

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

RENATO DE MORAES

Viabilidade dos enxertos de matrizes de colágeno associado a nanohidroxiapatita e elastina no reparo ósseo frente a condição experimental de ovariectomia

SÃO CARLOS

2023

RENATO DE MORAES

Versão Corrigida

Viabilidade dos enxertos de matrizes de colágeno associado a nanohidroxiapatita e elastina no reparo ósseo frente a condição experimental de ovariectomia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha

São Carlos

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP

M827v Moraes, Renato de
Viabilidade dos enxertos de matrizes de colágeno associado a nanohidroxiapatita e elastina no reparo ósseo frente a condição experimental de ovariectomia / Renato de Moraes ; orientador Marcelo Rodrigues da Cunha ; coorientadora Ana Maria de Guzzi Plepis. -- São Carlos, 2024.

Tese (Doutorado)- Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Colágeno. 2. Elastina. 3. Hidroxiapatita. 4. Polímeros. 5. Osteoporose. I. Título.



FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Renato de Moraes

TÍTULO: "Viabilidade dos enxertos de matrizes de colágeno associado a nanohidroxiapatita e elastina no reparo ósseo frente a condição experimental de ovariectomia"

Data da defesa: 04/12/2023

Comissão Julgadora	Resultado
Prof(a). Dr(a). Marcelo Rodrigues da Cunha Faculdade de Medicina de Jundiaí - FMJ -- Orientador	<u>Não votante</u>
Prof(a). Dr(a). Ana Maria de Guzzi Plepis Instituto de Química de São Carlos - IQSC/USP	<u>Aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Itibagi Rocha Machado Faculdade de Medicina de Jundiaí - FMJ	<u>Aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Marcelo de Azevedo e Souza Munhoz Faculdade de Medicina de Jundiaí - FMJ	<u>Aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Rogério Leone Buchaim Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP	<u>Aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior Universidade Federal do ABC	<u>Aprovado</u>

Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Bioengenharia: Prof. Dr. Adair Roberto
Aguilar

DEDICATÓRIA

À família

É com imenso prazer que dedico esse momento para expressar minha gratidão a cada um de vocês por seu apoio inabalável ao longo desta jornada. Esta conquista não teria sido possível sem o amor, a compreensão e o incentivo que vocês me proporcionaram.

À minha esposa Ana Paula, pelo apoio incondicional, amor e companheirismo. Agradeço por desfrutar do seu convívio e presença em minha vida.

Agradeço aos meus filhos Anita e João, que sempre trouxeram alegria aos meus dias e me lembraram do propósito por trás de todo o esforço.

Aos meus pais Roberto (In memoriam), e Zilda (In memoriam), pelo incentivo e custeio da minha formação acadêmica e profissional. Agradeço pelas orientações, que desde cedo me ensinaram a importância da educação e do trabalho e pelo exemplo que moldou a formação do meu caráter.

Ao meu irmão Roberto, pela presença nos bons momentos e especialmente nos mais difíceis da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Itibagi Rocha Machado, pela marcante presença em minha formação profissional e pessoal. Sempre estimulou o conhecimento e qualificação acadêmica. Agradeço a oportunidade de conviver e desfrutar da sua amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha, meu orientador, o qual me direcionou na execução do trabalho com empenho, dedicação, simpatia e amizade.

À Profa. Dra Ana Maria de Guzzi Plepis e Dra. Virgínia da Conceição Amaro Martins do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, campus São Carlos, pela cooperação, esclarecimentos e o desenvolvimento dos biomateriais deste trabalho.

À diretoria da Faculdade de Medicina de Jundiaí, representada pelo Prof. Dr. Evaldo Marchi, pelo suporte técnico e apoio a pesquisa.

Aos colegas Marcelo Munhoz, Eduardo Machado, Fernando Cunha e Rodrigo Alves Beraldo, pelo apoio e incentivo a elaboração desse trabalho.

Ao colega Ewerton Alexandre Galdeano pela grande colaboração no desenvolvimento e realização desta pesquisa.

RESUMO

MORAES, R. **Viabilidade dos enxertos de matrizes de colágeno associado a nanohidroxiapatita e elastina no reparo ósseo frente a condição experimental de ovariectomia.** 2023. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023

As lesões ósseas apresentam capacidade de regeneração em condições normais do osteometabolismo. Entretanto, devido a incidência cada vez maior de traumas de grande magnitude e doenças causadoras da deficiência mineral óssea tal como a osteoporose, são necessários *scaffolds* que possam auxiliar no processo de regeneração óssea. Atualmente, destacam-se os *scaffolds* poliméricos naturais e as nanopartículas bioativas. Objetivo: Avaliar o potencial osteorregenerativo em tíbias de ratas saudáveis e ovariectomizadas, de *scaffolds* de colágeno mineralizados com nanohidroxiapatita (nHA) e associados à elastina. Materiais e Métodos: O estudo experimental *in vivo* contou com 60 ratas Wistar com 20 semanas de idade e distribuídas em grupos não ovariectomizados (NO) e ovariectomizados (O), sendo: Controles (G1-NO-C e G4-O-C); Scaffold de colágeno com nHA (G2-NO-MSH e G5-O-MSH); Scaffold de colágeno com nHA e elastina (G3-NO-MSHC e G6-O-MSHC). Os animais foram sacrificados após 6 semanas de pós-operatório e as amostras foram analisadas por macroscopia, radiologia e histomorfometria. Testes ANOVA e Tukey foram realizados com IC 95% e índice de significância $p < 0.05$. Resultados: As análises revelaram biocompatibilidade, biodegradabilidade controlada e osteocondutividade de ambas as matrizes (MSH e MSHC), tanto nas ratas com condições normais do osteometabolismo, quanto nas ratas com deficiência gonadal e demonstraram potencial osteogênico superior quando comparado aos grupos controles. Não houve diferença significativa da taxa de neoformação óssea entre os *scaffolds*. A osteoporose não exacerbou a resposta imunológica, mas influenciou negativamente o processo de reparação do defeito ósseo.

Palavras-chave: Colágeno. Elastina. Hidroxiapatita. Polímeros. Osteoporose.

ABSTRACT

MORAES, R. **Viability of collagen matrix grafts associated with nanohydroxyapatite and elastin in bone repair under the experimental condition of ovariectomy.** 2023. Tese (Doutorado) - Interunit Bioengineering Postgraduate Program, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

Bone lesions have the capacity for regeneration under normal conditions of osteometabolism. However, due to the increasing incidence of major traumas and diseases that cause bone mineral deficiency, such as osteoporosis, aids that can assist in the bone regeneration process are necessary. Currently, natural polymeric scaffolds and bioactive nanoparticles stand out. Objective: To evaluate the osteoregenerative potential in tibias of healthy and ovariectomized rats, of collagen scaffolds mineralized with nanohydroxyapatite (nHA) and associated with elastin. Methods: The in vivo experimental study was carried out with 60 Wistar rats aged 20 weeks and distributed into non-ovariectomized (NO) and ovariectomized (O) groups, being: Controls (G1-NO-C and G4-O-C); Collagen scaffold with nHA (G2-NO-MSH and G5-O-MSH); Collagen scaffold with nHA and elastin (G3-NO-MSHC and G6-O-MSHC). The animals were sacrificed 6 weeks after surgery and the samples were analyzed by macroscopy, radiology and histomorphometry. The ANOVA and Tukey tests were performed with 95% CI and significance index $p < 0.05$. Results: The analyzes revealed biocompatibility, controlled biodegradability and osteoconductivity of both matrices (MSH and MSHC), both in rats with normal osteometabolism conditions and in rats with gonadal deficiency and demonstrated superior osteogenic potential when compared to control groups. There was no significant difference in the rate of new bone formation between the scaffolds. Osteoporosis did not exacerbate the immune response, but it did influence the process qualities of bone defect parts.

Keywords: Collagen. Elastin. Hydroxyapatite. Polymers. Osteoporosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Planejamento experimental com 60 ratas Wistar	42
Figura 2 - Procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral (A, B e C); Abordagem cirúrgica após 12 semanas para criação do defeito crítico na tíbia esquerda (D, E e F) das ratas Wistar de G1 a G6. (LO) Ovário esquerdo; (UH) Tuba uterina; (S) Sutura; (BD) Defeito ósseo crítico; (M) Matrizes poliméricas.....	44
Figura 3 - Demonstração dos cortes transversais realizados na área da lesão para obtenção das lâminas histológicas para análise do reparo ósseo. Região proximal (A), média (B) e distal (C) da falha óssea. Ampliação 4X.....	47
Figura 4 - Software utilizado na morfometria do volume ósseo formado no defeito. Nota-se a linha demarcatória (amarela) da neoformação óssea na área analisada.....	48
Figura 5 - Grupos de ratas não ovariectomizadas à esquerda (G1 a G3) e grupos de ratas ovariectomizadas à direita (G4 a G6). (A) Imagens macroscópicas in vivo; (B) Imagens macroscópicas das tíbias dissecadas; (C) Imagens radiológicas. As setas indicam a área do defeito ósseo crítico.	52
Figura 6 - Fotomicrografias com Tricrômico de Masson dos grupos não ovariectomizados à esquerda (G1-NO-C, G2-NO-MSH e G3-NO-MSHC) e grupos ovariectomizados à direita (G4-O-C, G5-O-MSH e G6-O-MSHC). Setas pretas indicam os focos de neoformação óssea; Setas amarelas indicam a presença de tecido conjuntivo frouxo; Asterisco (*) indica a presença dos <i>scaffolds</i> . Aumentos de 10 vezes	55
Figura 7 - Fotomicrografias com Picrosírius Red dos grupos não ovariectomizados à esquerda (G1-NO-C, G2-NO-MSH e G3-NO-MSHC) e grupos ovariectomizados à direita (G4-O-C, G5-O-MSH e G6-O-MSHC). Setas pretas indicam os focos de neoformação óssea; Setas amarelas indicam a presença de tecido conjuntivo frouxo; Asterisco (*) indica a presença dos <i>scaffolds</i> . Aumentos de 10 vezes	56
Figura 8 - Diagrama do volume percentual de osso neoformado para os grupos sadios e ovariectomizados e respectivas diferenças estatísticas. Os resultados estatísticos demonstrados na cor preta, demonstram as análises intergrupos sadios e intergrupos ovariectomizados. Os resultados estatísticos demonstrados na cor verde, demonstram as análises comparativas entre grupos homólogos. Índice de significância $p < 0.05$. (ns) Não significativo.....	58

Figura 9 - Fotomicrografias digitais das matrizes: (A) MSH 500x; (B) MSH 6000x; (C) MSHC 500x; (D) MSHC 6000x.	86
Figura 10 - Histogramas dos tamanhos de poros das matrizes: A) MSH; B) MSHC.....	87
Figura 11 - Porcentagem de absorção de PBS para: (■) MSH; (▲) MSHC	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Denominação das matrizes	85
Tabela 2 - Tamanhos de poros das matrizes	87
Tabela 3 - Porcentagem de absorção de PBS.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARRIVE – Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments

Asn - asparagina

BD - Defeito ósseo crítico

BMPs - *Bone Morphogenetic Protein* (Proteína Morfogenética Óssea)

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ – Fórmula da hidroxiapatita

Ca²⁺ - Cálcio

cm – Centímetro

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELPs - Elastin-like peptides

g – Grama

G1-NO-C – Grupo um de ratas não ovariectomizadas com defeito na tíbia e sem enxerto /

Controle não ovariectomizadas

G2-NO-MSH – Grupo dois de ratas não ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com matrizes de colágeno/nanohidroxiapatita

G3-NO-MSHC -Grupo três de ratas não ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com matrizes de colágeno/nanohidroxiapatita e associada a elastina

G4-O-C – Grupo quatro de ratas ovariectomizadas com defeito na tíbia e sem enxerto / Controle ovariectomizadas

G5-O-MSH – Grupo cinco de ratas ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com matrizes de colágeno/nanohidroxiapatita;

G6-O-MSHC – Grupo seis de ratas ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com matrizes de colágeno/nanohidroxiapatita associada com elastina.

GBR – Guided Bone Regeneration

Gln - glutamina

Gly – Glicina

h – Horas

HA – Hidroxiapatita

HAc - Ácido acético

ICB-USP - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

K⁺ - Potássio

kV – quilovoltagem

LO - Ovário esquerdo

M - Matrizes poliméricas

mA – Miliamperes

mbar – Milibares

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/kg – miligramas por quilo

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mol – Massa molar

MSH – Matriz de colágeno com nanohidroxiapatita

MSHC - Matriz de colágeno com nanohidroxiapatita e associada a elastina

Na⁺ - Sódio

NC3Rs - National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research

nHA – Nanohidroxiapatita

nm – Nanômetro

NO – Não ovariectomizado

ns - Não significativo

O – Ovariectomizado

PBS - Cinética de absorção em tampão fosfato salino

pH – Potencial hidrogeniônico

Pro – Prolina

S – Sutura

SIS - Serosa do intestino suíno

Td - Temperatura de desnaturação

TGF-beta1

UH - Tuba uterina

USP – Universidade de São Paulo

Val – Valina

X – vezes

Xaa – Xantina

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Percentual

°C – Graus Celsius

μm – Micra

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1 Osteoporose	30
1.2 Biomateriais	32
1.2.1 Colágeno.....	32
1.2.2 Elastina	34
1.2.3 Hidroxiapatita	36
1.3 Associação de biomateriais.....	37
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3 MÉTODOS.....	41
3.1 Obtenção dos biomateriais.....	41
3.2 Planejamento experimental.....	41
3.3 Técnica cirúrgica.....	42
3.3.1 Ovariectomia bilateral.....	42
3.3.2 Procedimento para realização da falha óssea tibial.....	43
3.3.3 Sutura dos tecidos e medicação	44
3.4 Controle pós-operatório	45
3.5 Morte indolor induzida dos animais e preparo dos materiais para análise.....	45
3.6 Análise das peças.....	45
3.6.1 Análise macroscópica.....	45
3.6.2 Análise radiográfica	45
3.6.3 Processamento histológico das amostras da área cirúrgica	46
3.6.4 Análise histológica por microscopia de luz transmitida (óptica)	46
3.6.5 Análise histológica por microscopia de luz polarizada	47
3.6.6 Análise morfométrica da neoformação óssea da área cirúrgica.....	47
3.6.7 Análise Estatística	49
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Análise macroscópica e radiológica do defeito ósseo	51
4.2 Análise morfológica da área do defeito ósseo	52
4.3 Análise histomorfométrica e estatística do volume ósseo neoformado na área do defeito ósseo.	57
5 DISCUSSÃO.....	59

5.1 Modelo experimental.....	59
5.1.1 Modelos de Osteoporose.....	59
5.1.2 Modelos de defeito ósseo.....	61
5.2 Compatibilidade dos biomateriais.....	61
5.3 Reabsorção	64
5.4 Caracterização da osteorregeneração.....	65
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS.....	84
ANEXO A – Obtenção, processamento e caracterização das matrizes	84
ANEXO B - Protocolo CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais.....	90

1. INTRODUÇÃO

A crescente incidência de traumas graves decorrentes de acidentes de trânsito e lesões por armas de fogo, resultam em situações clínicas apresentando grande cominuição e perda de massa óssea, desafiando assim o processo natural do reparo ósseo. Além disso, outras condições como infecções ósseas, ressecções tumorais, doenças congênitas, revisões de artroplastias, além de situações com osteoporose associada; exigem abordagens terapêuticas efetivas, necessitando assim a utilização de enxertos ósseos para a recuperação anatômica e funcional do osso comprometido (ORYAN *et al.*, 2014; WANG; YEUNG, 2017).

O tecido ósseo é um dos tecidos mais transplantados no mundo, ficando atrás apenas do sangue. Anualmente, cerca de 2,2 milhões de procedimentos de enxertia óssea são realizados por cirurgiões ao redor do mundo, sendo que somente nos Estados Unidos esse número chega a 500 mil e tem uma projeção de aumento de 13% ao ano (KINACI; NEUHAUS; RING, 2014; LOBB; DEGEORGE; CHHABRA, 2019).

O enxerto ósseo é um material implantável que pode promover a consolidação óssea por si só ou em combinação com outros materiais. Ele pode atuar através da osteogênese, osteoindução e osteocondução, de forma conjunta ou isolada. Historicamente, essas propriedades são consideradas essenciais para promover a consolidação óssea (BALDWIN *et al.*, 2019). A osteogênese é a capacidade de formação óssea pela presença de células osteogênicas no enxerto. A osteoindução ocorre pela presença de fatores pró-osteogênicos, que estimulam a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e osteoprogenitoras em osteoblastos. Já a osteocondução é a propriedade do enxerto de servir como um arcabouço para a proliferação celular e formação de osso novo (CALCEI; RODEO, 2019; NAUTH *et al.*, 2015).

Existem quatro tipos de enxertos ósseos com base em sua origem: autólogos, homólogos, heterólogos e enxertos sintéticos. O autólogo é considerado o mais efetivo devido às suas propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, que são essenciais para a formação, crescimento e regeneração óssea. Além disso, esse tipo de enxerto não apresenta risco de transmissão de doenças ou reações de histocompatibilidade (BUZA; EINHORN, 2016; JAHAN; TABRIZIAN, 2016). No entanto, o uso do enxerto autólogo é limitado devido à sua pouca disponibilidade, e ainda a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico, bem como os riscos de infecções e lesões neurovasculares na área doadora, e tais circunstâncias desestimulam o uso habitual deste tipo de enxerto (DIMITRIOU *et al.*, 2011). Da mesma forma,

a utilização de enxertos homólogos e heterólogos, apesar da maior disponibilidade, não estão imunes a complicações e limitações, incluindo a transmissão de doenças, reação imunológica e ausência de capacidade osteogênica (HAUGEN *et al.*, 2019). Todos os enxertos naturais acima mencionados apresentam desvantagens peculiares, que limitam seu uso em grande escala. Assim, o aprimoramento de novos biomateriais naturais ou sintéticos, capazes de mimetizar o processo biológico de reparo ósseo faz-se necessário. Desse modo, a engenharia tecidual através do desenvolvimento de *scaffolds* vem melhorando o ambiente para proliferação e adesão celular.

Na composição dos *scaffolds* destacam-se os polímeros naturais, entre eles o colágeno e a elastina, que apresentam biocompatibilidade, biorreabsorção e estrutura tridimensional semelhantes, e ainda são capazes de melhorar as suas propriedades mecânicas e biológicas através de modificações químicas e/ou enzimáticas (JAHAN; TABRIZIAN, 2016; MIRANDA-NIEVES; CHAIKOF, 2017; TEJEDA-MONTES *et al.*, 2014). Além disso, a adição de um biomaterial sintético cerâmico à esses *scaffolds* constituídos de blendas poliméricas naturais tem sido utilizada em trabalhos experimentais para reparo ósseo (BERTOLO; MARTINS; PLEPIS, 2019; MUNHOZ *et al.*, 2018). A hidroxiapatita na forma de partículas nanométricas é similar a parte óssea mineral do tecido ósseo, e através do conceito de biomimetismo, promove um arcabouço mais apropriado para a adesão e proliferação celular dos *scaffolds* (ELHENDAWI *et al.*, 2014).

Mesmo com o desenvolvimento de novos biomateriais na promoção da consolidação óssea, alguns trabalhos demonstram que a presença de fatores e doenças relacionados a baixa densidade óssea podem afetar a efetividade desses materiais, comprometendo sua capacidade de neoformação óssea. Com isso, a continuidade de trabalhos envolvendo *scaffolds* poliméricos em situações de baixa densidade óssea se faz necessária (HONG; KIM; YEO, 2022; OZAWA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2018b).

1.1 Osteoporose

A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por redução da massa óssea e alterações em sua microestrutura. Está associada a um desequilíbrio entre a reabsorção óssea ocasionada pelos osteoclastos e a formação óssea produzida pelos osteoblastos, comumente associada à deficiência estrogênica em mulheres menopausadas. Este desequilíbrio celular provoca um aumento da fragilidade óssea com consequente aumento do

risco de fraturas por traumas de baixa energia (ZHANG *et al.*, 2018b).

A osteoporose é considerada a doença osteometabólica mais frequente (BARTL; BARTL, 2019), acometendo cerca de 200 milhões de pessoas ao redor do mundo (RADOMINSKI *et al.*, 2017) e no Brasil estima-se uma prevalência de 10 milhões de pessoas com a doença (MORAES *et al.*, 2014). Dados da *National Osteoporosis Foundation* (NOF) indicam que no mundo a osteoporose está ligada diretamente a uma fratura a cada 3 segundos, a cada 22 segundos uma fratura de vértebra e a cada 3,3 min uma fratura de quadril (VAN STAA *et al.*, 2001). Com isso cerca de 50% das mulheres acima de 50 anos terá fratura relacionada à osteoporose ao longo da vida e entre os homens essa relação será de 20% (KANIS, 2007). Estudos nacionais apontam uma incidência de 40,3/1000 pessoas/ano de fraturas vertebrais em mulheres acima de 65 anos (DOMICIANO *et al.*, 2014). Dados epidemiológicos demonstraram que as fraturas proximais do fêmur levam a 20% de mortalidade em 12 meses, incapacidade funcional permanente em 30% e incapacidade de caminhar em 40% dos indivíduos (SONGPATANASILP *et al.*, 2016). Além do problema de saúde pública, os custos despendidos com os procedimentos relacionados à osteoporose são relevantes. Levantamento realizado por Moraes *et al.* (2014), através dos dados do SUS no triênio 2008 - 2010, demonstraram gastos aproximados a R \$300 milhões (MORAES *et al.*, 2014).

A osteoporose pode ser dividida em primária e secundária, sendo a primeira subdividida em tipo I e tipo II. A tipo I é conhecida como osteoporose pós menopausa em que ocorre uma perda óssea potente em idade precoce devido a forte ação dos osteoclastos. A osteoporose primária do tipo II é relacionada ao processo natural de envelhecimento, sendo o processo de perda óssea mais lento e gradual, provavelmente por ação deficiente dos osteoblastos. Já a osteoporose secundária é decorrente de patologias que levam a alteração do metabolismo do cálcio e/ou hormônios sexuais femininos (LEDER; WEIN, 2020). Exemplos são neoplasias, doenças renais, alterações da tireoide, doenças inflamatórias crônicas, doenças reumatológicas e autoimunes (BARTL; BARTL, 2019).

A osteoporose relacionada à menopausa decorre em consequência da diminuição dos níveis de estrogênio. A deficiência desse hormônio leva a um aumento na taxa de reabsorção óssea, levando a um desequilíbrio em relação a formação, com consequente redução da massa óssea. Há uma maior diferenciação de células da linhagem osteoclástica associada ao decréscimo na diferenciação da linhagem osteoblástica. O déficit estrogênico ainda diminui a absorção intestinal do cálcio, bem como o número de receptores para vitamina D (CAULEY, 2015).

Estudos sugerem que células de ossos osteoporóticos possuem proliferação

osteoblástica diminuída, resposta reduzida a sinalização celular com menor produção de TGF-beta1 e maior de interleucina 6 se comparado a osteoblastos de ossos não osteoporóticos (TORRICELLI *et al.*, 2002). Além disso, o número de células mesenquimais indiferenciadas com potencial osteogênico decresce em ossos osteoporóticos, bem como a composição e estrutura do colágeno (PASCHALIS *et al.*, 2004). Considerando que a qualidade do osso receptor é um fator relevante a ser considerado na utilização de biomateriais para promoção da consolidação óssea, os dados referidos anteriormente corroboram com o resultado de estudos que demonstraram que a rarefação óssea é um fator que dificulta a regeneração óssea, bem como a osteointegração dos biomateriais utilizados (DEREKA *et al.*, 2018; FINI; GIAVARESI; TORRICELLI, 2001; OZAWA *et al.*, 2002; TORRICELLI *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2018b).

O uso de substitutos ósseos é frequentemente necessário em pacientes com baixa densidade óssea, no entanto, muitos estudos pré-clínicos utilizam situações de densidade óssea regular, o que pode limitar sua aplicabilidade clínica. Portanto, é importante que os estudos experimentais considerem essas situações clínicas reais, enfatizando a necessidade de mais pesquisas com biomateriais utilizados em condições de osteoporose. Isso permitirá que novos biomateriais sejam desenvolvidos e testados adequadamente em situações clínicas relevantes, resultando em opções mais eficazes e seguras para a promoção da consolidação óssea em pacientes com baixa densidade óssea. Dentre esses biomateriais, destacam-se os polímeros de colágeno e serosa por serem proteínas abundantes no organismo.

1.2 Biomateriais

1.2.1 Colágeno

O colágeno é a principal proteína estrutural presente na matriz extracelular de diversos tecidos como ossos, ligamentos, cartilagem, tendões e pele. É a proteína mais encontrada no corpo humano e compõe 70% do peso seco do tendão e da pele, representando 90% da matriz extracelular do tecido ósseo, composto basicamente de colágeno tipo 1 (MOREIRA *et al.*, 2013). A estrutura molecular do colágeno é formada de três cadeias polipeptídicas dispostas em tripla hélice, compostas de aminoácidos arranjados sequencialmente por ligações covalentes, contendo sempre um aminoácido glicina. A variação na sequência e composição desses aminoácidos definem a formação dos diferentes tipos de colágeno, sendo conhecidos cerca de 29 tipos distintos (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014). Essas variações químicas

estão diretamente relacionadas às propriedades físicas e biológicas do colágeno como resistência, força e estabilidade (ABOU NEEL *et al.*, 2013; CEN *et al.*, 2008).

O colágeno vem sendo utilizado como biomaterial devido a sua grande aplicabilidade em vários campos da ciência. Isso é possível devido às suas propriedades que conferem adequada biocompatibilidade, capacidade de absorção controlada, biodegradabilidade, baixa imunogenicidade, adesão celular, capacidade de absorção de substâncias e possibilidade de manipulação em diferentes formas (BAUER *et al.*, 2014; MUTHUKUMAR *et al.*, 2018). Como polímero natural, apresenta similaridade estrutural com outros tecidos vivos, mimetizando a matriz extracelular e reproduzindo o intrincado arcabouço tridimensional. Desse modo, propicia o ambiente ideal para proliferação celular, neogênese vascular, quimiotaxia e diferenciação celular. Devido às propriedades citadas, produtos à base de colágeno são usados no auxílio de reparos de diversos tecidos como ossos, tendões, cartilagem, pele, vasos sanguíneos e disco intervertebral (MUTHUKUMAR *et al.*, 2018).

As matrizes poliméricas derivadas de colágeno são provenientes principalmente do colágeno extraído da pele, tendão e pericárdio bovino. Entretanto, fontes de colágeno oriundos da serosa de intestino bovino ou suíno são materiais promissores. Estudos anteriores demonstraram o potencial das matrizes poliméricas a base de colágeno derivado da serosa intestinal bovina, quando utilizadas para promoção da regeneração óssea em ratos (HIRATA *et al.*, 2015; MUNHOZ *et al.*, 2018; PETTIAN *et al.*, 2018). Da mesma maneira, as matrizes de colágeno provenientes da serosa do intestino suíno (SIS), são caracterizadas por apresentar relativa resistência, maleabilidade, elasticidade e possui absorção rápida, além de estimular o processo de reparo tecidual por seus efeitos angiogênicos (CUI *et al.*, 2022; CUNHA *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2017). Sun et al, em um estudo in vivo afirmam que essas matrizes são capazes de aumentar a angiogênese pela liberação do fator de crescimento endotelial vascular durante a biodegradação e apresentam baixo teor de imunogenicidade o que torna esse tipo de biomaterial viável no reparo aos danos do tecido ósseo (SUN *et al.*, 2018).

Outro fator significativo nos biomateriais a base de colágeno é a possibilidade de melhoras em suas propriedades físico-químicas. Goissis, Plepis e Rocha descreveram em 1998 a técnica de hidrólise alcalina seletiva para preparação de materiais de colágeno carregados negativamente a pH fisiológico, possibilitando a obtenção de biomateriais a base de colágeno oriundos de tecido animal (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). O processo consiste na hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln), resultando na formação de matrizes com aumento de cargas negativas superficiais da molécula do colágeno, sem maiores alterações em

sua estrutura. Essa alteração resulta em maior concentração de cargas na região central da molécula, possibilitando o surgimento de propriedades dielétricas e também elevando as propriedades piezoelétricas da molécula, considerados fatores favoráveis no processo de osteogênese (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; ROCHA *et al.*, 2006; ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002) Outro ponto em consideração é que a hidrólise alcalina permite a transformação da matriz de colágeno nativa em uma matriz com estrutura porosa, além de remover quaisquer células que porventura provoquem rejeição (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002).

Mesmo com as melhorias na composição química oriundas da hidrólise química, a composição de blendas com outros polímeros naturais, bem como a associação com materiais cerâmicos vem-se mostrando efetiva em estudos *in vivo* envolvendo a regeneração óssea. Essas composições tendem a melhorar propriedades como a estabilidade molecular, porosidade, rigidez, absorção e degradação das matrizes (CHACON *et al.*, 2023; CUNHA *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2019; MUNHOZ *et al.*, 2018).

1.2.2 Elastina

A elastina é uma proteína polimérica presente na matriz extracelular, caracterizada por conferir propriedades elásticas aos órgãos e tecidos, sendo mais abundante onde a elasticidade é preponderante, como em vasos sanguíneos, pele, pulmão, cartilagens e ligamentos elásticos. É formada através de ligações cruzadas do seu monômero precursor tropoelastina, entremeadas a uma estrutura microfibrilar de fibrilina (BELLINGHAM; KEELEY, 2004; FAURY, 2001; MARTYN; GREENWALD, 2001; PASQUALI-RONCHETTI; BACCARANI-CONTRI, 1997).

O uso dos materiais derivados da elastina como biomaterial tem invocado interesse da engenharia tecidual devido às características notáveis desta proteína estrutural: capacidade de coacervação da tropoelastina, elasticidade, grande estabilidade da substância (meia vida aproximada de 70 anos) e a atividade biológica de sinalização e indução molecular dos peptídeos derivados da degradação da elastina (KARNIK *et al.*, 2003; RAGNONI *et al.*, 2016; SIMIONESCU; PHILIPS; VYAVAHARE, 2005)

As fontes para obtenção da elastina para produção dos biomateriais provém da extração natural de enxertos, principalmente de origem animal e mais recentemente utilizando a terapia recombinante e a produção sintética (YEO *et al.*, 2015). Fontes naturais humanas são escassas

devido a expressão da tropoelastina ser reprimida em adultos. Como houve permanência de sequências importantes do gene da tropoelastina entre espécies, a utilização deste peptídeo derivado de animais tem sido disseminada em substituição à humana (CHUNG *et al.*, 2006).

A elastina ou tropoelastina natural pode ser proveniente de fontes como: ligamento nucal equino e bovino, grandes vasos (LEE; YEO; WEISS, 2017), pavilhão auricular bovino (MCCLURE; SIMPSON; BOWLIN, 2012) e membrana de pericárdio equino e bovino (ROCHA *et al.*, 2006), através de processos químicos com detergentes, enzimas, solubilização e hidrólise (PLEPIS *et al.*, 2013).

Os biopolímeros artificiais que contém elastina são chamados de elastin-like peptides (ELPs). Eles são principalmente baseados na sequência hidrofóbica repetida da tropoelastina, que é mais frequentemente representada pela sequência pentapeptídeo Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (VPGXG). Esses ELPs podem ser produzidos por síntese química ou tecnologia recombinante. A possibilidade de controlar sequências específicas de polipeptídeos permite um controle das características físico-químicas e estruturais dos ELPs, aumentando assim a diversidade de suas aplicações clínicas (YEO *et al.*, 2015)

Estudos prévios relataram problemas com válvulas cardíacas e implantes vasculares que contém elastina, com calcificação indesejada dessas estruturas (SWINDLE-REILLY; PARANJAPE; MILLER, 2014). Paradoxalmente, a propensão da elastina à calcificação é um achado interessante quando esse tecido é utilizado para auxiliar na regeneração óssea (MUNHOZ *et al.*, 2020).

Especificamente sobre os biomateriais compostos com elastina oriunda do pavilhão auricular bovino, estes possuem suas fibras orientadas em forma de favo desenvolvendo uma estrutura tridimensional composta por condrócitos espaçados rodeados por fibras elásticas, gerando as suas propriedades específicas que promovem resiliência e elasticidade aos tecidos, bem como sinais quimiotáticos, adesão e proliferação celular (LEE; YEO; WEISS, 2017).

A utilização proposta aos biomateriais a base de elastina além da regeneração óssea incluem: carreamento de células indiferenciadas e fármacos (MACHULA; ENSLEY; KELLAR, 2014), produção de próteses valvulares cardíacas (GRANADOS *et al.*, 2017), revestimento e regeneração de enxertos arteriais (MAHARA; KIICK; YAMAOKA, 2017) e nervos periféricos (HSUEH *et al.*, 2014), funcionando também como substitutos a enxertos de pele (XIE *et al.*, 2017) e cartilagem (ZHU *et al.*, 2017).

Os biomateriais à base de elastina também podem ser modificados ou associados a outras moléculas naturais ou sintéticas, incluindo peptídeos, proteínas, polissacarídeos e polímeros sintéticos, com a finalidade de melhorar a capacidade

existente ou conferir propriedades adicionais aos compósitos formados (MCCLURE; SIMPSON; BOWLIN, 2012; SWINDLE-REILLY; PARANJAPE; MILLER, 2014). Nesse sentido, o preparo da cartilagem através da hidrólise alcalina e a associação com outros polímeros naturais como o colágeno já demonstraram resultados promissores no processo de reparo ósseo em animais (CUNHA *et al.*, 2021; MORAES *et al.*, 2019; MUNHOZ *et al.*, 2020). A associação de moléculas de nanohidroxiapatita a essas blendas poliméricas podem melhorar sua capacidade mecânica e biocompatibilidade. Ryan et al, adicionaram nanohidroxiapatita a *scaffolds* de cológeno melhorando sua rigidez, porosidade e tamanho dos poros (RYAN *et al.*, 2015).

1.2.3 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é a forma mineralizada natural da apatita cálcica, que é encontrada na matriz óssea mineralizada, na dentina e em pequenas calcificações presentes em glândulas como a pinea (WANG; YEUNG, 2017). Sua fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e apresenta alta solubilidade em sistemas aquosos e baixa solubilidade em soluções ácidas. Nos últimos anos, a hidroxiapatita, juntamente com o beta tricálcio fosfato, tornou-se um dos biomateriais cerâmicos mais utilizados como enxerto ósseo (DOLCIMASCOLO *et al.*, 2019; GRIFFONI *et al.*, 2022).

As principais fontes de hidroxiapatita incluem corais, que são submetidos a um tratamento hidrotérmico para formar a hidroxiapatita coralina (MACHA *et al.*, 2015), tecidos ósseos de animais que passam por desproteínização (TURNBULL *et al.*, 2018), e formulações sintéticas que utilizam precipitação de soluções aquosas ou reações de estado sólido (ABBASI *et al.*, 2020).

Embora não possua atividade osteogênica ou osteoindutora, a hidroxiapatita apresenta uma notável capacidade osteocondutora e biocompatibilidade, devido à sua similaridade química com a matriz óssea mineralizada (ABDUL HALIM; HUSSEIN; KANDAR, 2021; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011). Além disso, a hidroxiapatita possui porosidade e tamanho de poros semelhantes aos do osso esponjoso, variando entre 200 e 500 μm (ALLEN, 2013). Essas qualidades estimulam a conexão, migração, proliferação e expressão fenotípica das células ósseas, permitindo a formação de osso novo diretamente depositado sobre o biomaterial (CHEN *et al.*, 2022; PUPO *et al.*, 2021).

Assim como outras cerâmicas, a hidroxiapatita (HA) é conhecida por sua alta resistência

e baixa ductilidade, o que significa que ela sofre pouca deformação, mas tende a quebrar quando sujeita a cargas que ultrapassam sua capacidade de resistência. A hidroxiapatita coralina, por sua vez, apresenta resistência compressiva discretamente superior à do osso esponjoso, e essa resistência aumenta proporcionalmente com o crescimento ósseo progressivo (MALLICK, 2014).

A reabsorção da hidroxiapatita é muito lenta devido as características dos seus poros, podendo levar anos ou até mesmo não ocorrer (HAK, 2007). No entanto, a introdução da nanotecnologia potencializou a biorreatividade dos materiais, aumentando o número de moléculas na superfície do material e melhorando suas propriedades através do contato mais próximo com outras substâncias (NOOR, 2013).

A hidroxiapatita pode ser encontrada na forma de pós, blocos, grânulos e cimentos, tanto densos quanto porosos e na escala nano pode ter formatos como bastões, fibras, esferas ou folhas (HENCH; WILSON, 1993; LOWE; HARDY; WALSH, 2020), sendo utilizada para preenchimento de defeitos ou cavidades ósseas após trauma, bem como em associação com enxerto autólogo em casos de quantidade insuficiente deste (HAK, 2007).

1.3 Associação de biomateriais

Através da engenharia de tecidos, é possível desenvolver sistemas tridimensionais chamados *scaffolds*, que favorecem a cicatrização óssea. Para desempenhar essa função, um *scaffold* deve ser biodegradável, biocompatível e não produzir substâncias tóxicas durante a sua degradação. Além disso, em casos de regeneração óssea, é essencial que apresente propriedades como osteointegração e osteocondução (CAO; LIU; CHEW, 2009; OGUERI *et al.*, 2019), que são responsáveis por promover a formação de uma matriz extracelular capaz de substituí-lo gradualmente.

Atualmente, é um desafio determinar qual biomaterial é o mais adequado para o reparo de lesões ósseas, seja utilizado isoladamente ou em conjunto. Estudos prévios, incluindo muitos realizados por pesquisadores nacionais, têm contribuído para um melhor entendimento da associação de diversos biomateriais, especialmente quando se utiliza polímeros naturais como base para a fabricação desses *scaffolds* (CHACON *et al.*, 2023; CUNHA *et al.*, 2021; MACHADO *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2019; MUNHOZ *et al.*, 2020; PETTIAN *et al.*, 2018).

Sistemas baseados em polímeros naturais proporcionam uma arquitetura tridimensional

altamente porosa, criando um ambiente adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular (NEACSU *et al.*, 2020). Além disso, essas matrizes devem estimular o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos para o transporte de oxigênio e nutrientes para o local do defeito ósseo. Considerando que a arquitetura óssea natural é composta por cristais de hidroxiapatita entremeados a moléculas de colágeno, parece lógico utilizar materiais que mimetizam essa estrutura. Portanto, um *scaffold* feito de polímeros naturais e adicionado de cristais de hidroxiapatita pode melhorar o biomimetismo do composto, tanto em termos de composição quanto de estrutura da matriz óssea extracelular (DU *et al.*, 2019).

Diante disso, torna-se promissor as pesquisas em animais usando polímeros naturais, como o colágeno derivado da serosa intestinal suína e a elastina da cartilagem auricular bovina, em conjunto com hidroxiapatita de dimensões nano, para a formulação de *scaffolds* destinados ao preenchimento de defeitos ósseos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a potencial de neoformação óssea dos *scaffolds* de colágeno serosa de intestino porcino com nanohidroxiapatita e associadas a elastina, quando utilizadas no reparo ósseo de defeitos provocados experimentalmente na tíbia de ratas sadias não ovariectomizadas e em ratas ovariectomizadas.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais utilizados no reparo de defeitos tibiais em ratas através das análises das condições macroscópicas, radiográficas e hidrológicas da área cirúrgica;
- Determinar a reabsorção dos biomateriais simultaneamente ao processo de osteogênese na área cirúrgica;
- Caracterizar a morfologia do tecido ósseo neoformado na área cirúrgica, bem como quantificar o volume óssea relativo apresentado
- Avaliar a influência da ovariectomia no processo de consolidação óssea nesses animais

3 MÉTODOS

3.1 Obtenção dos biomateriais

Os *scaffolds* utilizadas foram preparadas e caracterizadas pelo mestrando Claudio Fernandes Garcia, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis no Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP. Os materiais utilizados foram o colágeno obtido de serosa suína, a cartilagem auricular bovina e a nanohidroxiapatita sintetizada. (Anexo, itens 8.1 e 8.2)

3.2 Planejamento experimental

Este trabalho baseou-se nas normas descritas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) para uso de animais em pesquisa. Utilizou-se 60 ratas da espécie *Ratus norvegicus* - Wistar, com 6 meses de idade e aproximadamente 350 gramas de peso corpóreo (YOUSEFZADEH *et al.*, 2020), fornecidos pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram alojados no Biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí em temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas e permaneceram em gaiolas com maravalha, recebendo ração balanceada (purina) e água *ad-libitum*.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para uso de animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí, protocolo nº 246/2019 (Anexo, item 8.3).

Inicialmente em 30 animais foram realizadas a ovariectomia bilateral e após 8 semanas realizados os procedimentos na tíbia esquerda.

Os animais foram alocados em 6 grupos com 10 animais cada, conforme a seguir:

Grupo 1 (G1-NO-C): Ratas não ovariectomizadas com defeito na tíbia e sem enxerto (Controle não ovariectomizadas);

Grupo 2 (G2-NO-MSH): Ratas não ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com *scaffolds* de colágeno/nanohidroxiapatita;

Grupo 3 (G3-NO-MSHC): Ratas não ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com *scaffolds* de colágeno/nanohidroxiapatita e associada a elastina;

Grupo 4 (G4-O-C): Ratas ovariectomizadas com defeito na tíbia e sem enxerto

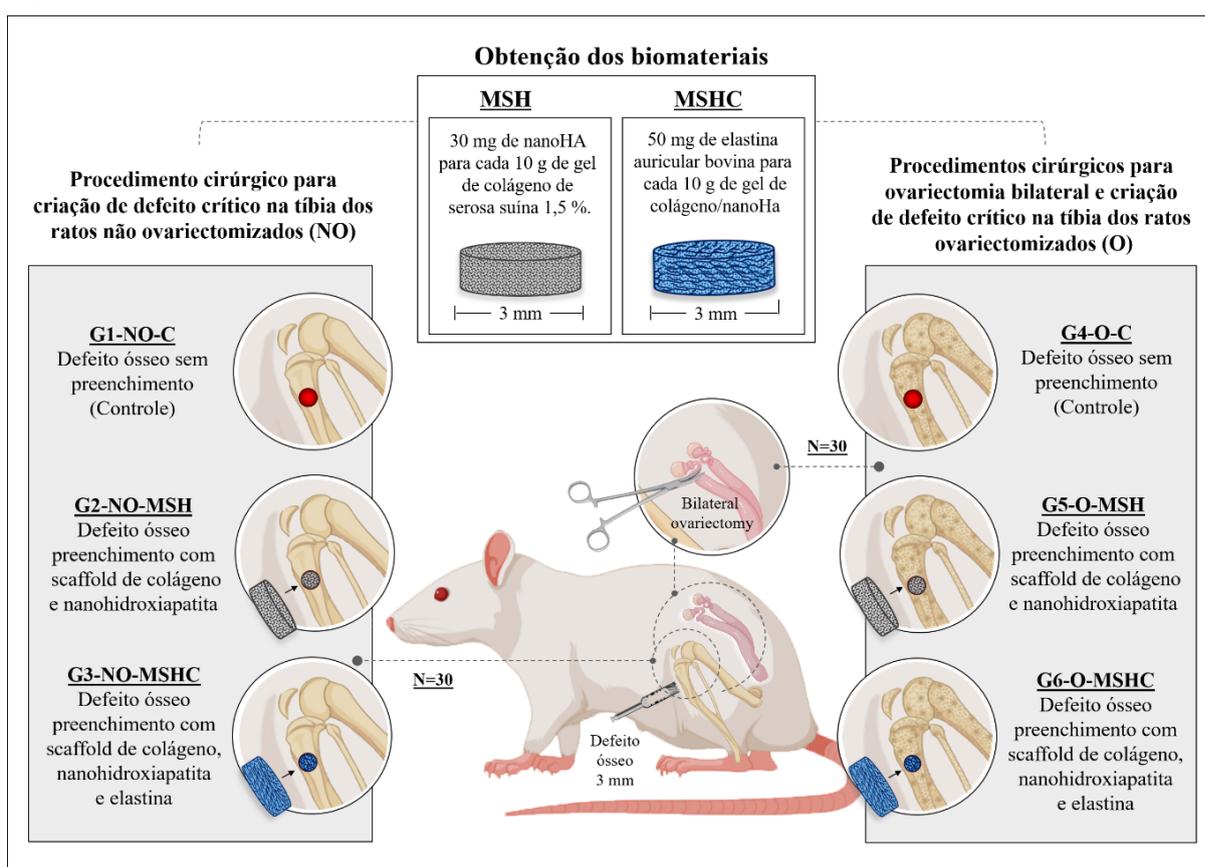
(Controle ovariectomizadas);

Grupo 5 (G5-O-MSH): Ratas ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com *scaffolds* de colágeno/nanohidroxiapatita;

Grupo 6 (G6-O-MSHC): Ratas ovariectomizadas com defeito na tíbia e enxertado com *scaffolds* de colágeno/nanohidroxiapatita associada com elastina.

Em cada grupo, as tíbias de 10 animais foram utilizadas para análise macroscópica, radiográfica e histológica, conforme Figura 1:

Figura 1 – Planejamento experimental com 60 ratas Wistar



Fonte: Próprio autor.

3.3 Técnica cirúrgica

3.3.1 Ovariectomia bilateral

Os animais dos grupos 4, 5 e 6 foram pesados e anestesiados com uma solução de Xilazina (1 mg/kg), um sedativo, analgésico e relaxante muscular, juntamente com Ketamina

(70 a 80 mg/kg), um agente anestésico com efeito sedativo, e tramadol (10 mg/kg), todos administrados por via intramuscular (CUNHA *et al.*, 2010). Após a tricotomia e assepsia com clorexidina degermante da região dorsal, realizou-se uma incisão na pele a 2 cm em ambos os lados da coluna vertebral. O subcutâneo foi descolado para visualização da musculatura local. A mesma foi seccionada no sentido longitudinal dando acesso ao retroperitônio. Desta maneira, os ovários foram identificados e removidos através da secção e remoção cirúrgica dos lóbulos do útero e das tubas uterinas (Figura 4).

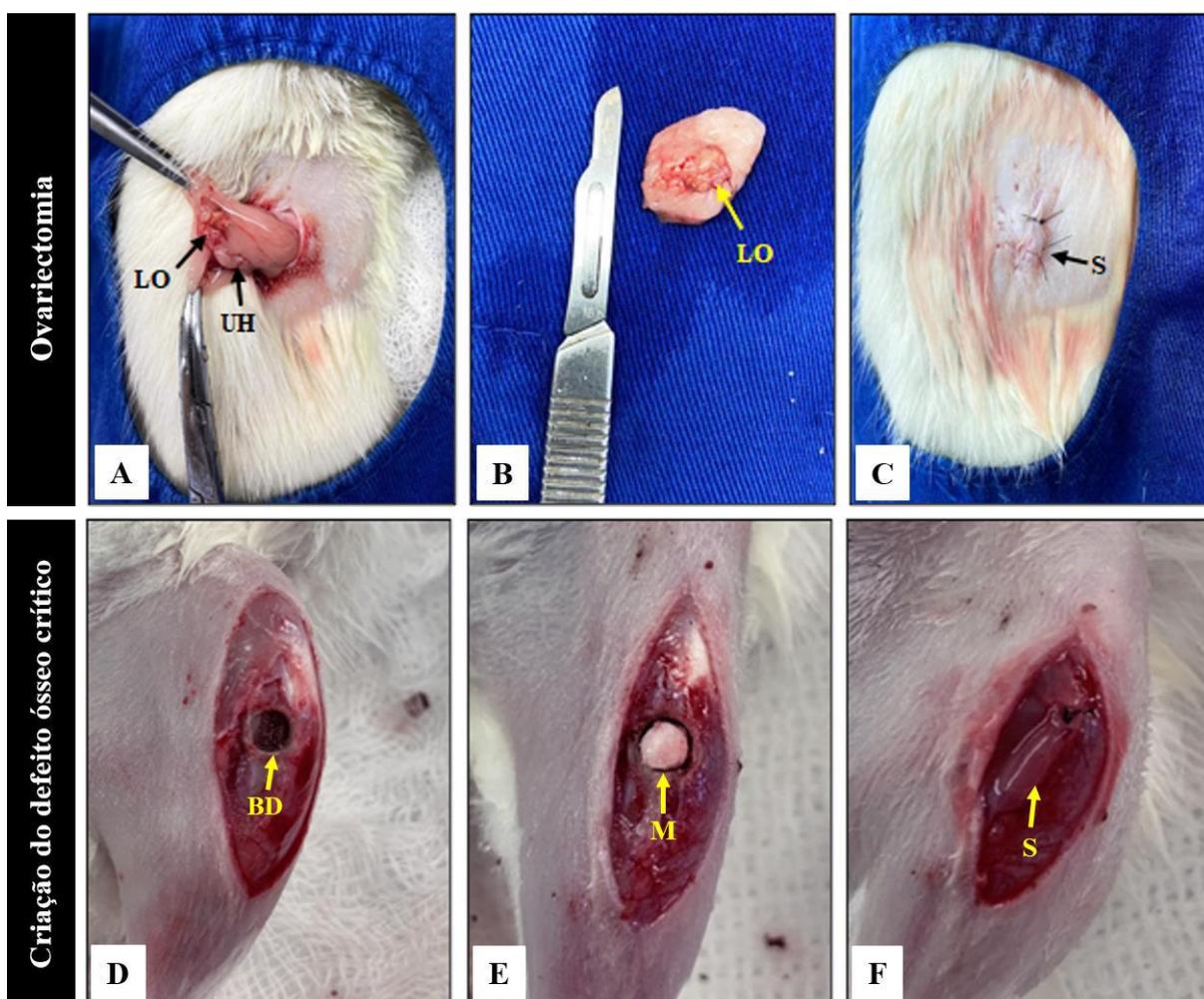
Após a cirurgia, procedeu-se à sutura dos tecidos e cada animal recebeu uma dose via intramuscular de 0,1 mg/100 g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil). No local da ferida cutânea da região cirúrgica, foi aplicado o antibiótico Rifamicina *Spray*. Também foi colocado paracetamol (15 gotas) na água da mamadeira dos animais durante o período pós cirúrgico.

3.3.2 Procedimento para realização da falha óssea tibial

Para a realização da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma solução de Xilazina (1 mg/kg), um sedativo, analgésico e relaxante muscular, juntamente com Ketamina (70 a 80 mg/kg), um agente anestésico com efeito sedativo, e tramadol (10 mg/kg), todos administrados por via intramuscular. Além disso, durante a cirurgia, foram colocadas gazes embebidas em solução de soro fisiológico a 0,9% nos olhos dos animais para prevenir o ressecamento das córneas.

Após a anestesia e tricotomia do membro pélvico esquerdo, foi realizada antissepsia com Clorexidine Degermante. Em seguida, foi feita uma incisão cutânea na face anteromedial e com a extremidade proximal da tíbia esquerda exposta e o perióstio rebatido, foi criada uma falha óssea utilizando uma broca cirúrgica de 3mm de diâmetro, acoplada a uma caneta de mini-motor (ELTEC LB-100- Eltec Elektronik AG, Mainz, Alemanha), até atingir o canal medular (Figura 2). A localização do defeito na tíbia foi padronizada a 10 mm inferior à articulação do joelho em sua face medial. Durante todo o procedimento, a área foi continuamente irrigada com solução fisiológica para evitar o aquecimento local e lesões no tecido. Após a obtenção da cavidade, seu conteúdo medular foi curetado e aspirado por meio de material cirúrgico apropriado. Em seguida, as matrizes previamente esterilizadas por óxido de etileno, foram implantadas, de acordo com os grupos descritos na figura 2, exceto nos grupos controle.

Figura 2 - Procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral (A, B e C); Abordagem cirúrgica após 12 semanas para criação do defeito crítico na tíbia esquerda (D, E e F) das ratas Wistar de G1 a G6. (LO) Ovário esquerdo; (UH) Tuba uterina; (S) Sutura; (BD) Defeito ósseo crítico; (M) Matrizes poliméricas.



Fonte: Próprio autor.

3.3.3 Sutura dos tecidos e medicação

Após a cirurgia, procedeu-se à sutura dos tecidos, sendo o perióstio e a pele reposicionados e suturados com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, cada animal recebeu uma dose de 0,1 mg/100 g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil). No local da ferida cutânea da região cirúrgica, foi aplicado o antibiótico Rifamicina Spray. Também foi colocado paracetamol (15 gotas) na água da mamadeira dos animais durante o período pós cirúrgico.

3.4 Controle pós-operatório

Os animais operados ficaram isolados em gaiolas separadas, em observação constante e receberam ração comum e água *ad-libitum*. Realizou-se a limpeza das caixas com a troca da maravalha três a quatro vezes na semana. No pós-operatório foram observados todos os cuidados necessários com os fatores de estresse e dor.

3.5 Morte indolor induzida dos animais e preparo dos materiais para análise

A morte indolor induzida dos animais foi realizada após 6 semanas do procedimento cirúrgico através de alta dosagem de anestesia intraperitoneal de ketamina, Xilazina e Tiopental. Após constatada a morte do animal, a ressecção da tíbia ocorreu com a desarticulação no joelho e tornozelo. Os ossos foram identificados, preparados e armazenados de acordo com o protocolo de cada análise específica.

3.6 Análise das peças

3.6.1 Análise macroscópica

A consistência e a natureza dos tecidos cutâneo e subcutâneo da área cirúrgica foram observadas e, juntamente com a remoção da tíbia, foram fotodocumentados com o intuito de registrar alguma alteração patológica ou sinal sugestivo de rejeição aos biomateriais implantados.

3.6.2 Análise radiográfica

Utilizou-se aparelho Odel 300 miliamperes, foco com 100 miliamperes, tempo de 0,06 segundos e radiação de 40 kV. As imagens foram digitalizadas pelo sistema Agfa e avaliadas quanto a integridade da falha óssea, bem como a regeneração através do aspecto radiopaco e radiolúcido da área do implante.

3.6.3 Processamento histológico das amostras da área cirúrgica

As amostras contendo a área receptora do enxerto permaneceram imersas em formol tamponado 10% (Allkimia® - Campinas/SP - Brasil) durante 10 dias, seguidas de imersão em solução descalcificante de cloreto de hidrogênio (Allkimia® - Campinas/SP - Brasil). A solução foi trocada a cada 3 dias em um período que variou entre 15 e 20 dias. Após a descalcificação as amostras foram lavadas em água corrente. As mesmas foram inseridas em cassetes histológicos e submetidas ao processo de desidratação e diafanização em processador automático de tecidos LUPE®PT, contendo 2 recipientes com formol tamponado 10%, 4 recipientes com álcool absoluto, 4 contendo xilol 100% e 2 recipientes com parafina líquida a 70°C.

O tempo de imersão das amostras em cada recipiente foi de 1 hora, totalizando um processo de 12 horas. Em seguida as amostras foram incluídas verticalmente em bloco de parafina e congeladas a -5°C e foram submetidas a cortes semisseriados com 5 µm de espessura. Após o processo de desparafinização foram coradas com os seguintes marcadores ósseos: Tricrômico Masson e Picrosírus Red. Para análise e fotomicrografia das lâminas histológicas ao longo da falha óssea de cada animal, usou-se o fotomicroscópio MOTIC BA310 com objetivas de 4, 10 e 20 vezes. As imagens obtidas permitiram uma análise qualitativa da neoformação óssea, distinguindo osso maduro do imaturo, bem como fornecendo características dos componentes da matriz extracelular.

3.6.4 Análise histológica por microscopia de luz

Nesta técnica, utilizou-se o Tricrômico de Masson que permitiu diferenciar osso maduro original corado em vermelho do osso neoformado imaturo que se cora em azul, além da possibilidade de visualização das fibras colágenas que também se coram em azul. As imagens histológicas nos permitem uma análise qualitativa da neoformação óssea, pela distinção da evolução da organização óssea, bem como fornecendo características dos componentes da matriz extracelular pela identificação do tecido predominante.

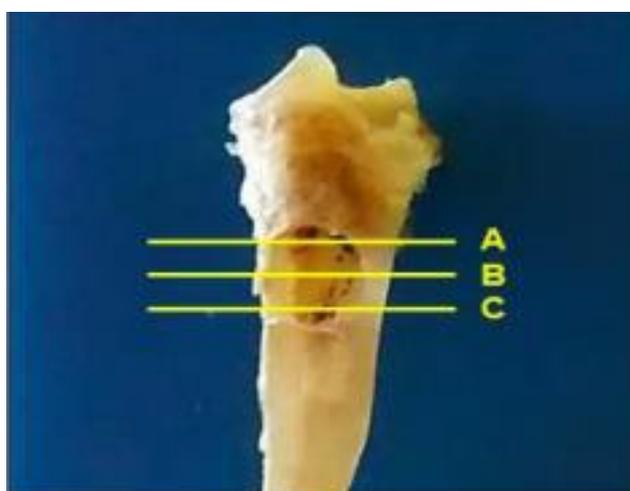
3.6.5 Análise histológica por microscopia de luz polarizada

O método Picrosirius Red (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1 g de vermelho da Síria F3b, Sírus Red F3B-Bayer) permite avaliar o colágeno formado no início da consolidação óssea. O Picrosirius Red interage com as moléculas do colágeno, intensificando a sua capacidade de birrefringência (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

3.6.6 Análise morfométrica da neoformação óssea da área cirúrgica

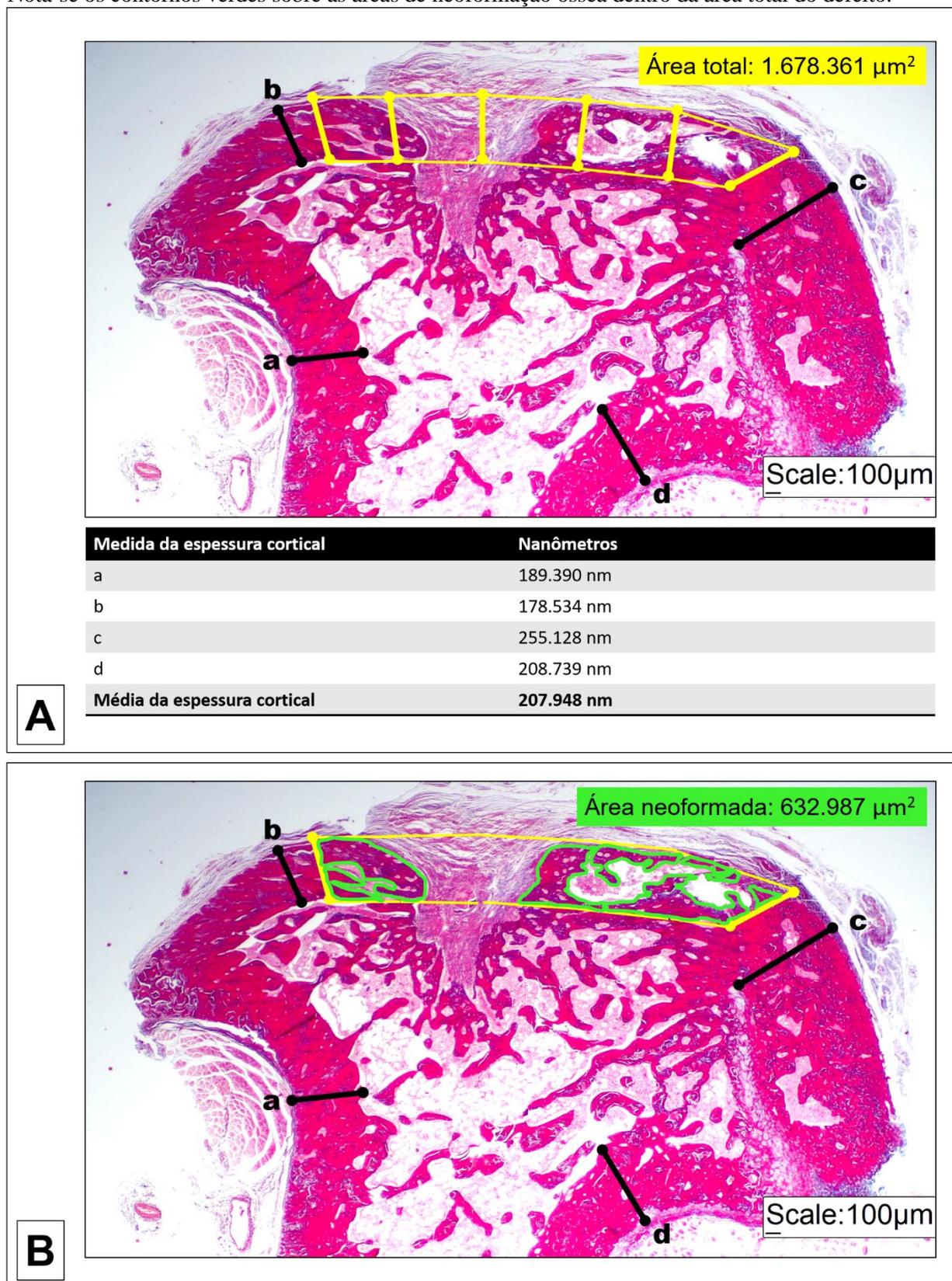
A análise teve por base o método de estereologia, sendo analisados os cortes realizados ao longo da dimensão da falha óssea na tíbia (Figura 3). As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson, analisadas com um microscópio de luz NIKON ECLIPSE E200 utilizando-se lentes objetivas de 4X e 10X de aumento e fotografadas. Para obtenção dos dados, foi utilizado o software *Image J*, do Laboratório de Morfologia dos Tecidos do Departamento de Morfologia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí. inicialmente foi feito o cálculo da área total (volume relativo) em μm^2 da área lesada, seguido pelo cálculo da área de osso neoformado. Esses dados permitiram estabelecer o percentual de osso neoformado da área cirúrgica através do uso de uma regra de três (Figura 4).

Figura 3 - Demonstração dos cortes transversais realizados na área da lesão para obtenção das lâminas histológicas para análise do reparo ósseo. Região proximal (A), média (B) e distal (C) da falha óssea. Ampliação 4X.



Fonte: Próprio autor.

Figura 4 - Software utilizado na morfometria do volume ósseo formado no defeito. (A) Observa-se as linhas pretas para cálculo da espessura média da cortical óssea. Em seguida, linhas amarelas são traçadas sobre o defeito ósseo com linha de comunicação para identificação da área total do defeito ósseo; (B) Nota-se os contornos verdes sobre as áreas de neoformação óssea dentro da área total do defeito.



Fonte: Próprio autor.

3.6.7 Análise Estatística

Os valores obtidos para as análises do percentual do volume ósseo neoformado na área cirúrgica foram submetidos ao teste de ANOVA e Tukey para comparação e diferenciação entre os grupos estudados, sendo utilizado o software BioEstat 5.0 do laboratório de Morfologia dos Tecidos do Departamento de Anatomia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí.

4 RESULTADOS

4.1 Análise macroscópica e radiológica do defeito ósseo

O presente estudo avaliou o potencial osteoregenerativo de *scaffolds* poliméricos de colágeno da serosa do intestino porcino com nano cristais de hidroxiapatita, acrescidas ou não a elastina derivada da cartilagem auricular bovina, implantados em defeitos ósseos na tíbia de ratas em condições normais do osteometabolismo e em ratas com deficiência estrogênica causada pela ovariectomia bilateral.

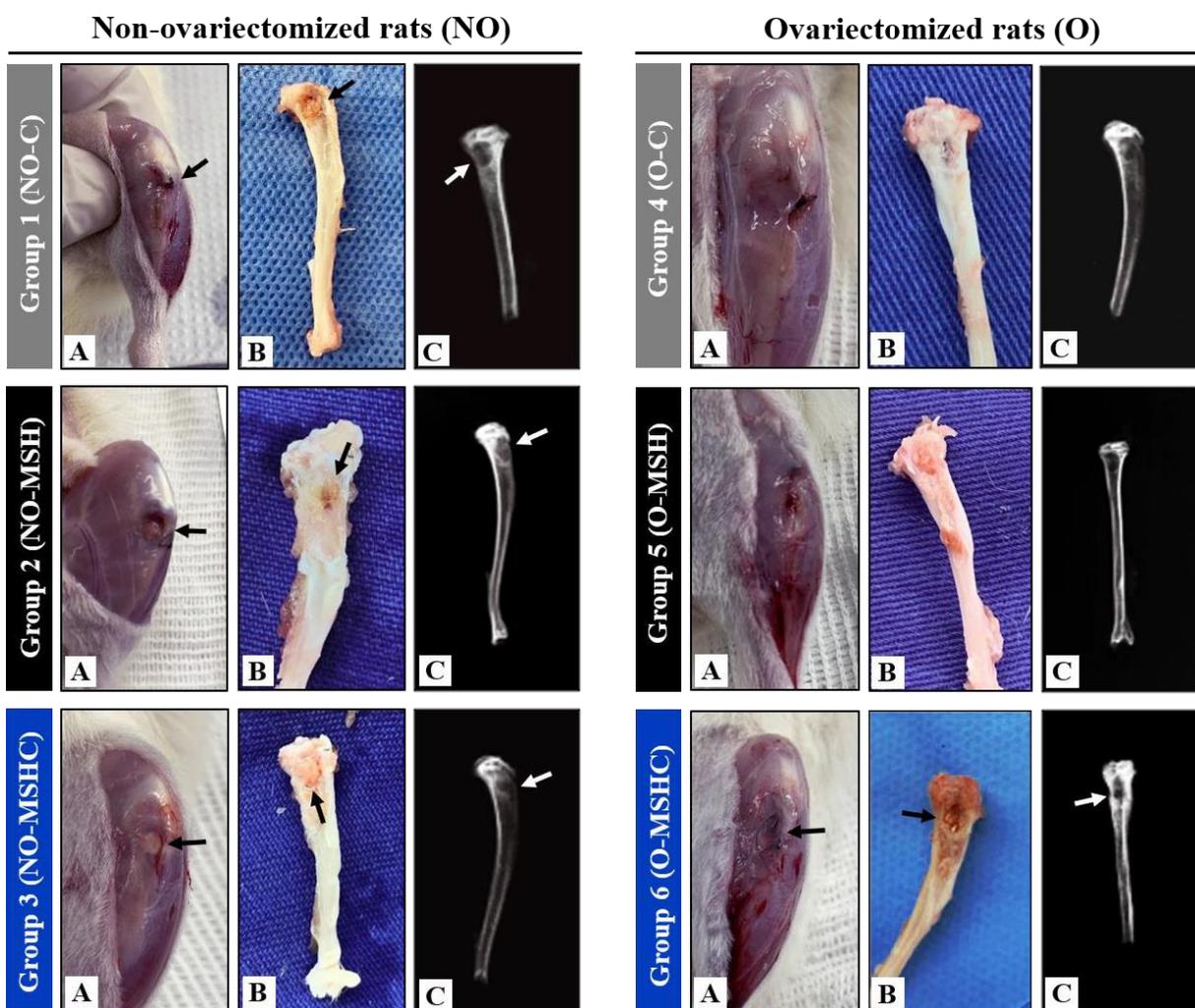
O protocolo experimental aplicou os princípios das diretrizes ARRIVE do Centro Nacional para a Substituição, Refinamento e Redução de Animais em Pesquisa (*National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research - NC3Rs*), com os devidos cuidados pré e pós-operatórios com medidas a controle analgésico e de boas práticas assépticas para a realização dos procedimentos.

A análise macroscópica revelou a cicatrização adequada com ausência de sinais inflamatórios, observada pelas condições clínicas dos tecidos moles subcutâneos, que não apresentavam a formação de aderências em todos os grupos do estudo, conforme imagens A e B da Figura 5. As áreas enxertadas com as membranas MSH (grupos G2 e G5) e MSHC (grupos G3 e G6), evidenciaram bordas bem delimitadas e com discreta presença de fluidos sanguíneos ao redor dos biomateriais. Este achado foi compatível com as áreas dos defeitos ósseos não preenchidos por *scaffolds* (grupos controle G1 e G4), cuja semelhança é indicativa do processo natural da reparação óssea associada a angiogênese local, que era esperada para todos os grupos.

Não foram observados outros sinais sugestivos de complicações infecciosas como cistos, fibromatoses, necroses ou abscessos. Os grupos com deficiência de hormônio gonadal (G4 a G6) não apresentaram exacerbação de resposta inflamatória local e ambos os *scaffolds* poliméricos apresentaram biocompatibilidade nos defeitos ósseos críticos.

Na análise radiológica foram observados contornos bem preservados dos defeitos ósseos, com radiopacidade das margens corticais da tíbia em todos os grupos do estudo, descartando também rarefações ósseas ou processos infecciosos como a osteomielite. No centro dos defeitos críticos foram observadas áreas arredondadas com radiolucências presentes e delimitadas pelas margens corticais. Não foram observadas fraturas secundárias, pseudoartroses, processos carcinogênicos ou quaisquer outras anormalidades morfológicas, conforme imagens C (Figura 5).

Figura 5 - Grupos de ratas não ovariectomizadas à esquerda (G1 a G3) e grupos de ratas ovariectomizadas à direita (G4 a G6). (A) Imagens macroscópicas in vivo; (B) Imagens macroscópicas das tíbias dissecadas; (C) Imagens radiológicas. As setas indicam a área do defeito ósseo crítico.



Fonte: Próprio autor.

4.2 Análise morfológica da área do defeito ósseo

A histologia com Tricrômico de Masson aplicada aos grupos G1 a G3, evidenciou que os animais em condições osteometabólicas normais apresentaram maior eficiência osteorregenerativa em comparação aos animais com deficiência estrogênica, provocada experimentalmente com a ovariectomia bilateral (G4 a G6).

Os grupos controles não ovariectomizado (G1-NO-C) e ovariectomizado (G4-O-C), apresentaram discreta formação de tecido ósseo ao longo de todo o defeito ósseo em menor quantidade que nos grupos enxertados com os *scaffolds*. A neoformação ocorreu de forma centrípeta em direção ao canal medular e o defeito ósseo foi preenchido predominantemente por tecido conjuntivo frouxo.

O *scaffold* de colágeno com nanohidroxiapatita implantado nos grupos sadio (G2-NO-MSH) e no grupo ovariectomizado (G5-O-MSH), apresentou potencial osteogênico e estimulou a diferenciação celular, que pode ser observada pelo maior número de lacunas alojando osteócitos em ambos os grupos. Em G2-NO-MSH a neoformação óssea iniciou nas margens da cortical da tíbia e projetou-se ao centro do defeito crítico de forma suficiente para cobrir toda a extensão da falha.

Isso não foi observado no respectivo grupo doente (G5-O-MSH), no qual a ponte óssea neoformada não projetou a ponto de unir as duas bordas do defeito. A neoformação ocorreu em menor quantidade e em direção ao canal medular da tíbia, formando uma invaginação. A formação óssea de característica trabecular formaram lacunas com aprisionamento de tecido hematopoiético e, na interface osso-*scaffold* havia tecido conjuntivo interposto. Enquanto no grupo sadio (G2-NO-MSH), ocorreu maior osteogênese e de característica compacta. Nos dois grupos os resquícios da membrana ainda podiam ser observados após seis semanas de pós-operatório, sendo mais evidente no interior do defeito ósseo dos animais do grupo G5-O-MSH. Sendo assim, o biomaterial apresentou menor biodegradação nas ratas com insuficiência mineral causada pela deficiência gonadal.

A matriz polimérica confeccionada com colágeno, nanohidroxiapatita e elastina, implantada nos grupos sadio (G3-NO-MSHC) e no grupo patológico (G6-O-MSHC), apresentou maior potencial osteogênico, quando comparada à matriz de colágeno contendo apenas o aditivo inorgânico. Em G3-NO-MSHC as lamelas ósseas originadas nas bordas, migraram até o centro do defeito crítico, apresentando matriz osteóide com característica compacta e mais espessa, cuja neoformação preservou a direção da projeção cortical nativa da tíbia, não invadindo o canal medular. No respectivo grupo doente G6-O-MSHC, ocorreu neoformação óssea em menor quantidade e trabecular, formando uma invaginação para o interior do canal medular e com mais interposição de tecido conjuntivo frouxo na interface entre o osso e o *scaffold*.

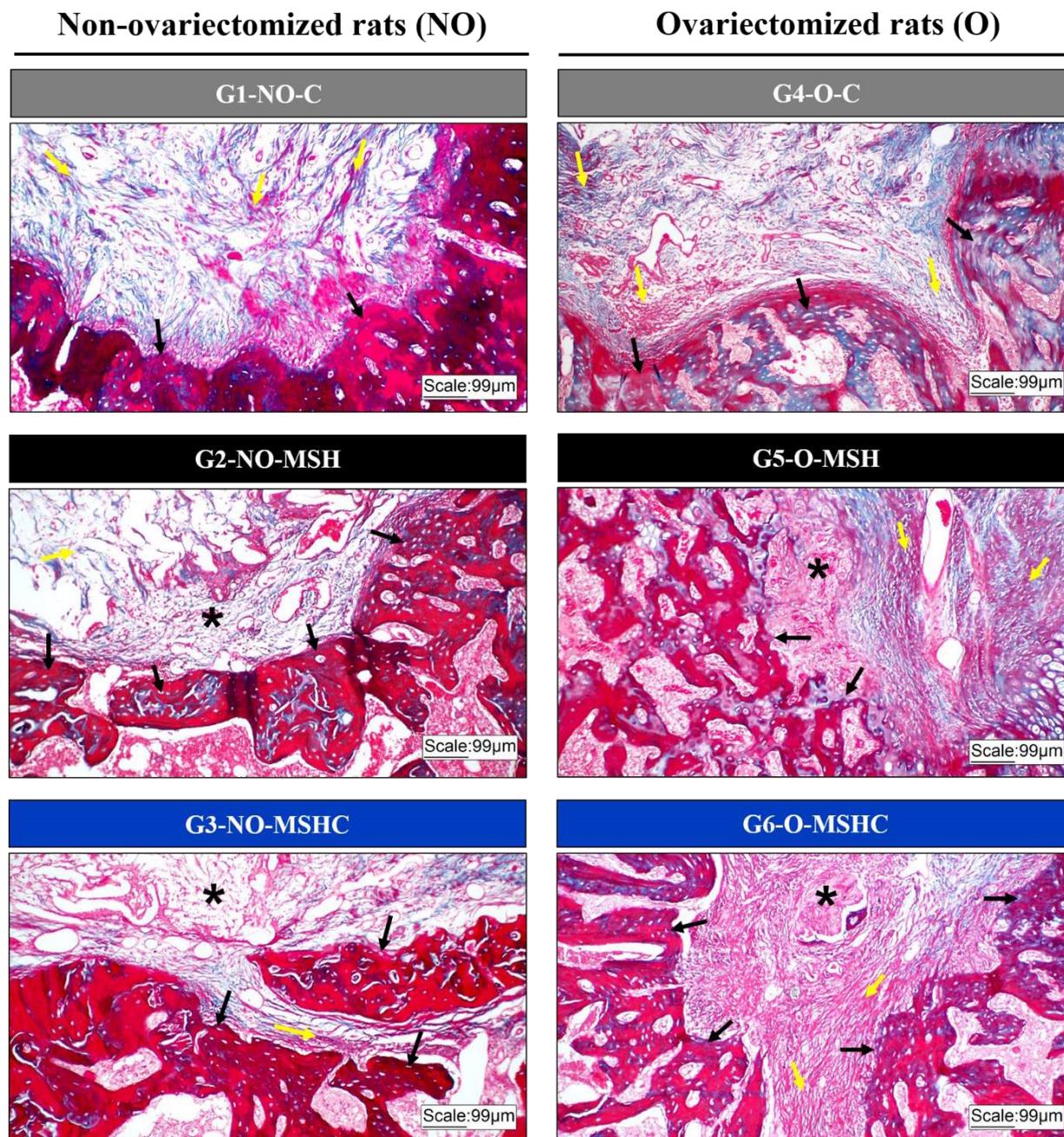
Diferentemente de MSH, a matriz MSHC demonstrou biodegradação menos acelerada, fornecendo suporte para a proliferação celular e crescimento da matriz osteóide. Ambas apresentaram capacidade de diferenciação celular, confirmada pela presença de inúmeros osteócitos ao longo do osso novo, sendo mais evidente nos grupos experimentais que receberam MSHC.

Quanto às diferenças observadas entre os grupos sadios e ovariectomizados, nos animais sadios foram constatadas neoformações ósseas mais significativas, com características compacta e mais madura, identificável pela predominância da coloração vermelha. Enquanto

nas ratas com condições osteometabólicas desfavoráveis, a neoformação foi insuficiente para o fechamento da falha óssea, migrou para o interior do canal medular e se apresentou de forma trabecular e mais imatura, observável pela maior área corada em azul pelo Tricrômico de Masson e acabou favorecendo a formação de tecido conjuntivo.

Outro aspecto importante foi que nas ratas com condições osteometabólicas normais (G2-NO-MSH e G3-NO-MSHC), a biodegradação dos *scaffolds* ocorreu de forma mais acelerada, quando comparados aos grupos de ratas doentes. Nos grupos saudáveis também houve a maturação do tecido ósseo compacto neoformado. Tanto nos grupos doentes quanto nos grupos saudáveis, ambas as matrizes demonstraram potencial osteogênico e osteocondutor, contudo as membranas MSHC se destacaram nestes aspectos, principalmente quando aplicada nos animais saudáveis (Figura 6).

Figura 6 - Fotomicrografias com Tricrômico de Masson dos grupos não ovariectomizados à esquerda (G1-NO-C, G2-NO-MSH e G3-NO-MSHC) e grupos ovariectomizados à direita (G4-O-C, G5-O-MSH e G6-O-MSHC). Setas pretas indicam os focos de neoformação óssea; Setas amarelas indicam a presença de tecido conjuntivo frouxo; Asterisco (*) indica a presença dos *scaffolds*. Aumentos de 10 vezes.



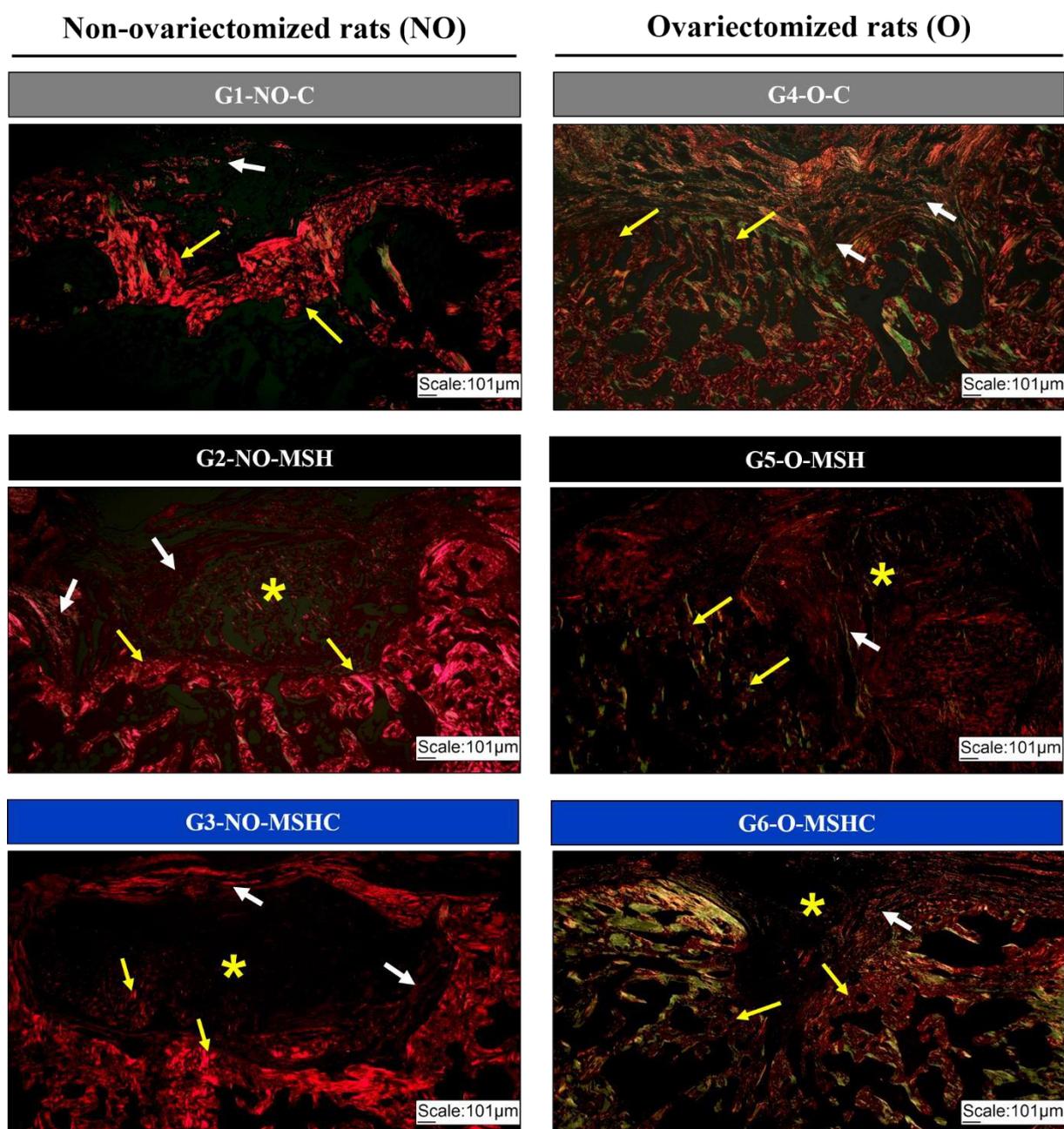
Fonte: Próprio autor.

A coloração histológica Picrosírius Red, permitiu analisar a formação, densidade e orientação das fibras colágenas. Nos grupos sadios as fibras colágenas do tecido ósseo neoformado foram marcadas predominantemente na cor vermelha, com agrupamento de forma densa indicando a formação de osso compacto. Também foi possível observar as fibras colágenas do tecido conjuntivo apresentando o mesmo padrão de coloração, porém mais

dispensas e paralelas migrando para múltiplas direções (tecido conjuntivo frouxo e desorganizado).

Nos grupos com deficiência gonadal as fibras colágenas apresentaram birrefringência à luz polarizada, com padrão de coloração em tons laranja e esverdeado, presentes nas neoformações ósseas e nas áreas com tecido conjuntivo interposto. Os animais doentes apresentaram menor formação e densidade das fibras colágenas (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias com Picosírius Red dos grupos não ovariectomizados à esquerda (G1-NO-C, G2-NO-MSH e G3-NO-MSHC) e grupos ovariectomizados à direita (G4-O-C, G5-O-MSH e G6-O-MSHC). Setas pretas indicam os focos de neoformação óssea; Setas amarelas indicam a presença de tecido conjuntivo frouxo; Asterisco (*) indica a presença dos *scaffolds*. Aumentos de 10 vezes.



4.3 Análise histomorfométrica e estatística do volume ósseo neoformado na área do defeito ósseo.

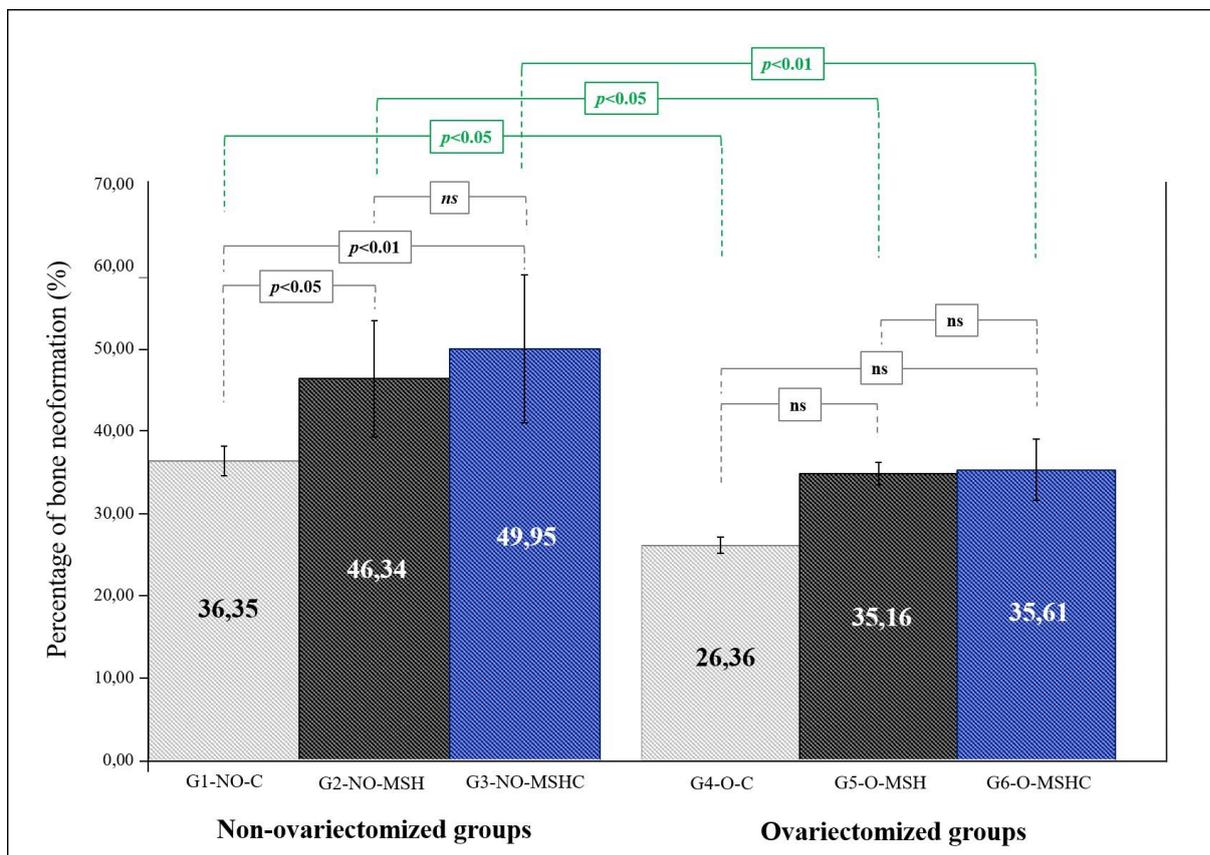
A histomorfometria foi realizada a partir de três áreas diferentes ao longo do defeito crítico para cada animal, obtendo-se o volume percentual do osso neoformado e seus respectivos desvios padrão para os grupos de estudo: $36,35 \pm 1,79$ (G1-NO-C); $46,34 \pm 7,07$ (G2-NO-MSH); $49,95 \pm 9,01$ (G3-NO-MSHC); $26,36 \pm 0,98$ (G4-O-C); $35,16 \pm 1,41$ (G5-O-MSH); $35,61 \pm 3,78$ (G6-O-MSHC).

A análise estatística revelou diferença significativa entre os grupos sadios enxertados em relação ao grupo homólogo controle (G2 e G3 vs G1), demonstrando que ambos os *scaffolds* apresentaram potencial osteorregenerativo para GBR. Apesar do maior volume de osso novo identificado nos grupos com deficiência osteometabólica, as matrizes não produziram diferença significativa quando implantadas em animais doentes e comparadas com o respectivo controle (G4 vs G5 vs G6).

Não houve diferença estatística entre o volume de osso neoformado dos grupos sadios enxertados (G2 vs G3) e em relação aos grupos ovariectomizados (G5 vs G6), desta forma as matrizes MSH e MSHC apresentaram potenciais osteocondutores semelhantes.

A deficiência gonadal produziu efeito deletério significativo para a osteogênese, quando comparamos os grupos sadios e homólogos doentes (G1 vs G4; G2 vs G5; G3 vs G6), indicando que os animais ovariectomizados apresentaram condições osteometabólicas mais desfavoráveis para a regeneração de defeitos ósseos críticos (Figura 8).

Figura 8 - Diagrama do volume percentual de osso neoformado para os grupos saudáveis e ovariectomizados e respectivas diferenças estatísticas. Os resultados estatísticos demonstrados na cor preta, demonstram as análises intergrupos saudáveis e intergrupos ovariectomizados. Os resultados estatísticos demonstrados na cor verde, demonstram as análises comparativas entre grupos homólogos. Índice de significância $p < 0.05$. (ns) Não significativo.



Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

A investigação de biomateriais como alternativas aos enxertos ósseos autólogos torna-se imperativa devido à alta prevalência de lesões que resultam em perda de massa óssea, demandando estímulos para auxiliar a consolidação. Essa necessidade é agravada pelos desafios inerentes ao uso dos enxertos convencionais, ainda considerados como o padrão-ouro em procedimentos ortopédicos (LOBB; DEGEORGE; CHHABRA, 2019; OGUERI *et al.*, 2019; ORYAN *et al.*, 2014; ORYAN; MONAZZAH; BIGHAM-SADEGH, 2015).

Consequentemente, avanços significativos têm sido feitos no desenvolvimento de biomateriais nos últimos anos, aprimorando características como osteocondução, osteointegração e bioatividade. No entanto, ainda não foi identificado um biomaterial ideal para substituição óssea, devido às limitações e desvantagens existentes. Estas incluem baixa resistência mecânica, custo elevado de produção, desafios na síntese através de processos físico-químicos, capacidade osteogênica limitada e obstáculos na osteointegração, frequentemente devido à presença de tecido conjuntivo interposto (BALDWIN *et al.*, 2019; HIRATA *et al.*, 2015; SOHN; OH, 2019).

Nesse contexto, torna-se justificável a exploração de abordagens inovadoras no âmbito da Engenharia Tecidual, como o foco desta pesquisa. Fica evidente a importância de tais estudos, que contribuem para o progresso científico nesse campo crucial, buscando soluções avançadas para desafios médicos complexos.

No presente estudo, foram realizados testes *in vivo* com um novo biomaterial a base de colágeno da serosa de intestino porcino, associada a nanohidróxiapatita sintética, tanto isoladamente quanto em combinação com a elastina derivada da cartilagem auricular bovina. Essa avaliação visou investigar a capacidade de reparo de defeitos ósseos criados experimentalmente na tíbia de ratos em condições de ovariectomia.

5.1 Modelo experimental

5.1.1 Modelos de Osteoporose

Estudos experimentais em animais consistem em uma ferramenta válida e amplamente utilizada para experimentação de drogas e implementação de procedimentos. O modelo animal

permite avaliar a propriedade de diversas substâncias, pois apresentam boa padronização, baixo custo, reprodutibilidade, e ambiente biológico semelhante aos humanos. Constituem dessa forma, etapa primordial para segurança na utilização posterior em humanos. Para o estudo da osteoporose, os modelos animais são bem estabelecidos e constituem ferramenta importante para compreensão desta patologia.

A ovariectomia em ratos é o modelo mais encontrado para indução de osteoporose (TURNER, 2001). Outros métodos empregados para inibir a produção ovariana de estrogênio envolvem o uso de substâncias químicas que levam a sua falha ou substâncias que inibem o eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Estudos prévios sugerem que a castração química resulta em alterações da densidade óssea de menor magnitude e mais lentamente em comparação a castração cirúrgica (SOPHOCLEOUS; IDRIS, 2014), sendo esta última a utilizada nesse trabalho.

Quanto a via de acesso para a ovariectomia, foi utilizada a via dupla dorsolateral, pois em comparação a via dorsal única, aquela apresenta menor tempo, menor tamanho da incisão e menor tempo de cicatrização (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2012). Além do mais, a via ventral esta associada a 30% de mortalidade em 24h, possivelmente devido a manipulação do trato gastrointestinal (BAZZIGALUPPI *et al.*, 2018).

Apesar de não haver estudos comparativos das diversas linhagens de ratos em modelos de osteoporose, as mais utilizadas são a Sprague-Dawley e Wistar, que apresentam respostas similares a ovariectomia (LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016). Utilizou-se nesse trabalho ratos Wistar com 6 meses de idade, pois estudos prévios sugerem entre 6 e 9 meses, a melhor época para ovariectomia nos estudos de osteoporose. Isso devido a menor possibilidade de alterações ósseas relacionadas a idade, que se tornam mais frequentes a partir dos 9 meses. Por outro lado, ratos com menos de 6 meses ainda apresentam um turnover ósseo positivo podendo ser um fator conflitante (FRANCISCO *et al.*, 2011; LAIB *et al.*, 2001).

Com a ovariectomia, os efeitos da queda hormonal não são uniformes em todos os ossos. Após 4 semanas os locais mais afetados em ratos são fêmur, tíbia, úmero e coluna (LIU *et al.*, 2015). Desses a tíbia é afetada com mais intensidade e mais precocemente, em especial o osso esponjoso presente na parte proximal do osso. Outra consideração é que a tíbia proximal necessita de 30 a 60 dias para que haja perda de 50% da massa óssea, o que faz desse sítio o escolhido para estudos de curto prazo (FRANCISCO *et al.*, 2011; WRONSKI *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 2018b). Portanto, foi utilizada nessa pesquisa a tíbia proximal de ratas como local para a realização do defeito ósseo e o sacrifício dos animais realizado com 6 semanas após o procedimento, corroborando com outros estudos prévios que também utilizaram a tíbia

proximal de ratos como local para análise dos efeitos da osteoporose (BASTOS *et al.*, 2014; CARLOS *et al.*, 2019; CHACON *et al.*, 2023; LIU *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 1994; SHARMA *et al.*, 2018).

5.1.2 Modelos de defeito ósseo

Os biomateriais utilizados em humanos para preenchimento de falhas ósseas devem ser previamente testados *in vitro* e *in vivo* para garantir a sua segurança e eficácia. Por isso, o uso dessas substâncias em um modelo animal estabelecido é um passo indispensável para averiguação da biocompatibilidade e características mecânicas. Essa pesquisa foi realizada em Tíbias proximais de ratas Wistar com defeito crítico de 3 mm.

Dentre os vários animais utilizados nesses estudos destacam-se os ratos pela sua capacidade de simular o ambiente fisiológico ósseo dos humanos, permitindo assim comparar a viabilidade dos diversos biomateriais empregados como substitutos ósseos (DOS SANTOS *et al.*, 2019; SKALICZKI *et al.*, 2012). Além disso, são animais de fácil manuseio, baixo custo de manutenção e seu uso é eticamente aceitável.

A definição de um defeito crítico ósseo é a menor lesão óssea que não cicatriza espontaneamente após um certo período. Para fins práticos, se não houver um preenchimento de 30% da área da lesão em 52 semanas, essa lesão não cicatrizara espontaneamente (LI *et al.*, 2015). Apesar da dificuldade da padronização exata do montante do defeito crítico, para o fêmur distal esse tamanho varia de 2 a 3 mm, 5 mm para diáfise e para calvaria 5 mm (LI *et al.*, 2015; VAJGEL *et al.*, 2014). Seguimos outros trabalhos em que o defeito crítico na tíbia foi de 3 mm (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2015; RADY; MUBARAK; ABDEL MONEIM, 2018), embora outros autores definiram na tíbia proximal o defeito crítico como um defeito unicortical de 2 x 5 mm (REN *et al.*, 2022).

5.2 Compatibilidade dos biomateriais

A biocompatibilidade pode ser definida como a boa resposta do organismo hospedeiro quando um determinado biomaterial entra em contato com seus tecidos ou fluidos orgânicos (HAJI; SELIVANY; SULIMAN, 2022; RATNER, 2013; SHARMA; LUTHRA, 2023). Ainda segundo esses autores, um material biocompatível não deve provocar uma resposta inflamatória

que inclua a presença de células polimorfonucleares, uma vez que essas células são indicativas de uma reação de corpo estranho, caracterizando incompatibilidade biológica do enxerto. Seguindo esse conceito, não estamos apenas considerando a interação biológica entre os tecidos do receptor e o implante, mas também a capacidade desse biomaterial de atender às demandas funcionais do tecido em questão (COSTA *et al.*, 2021).

Em relação a regeneração óssea, estudos *in vitro* demonstraram que a formação de osso está intimamente ligada ao ambiente celular e requer uma superfície que não seja tóxica (DUBOIS *et al.*, 1999). Outro fator a ser considerado é que durante o processo de formação de osso novo, o biomaterial enxertado também pode passar por um processo de degradação, liberando produtos residuais que, juntamente com as alterações de pH, atividade metabólica local e a baixa vascularização da área cirúrgica, podem desencadear reações inflamatórias indesejadas (YU *et al.*, 2015).

Segundo os preceitos de Henkel *et al.* (2013), é essencial que o biomaterial seja fabricado a partir de produtos que não apresentem potencial para desencadear reações imunológicas ou respostas clínicas de rejeição (HENKEL *et al.*, 2013). Substâncias naturais com agentes de reticulação demonstram vantagens como as descritas anteriormente, especialmente em termos de baixa toxicidade celular e capacidade de prevenir calcificações (MA *et al.*, 2014).

Esta pesquisa com biomateriais a base de colágeno da serosa de intestino porcino, associada a nanohidróxiapatita sintética, tanto isoladamente quanto em combinação com a elastina derivada da cartilagem auricular bovina atendeu aos requisitos de biocompatibilidade, pois revelou a ausência de sinais inflamatórios e infecciosos de rejeição tecidual em todos os grupos de estudo que receberam os enxertos de biomaterial. Durante a inspeção visual direta das áreas cirúrgicas, não foram observados quaisquer indícios de secreção purulenta, abscessos, edema ou vermelhidão local. Na análise histológica, não se detectou a presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos, enquanto a radiografia não indicou qualquer processo de rarefação óssea ou reação periostal na região do enxerto.

Dentre os fatores que contribuem significativamente para a baixa toxicidade dos biomateriais empregados nesta pesquisa, destaca-se o processo físico-químico a que esses materiais poliméricos naturais são submetidos, especialmente quando consideramos a sua origem animal. O método de hidrólise alcalina aplicado na obtenção desses biomateriais desempenha um papel crucial na eliminação de células, impurezas e resíduos dos tecidos bovino e suíno. Isso resulta em uma considerável redução da imunogenicidade do material, visto que a resposta imunológica está diretamente relacionada à presença de células dos tecidos.

Essas conclusões são respaldadas por Rocha, Goissis e Rossi (2002), que não relataram quaisquer reações adversas inflamatórias ao implantar matrizes poliméricas na tíbia de ratos. Esses pesquisadores também destacam que as matrizes nativas, originadas do tecido bovino e submetidas ao processo de hidrólise alcalina para a modificação das cargas iônicas, passam pelo mesmo processo de eliminação de células, assegurando, assim, a biocompatibilidade quando enxertadas na área receptora dos ratos.

Concordando com nossos resultados, outras investigações que empregaram polímeros naturais para a regeneração óssea, utilizando métodos físico-químicos semelhantes, também demonstraram baixa imunogenicidade e rejeição tecidual. Por exemplo, Cunha *et al.* (2021) implantaram membranas à base de colágeno, derivadas da serosa intestinal de suínos, com um processo de preparação semelhante no osso parietal de ratos e não observaram infiltrados inflamatórios nas áreas implantadas. De maneira similar, De Moraes *et al.* (2019), ao utilizar um polímero natural à base de elastina, proveniente do pavilhão auricular bovino e processado pelo método de hidrólise alcalina, não detectaram fatores imunogênicos, como neutrófilos e monócitos, em suas amostras de crânio de ratos. Essas descobertas estão em consonância com outros estudos que comprovam a biocompatibilidade de membranas poliméricas naturais, empregando métodos físico-químicos semelhantes (HIRATA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2012; MUNHOZ *et al.*, 2013). Além disso, a nanohidroxiapatita sintetizada também demonstraram ser biocompatível, conforme evidenciado em diversas pesquisas (CHENG *et al.*, 2003; GOSHIMA *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2013).

Este estudo concentrou-se principalmente na caracterização imunológica da matriz de colágeno e nanohidroxiapatita associada à elastina, devido à escassez de informações disponíveis sobre esse biomaterial derivado da cartilagem auricular bovina e serosa intestinal porcina. Em resumo, podemos afirmar que os biomateriais empregados nesta pesquisa demonstraram ser não tóxicos, tornando-os uma alternativa viável na prática clínica. No entanto, é crucial destacar que outros fatores devem ser considerados para que esses materiais sejam considerados bioativos e adequados para acelerar a regeneração óssea. Isso inclui sua capacidade de reabsorção simultaneamente à neoformação óssea e a ausência de tecido fibroso nas áreas circundantes.

5.3 Reabsorção

A biorreabsorção do biomaterial é uma propriedade fundamental, pois permite a regeneração óssea, requerendo uma sincronia entre a degradação da membrana e a proliferação celular (CAÑAS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2023; ORYAN *et al.*, 2014). Por outro lado, é crucial que o processo de reabsorção do biomaterial não ocorra demasiadamente rápido, a fim de permitir que o biomaterial desempenhe sua função de suporte e apoio durante o crescimento celular (VANLEENE, 2015). Oryan *et al.* (2014) ressaltam que o tempo de reabsorção de cada biomaterial é específico, dependendo de sua estrutura característica e das particularidades morfofisiológicas do tecido receptor, destacando que o equilíbrio entre a degradação do biomaterial e o processo de neoformação óssea é extremamente delicado, visto que reações químicas e celulares durante a degradação podem atuar como inibidores da formação óssea (CUNHA *et al.*, 2015).

Observou-se neste estudo que após 6 semanas, foi possível visualizar, pelo menos parcialmente, as membranas em todos os grupos enxertados por meio de avaliação macroscópica. No entanto, os grupos G2-NO-MSH e G3-NO-MSHC demonstraram uma maior taxa de reabsorção, evidenciada pela presença de uma maior neoformação óssea entrelaçada com as membranas, conforme revelado pela análise histológica utilizando a técnica do Tricrômico de Masson. Ambos os grupos são compostos por animais saudáveis, demonstrando a influência negativa da deficiência hormonal na regeneração óssea. O estudo de Chacon *et al* (2023), utilizando blendas de colágeno e quitosana associada a hidroxiapatita, revelou a menor taxa de reabsorção dos biomateriais implantados nos grupos ovariectomizados. Cunha *et al.* (2010) concluíram que a formação óssea depende das propriedades dos biomateriais, entre elas a taxa de reabsorção, e possuem relação direta com a qualidade do tecido ósseo hospedeiro.

De acordo com diversos autores, os polímeros naturais exibem uma capacidade intrínseca de biorreabsorção, e esse processo de forma precoce pode até prejudicar a resposta do tecido receptor (LEE; MOONEY, 2012; MA, 2004). Estudos anteriores que utilizaram matrizes poliméricas naturais de colágeno submetidas a hidrólise alcalina em implantes no fêmur de ratas, foi observada a biorreabsorção das membranas após 2 meses (CUNHA *et al.*, 2008). Em uma linha semelhante, Munhoz *et al.* (2018), ao empregar uma blenda polimérica composta de quitosana e colágeno em defeitos na calvária de ratos, destacou a importância de aguardar oito semanas para que ocorresse a reabsorção dos biomateriais. O mesmo autor salientou que a biorreabsorção não necessariamente estimula a formação óssea, mas pode resultar na formação de um encapsulamento fibrótico do material enxertado, uma situação que inviabiliza a utilização

eficaz do biomaterial. Esta afirmação salienta a importância da concomitância da formação óssea com a degradação do biomaterial. Nessa pesquisa essa condição foi observada especialmente no grupo G3-NO-MSHC. A associação dos biomateriais naturais poliméricos em animais saudáveis criou condições físicas e biológicas adequadas para a regeneração óssea. Diversos estudos demonstram que a elastina possui característica intrinsecamente hidrofóbica, deixando a reabsorção de matrizes contendo esse biomaterial mais lenta (GURUMURTHY; BIERDEMAN; JANORKAR, 2016; SARANGTHEM; SINGH; DINDA, 2021). Paradoxalmente neste trabalho, a taxa de absorção das matrizes contendo elastina foi maior que as matrizes compostas apenas de colágeno e nanohidroxiapatita. Esse fato pode ser significativo quando observamos que a melhor razão entre absorção e neoformação óssea foi conseguida no grupo G3-NO-MSHC.

Esse estudo demonstrou que a biorreabsorção dos biomateriais e concomitante neoformação óssea está relacionada principalmente a qualidade óssea do hospedeiro, reforçando a necessidade de avaliação de alterações orgânicas intrínsecas do leito receptor e não somente as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade presentes em um biomaterial.

5.4 Caracterização da osteorregeneração

O conceito de osteorregeneração, amplamente explorado na engenharia tecidual, representa um desafio constante para os pesquisadores que buscam desenvolver materiais não tóxicos, com reabsorção controlada, capazes de atender aos princípios fundamentais da regeneração óssea, baseados na osteocondução, osteoindução e osteogênese.

A osteogênese é o processo de formação de osso novo, desencadeado pela atividade das células osteoblásticas presentes no enxerto (NAUTH *et al.*, 2015; ZIZZARI *et al.*, 2016). Por outro lado, a osteocondução descreve a capacidade do material transplantado em atuar como suporte para a formação de osso novo, devido à sua estrutura microscópica que permite a infiltração vascular e a migração de elementos celulares necessários para a osteogênese. A eficácia da osteocondução depende da arquitetura microscópica do material, sendo um fator essencial na regeneração óssea. Essa eficácia é facilitada pela presença de poros que permitem a migração e a proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, bem como o depósito de componentes da matriz nos espaços vazios disponíveis (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; HAN; SONG, 2020). A osteoindução é um processo mediado por proteínas, como as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas), e fatores de crescimento que promovem o

estímulo para a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004; URIST, 2002).

Além das dificuldades relacionadas à regeneração do tecido ósseo em geral, pacientes com osteoporose constituem um desafio ainda maior. A presença desta patologia em nível global eleva os cuidados dispendidos de modo significativo, sendo considerado um problema de saúde pública devido aos custos envolvidos e à complexidade no tratamento dessas condições. Essa parcela da população, quando enfrenta defeitos ósseos, requer procedimentos auxiliares que possam promover ou estimular a regeneração óssea. Portanto, o desenvolvimento de biomateriais capazes de atender a essa necessidade é de extrema importância e justifica os esforços dedicados a esse fim, até mesmo porque, até o momento, ainda não identificamos o biomaterial ideal para alcançar esse objetivo.

Considerando os conceitos mencionados anteriormente, a análise morfométrica revelou que as membranas a base de colágeno da serosa de intestino porcino, associada a nHA sintética, tanto isoladamente quanto em combinação com a elastina derivada da cartilagem auricular bovina demonstraram propriedades osteocondutoras. Isso é evidenciado pelo aumento da neoformação óssea em comparação com o grupo controle, que apresentou uma falha óssea não preenchida. No entanto, é importante observar que nos grupos de animais ovariectomizados, quando comparados ao grupo controle, a diferença não foi significativa. Esse achado está em concordância com resultados observados em outras pesquisas, tanto experimentais quanto clínicas. Em um artigo de revisão, Cheung *et al.* (2016) reportam que a regeneração em ossos osteoporóticos é prejudicada não apenas na fase inicial de consolidação, mas também nas etapas finais do processo de remodelação óssea. O estudo ainda destaca que, nas fases iniciais da consolidação, animais com osteoporose induzida por ovariectomia apresentam um recrutamento reduzido de células mesenquimais indiferenciadas, níveis inferiores de angiogênese e atrasos no desenvolvimento dos receptores de estrogênio (CHEUNG *et al.*, 2016).

Outros estudos experimentais realizados em ratos também corroboram a observação de que animais submetidos à ovariectomia apresentaram uma taxa reduzida de neoformação óssea em defeitos ósseos enxertados com polímeros naturais (CHACON *et al.*, 2023; CUNHA *et al.*, 2008; HIRATA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018b). A menor osteogênese analisada em todos os grupos com deficiência gonadal, pode estar relacionada à alteração do metabolismo mineral, tais como o magnésio com implicações importantes no processo de adesão celular, o zinco que atua como um agente estimulador da diferenciação de osteoblastos e o potássio no controle bioquímico e deposição de apatita (HONG *et al.*, 2022). Um estudo incorporou íons de

magnésio em um scaffold intrafibrilar de colágeno e HA, obtendo resultados significativos para a osteoindutividade (YU *et al.*, 2020).

É fundamental ressaltar que além das condições biológicas do hospedeiro, a regeneração óssea é influenciada por outros fatores, entre eles o tamanho dos poros e a porosidade dos biomateriais utilizados. Os biomateriais com porosidade desempenham um papel crucial, pois facilitam a migração, proliferação e diferenciação celular, além de permitirem o eficiente transporte de nutrientes e oxigênio dentro de sua estrutura (MOORE *et al.*, 2004; ZIMMERMANN; MOGHADDAM, 2011). Com essas propriedades, essas membranas atuam como estruturas tridimensionais intrínsecas, funcionando como andaimes ou *scaffolds* para a proliferação celular.

Vários autores têm estudado o tamanho dos poros de um biomaterial, destacando sua relevância na promoção do crescimento ósseo. No entanto, não há um consenso quanto ao tamanho ideal dos poros para o crescimento celular, uma vez que relatos variam de 50 µm até 500 µm (DAHABREH *et al.*, 2014; MAUFFREY *et al.*, 2011; PRAKASAM *et al.*, 2017). Outros autores citam que: enquanto poros de maior diâmetro, acima de 200 a 300 µm favorecem o crescimento ósseo, poros menores facilitam a adesão celular, o fluxo capilar e retenção de fluidos fisiológicos, favorecendo a integração do biomaterial com o tecido ósseo (ZHANG *et al.*, 2018a).

Neste estudo, a caracterização das blendas MSH e MSHC, demonstrou que o processo de hidrólise alcalina e liofilização gerou porosidade média de 28,8 e 26,1µm, cujos poros mantiveram-se interconectados e nucleados por partículas de nHA em seu interior, preservando a arquitetura tridimensional para a absorção de fluídos e possibilidade de estimulação da angiogênese. Mesmo apresentando poros com tamanhos inferiores ao preconizado na literatura, houve maior formação de volume ósseo relativo dos grupos que receberam as membranas em relação aos grupos controle. Observou-se também que a associação da elastina nas membranas MSHC não alterou de modo significativo a medida dos poros. Como descrito anteriormente, talvez não somente a microporosidade, mas a interconexão entre poros de tamanhos distintos talvez seja a característica mais crucial em um biomaterial utilizado para a regeneração óssea (ELSHEIKH *et al.*, 2022; LYONS *et al.*, 2020).

Outro diferencial destes *scaffolds* é o emprego da nanotecnologia com o intuito de mimetizar a morfologia óssea. A rigidez do osso nativo é decorrente da deposição de nHA em lacunas medindo 40 nm formadas pelas fibras de colágeno e por esta razão, biomateriais nanoestruturados apresentam vantagem clínica (TONG *et al.*, 2023). As nanopartículas de hidroxiapatita com tamanho de 1 a 100 nm apresentam maior atividade biológica e viabilizam

a adesão de células tronco mesenquimais (TAN *et al.*, 2019), evitando o aumento drástico da rigidez e resistência à degradação dos andaimes (SHAHREZAIE *et al.*, 2018). Esta característica foi interessante principalmente para as matrizes MSHC, nas quais já era esperada maior dureza do biomaterial em virtude da presença da elastina. É importante destacar, no entanto, que a incorporação de um material cerâmico em um biomaterial pode resultar na diminuição do tamanho dos poros do composto. O excesso de mineralização de polímeros pode acarretar efeitos adversos na microarquitetura dos andaimes, criando uma topografia inadequada para a infiltração celular e a reabsorção *in vivo* (TSAI; HSU; CHEN, 2008). Estudos indicam que a deposição de cristais de hidroxiapatita sobre as matrizes poliméricas reduziu o diâmetro e a interconectividade dos poros, impactando negativamente a osteogênese (CUNHA *et al.*, 2017; HAMADA *et al.*, 2010).

Apesar do acréscimo da elastina em MSHC, ambos os *scaffolds* apresentaram neoformação óssea semelhantes, tanto nos animais sadios quanto nos animais com deficiência mineral óssea. Inversamente ao esperado, a adição de uma proteína hidrofóbica não conferiu maior resistência às matrizes nos testes de absorção *in situ*, que apresentou taxa de degradação superior à MSH. O mesmo resultado foi confirmado *in vivo* pela presença de fragmentos menores dos andaimes que continham elastina nos defeitos ósseos. Em contrapartida à biodegradação mais acelerada do andaime MSHC, também foi constatada intensa diferenciação osteogênica, especialmente no grupo sadio (G3-NO-MSHC) no qual foi possível observar a neoformação óssea com morfologia mais compacta, rica em osteócitos e com característica de maturidade confirmada pela predominância da coloração vermelha nas lâminas coradas com tricrômico de masson.

Uma outra vantagem significativa da utilização de polímeros na engenharia tecidual reside na capacidade intrínseca desses materiais de sofrerem alterações tanto químicas quanto físicas em sua estrutura. Isso abre caminho para melhorar sua capacidade osteogênica, por exemplo, através da modificação das sequências moleculares para aumentar a carga aniônica dos tecidos, conforme destacado por YEO *et al.* (2015). As modificações químicas aplicadas a polímeros naturais, como o colágeno, podem ser alcançadas por meio de tratamento alcalino, que promove a hidrólise seletiva das cadeias carboxiamidas da aspargina e glutamina. Isso resulta em um aumento no número de cargas negativas superficiais na molécula, elevando, conseqüentemente, as propriedades piezoelétricas e dielétricas do material (ROCHA *et al.*, 2006). Nesse estudo, tanto o colágeno como a elastina foram obtidas através da hidrólise alcalina. Essas propriedades ganham destaque por sua relevância, uma vez que se sabe que as correntes elétricas desempenham um papel fundamental no processo de remodelação óssea.

Outro aspecto importante como descrito anteriormente é que esse tratamento transforma a matriz nativa do material em uma estrutura porosa, o que favorece a adesão celular e a proliferação angioblástica. Isso, por sua vez, proporciona ao material condições mais propícias para a neoformação óssea (ROCHA; GOISSIS; ROSSI, 2002). Considerando as vantagens da hidrólise alcalina em polímeros naturais, conforme destacado por Bet *et al.* (2001) (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001), diversos estudos têm evidenciado as propriedades promissoras do uso de colágeno aniônico em defeitos ósseos induzidos experimentalmente em ratos. Os resultados obtidos indicam uma notável biocompatibilidade com o tecido hospedeiro, uma vez que as células nativas do tecido foram eliminadas durante a fabricação desses materiais, permitindo que o colágeno aniônico mimetizasse a Matriz Extracelular (MEC) (HIRATA *et al.*, 2015; PETTIAN *et al.*, 2018). Além disso, observou-se que o colágeno estimulou ativamente a regeneração celular e vascular, promovendo a formação de novo tecido que se assemelhava ao osso original. Esses achados são extremamente promissores no contexto da engenharia tecidual e apontam para a capacidade do colágeno aniônico em desencadear processos regenerativos essenciais para a restauração de defeitos ósseos.

Com base nos resultados desta pesquisa e na correlação com dados da literatura, torna-se evidente a necessidade de conduzir novos estudos para aprofundar a compreensão da estrutura e das características das membranas utilizadas. Esses estudos devem abranger a determinação do tamanho dos poros, a caracterização da hidrofília/hidrofobia da superfície, a quantificação da concentração de HA adicionada e a determinação do melhor tempo para a hidrólise alcalina. Além disso, é importante considerar a possibilidade de incluir proteínas e/ou fatores de crescimento que estimulem a osteoindução e a osteogênese nesses *scaffolds*.

Portanto, é imperativo que novas pesquisas sejam conduzidas no campo dos biomateriais, com o objetivo de fornecer uma orientação mais sólida para sua aplicação, seja de forma isolada, em misturas ou em associação com outros materiais que possam promover a osteoregeneração de maneira eficaz, de acordo com os padrões clínicos estabelecidos pela medicina regenerativa.

6 CONCLUSÃO

- Os biomateriais implantados demonstraram biocompatibilidade com o tecido ósseo dos ratos, evidenciada pela ausência de sinais inflamatórios ou de rejeição, tanto em observações macroscópicas, radiográficas quanto histológicas.
- Houve reabsorção parcial dos biomateriais implantados, especialmente nos grupos que receberam hidroxiapatita, ocorrendo concomitantemente à neoformação óssea.
- O osso recém-formado exibiu características de imaturidade e lamelação, acompanhadas por uma organização das fibras de colágeno, indicando um processo de remodelação óssea ativa e atividade osteoblástica.
- A neoformação óssea ocorreu em todos os grupos submetidos ao enxerto de biomateriais, com os resultados mais promissores sendo observados nos animais sem ovariectomia.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, N. *et al.* Porous scaffolds for bone regeneration. **Journal of Science: advanced materials and devices**, v. 5, n. 1, p. 1–9, Mar. 2020.
- ABDUL HALIM, N. A.; HUSSEIN, M. Z.; KANDAR, M. K. Nanomaterials-Upconverted hydroxyapatite for bone tissue engineering and a platform for drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 6477–6496, Sept. 2021.
- ABOU NEEL, E. A. *et al.* Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 429–456, Apr. 2013.
- ALLEN, T. **Particle size measurement**. Berlin: Springer, 2013.
- BALDWIN, P. *et al.* Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 33, n. 4, p. 203–213, Apr. 2019.
- BARTL, R.; BARTL, C. **The Osteoporosis manual: prevention, diagnosis and management**. Berlin: Springer, 2019.
- BASTOS, M. F. *et al.* Impact of caffeine and/or estrogen deficiency on trabecular bone area and healing: a study in rats. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 29, n. 1, p. 221–231, Jan. 2014.
- BAUER, A. J. P. *et al.* Current development of collagen-based biomaterials for tissue repair and regeneration. **Soft Materials**, v. 12, n. 4, p. 359–370, Oct. 2014.
- BAZZIGALUPPI, P. *et al.* Oophorectomy reduces estradiol levels and long-term spontaneous neurovascular recovery in a female rat model of focal ischemic stroke. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 338, Sept. 2018.
- BELLINGHAM, C. M.; KEELEY, F. W. Self-ordered polymerization of elastin-based biomaterials. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 8, n. 2, p. 135–139, Mar. 2004.
- BERTOLO, M. R. V.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Effects of calcium phosphates incorporation on structural, thermal and drug-delivery properties of collagen:chitosan scaffolds. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 25–35, 2019.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1074–1079, 2001.
- BUZA III, J. A.; EINHORN, T. Bone healing in 2016. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 101–105, May. 2016.
- CALCEI, J. G.; RODEO, S. A. Orthobiologics for bone healing. **Clinics in Sports Medicine**, v. 38, n. 1, p. 79–95, Jan. 2019.

CAÑAS-GUTIÉRREZ, A. *et al.* Biomineralization process in three-dimensional scaffolds based on bacterial nanocellulose for bone tissue engineering: chemical and morphological features, and stem cell differentiation. **Polymers**, v. 15, n. 9, Feb. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym15092012>.

CAO, H.; LIU, T.; CHEW, S. Y. The Application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 12, p. 1055–1064, Oct. 2009.

CARLOS, B. L. *et al.* Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. **Journal of Biomaterials Science**. Polymer edition, v. 30, n. 14, p. 1291–1307, Oct. 2019.

CAULEY, J. A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, v. 99, pt A, p. 11–15, July 2015.

CEN, L. *et al.* Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 492–496, May 2008.

CHACON, E. L. *et al.* Collagen-chitosan-hydroxyapatite composite scaffolds for bone repair in ovariectomized rats. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 28, Jan. 2023.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v. 101, n. 8, p. 821–833, Aug. 2014.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. R. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors**, v. 22, n. 4, p. 233–241, Dec. 2004.

CHEN, M. *et al.* Function of calcium-rich hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in osteoporosis. **Materials Express**, v. 12, n. 2, p. 214–219, 2022.

CHEUNG, W. H. *et al.* Fracture healing in osteoporotic bone. **Injury**, v. 47, Suppl. 2, p. S21–6, June 2016.

CHUNG, M. I. S. *et al.* Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: clues to the evolutionary history of elastins. **Matrix Biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 25, n. 8, p. 492–504, Oct. 2006.

COSTA, P. D. C. *et al.* Natural origin biomaterials for 4D bioprinting tissue-like constructs. **Advanced Materials Technologies**, v. 6, n. 10, Oct. 2021. DOI: 10.1002/admt.202100168.

CUI, W. *et al.* Biomimetic porous scaffolds containing decellularized small intestinal submucosa and Sr²⁺/Fe³⁺ co-doped hydroxyapatite accelerate angiogenesis/osteogenesis for bone regeneration. **Biomedical Materials**, v. 17, n. 2, p. 025008, 2022. DOI: 10.1088/1748-605X/ac4b45.

CUNHA, F. B. *et al.* In Vivo biological behavior of polymer scaffolds of natural origin in the bone repair process. **Molecules**, v. 26, n. 6, Mar. 2021. DOI: 10.3390/molecules26061598.

CUNHA, M. R. *et al.* Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. **Journal of Materials Science**. Materials in medicine, v. 19, n. 3, p. 1341–1348, Mar. 2008.

CUNHA, M. R. *et al.* Characterization of the physical and mechanical properties of femoral bone defects filled with polyanionic collagen scaffolds in ovariectomized rats. **Materials Research**, v. 13, n. 2, p. 239-244. 2010.

CUNHA, M. R. *et al.* Evaluation of the bone repair in defects grafted with hydroxyapatite and collagen membrane combined with laser therapy in rats. **Journal of Laser Applications**, v. 23, n. 4, Nov. 2011. DOI: 10.2351/1.3646907.

CUNHA, M. R. *et al.* Hydroxyapatite and a new fibrin sealant derived from snake venom as scaffold to treatment of cranial defects in rats. **Materials Research**, v. 18, n. 1, p. 196–203, 2015.

CUNHA, M. R. *et al.* In Vivo study of the osteoregenerative potential of polymer membranes consisting of chitosan and carbon nanotubes. **Materials Research**, v. 20, n. 3, p. 819–825, 2017.

DAHABREH, Z. *et al.* Ability of bone graft substitutes to support the osteoprogenitor cells: an in-vitro study. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 4, p. 497–504, Sept. 2014.

DEREKA, X. *et al.* Osseointegration in osteoporotic-like condition: a systematic review of preclinical studies. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 6, p. 933–940, Dec. 2018.

DIMITRIOU, R. *et al.* Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. **Injury**, v. 42, Suppl. 2, p. S3-15, Sept. 2011.

DOLCIMASCOLO, A. *et al.* Innovative biomaterials for tissue engineering. *In*: BARBECK, M. *et al.* (Ed.). **Biomaterial-supported tissue reconstruction or regeneration**. London: IntechOpen, 2019.

DOMICIANO, D. S. *et al.* Incidence and risk factors for osteoporotic vertebral fracture in low-income community-dwelling elderly: a population-based prospective cohort study in Brazil. The São Paulo Ageing & Health (SPA) Study. **Osteoporosis International: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 25, n. 12, p. 2805–2815, Dec. 2014.

DU, Y. *et al.* Hierarchically designed bone scaffolds: From internal cues to external stimuli. **Biomaterials**, v. 218, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119334>.

DUBOIS, J. C. *et al.* An Image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials. **Biomaterials**, v. 20, n. 19, p. 1841–1849, Oct. 1999.

ELHENDAWI, H. *et al.* Effect of synthesis temperature on the crystallization and growth of in situ prepared nanohydroxyapatite in chitosan matrix. **ISRN Biomaterials**, v. 2014, Feb. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/897468>.

ELSHEIKH, M. *et al.* Effects of pore interconnectivity on bone regeneration in carbonate apatite blocks. **Regenerative Biomaterials**, v. 9, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/rb/rbac010>.

FAURY, G. Function–structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. **Pathologie et Biologie**, v. 49, n. 4, p. 310–325, Jan. 2001.

FINI, M.; GIAVARESI, G.; TORRICELLI, P. Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone: a preliminary in vitro and in vivo study. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. British volume, v. 83-B, n. 1, p. 139–143, Jan. 2001.

FRANCISCO, J. I. *et al.* Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. **Journal of Orthopaedic Research**: official publication of the Orthopaedic Research Society, v. 29, n. 2, p. 189–196, Feb. 2011.

GABBAI-ARMELIN, P. R. *et al.* Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **Journal of Materials Science**. Materials in medicine, v. 26, n. 5, May 2015. DOI: 10.1007/s10856-015-5516-1.

GARCIA, C. F. *et al.* Development of collagen/nanohydroxyapatite scaffolds containing plant extract intended for bone regeneration. **Materials Science and Engineering: C materials for biological applications**, v. 123, Apr. 2021. DOI: 10.1016/j.msec.2021.111955.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36 Suppl. 3, p. S20-S27, Nov. 2005.

GRANADOS, M. *et al.* Development and characterization of a porcine mitral valve scaffold for tissue engineering. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 10, n. 4, p. 374–390, Aug. 2017.

GRIFFONI, C. *et al.* Ceramic bone graft substitute (Mg-HA) in spinal fusion: a prospective pilot study. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, Nov. 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1050495.

GURUMURTHY, B.; BIERDEMAN, P. C.; JANORKAR, A. V. Composition of elastin like polypeptide-collagen composite scaffold influences in vitro osteogenic activity of human adipose derived stem cells. **Dental materials**: official publication of the Academy of Dental Materials, v. 32, n. 10, p. 1270–1280, Oct. 2016.

HAJI, T. H.; SELIVANY, B. J.; SULIMAN, A. A. Sealing ability in vitro study and biocompatibility in vivo animal study of different bioceramic based sealers. **Clinical and Experimental Dental Research**, v. 8, n. 6, p. 1582–1590, Dec. 2022.

HAK, D. J. The Use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 15, n. 9, p. 525–536, Sept. 2007.

HAMADA, H. *et al.* Effect of geometrical structure on the biodegradation of a three-dimensionally perforated porous apatite/collagen composite bone cell scaffold. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 7, p. 1228–1232, 2010.

HAN, J. S.; SONG, H. K. Bone substitutes: from basic to current update. **Journal of the Korean Fracture Society**, v. 33, n. 4, p. 238–244, Oct. 2020.

HAUGEN, H. J. *et al.* Bone grafts: which is the ideal biomaterial?. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 46 Suppl 21, p. 92–102, June 2019.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to bioceramics**. Singapura: World Scientific, 1993.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1142/2028>.

HENKEL, J. *et al.* Bone regeneration based on tissue engineering conceptions - a 21st century perspective. **Bone Research**, v. 1, n. 3, p. 216–248, Sept. 2013.

HIRATA, H. H. *et al.* Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats. **Injury**, v. 46, n. 7, p. 1215–1222, July 2015.

HONG, J.-M.; KIM, U.-G.; YEO, I.-S. L. Comparison of three-dimensional digital analyses and two-dimensional histomorphometric analyses of the bone-implant interface. **PLOS ONE**, v. 17, n. 10, Oct. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276269>.

HONG, M.-H. *et al.* Biomineralization of bone tissue: calcium phosphate-based inorganics in collagen fibrillar organic matrices. **Biomaterials Research**, v. 26, Sept. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00288-0>.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Influence of collagen addition on the thermal and morphological properties of chitosan/xanthan hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 225–230, Sept. 2015.

HSUEH, Y.-S. *et al.* Design and synthesis of elastin-like polypeptides for an ideal nerve conduit in peripheral nerve regeneration. **Materials Science & Engineering. C, materials for biological applications**, v. 38, p. 119–126, May 2014.

JAHAN, K.; TABRIZIAN, M. Composite biopolymers for bone regeneration enhancement in bony defects. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 1, p. 25–39, Jan. 2016.

KANIS, J. A. **Assessment of osteoporosis at the primary health-care level**. Sheffield: University of Sheffield; Geneva: World Health Organization, 2007. (Technical report University of Sheffield).

KARNIK, S. K. *et al.* A Critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. **Development**, v. 130, n. 2, p. 411–423, Jan. 2003.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a new method of ovariectomy in female rats. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 3, p. 462–470, jun. 2012.

KINACI, A.; NEUHAUS, V.; RING, D. C. Trends in bone graft use in the United States. **Orthopedics**, v. 37, n. 9, Sept. 2014. DOI: [10.3928/01477447-20140825-54](https://doi.org/10.3928/01477447-20140825-54).

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 267, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000300006>.

LAIB, A. *et al.* The Temporal changes of trabecular architecture in ovariectomized rats assessed by MicroCT. **Osteoporosis international**: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, v. 12, n. 11, p. 936–941, 2001.

LANGDAHL, B.; FERRARI, S.; DEMPSTER, D. W. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 8, n. 6, p. 225–235, Dec. 2016.

LEDER, B. Z.; WEIN, M. N. **Osteoporosis**: pathophysiology and clinical management. Berlin: Springer Nature, 2020.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, Jan. 2012.

LEE, P.; YEO, G. C.; WEISS, A. S. A Cell adhesive peptide from tropoelastin promotes sequential cell attachment and spreading via distinct receptors. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 14, p. 2216–2230, July 2017.

LI, M. *et al.* Small intestinal submucosa: a potential osteoconductive and osteoinductive biomaterial for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 149- 156, June 2017.

LI, Y. *et al.* Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 3, n. 3, p. 95–104, July 2015.

LIM, J. *et al.* Comparison of bone regeneration rate in flat and long bone defects: calvarial and tibial bone. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 6, p. 336–340, Dec. 2013.

LIU, W. *et al.* Alkaline biodegradable implants for osteoporotic bone defects--importance of 76 microenvironment pH. **Osteoporosis International**: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, v. 27, n. 1, p. 93–104, Jan. 2016.

LIU, X. L. *et al.* Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, n. 4, p. 392–398, Apr. 2015.

LOBB, D. C.; DEGEORGE JR., B. R.; CHHABRA, A. B. Bone graft substitutes: current concepts and future expectations. **The Journal of Hand Surgery**, v. 44, n. 6, p. 497- 505, June 2019.

LOWE, B.; HARDY, J. G.; WALSH, L. J. Optimizing nanohydroxyapatite nanocomposites for bone tissue engineering. **ACS Omega**, v. 5, n. 1, p. 1–9, Jan. 2020.

LYONS, J. G. *et al.* Nanostructured biomaterials for bone regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 922, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00922>.

MA, B. *et al.* Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. **Regenerative Biomaterials**, v. 1, n. 1, p. 81–89, Nov. 2014.

- MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30–40, May 2004.
- MACHA, I. J. *et al.* Marine structure derived calcium phosphate-polymer biocomposites for local antibiotic delivery. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 666–680, Jan. 2015.
- MACHADO, E. G. *et al.* A New heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 3, p. 288–296, Apr. 2015.
- MACHULA, H.; ENSLEY, B.; KELLAR, R. Electrospun tropoelastin for delivery of therapeutic adipose-derived stem cells to full-thickness dermal wounds. **Advances in Wound Care: the journal for prevention and healing**, v. 3, n. 5, p. 367–375, May 2014.
- MAHARA, A.; KIICK, K. L.; YAMAOKA, T. In vivo guided vascular regeneration with a non-porous elastin-like polypeptide hydrogel tubular scaffold. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 105, n. 6, p. 1746–1755, June 2017.
- MALLICK, K. **Bone substitute biomaterials**. Amsterdã: Elsevier, 2014.
- MARTYN, C. N.; GREENWALD, S. E. A Hypothesis about a mechanism for the programming of blood pressure and vascular disease in early life. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 28, n. 11, p. 948–951, Nov. 2001.
- MAUFFREY, C. *et al.* Bone graft substitutes for articular support and metaphyseal comminution: what are the options?. **Injury**, v. 42, Suppl. 2, p. S35-S39, Sept. 2011.
- MCCLURE, M. J.; SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G. L. Tri-layered vascular grafts composed of polycaprolactone, elastin, collagen, and silk: optimization of graft properties. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 10, p. 48–61, June 2012.
- MIRANDA-NIEVES, D.; CHAIKOF, E. L. Collagen and elastin biomaterials for the fabrication of engineered living tissues. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 3, n. 5, p. 694–711, May 2017.
- MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The Use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, Suppl. 3, p. 1–11, 1991.
- MOORE, M. J. *et al.* Quantitative analysis of interconnectivity of porous biodegradable scaffolds with micro-computed tomography. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 71, n. 2, p. 258–267, Nov. 2004.
- MORAES, L. F. S. *et al.* Gastos com o tratamento da osteoporose em idosos do Brasil (2008 - 2010): análise dos fatores associados. **Revista Brasileira de Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology**, v. 17, n. 3, p. 719–734, 2014.
- MORAES, R. *et al.* Suitability of the use of an elastin matrix combined with bone morphogenetic protein for the repair of cranial defects. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 8, p. 5261–5271, Aug. 2019.

- MOREIRA, P. L. *et al.* Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: an ultrastructural and immunocytochemical study. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied biomaterials**, v. 101, n. 1, p. 18-27, Jan. 2013.
- MUNHOZ, M. A. S. *et al.* Use of collagen/chitosan sponges mineralized with hydroxyapatite for the repair of cranial defects in rats. **Injury**, v. 49, n. 12, p. 2154–2160, Dec. 2018.
- MUNHOZ, M. A. E. S. *et al.* Elastin-derived scaffolding associated or not with bone morphogenetic protein (BMP) or hydroxyapatite (HA) in the repair process of metaphyseal bone defects. *PloS one*, v. 15, n. 4, Apr. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0231112.
- MUTHUKUMAR, T. *et al.* Collagen as a potential biomaterial in biomedical applications. *Reviews on Advanced Materials Science*, v. 53, n. 1, p. 29–39, Jan. 2018.
- PLEPIS, Ana Maria de Guzzi *et al.* Mineralização de matrizes de cartilagem auricular preparadas em diferentes tempos e temperaturas. 2013, **Anais..** São Paulo: USP/Pró-Reitoria de Pesquisa, 2013. Disponível em: <https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2234&numeroEdicao=21>. Acesso em: 05 mar. 2024.
- NAUTH, A. *et al.* Bone graft substitution and augmentation. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 29, Suppl. 12, p. S34-S38, Dec. 2015.
- NEACSU, I. A. *et al.* Biomimetic composite scaffold based on naturally derived biomaterials. **Polymers**, v. 12, n. 5, May 2020. DOI: 10.3390/polym12051161.
- NOOR, Z. Nanohydroxyapatite application to osteoporosis management. **Journal of Osteoporosis**, v. 2013, Oct. 2013. DOI: 10.1155/2013/679025.
- OGUERI, K. S. *et al.* Polymeric biomaterials for scaffold-based bone regenerative engineering. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 5, n. 2, p. 128–154, June 2019.
- ORYAN, A.; MONAZZAH, S.; BIGHAM-SADEGH, A. Bone injury and fracture healing biology. **Biomedical and Environmental Sciences: BES**, v. 28, n. 1, p. 57–71, Jan. 2015.
- ORYAN, A. *et al.* Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, Mar. 2014. DOI: 10.1186/1749-799X-9-18.
- OZAWA, S. *et al.* Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 137–143, Jan. 2002.
- PASCHALIS, E. P. *et al.* Bone fragility and collagen cross-links. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 12, p. 2000-2004, Dec. 2004.
- PASQUALI-RONCHETTI, I.; BACCARANI-CONTRI, M. Elastic fiber during development and aging. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, n. 4, p. 428-435, Aug. 1997.
- PENG, Z. *et al.* The Mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523–532, Sept. 1994.

PETTIAN, M. S. *et al.* Use of an anionic collagen matrix made from bovine intestinal serosa for in vivo repair of cranial defects. **PloS one**, v. 13, n. 7, July 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0197806.

PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G.; DAS-GUPTA, D. K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. **Polymer Engineering and Science**. v. 36, n. 24, p. 2932-2938, Dec. 1996.

PRAKASAM, M. *et al.* Biodegradable materials and metallic implants—a review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 8, n. 4, Sept. 2017. DOI: 10.3390/jfb8040044.

PUPO, Y. M. *et al.* Effect of hydroxyapatite microspheres, amoxicillin-hydroxyapatite and collagen-hydroxyapatite composites on human dental pulp-derived mesenchymal stem cells. **Materials**, v. 14, n. 24, Dec. 2021. DOI: 10.3390/ma14247515.

RADOMINSKI, S. C. *et al.* Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of 79 postmenopausal osteoporosis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, Suppl. 2, p. 452–466, ago. 2017.

RADY, D.; MUBARAK, R.; ABDEL MONEIM, R. A. Healing capacity of bone marrow mesenchymal stem cells versus platelet-rich fibrin in tibial bone defects of albino rats: an in vivo study. **F1000Research**, v. 7, Sept. 2018. DOI: 10.12688/f1000research.15985.1.

RAGNONI, E. *et al.* Coacervation of α -elastin studied by ultrafast nonlinear infrared spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 40, p. 27981-27990, Sept. 2016.

RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Canada: Academic Press, 2013.

REN, M. *et al.* Enhanced bone formation in rat critical-size tibia defect by a novel quercetin-containing alpha-calcium sulphate hemihydrate/nano-hydroxyapatite composite. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 146, Feb. 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112570.

ROCHA, L. B. *et al.* Biomineralization of polyanionic collagen-elastin matrices during cavariar bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**, v. 79, n. 2, p. 237–245, Nov. 2006.

ROCHA, L. B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M. A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 449–456, Jan. 2002.

RYAN, A. J. *et al.* Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 6, p. 732–745, Dec. 2015.

SANTOS, D. A. *et al.* Effects of the combination of low-level laser therapy and anionic polymer membranes on bone repair. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 4, p. 813-821, June 2020.

SARANGTHEM, V.; SINGH, T. D.; DINDA, A. K. Emerging role of elastin-like polypeptides in regenerative medicine. **Advances in Wound Care: the journal for prevention and healing**, v. 10, n. 5, p. 257–269, May 2021.

SARFRAZ, S. *et al.* Synthesis and characterization of nano hydroxyapatite. **Advanced Materials Research**, v. 264-265, p.1370-1375, June 2011.

SHAHREZAIE, M. *et al.* Effectiveness of tissue engineered three-dimensional bioactive graft on bone healing and regeneration: an in vivo study with significant clinical value. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 4, p. 936–960, Apr. 2018.

SHARMA, A.; LUTHRA, G. Significance of ISO 10993 standards in ensuring biocompatibility of medical devices: a review. **Journal of Pharmaceutical Research 80 International**, v. 35, n. 8, p. 23–34, Apr. 2023.

SHARMA, D. *et al.* The effects of estrogen deficiency on cortical bone microporosity and mineralization. **Bone**, v. 110, p. 1–10, May 2018.

SIMIONESCU, A.; PHILIPS, K.; VYAVAHARE, N. Elastin-derived peptides and TGF- β 1 induce osteogenic responses in smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 2, p. 524–532, Aug. 2005.

SKALICZKI, G. *et al.* Compromised bone healing following spacer removal in a rat femoral defect model. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 99, n. 2, p. 223–232, June 2012.

SOHN, H.-S.; OH, J.-K. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. **Biomaterials Research**, v. 23, Mar. 2019. DOI: 10.1186/s40824-019-0157-y.

SONGPATANASILP, T. *et al.* Thai Osteoporosis Foundation (TOPF) position statements on management of osteoporosis. **Osteoporosis and Sarcopenia**, v. 2, n. 4, p. 191–207, Dec. 2016.

SOPHOCLEOUS, A.; IDRIS, A. I. Rodent models of osteoporosis. **BoneKEY Reports**, v. 3, Dec. 2014. DOI: 10.1038/bonekey.2014.109.

SUN, T. *et al.* Biomimetic composite scaffold containing small intestinal submucosa and mesoporous bioactive glass exhibits high osteogenic and angiogenic capacity. **Tissue Engineering**. Part A, v. 24, n. 13–14, p. 1044–1056, July 2018.

SWINDLE-REILLY, K. E.; PARANJAPE, C. S.; MILLER, C. A. Electrospun poly(caprolactone)-elastin scaffolds for peripheral nerve regeneration. **Progress in Biomaterials**, v. 3, n. 1, p. 20, Feb. 2014.

TAN, J. *et al.* Sustained release of two bioactive factors from supramolecular hydrogel promotes periodontal bone regeneration. **ACS Nano**, v. 13, n. 5, p. 5616–5622, May 2019.

TEJEDA-MONTES, E. *et al.* Mineralization and bone regeneration using a bioactive elastinlike recombinamer membrane. **Biomaterials**, v. 35, n. 29, p. 8339–8347, Sept. 2014.

TONG, L. *et al.* Nanostructured 3D-printed hybrid scaffold accelerates bone regeneration by photointegrating nanohydroxyapatite. **Advancement of Science**, v. 10, n. 13, May 2023. DOI: 10.1002/advs.202300038.

TORRICELLI, P. *et al.* Human osteoblast cultures from osteoporotic and healthy bone: biochemical markers and cytokine expression in basal conditions and in response to 1,25(OH)₂D₃. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 219–227, May 2002.

TSAI, S.-W.; HSU, F.-Y.; CHEN, P.-L. Beads of collagen-nanohydroxyapatite composites prepared by a biomimetic process and the effects of their surface texture on cellular behavior in MG63 osteoblast-like cells. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1332–1341, Sept. 2008.

TURNBULL, G. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278–314, Sept. 2018.

TURNER, A. S. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. **European Cells & Materials**, v. 1, p. 66–81, June 2001.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. 1965. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 395, p. 4–10, Feb. 2002.

VAJGEL, A. *et al.* A Systematic review on the critical size defect model. **Clinical Oral Implants Research**, v. 25, n. 8, p. 879–893, Aug. 2014.

VAN STAA, T. P. *et al.* Epidemiology of fractures in England and Wales. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 517–522, Dec. 2001.

VANLEENE, M. Nano-engineered scaffold for osteoarticular regenerative medicine. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 6, n. 1, 2015. DOI: 10.4172/2157-7439.1000258.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. **Bioactive Materials**, v. 2, n. 4, p. 224–247, Dec. 2017.

WRONSKI, T. J. *et al.* Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcified Tissue International**, v. 45, n. 6, p. 360–366, Dec. 1989.

XIE, H. *et al.* Treatment of burn and surgical wounds with recombinant human tropoelastin produces new elastin fibers in scars. **Journal of Burn Care & Research**: official publication of the American Burn Association, v. 38, n. 5, p. e859–e867, 2017.

YEO, G. C. *et al.* Fabricated elastin. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 16, p. 2530–2556, Nov. 2015.

YOUSEFZADEH, N. *et al.* Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 89–107, Jan. 2020.

YU, L. *et al.* Intrafibrillar mineralized collagen–hydroxyapatite-based scaffolds for bone regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 16, p. 18235–18249, Apr. 2020.

YU, X. *et al.* Biomaterials for bone regenerative engineering. **Advanced Healthcare 82 Materials**, v. 4, n. 9, p. 1268–1285, June 2015.

ZHANG, K. *et al.* Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering. **Regenerative Biomaterials**, v. 5, n. 2, p. 115–124, Mar. 2018a.

ZHANG, Q. *et al.* Histomorphometric Study Of New Bone Formation Comparing Defect Healing With Three Bone Grafting Materials: The Effect Of Osteoporosis On Graft Consolidation. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 33, n. 3, p. 645–652, Feb. 2018b.

ZHU, D. *et al.* Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 127, p. 132–140, May 2017.

ZIMMERMANN, G.; MOGHADDAM, A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. **Injury**, v. 42, Suppl. 2, p. S16-S21, Sept. 2011.

ZIZZARI, V. L. *et al.* Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 122, n. 4, p. 392–402, Oct. 2016.

ANEXOS

ANEXO A – Obtenção, processamento e caracterização das matrizes

Matrizes

As matrizes utilizadas foram preparadas e caracterizadas pelo mestrando Claudio Fernandes Garcia, sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis no Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP. Os materiais utilizados foram o colágeno obtido de serosa suína, a cartilagem auricular bovina e a nanohidroxiapatita sintetizada.

Preparo do colágeno

O colágeno aniônico foi obtido de serosa suína, comprada em casa de carnes. A serosa foi limpa com água, cortada e lavada com banhos em soluções de ácido acético 0,5% e hidróxido de sódio 0,5% para remoção de sangue e gordura. Posteriormente passou por hidrólise alcalina (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2015) em solução com hidróxidos, cloretos e sulfatos de K^+ , Ca^{2+} e Na^+ por 120h. Essa solução de hidróxidos e sais foi removida e a serosa passou por uma solução aquosa com os mesmos sais.

Posteriormente, todos os sais foram removidos por lavagens em soluções de ácido bórico 3%, água desionizada e EDTA 0,3%, e novamente com água desionizada até pH 6,0. O material foi liofilizado e posteriormente solubilizado em ácido acético (HAc) pH 3,5 para se obter uma concentração de 4% em massa.

Síntese da nanohidroxiapatita (nHa)

Para a síntese da nHA, 100 mL de uma solução de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de brometo de cetrimônio foi adicionada lentamente em $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de K_2HPO_4 . Após a adição, o pH foi ajustado para 12 com NaOH e a mistura ficou sob agitação por 2h. Uma solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de $CaCl_2$ foi preparada e adicionada à solução anterior, sob agitação constante. A suspensão formada foi colocada sob refluxo por 6 h, e posteriormente em ultrassom por 1 h. Depois, a suspensão foi lavada com água deionizada e com etanol. Depois, o precipitado foi colocado a 40°C durante 12h para a evaporação do solvente, e em seguida calcinado a 550°C durante 5h (SARFRAZ et

al., 2011). A caracterização desta nHA está descrita em Garcia et al., 2021.(GARCIA et al., 2021)

Preparo da cartilagem auricular

A cartilagem auricular bovina foi primeiramente cortada (tiras de 1 cm) e lavada adequadamente com solução de 0,9% de NaCl para remoção de sangue e outros contaminantes. Em seguida passou por um tratamento de hidrólise alcalina(HORN; MARTINS; PLEPIS, 2015) como descrito para o preparo do colágeno, mas por um período de 15 h e a 37°C. O material resultante foi suspenso em uma solução de HAc pH 3,5, homogeneizado e liofilizado.

Obtenção das matrizes

O gel de colágeno de 4% foi diluído para 1,5% com uma suspensão de nanohidroxiapatita em HAc pH 3,5 utilizando-se a relação de 30 mg de nHA para cada 10 g de gel de colágeno 1,5 %.

A partir desse gel com nHA foram feitas as matrizes descritas na Tabela 1. Para tanto, as matrizes contendo cartilagem auricular bovina foram feitas adicionando-se 50 mg de cartilagem para cada 10 g de gel de colágeno/nHA.

Tabela 1 - Denominação das matrizes.

Matriz	Composição
MSH	Matriz de colágeno de serosa suína com nanohidroxiapatita
MSHC	Matriz de colágeno de serosa suína com nanohidroxiapatita e cartilagem auricular bovina

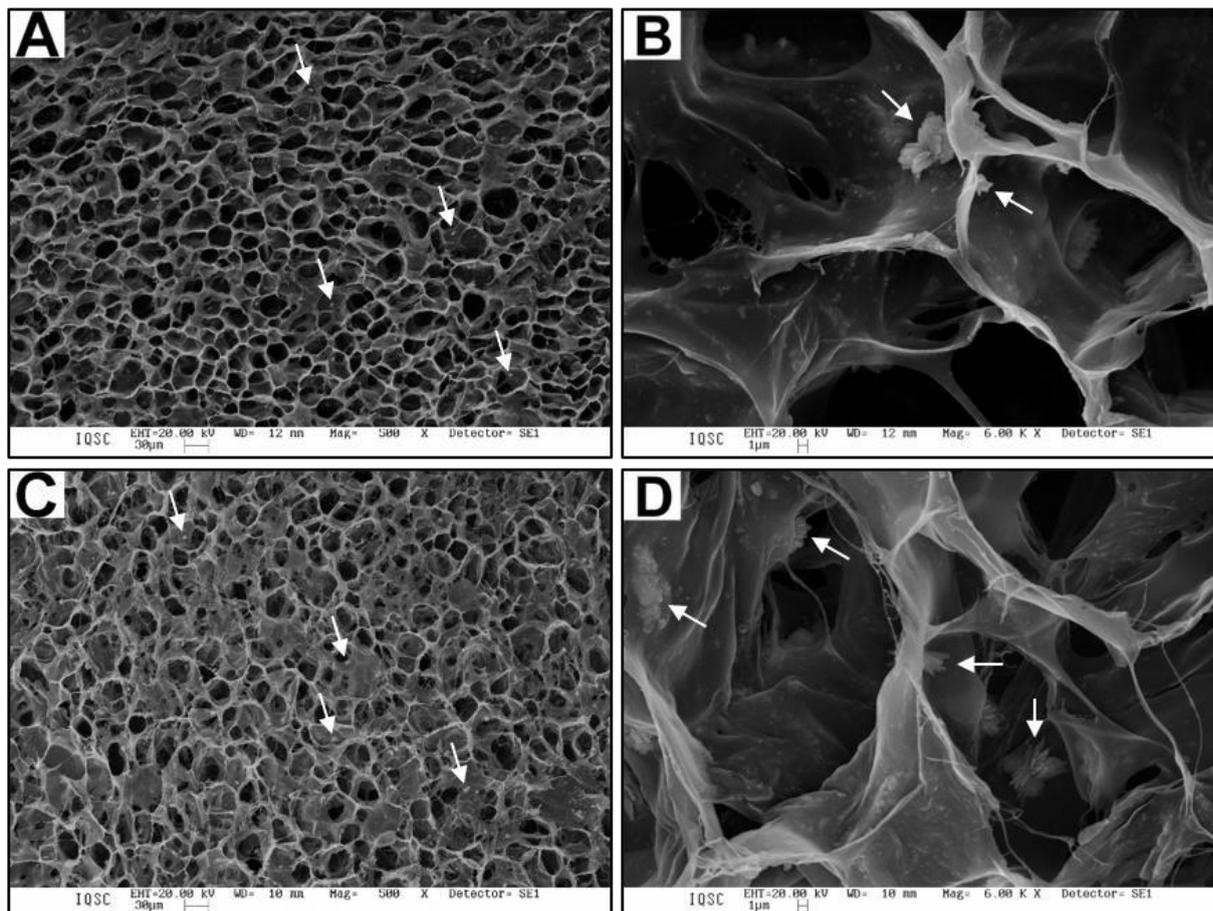
As matrizes desses géis foram obtidas por liofilização de cerca de 6 g de cada gel em moldes de teflon® de 11 cm X 1,5 cm. Essas matrizes foram neutralizadas em vapor de amônia por um período de 2h e depois aeradas sob fluxo de ar por pelo menos 72h.

Caracterização

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises foram feitas com as matrizes coladas em *stubs* por fita condutora de carbono e previamente recobertas com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm/s, possibilitando a análise de suas estruturas. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), da Central de Análises Químicas do IQSC/USP, operando com feixe de elétrons de 20 kV. O tamanho dos poros das matrizes foi obtido através do *software* ImageJ, utilizando-se 30 determinações, na ampliação de 500x. Foi utilizada uma aproximação do diâmetro de Martin (ALLEN, 2013), forme Figura 9:

Figura 9 - Fotomicrografias digitais das matrizes: (A) MSH 500x; (B) MSH 6000x; (C) MSHC 500x; (D) MSHC 6000x.



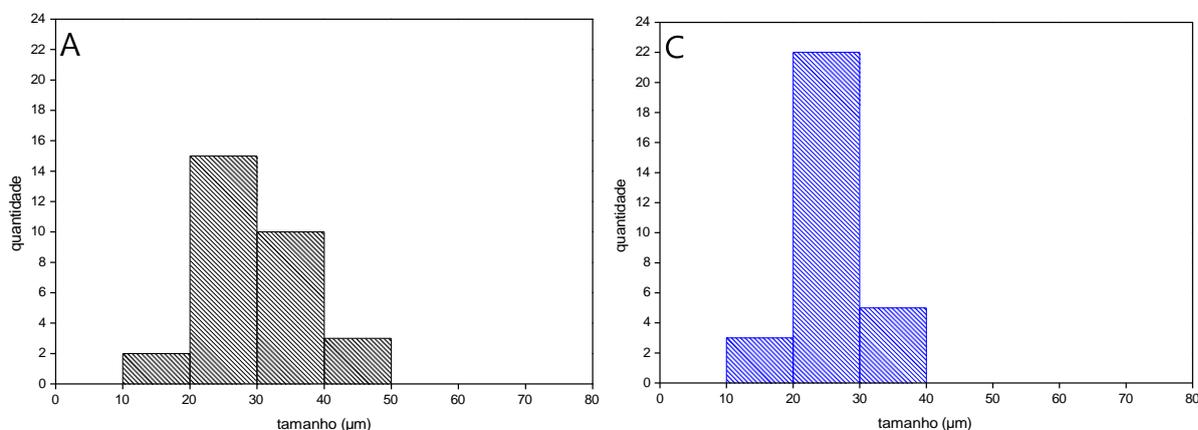
Na tabela 2 abaixo estão descritos a média do tamanho dos poros encontrados nas matrizes:

Tabela 2 - Tamanhos de poros das matrizes

	Tamanho dos poros (μm)		
	Menor	Maior	Média \pm dp
MSH	14,3	48,7	$28,8 \pm 7,8^a$
MSHC	13,9	39,7	$26,1 \pm 5,2^a$

Nota: Na mesma coluna, letras iguais significam valores estatisticamente iguais ($p < 0,05$). dp: desvio padrão.

Figura 10 - Histogramas dos tamanhos de poros das matrizes: A) MSH; B) MSHC.



Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises foram feitas em equipamento DSC Mod 2010 (TA Instruments), com aproximadamente 20 mg de amostra em suporte de alumínio, sob fluxo de nitrogênio de 80 mL min^{-1} , razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ e variação de temperatura de $5 - 120^\circ\text{C}$. A temperatura foi calibrada com padrão de índio e um suporte vazio foi usado como referência. A temperatura de desnaturação do colágeno (Td) foi obtida a partir do ponto médio da inflexão da curva DSC

Cinética de absorção em tampão fosfato salino (PBS)

As matrizes foram colocadas em câmara contendo $\text{NaOH}_{(s)}$ por 24h e posteriormente pesadas (m_{seca}). Então foram colocadas em frascos contendo 10 mL de PBS pH 7,4 e em intervalos de tempo específicos foram retiradas, pesadas (m_{umida}) e retornadas aos frascos para novas tomadas de tempo. O processo foi feito em quadruplicata e a porcentagem de PBS absorvido ($\% \text{ absorção}$) calculada pela equação (1).

$$\% \text{ absorção} = \frac{m_{umida} - m_{seca}}{m_{seca}} \cdot 100 \quad (1)$$

A Figura 11 mostra a cinética de absorção de tampão fosfato salino para as matrizes. Observa-se que a matriz MSH apresenta a menor e a mais lenta das absorções, obtendo-se em 24h 2290% enquanto as matrizes com cartilagem (MSHC) apresentaram intumescimento maior e de 2837%. Na tabela 3 estão as porcentagens de absorção de PBS:

Figura 11 - Porcentagem de absorção de PBS para: (■) MSH; (▲) MSHC.

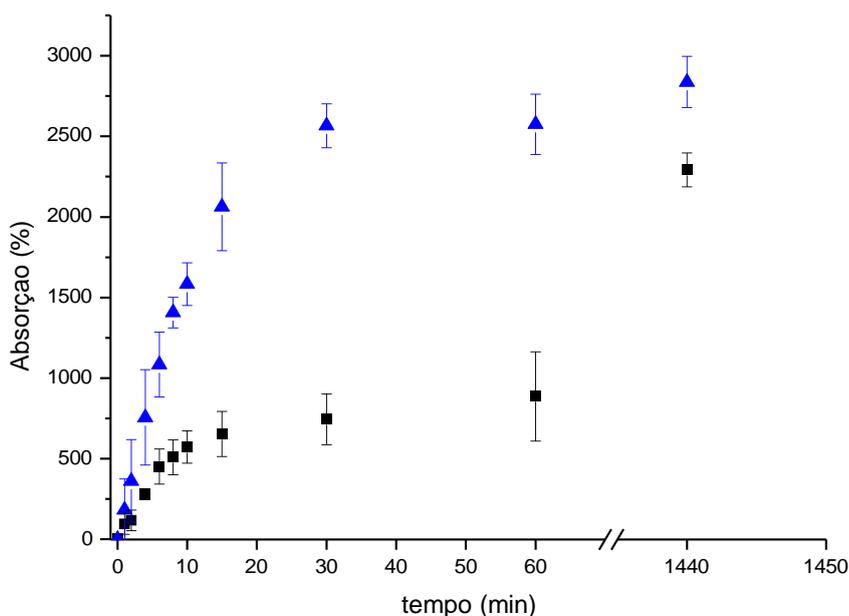


Tabela 3 - Porcentagem de absorção de PBS

Scaffolds	% Absorção		
	30 min	60 min	1440 min
MSH	745 ± 158 ^a	886 ± 276 ^a	2291 ± 105 ^a
MSHC	2566 ± 136 ^b	2574 ± 187 ^b	2837 ± 158 ^b

Nota: Em mesma coluna, letras iguais significam números estatisticamente iguais (p<0,05)

ANEXO B - Protocolo CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais

**FACULDADE DE MEDICINA DE JUNDIAÍ**

Autarquia Municipal criada por Lei Municipal Nº 1506, de 12 de março de 1968 – CNPJ 50.985.266/0001-09
Reconhecimento Federal Decreto Nº 71656 de 04/01/1973

Rua Francisco Telles, 250 – CEP: 13.202-550 – Cx. Postal: 1109
Fone/Fax: (11) 3395-2100 – Jundiaí – SP – site: www.fmj.br – e-mail: fmj@fmj.br

COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

Jundiaí, 01 de junho de 2022

Ilustríssimo Senhor
PROFESSOR DR. MARCELO RODRIGUES DA CUNHA

Ref.: Aprovação de Projeto de Pesquisa

TÍTULO: “Utilização de membrana de colágeno, elastina e nanohidróxiapatita no reparo de defeitos provocados experimentalmente na tibia de ratas ovariectomizadas.”

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA desta Faculdade, em reunião, no cumprimento de suas atribuições e após revisão ao seu protocolo de pesquisa em epígrafe, emitiu o parecer APROVANDO o seguinte documento:

>> Protocolo para Uso de Animais em Pesquisa nº 246/19

O projeto intitulado “*Utilização de membrana de colágeno, elastina e nanohidróxiapatita no reparo de defeitos provocados experimentalmente na tibia de ratas ovariectomizadas*” é de responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha do Departamento de Morfologia e Patologia Básica da Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ) que tem biotério de manutenção com as condições adequadas para o alojamento dos animais. Nessa referida pesquisa serão utilizados setenta e dois (72) animais sendo todos *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, com 30 dias de vida. Os animais desta pesquisa serão provenientes do Biotério/IPEN. Este projeto foi aprovado pelo CEUA/FMJ, protocolo 246/19.

Lembramos a V.Sa. que é necessário enviar a este CEUA relatórios de eventos adversos, caso estes venham a ocorrer, assim como relatório final com os resultados da pesquisa, para finalização do processo. Qualquer dúvida estamos à disposição.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni
Coordenador de Pós-Graduação e Pesquisa