupo no período de 6 semanas ao compará-lo ao período de 2 semanas.

Em suma, em nosso estudo, os resultados dos testes *in vitro* reiteram que os grupos experimentais foram favoráveis para a diferenciação de células indiferenciadas de ratas ovariectomizadas em células osteogênicas. Ademais, no estudo *in vivo*, sugere-se, que tempos mais longos de avaliação são necessários para a verificação da formação de um tecido ósseo mais maduro e que apesar disso, o biomaterial apresentou-se como um material promissor na utilização em reparo ósseo de animais ovariectomizados.

6 CONCLUSÃO

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

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A — Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José dos Campos



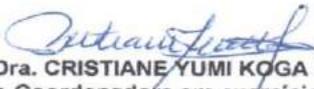
Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos
UNESP

CERTIFICADO CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 10/2019, intitulado:- "Influência da funcionalização do biovidro, preparado pela rota sonoquímica, com fármaco teriparatida 10% na resposta celular:- In vitro e in vivo." sob a responsabilidade de LUANA MAROTTA REIS DE VACONCELLOS, tendo como colaboradores:- Juliani Caroline Ribeiro de Araújo e Leonardo Álvares Sobra Silva; e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 09/08/2019.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	09/08/2019 a 31/08/2020	
Espécie/linhagem/raça	Ratas Wistar	
Nº de Animais	75 ratas	
Peso/Idade	90 dias ? 350 grs.	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP	

São José dos Campos, 09 de agosto de 2018


Prof. Dra. **CRISTIANE YUMI KOGA ITO**
Vice-Coordenadora em exercício

