

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARCELO RODRIGUES DA CUNHA

**“IMPLANTES TRIDIMENSIONAIS DE COLÁGENO POLIANIÔNICO EM
FALHAS ÓSSEAS PRODUZIDAS NO FÊMUR DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e
Estrutural na área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Candelária Genari

Co-Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues Santos Júnior

Campinas, 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO
DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C914i

Cunha, Marcelo Rodrigues da
Implantes tridimensionais de colágeno polianiónico em
falhas ósseas produzidas no fêmur de ratas
ovariectomizadas / Marcelo Rodrigues da Cunha. --
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Selma Candelaria Genari.
Co-orientador: Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Osteoporose. 2. Colágeno. 3. Biomateriais. I.
Genari, Selma Candelaria. II. Santos Júnior, Arnaldo
Rodrigues dos. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Three-dimensional implants of polyanionic collagen in bone defects produced in the femur of ovariectomized rats.

Palavras-chave em inglês: Osteoporosis; Collagen; Biomaterials.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

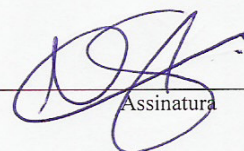
Banca examinadora: Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior, Maria Jose Salete Viotto, Christiane Bertachini Lombello, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Evanisi Teresa Palomari.

Data da defesa: 21/08/2006.

Campinas, 21 de agosto de 2006.

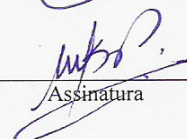
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior (Co-Orientador)



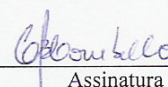
Assinatura

Profa. Dra. Maria José Salete Viotto



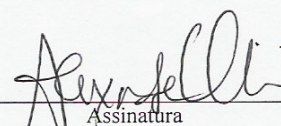
Assinatura

Profa. Dra. Christiane Bertachini Lombello



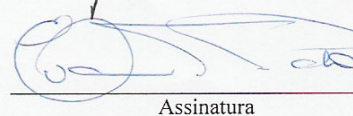
Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari



Assinatura

Prof. Dr. César Alexandre Fabrega Carvalho

Assinatura

Prof. Dr. William Dias Belangero

Assinatura

Prof. Dr. Marco César Somazz

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores: Profa. Dra. Selma Candelária Genari e Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues Santos Junior pela orientação, dedicação, paciência e principalmente pela amizade.

A Profa. Dra. Keico Okino Nonaka e ao seu orientado de mestrado Charles, da Universidade Federal de São Carlos, pela realização e orientação das análises biomecânicas.

Aos professores da pré-banca pelas correções e orientações.

Aos membros da banca por aceitaram participar da minha defesa pública .

Aos secretários da Pós-graduação e aos técnicos do laboratório de Anatomia (Nori e Marcos) pelo auxílio e orientações.

Aos amigos da pós-graduação Leandro e Patrícia pelo companheirismo e pela ajuda na parte prática da tese.

Ao Dr. Marco Antônio pelas análises radiográficas

A minha ex-professora da graduação e eterna amiga, Profa. Dra. Maria Jose Salete Viotto, que sempre acreditou na minha capacidade e por ser a principal responsável pela minha formação e realização profissional: Professor de Anatomia Humana.

Aos meus amigos professores César Alexandre e Jose Meciano Filho (Nino) pela amizade e aprendizado.

A minha família e a minha esposa pelo amor, apoio e incentivo.

LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

BMP – Proteína Morfogenética óssea

BP – Matrizes tratadas

IL-1 - interleucina-1

IL-6 - interleucina-6

MEC ou CEM – Matriz extracelular

aECM ou MECa – matriz extracelular artificail

OMS - Organizao Mundial de Sade

PLLA - poli(L-cido ltico)

PTH - hormnio da paratireoide

FNT - fator de necrose tumoral

NO - no ovariectomizado

OU ou UO - ovariectomizado unilateralmente

OBCH ou BOHRT - ovariectomizado bilateralmente com reposio hormonal

OBSH ou BOWHRT - ovariectomizado bilateralmente sem reposio hormonal

NCM – matriz de colgeno nativo

PCM – matriz de colgeno polinionico

PCM48 – matriz de colgeno polinionico submetido em meio alcalino por 48 horas

PCM96 - matriz de colgeno polinionico submetido em meio alcalino por 96 horas

LISTA DE FIGURAS E TABELAS DA INTRODUÇÃO

FIGURAS

Figura 1: Diagrama da formação e estrutura do colágeno

Figura 2: Hidrólise alcalina dos grupos carboxamidas dos resíduos de Asn e Gln.

Figura 3: Ligações cruzadas induzidas por glutaraldeído na molécula de colágeno

Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura da membrana do pericárdio bovino:
nativa (A); BP 24 (B) e BP 48 (C). Barra = 100µm.

TABELAS

Tabela 1 – Classes, tipos e características distintas dos colágenos

Tabela 2 – Incremento de grupos carboxílicos e características morfológicas das
matrizes de colágeno aniônicas

RESUMO

Recentemente, existe um interesse no desenvolvimento de biomateriais que possam ser utilizados na substituição do tecido ósseo ou que atuem como indutores na reparação em caso de fraturas ou defeitos ósseos. Os biomateriais constituídos de elementos de matriz extracelular tridimensionais (MECa) compostas de colágeno/elastina apresentam a vantagem de poder sofrer alterações nas suas propriedades por modificações químicas do colágeno, resultando em matrizes carregadas positivo ou negativamente. Tais modificações podem melhorar as propriedades mecânicas e fisiológicas da MECa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das MECa de colágeno nativo e polianiónica no processo de reparação de defeitos produzidos no fêmur de ratas ovariectomizadas. Foram realizados defeitos na porção do côndilo femoral de ratas normais e ovariectomizadas. Foi feita a análise das características morfológicas, físicas e mecânicas do osso formado na região. A análise do material demonstrou ausência de alterações patológicas nas áreas implantadas, sugerindo que o material usado é biocompatível. A análise microscópica revelou que a área que recebeu a membrana de colágeno nativa teve menor quantidade de osso neoformado. Nos animais ovariectomizados que receberam membranas polianiónicas, observou-se um atraso no processo da regeneração na falha óssea, principalmente naqueles que não foram submetidos à reposição hormonal. A densidade e percentual mineral foi menor nos animais ovariectomizados e a resistência mecânica foi maior nas áreas que receberam membrana polianiónica 96 (PMC96). Conclui-se que nos casos de osteoporose por deficiência hormonal, a melhor membrana a ser utilizada num reparo ósseo é a polianiónica 96, pois proporciona crescimento ósseo mais rápido e de boa qualidade mecânica.

ABSTRACT

There has been recent interest in the development of biomaterials that can be used as replacement of bone tissue or that act as inducer of the healing process in the case of bone fractures or defects. Biomaterials consisting of three-dimensional extracellular matrix elements (aECM) composed of collagen/elastin have the advantage that their properties can be altered by introducing chemical modifications to the collagen that result in positively or negatively charged matrices. These modifications may improve the mechanical and physiological properties of aECM. The objective of the present study was to evaluate the effect of aECM consisting of native and polyanionic collagen on the healing process of defects created in the femur of ovariectomized rats. Defects were created in the femoral condyle of intact and ovariectomized rats and the morphological, physical and mechanical characteristics of the bone formed in the region were analyzed. The results showed the absence of pathological alterations on implanted areas, suggesting that the implants were biocompatible. Microscopic analysis verified that areas that received native membrane had less quantity of neoformed bone. In ovariectomized animals that received anionic membranes, we observed a delay in bone regeneration, mainly in animals that did not receive hormonal replacement. The density and mineral matter percentage was smaller in ovariectomized animals and the mechanical resistance was greater in the area receiving the 96 polyanionic membrane (PMC96). Thus, we conclude that in cases of osteoporosis due to hormone deficiency, the 96 polyanionic membrane possibly is the best to be used for bone repair since it provides faster bone growth, as well as good mechanical resistance.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado encontra-se organizada em capítulos.

O Capítulo 1 aborda o tema através de uma introdução na qual são tratados os aspectos gerais da osteoporose, relevantes no presente trabalho, assim como uma abordagem sobre os biomateriais enquanto estimuladores da regeneração óssea, incluindo o colágeno nativo e o polianiónico. Além disso, este capítulo descreve os objetivos do presente trabalho.

O Capítulo 2 refere-se ao artigo intitulado “*Osteointegration of Implants polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats subjected to hormone replacement therapy*”, o qual foi submetido para publicação na revista **BONE**

O Capítulo 3 apresenta o artigo “*Characterization of the physical and mechanical properties of femoral bone defects filled with polyanionic collagen membranes in ovariectomized rats*”, o qual foi submetido na revista **BRAZILIAN JOURNAL OF MORPHOLOGICAL SCIENCES**.

O Capítulo 4 apresenta as conclusões do trabalho, enquanto o Capítulo 5 traz as referências bibliográficas referentes ao Capítulo 1.

O Anexo apresentado nesta tese, refere-se ao trabalho “Cultura de osteoblastos sobre membranas de colágeno polianiónico: avaliação preliminar do potencial de indução da formação de tecido ósseo visando reparação tecidual”, desenvolvido paralelamente durante as atividades de tese, e publicado no Boletim de Medicina Veterinária – Unipinhal, em 2005.

ÍNDICE

CAPA	1
FICHA CATALOGRÁFICA	2
BANCA EXAMINADORA	3
AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE ABREVIACÕES	5
LISTA DE FIGURAS E TABELAS DA INTRODUÇÃO	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
ORGANIZAÇÃO DA TESE	9
Capítulo 1: INTRODUÇÃO	11
A osteoporose	13
Biomateriais poliméricos a Base de colágeno	20
Colágeno e Matriz Extracelular	25
O Colágeno como biomaterial para a Regeneração Óssea	27
O Colágeno polianiónico	29
OBJETIVOS	36
Capítulo 2: ARTIGO 1	37
Capítulo 3: ARTIGO 2	67
Capítulo 4: CONCLUSÕES da TESE	99
Capítulo 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO	111

Capítulo 1: INTRODUÇÃO

O objetivo da regeneração de uma fratura é a restauração funcional e anatômica do osso. Uma fratura resulta na perda da estabilidade mecânica, descontinuidade e destruição parcial do suprimento sanguíneo do tecido ósseo. Seu reparo é um processo que envolve a estabilização dos fragmentos, consolidação por união óssea, revascularização das extremidades dos fragmentos necrosados e, finalmente, remodelagem interna e externa do tecido neoformado. No entanto, fraturas com perda de massa óssea extensa, geralmente necessitam da utilização de procedimentos clínicos como a utilização de enxertos ósseos. Até algumas décadas existiam poucas alternativas para a reparação de lesões extensas em diversos tecidos ou órgãos, incluindo o tecido ósseo, restringindo-se aos implantes ou enxertos.

Os enxertos ósseos autógenos são considerados vantajosos uma vez que evitam complicações de rejeição imunológica e fornecem células que podem imediatamente iniciar o processo regenerativo (Ishaug-Riley *et al.*, 1997). No entanto, apresentam algumas desvantagens que limitam a sua utilização como: morbidade da área doadora, reabsorção pós-operatória, contornos irregulares dos enxertos angulares (Mark *et al.*, 1990) e complicações como dor crônica e lesões vasculares durante o procedimento cirúrgico (Younger e Chapman, 1989). Além disso, a incorporação deste tipo de enxerto sofre influências de outros fatores como o perióstio, orientação do enxerto, vascularização, tipo de fixação e origem embrionária (Hardesty e Marsh, 1990). Outro ponto negativo é a difícil obtenção quando solicitado em grande quantidade (Brown *et al.*, 1976).

Os transplantes implicam em uma série de problemas como a necessidade de doadores, o risco de contaminação bacteriana e o custo da cirurgia. Por outro lado, os

implantes levantam a necessidade de utilização de materiais naturais ou sintéticos que possam ser implantados no organismo. Estes últimos servem como suporte da regeneração óssea, interagindo com a interface dos fragmentos “receptores” e atuando no processo de restauração tecidual. Esses dispositivos, desenvolvidos para serem implantados, são atualmente conhecidos como biomateriais (Hench, 1998). Assim, a cada ano, somente nos Estados Unidos, são realizados cerca 500.000 procedimentos cirúrgicos para promover o reparo de ossos lesados, utilizando enxertos ou substitutos ósseos (Yang et al., 2004).

Os biomateriais ao serem implantados no organismo animal ou humano devem apresentar uma boa integração com o tecido receptor. Entretanto, vários fatores podem limitar o sucesso desses implantes. No caso do tecido ósseo, um fator de extrema importância é a qualidade do osso receptor.

Na ortopedia, existem algumas situações que podem necessitar de uma intervenção cirúrgica como nos casos das fraturas decorrentes de traumas mecânicos de alta energia ou remoções de partes ósseas em decorrência de tumores cancerígenos. Em ambas situações, poderão ser utilizados enxertos de biomateriais como coadjuvantes alternativo na reconstrução do defeito ósseo juntamente com implantes ou fixadores metálicos. Entretanto, o clínico poderá se deparar com um osso de qualidade insatisfatória decorrente de vários fatores como má vascularização óssea, infecções, osteoporose, os quais podem comprometer o processo regenerativo. Segundo Stromsoe (2004), a osteoporose não aparece somente como um risco para o desenvolvimento das fraturas patológicas, mas também como sério problema na osteofixação no tratamento das mesmas.

A OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença sistêmica que acomete o esqueleto, sendo caracterizada por perda de massa óssea e alteração da micro-arquitetura do tecido ósseo, predispondo o indivíduo a fraturas patológicas devido à fragilidade óssea (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993).

Na última década houve um aumento do interesse público, médico e da indústria farmacêutica nesta área, visto o avanço das técnicas diagnósticas e a prevenção e tratamento da osteoporose (Raiz, 1997; Dennison *et al.*, 2005), além do aumento considerável dos índices epidemiológicos (Peck *et al.*, 1988).

Com base nos dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), calcula-se que nos Estados Unidos existam cerca de 10 milhões de pessoas com osteoporose e mais de 18 milhões com baixa massa óssea. No ano de 2015, estima-se que esses números subirão para 15 e 27 milhões, respectivamente, e a cada 5 pessoas com osteoporose, 4 serão mulheres (Melton, 1995). No Brasil, 30% das mulheres que passaram pela menopausa irão desenvolver osteoporose. Metade delas sofrerá fraturas, principalmente do fêmur. Destas, aproximadamente 700.000 morrerão de complicações delas decorrentes. Tais estimativas colocam a osteoporose como uma das principais causas de mortalidade da população feminina, ao lado de outras causas como câncer, coronariopatias e acidente vascular cerebral (Moreira e Carvalho, 2001; Nawroth *et al.*, 2000; Fogart *et al.*, 2005; Lane, 2006). No futuro, com o aumento da idade das populações, estima-se um aumento considerável da osteoporose afetando 200 milhões de pessoas no mundo (Moreira e Carvalho, 2001), constituindo a doença metabólica óssea e musculoesquelética não artrítica que afetará os idosos e mulheres de meia-idade

(Chang *et al.*, 2004; Dargent-Molina, 2004; Lane, 2006). Como a estimativa do número de indivíduos com osteoporose depende do modo como a doença é interpretada, o comitê da OMS, em 1994, sugeriu as definições contidas no quadro apresentado (Kanis *et al.*, 1994):

NORMAL: valor para densidade óssea superior a 1 desvio-padrão abaixo do esperado para jovens saudáveis

BAIXA MASSA ÓSSEA (OSTEOPENIA): valor para densidade óssea entre 2,5 desvios-padrão e 1 desvio-padrão abaixo do esperado para jovens saudáveis

OSTEOPOROSE: valor para densidade óssea superior a 2 desvios-padrão abaixo do esperado para jovens saudáveis

OSTEOPOROSE ESTABELECIDADA: valor para densidade óssea superior a 2 desvios-padrão abaixo do esperado para jovens saudáveis e pelo menos uma fratura por fragilidade óssea.

Entre os fatores que aumentam o risco para o desenvolvimento da osteoporose estão: baixa ingestão de cálcio, tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, e principalmente, as mulheres com distúrbios hormonais decorrentes da menopausa (May *et al.*, 1995; Wark, 1996; Gregg *et al.*, 1997; Cummings *et al.*, 2002; Grazio, 2002; Tanaka *et al.*, 2002; Col *et al.*, 2005; Fujiwara, 2005; Lane, 2006) e nos casos de ovariectomias (Bagi *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2004; Kim, 2005; Wang *et al.*, 2005).

Os hormônios gonadais femininos, como o estrógeno, estimulam a atividade osteogênica e a mineralização óssea (Lincoln e Tyler, 1999; Riggs, 2003.). Outra importância desse hormônio está na sua forte influência no equilíbrio funcional das células ósseas o que determina o controle da remodelação óssea (Turner *et al.*, 1994).

Nos primeiros anos da menopausa, a privação hormonal constitui o principal fator na determinação da fisiopatologia da osteoporose, sendo responsável por 15% da perda óssea (Braidman *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1999). Desta maneira, a reposição hormonal é um evento importante na prevenção e tratamento da perda óssea, não apenas por re-equilibrar o metabolismo ósseo, mas por elevar a absorção de cálcio e diminuir a excreção do mesmo (Heaney *et al.*, 1989).

A associação entre osteoporose e deficiência hormonal de estrógeno foi descrita primeiramente por Albright *et al.* (1940), e a vasta informação atual a respeito desta relação, assegura a importância do estrogênio na homeostasia do tecido ósseo, tanto em animais de laboratório como em seres humanos (Szejnfeld, 2000; Gennari *et al.*, 2003; Lormeau *et al.*, 2004).

O estrogênio tem ação anti-reabsortiva óssea através de mecanismos ainda não totalmente esclarecidos, sendo entre eles, a ligação com receptores específicos nos osteoblastos, alteração na produção de calcitonina e hormônio da paratireóide (PTH), modulação da produção de prostaglandina E, citocinas e interleucinas (Moreira e Carvalho, 2001).

Eriksen *et al.* (1988) e Konn *et al.* (1988) demonstraram a presença de receptor de estrogênio em osteoblastos ou em células de linhagem osteoblástica e detectaram RNAm para o receptor estrogênico nas células ósseas humanas estudadas. Embora os receptores de estrogênio encontrem-se nos osteoblastos, a sua principal função reside na inibição da reabsorção óssea através de um possível efeito de apoptose dos osteoclastos. Assim sendo, os estrogênios inibem a liberação de fatores estimuladores dos osteoclastos ou aumentam seus fatores inibitórios (Zheng *et al.*, 1995).

O mais importante efeito do estrogênio sobre a remodelação óssea é representado pela diminuição da reabsorção, comparativamente à formação óssea. Apesar da existência de receptor de estrogênio em osteoclastos, é provável que a ligação do mesmo ao osteoblasto regule indiretamente a função osteoclástica. Ocorre, portanto, interação célula a célula, mediante a liberação das citocinas e de fatores de crescimento. Possivelmente, a ligação das citocinas aos osteoblastos acarreta a liberação de fatores solúveis, capazes de modular a atividade osteoclástica (Halbe, 2000).

Dentre as citocinas com propriedades de reabsorção, modulada pelo estrogênio, encontra-se a interleucina-1 (IL-1) e o FNT (fator de necrose tumoral), que são secretado pelos monócitos, em elevada quantidade, nas mulheres ovariectomizadas na pré-menopausa, com baixos níveis de estrogênio. O FNT e a IL-1 agem sobre os osteoblastos para induzir a produção e a secreção de fator estimulante da colônia de macrófagos e de interleucina-6 (IL-6), os quais aumentam a população de macrófagos bem como sua diferenciação. Entretanto, a concentração desses fatores de reabsorção se inverte com a estrogenoterapia (Szejnfeld, 2000).

Segundo Halbe (2000), os estrogênios não parecem estimular a formação óssea, mas podem inibir a sua reabsorção. Tem sido sugerido que os estrogênios exercem seus efeitos através da estimulação de fatores de crescimento como os dos fibroblastos no osso. Outros mecanismos indiretos podem atuar através da inibição da síntese da prostaglandinas. Entre essas, particularmente aquelas da série E, agem como reguladores locais das células ósseas, influenciando tanto a formação como a reabsorção.

O hormônio paratireóidiano (PTH), estimulador da reabsorção óssea, parece ter seu efeito antagonizado pelos estrogênios. Um decréscimo da atividade estrogênica leva

a uma ligeira elevação da concentração de cálcio no sangue. Em mulheres pós-menopausa têm sido observadas elevadas concentrações plasmáticas e urinárias de cálcio, fósforo e hidroxiprolina (degradação do colágeno), o que reflete a reabsorção óssea (Halbe, 2000).

Entre as teorias para explicar o papel dos estrogênios na supressão da perda óssea, encontra-se a da calcitonina. Essa é uma teoria, segundo a qual os estrogênios atuam de maneira indireta no osso, ao estimular a secreção de calcitonina pelas células medulares da tireóide e, desse modo, dirigir a inibição da atividade osteoclástica, diminuindo assim, a reabsorção óssea. Assim sendo, supõe-se que a falta de estrogênio pós-menopausa, exacerbe o estado de deficiência de calcitonina nas mulheres, permitindo que o PTH possa agir sem oposição na reabsorção, com conseqüente diminuição da massa óssea. No entanto, esta teoria não é aceita uniformemente, havendo estudos que não comprovam a deficiência de calcitonina após menopausa ou em pacientes com osteoporose estabelecida (Halbe, 2000).

O fato que parece predominante na pós-menopausa em função da condição hipoestrogênica é o balanço negativo de cálcio, resultante da ativação da remodelação óssea com predomínio da reabsorção sobre a formação de osso. A contínua reabsorção leva à progressiva destruição das trabéculas, resultando em danos à integridade da micro-arquitetura óssea, conduzindo a um quadro de osteoporose (Hawker, 1996; Lane *et al.*, 1998; Ito, *et al.* 2002).

No indivíduo normal, a formação óssea supera a reabsorção até cerca de 25 a 30 anos, quando se atinge o pico da massa óssea. Aos 35 e 40 anos, ocorre um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea e após os 40 anos, a reabsorção prevalece sobre o depósito ósseo, ocorrendo assim, uma perda de 0,3 a 0,5% da massa óssea por ano

(Kanis, 1998). A perda óssea relacionada à menopausa resulta em 15 a 30% de decréscimo de osso trabecular e de 10 a 15% de redução do osso cortical. Assim, a deficiência estrogênica é responsável por um terço da metade da perda óssea observada durante a vida feminina (Halbe, 2000).

Em ratas, o pico de massa óssea ou maturidade esquelética é alcançado aos 10 meses de idade e assim como em humanos, a perda da massa óssea é acelerada após a queda da função ovariana. Nos casos de ovariectomia, ocorre uma perda óssea acelerada durante um período de 3 a 4 meses. A rata apresenta picos estrogênicos de 18 horas a cada 4 dias e, embora não apresente menopausa naturalmente, há perda óssea em função da deficiência estrogênica. Tais características colocam o rato como modelo experimental viável para o estudo da osteoporose pós-menopausa, pois simula a perda óssea trabecular (Kalu *et al.*, 1991).

A remodelação óssea acompanha o ritmo da perda da massa óssea, estando aumentada após ovariectomia. Como observado em mulheres pós-menopausa que se submeteram a reposição hormonal, a administração de estrogênio às ratas ovariectomizadas impede a perda óssea, normalizando também o processo de remodelação. Com estas características, o rato tem sido utilizado comumente nas pesquisas experimentais sobre osteoporose e importantes contribuições têm sido alcançadas com o seu uso, desde o final da década de 1950 quando estudos com ratos demonstraram a capacidade dos osteoclastos em reabsorver tecido ósseo (Kalu *et al.*, 1991).

Shen *et al.* (2000) demonstraram que a diminuição da concentração de estrógeno em ratas ovariectomizadas provocou diminuição da densidade mineral óssea e alterações no trabeculado do fêmur. Cabe ressaltar que a configuração do trabeculado

bem como a mineralização do tecido ósseo são fatores importantes na prevenção das fraturas patológicas, sendo este o evento mais temido da osteoporose (Maugars *et al.*, 1995).

As fraturas patológicas, principalmente do fêmur, constituem uma grave consequência da osteoporose e são resultantes da diminuição mineral e deterioração da micro-arquitetura devido as alterações do trabeculado ósseo quanto a quantidade e espessura (Maugars *et al.*, 1995; Hawker, 1996). O tratamento dessas fraturas baseia-se através de métodos conservadores ou cirúrgicos, podendo ser utilizado prótese ou fixação por meio de pinos/parafusos dependendo do tipo e gravidade das fraturas (Kanis, 1996).

O uso de implantes de biomateriais tem se mostrado como método coadjuvante ao auxílio do tratamento dessas fraturas, principalmente nos casos onde há a necessidade de preenchimento de falhas ósseas ou fraturas não consolidadas. Entretanto, estudos como de Albrektsson *et al.* (1981), relataram que o estado de saúde do osso é essencial para que haja a sua interação com os biomateriais, caso contrário, os resultados serão insatisfatórios. Com suporte nesta afirmação, Fini *et al.* (1997) induziram osteoporose em ratas ovariectomizadas e observaram a reação óssea frente ao implante de titânio e hidroxiapatita no côndilo femoral. Nos seus achados morfológicos, verificaram que a interface osso-implante ficou comprometida pela lenta e baixa neoformação óssea, resultado este que confirma a importância da qualidade do tecido ósseo no processo de osteointegração do implante.

Pan *et al.* (2000) investigando a influência da deficiência hormonal de estrógeno na remodelação óssea adjacente ao implante de hidroxiapatita na tíbia de ratas ovariectomizadas, notaram diminuição do volume ósseo formado na área receptora bem

como diminuição do contato osso-implante. De acordo com Yamazaki *et al.* (1999) e Ozawa *et al.* (2002), a diminuição da massa óssea em ratas ovariectomizadas interfere no contato osso-implante e também prejudica o suporte do implante devido à qualidade do osso circunvizinho.

Esses resultados em ratas com osteoporose induzida pela ovariectomia, podem sugerir que mulheres com alteração hormonal de estrógeno, poderão ter o prognóstico comprometido quando necessário o uso de algum biomaterial como enxerto ósseo (Pan *et al.*, 2000).

BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS A BASE DE COLÁGENO

Os polímeros são moléculas de cadeia longa que consistem em número repetido de unidades (monômeros). Desde 1960, membranas poliméricas têm sido usadas em animais para facilitar a reparação de defeitos ósseos. Tem sido aceito que essas membranas agem como barreira na prevenção do crescimento de tecido conjuntivo junto ao defeito, permitindo somente a neoformação óssea. Coraça (2002) implantou poli(L-ácido láctico – PLLA) em falhas ósseas produzidas em tíbia de ratos e verificou boa formação óssea ao redor do implante estando contínua com a cortical do osso.

Ultimamente, a aplicação de membranas poliméricas tem sido direcionada ao tratamento de grandes defeitos na diáfise óssea. Essas membranas podem ser usadas sozinhas ou associadas a substâncias osteogênicas, e podem ser preparadas usando polímeros bioabsorvíveis ou não.

Polímeros naturais como colágeno, proteoglicanos, glicosamionoglicanos e elastina, além de sua biocompatibilidade, participam no controle da estrutura do tecido e

na regulação do fenótipo celular simulando a matriz extracelular. O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante no organismo humano, representando 25 a 30% da massa total de proteínas nos mamíferos. São reconhecidos, até o presente, 24 tipos de colágeno. Na tabela 1 abaixo, observam-se as características dos tipos de colágeno atualmente estudados (Yang *et al.*, 2004).

Tabela 1 – Classes, tipos e características distintas dos colágenos.

Classe	Tipo	Características
Colágenos formadores de fibrilas	I	Encontrado no tecido conjuntivo. Tipo mais abundante encontrado na pele, osso, ligamento e tendão. Heterotrimérico (duas cadeias $\alpha 1$ e 1 cadeia $\alpha 2$)
	II	Colágeno da cartilagem, encontrado no disco intervertebral e humor vítreo. Homotrimérico
	III	Prevalente nos vasos sanguíneos, pele e intestino. Contaminante principal de produtos à base de colágeno. Homotrimérico
	V	Associado com o colágeno tipo I no osso
	XI	Forma fibrilas com o colágeno tipo II na cartilagem e disco intervertebral. Potente agente estimulador de células mononucleadas do sangue humano para a produção de prostaglandina E2 e interleucina – 1

	XXIV	Relacionado aos colágenos tipo V, IX e XI. Co-expressado com o colágeno tipo I no osso em desenvolvimento e olhos. Apresenta pequena imperfeição na tripla hélice.
	XXVII	Apresenta a mesma estrutura básica que o tipo V, XI. Apresenta pequena região com interrupção da hélice. Expressado por condrócitos, células epiteliais em tecidos em desenvolvimento incluindo estômago, pulmão, gônadas, pele e dente.
Colágenos associados aos colágenos formadores de fibrilas com interrupções nas triplas hélices	IX	Apresenta três domínios de tripla hélice e três domínios não helicais. Co-existe com o colágeno tipo II na cartilagem e no humor vítreo
	XII	Associado com o colágeno tipo I nos ligamentos e tendões
	XIV	Associado com o colágeno tipo I na pele e nos tendões
	XVI	Apresenta domínios interrompidos da tripla hélice. Expressado em fibroblastos e queratinócitos
	XIX	Homologia limitada ao colágeno tipo XVI. Apresenta cinco domínios de tripla hélice. Expresso em fibroblastos.
	XX	Similar aos colágenos tipos XII e XIV. Encontrado no epitélio da córnea, pele e tendão.
	XXI	Apresenta um único domínio para o fator de Willembrand e domínios para a trombospondina. Encontrado no coração, estômago, rim, músculos e placenta.

	XXII	Contém quatro domínios de tripla hélice
Colágenos formadores de redes	IV	Encontrado na membrana basal
	VIII	Encontrado em muitos tecidos, especialmente no endotélio. Pode formar uma treliça hexagonal.
	X	Colágeno com cadeia pequena, encontrado na cartilagem hipertrófica, com estrutura polimérica similar ao colágeno tipo VIII.
Colágenos multiplexin	XV	Colágeno da membrana basal. Deve tomar parte no controle da angiogênese. Expresso por fibroblastos e células musculares lisas.
	XVIII	Colágeno da membrana basal. Seu domínio C-terminal (NC1), endostatina, é um inibidor da angiogênese. Encontrado em tecidos vascularizados.
Colágenos com domínios transmembrana	XIII	Encontrado em muitos tecidos com um único domínio transmembrana N-terminal
	XV	Encontrado primariamente na pele com um único domínio transmembrana N-terminal no colágeno tipo XIII
	XVII	Consiste de um domínio citoplasmático amino-terminal, uma região transmembrana e três domínios colagenosos intercalado por pequenos domínios não-colagênicos.

	XXIII	Interage com CLAC e seu precursor como CLAC-P/colágeno tipo XXV
Colágeno formador de filamentos “em contas”	VI	Contem um pequeno domínio de tripla hélice com domínios globulares em ambas regiões terminais. Muito difundido
Colágeno formador de fibrilas de ancoragem	VII	Forma filamentos de ancoragem que liga a membrana basal epitelial ao tecido fibrilar adjacente
Outros	XXVI	Contêm dois clusters de repetições colagênicas de Gly-X-Y e três domínios não-colagênicos. Expresso nos testículos e ovários de tecidos adultos e mais abundante em neonatos
CLAC = <i>collagen-like Alzheimer amyloid plaque component</i> ; NC1 = domínio não-colagênico		

Fonte: Yang *et al.*, 2004

Como o colágeno é o principal composto orgânico do tecido ósseo, ele vem sendo amplamente usado na fabricação de biomateriais (Kim e Mooney, 1998) indicados para o reparo de danos ou traumas do esqueleto (Bernales *et al.*, 2004). A biocompatibilidade e estabilidade do colágeno, devido as características biológicas de biodegradável, bioabsorvível, apresentar debilidade antigênica, além de poder ser manipulado facilmente em diferentes formas, torna-o um recurso fundamental à aplicação médica (Bernales *et al.*, 2004).

Os colágenos bovino e equino, principalmente do tipo I devido a sua abundância e propriedades físicas e biológicas, têm sido indicados em aplicações clínicas (Lee *et al.*, 2001; Yamamura *et al.*, 2005). No entanto, o colágeno pode também

apresentar algumas desvantagens como a baixa resistência mecânica a tração e ineficiência quando implantado em áreas infectadas (Lee *et al.*, 2001).

O colágeno também tem importante papel na formação de tecidos e órgãos, e vem sendo usado como suporte para proteínas indutoras de osso (Chen *et al.*, 2000). Além disso, tem influência na diferenciação celular e possui sítios de reconhecimento que proporcionam interações com as células (Juliano e Haskill, 1993; Yang *et al.*, 2004). Devido a sua atividade osteoindutiva, o colágeno é considerado um bom substituto ósseo, suporta a proliferação celular, ou seja, apresenta propriedades importantes para facilitar o processo regenerativo, estimulando a migração e infiltração celular (Tuan *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 2004).

COLÁGENO E MATRIZ EXTRACELULAR

A Matriz Extracelular (MEC) dos tecidos constitui uma rede de macromoléculas organizadas que preenche o espaço intersticial das células, composta por inúmeras proteínas e polissacarídeos. As macromoléculas se agrupam em uma região fibrilar composta por colágeno e/ou fibrilas do sistema elástico e uma região não fibrilar onde se observam glicosaminoglicanos e glicoproteínas que promovem a interação de diferentes componentes da MEC com as células de diferentes tecidos. Esses componentes são responsáveis pelas propriedades mecânicas e fisiológicas da MEC (Alberts *et al.*, 1994). Desta maneira, a MEC artificial pode simular o espaço intersticial dos tecidos vivos permitindo a adesão celular e servindo como suporte para crescimento de novo tecido (Ma e Zhang, 1999) e guia para o desenvolvimento e diferenciação de novos tipos celulares (Kim e Mooney, 1998).

Os múltiplos componentes da matriz são secretados por células do tecido conjuntivo e dividem-se em dois tipos: 1) aqueles constituídos por moléculas protéicas alongadas que se agregam formando estruturas fibrilares ou fibrosas como o colágeno e a elastina, e 2) os constituintes que se agregam, mas não formam fibrilas ou fibras que são as glicoproteínas e as glicosaminoglicanos e proteoglicanos. As glicoproteínas como a fibronectina e a laminina têm a função de realizar a adesão entre a matriz e as células. Os glicosaminoglicanos e proteoglicanos permitem a circulação de nutrientes, hormônios e mensageiros químicos nos tecidos conjuntivos (Junqueira, 1997).

A quantidade de matriz é variável dependendo do tipo de tecido, sendo abundante nos tecidos conjuntivos como cartilagem, osso e derme, e escassa no tecido nervoso e epitelial (Junqueira, 1997).

A matriz extracelular (MEC) do osso é composta por 90% de proteínas colagênicas (97% colágeno tipo I e 3% colágeno tipo V) e 10 % de proteínas não colágenas (osteocalcina, osteonectina, proteoglicanos, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas, e outros). Todas essas proteínas são sintetizadas por osteoblastos e muitas estão envolvidas na adesão. *In vitro*, outras proteínas como fibronectina e vitronectina têm mostrado envolvimento na adesão de osteoblastos (Malaval *et al.*, 1996). Estudos objetivando a análise da atividade destas proteínas na adesão, utilizaram as mesmas para o recobrimento de matrizes tridimensionais, posteriormente submetidas a cultura de células ósseas. Tais estudos demonstraram que osteoblastos humanos aderiram preferencialmente a fibronectina, quando comparado ao colágeno tipo I e IV (Gronthos *et al.*, 1997).

O COLÁGENO COMO BIOMATERIAL PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

A molécula de colágeno é longa, rígida e apresenta configuração espacial de tripla hélice, formada pelo enrolamento de 3 cadeias polipeptídios unidas entre si por meio de pontes de hidrogênio, nas quais um resíduo de glicina se repete sempre a cada três aminoácidos na sequência (Figura 1) (Moreira e An, 2002). Estas cadeias representam uniões inter e extramoleculares as quais mantêm o intercruzamento molecular, requisito necessário para que as fibras de colágeno possam resistir à força mecânica de tensão a que são submetidas. As diferenças na estrutura química dessas cadeias são responsáveis pelos vários tipos de colágeno (Alberts, 2002; Bechman *et al.*, 2004).

As fibras de colágeno se dispõem espacialmente em diferentes maneiras de acordo com o tipo de tecido, sendo esta disposição do colágeno controlada pelas células do tecido conjuntivo. Na pele, apresentam-se em tramas ou em camadas alternadas com diferentes orientações de forma a resistir ao estresse mecânico em várias direções. Nos tendões estão alinhadas em feixes paralelos ao longo do eixo principal de tensão. (Alberts, 2002). Nos colágenos tipos I, II e III, as moléculas se associam paralelamente formando fibrilas. No colágeno tipo II, a polimerização estaciona na fase de fibrila, como observado nas cartilagens. Nos colágenos tipo I e III, o processo de polimerização se acentua e no colágeno tipo III, essas fibrilas se agrupam formando delgadas fibras chamadas de fibras reticulares do conjuntivo (Junqueira, 1997).

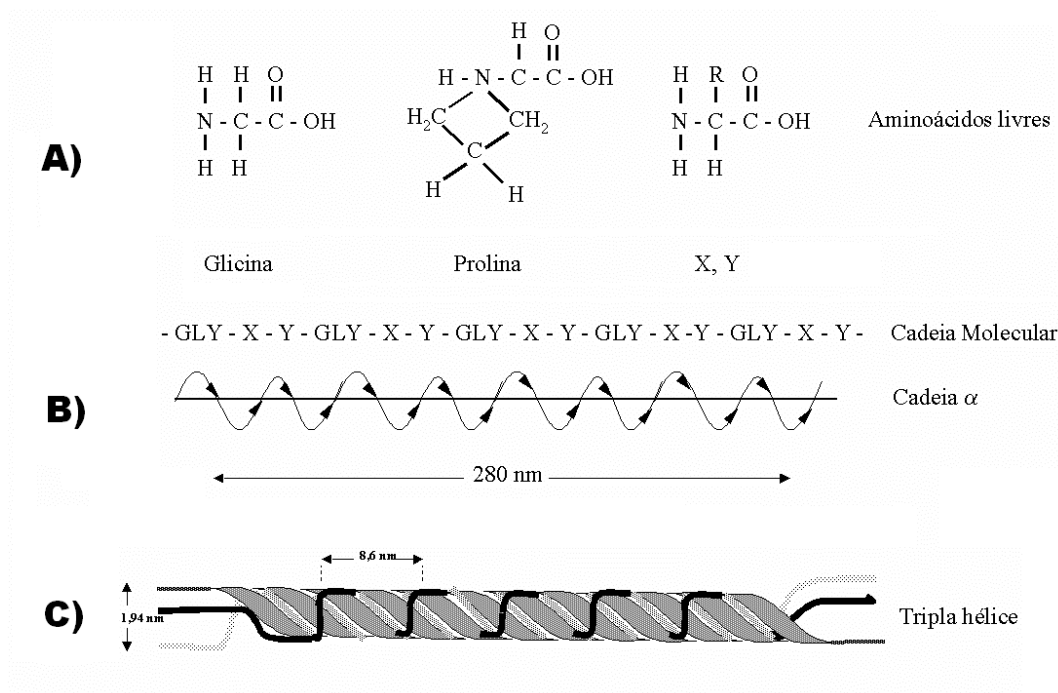


Figura 1. Diagrama da formação e estrutura do colágeno; A) fórmula estrutural dos aminoácidos mais comuns a molécula do colágeno; B) Estrutura primária da molécula do colágeno; C) Representação da estrutura secundária da molécula do colágeno, com a configuração espacial de uma tripla-hélice (Extraído e modificado de MOREIRA and AN, 2002).

Num estudo clínico, membranas de colágeno foram implantadas em fissuras bucais de pacientes com o intuito de avaliar a ossificação do defeito ósseo após cirurgia na boca. Dentro de um período de nove meses, observou-se maior formação óssea na área receptora da membrana comparada com o controle. Além disso, a membrana não induziu resposta imunológica. Este resultado sugere que essas membranas constituem uma nova ferramenta à aplicação em cirurgias odontológicas como guia para regeneração óssea (Schlegel *et al.*, 1997).

O colágeno em combinação com outros materiais ou fatores de crescimento também pode ser usado nos defeitos ortopédicos. Assim, Takaoka *et al.* (1988) utilizaram colágeno de osso desmineralizado juntamente com hidroxiapatita no tratamento de defeitos ortopédicos congênitos e adquiridos. Nos seus resultados, notaram que o colágeno de osso desmineralizado enxertado em combinação com a hidroxiapatita, foi um excelente material osteoindutivo em associação à BMP.

Nakagawwa e Tagawa (2000) observaram osteoindução quando células osteogênicas foram colocadas na matriz de colágeno associado com a proteína morfogenética do osso (BMP). Hollinger *et al.* (1998), implantaram membrana de colágeno com BMP em ossos fraturados e observaram bom contato entre osso neoformado e implante. Chao *et al.* (2005) implantaram um composto de colágeno/tricálcio fosfato em defeitos produzidos na mandíbula de coelhos e observaram completa regeneração do tecido ósseo após 12 semanas e atribuíram os bons resultados à capacidade osteocondutiva do colágeno.

O COLÁGENO POLIANIÔNICO

As matrizes extracelulares artificiais (MECa) compostas de colágeno, ainda apresenta a vantagem de poderem sofrer alterações nas suas propriedades por modificações químicas do colágeno, resultando em matrizes carregadas positivo ou negativamente (Reid *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1995; Jayakrishnam e Jamela, 1996). Essas modificações podem melhorar as propriedades mecânicas e fisiológicas da MECa, levando, por exemplo, ao aumento de cargas negativas, e com isso a implementação das

propriedades dielétricas em relação aquelas encontradas no colágeno nativo, além de ser importante para adesão celular em substrato de cultura.

As modificações químicas do colágeno podem ser obtidas através do tratamento alcalino que causa hidrólise seletiva de cadeias carboxiamidas de asparagina e glutamina. Além do aumento do número de cargas negativas superficiais na molécula do colágeno, este processo eleva as propriedades piezoelétricas do colágeno e têm importante função na osteogênese (Rocha *et al.*, 2002). Além disso, esse tratamento transforma a matriz colagênica nativa em uma estrutura porosa e ainda promove a remoção das células que poderiam provocar rejeição imunológica (Rocha *et al.*, 2002).

Devido a essas propriedades do colágeno, o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto Goissis do Departamento de Química e Física Molecular, do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, desenvolveu uma matriz de colágeno polianiônico do tipo I, original do pericárdio bovino, através de uma hidroxilação seletiva de cadeias carboxiamidas de asparagina e glutamina (Figura 2), promovendo um aumento do número de cargas negativas superficiais da molécula de colágeno (Goissis *et al.*, 1999).

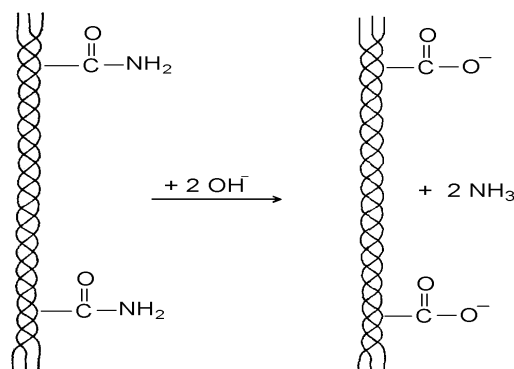


Figura 2 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxamidas dos resíduos de Asn e Gln. (Goissis *et al.*, 1999)

Esse processo foi seguido de ligações cruzadas induzidas por glutaraldeído, permitindo a formação de um centro de cargas assimétrico, o que é uma característica importante para o desenvolvimento de materiais dielétricos (Figura 3) (Pollack, 1984).

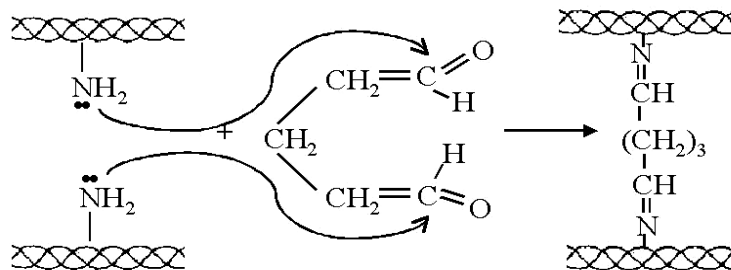


Figura 3 – Ligações cruzadas induzidas por glutaraldeído na molécula de colágeno. (Pollack, 1984)

Estudos anteriores caracterizaram quimicamente as matrizes de colágeno aniônicas (Goissis *et al.*, 1998; Lacerda *et al.*, 1998). Matrizes tratadas por 24 horas (BP 24) apresentaram um incremento de 46 ± 12 grupos carboxílicos por molécula de colágeno, enquanto matrizes tratadas por 48 horas (BP 48) apresentaram 87 ± 17 (Bet *et al.*, 2001) (Tabela 2). Independente do aumento nos grupos carboxílicos, a estrutura de tripla hélice do colágeno foi preservada em todas as membranas (Bet *et al.*, 2003). Além disso, demonstrou-se que a absorção de água pelas matrizes e seu potencial hidrofílico aumenta linearmente com o aumento do conteúdo de carboxilados (Bet *et al.*, 2003). Essas características afetarão o comportamento de adesão celular a essas matrizes,

muito mais do que a morfologia de suas superfícies (Bet *et al.*, 2003). Estudos morfológicos dessas matrizes demonstraram que o aspecto denso da matriz nativa, após o tratamento químico, transforma-se em uma estrutura esponjosa, com poros de diferentes formas e diâmetros (Rocha *et al.*, 2002)(Tabela 2, Figura 4).

Tabela 2 – Incremento de grupos carboxílicos e características morfológicas das matrizes de colágeno aniônicas

Matriz	Aumento de grupos carboxílicos	de Tamanho do poro (µm)	Tamanho mínimo de poro	Tamanho máximo de poro
BP 24	46±12	42.54±23.03	11.34	105.5
BP 48	87±17	52.24±24.99	14.06	134.3

Fonte: Bet *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002

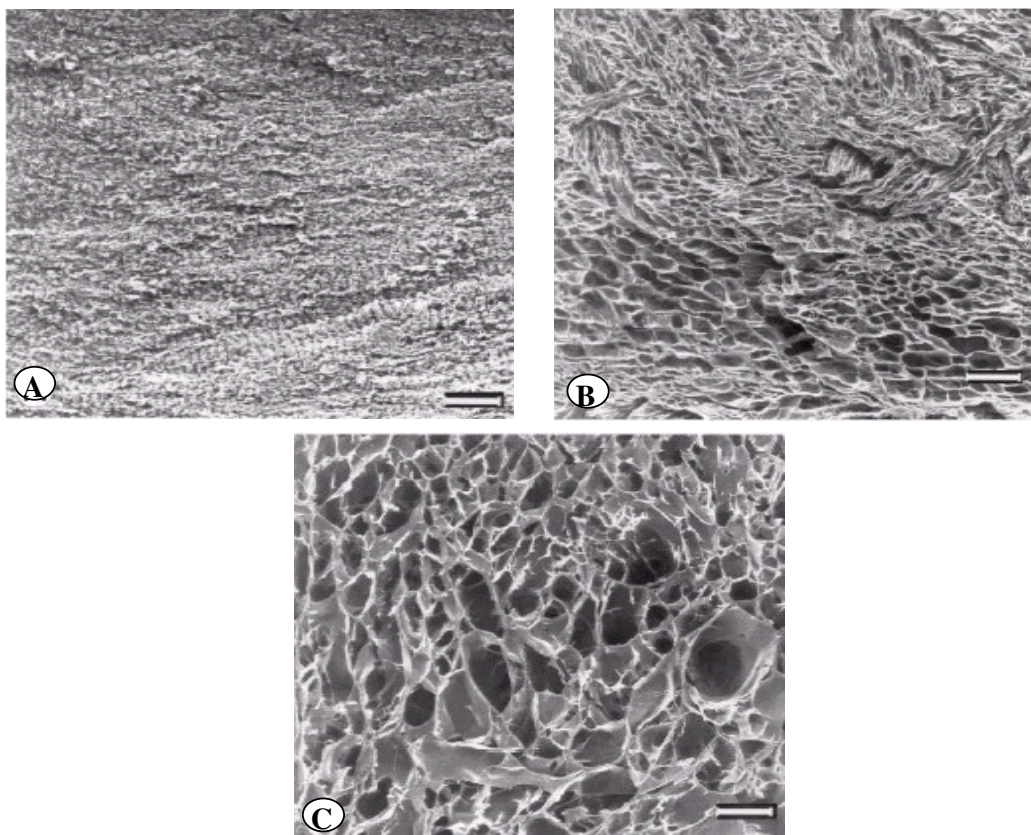


Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura da membrana do pericárdio bovino: nativa (A); Pericárdio bovino tratado em meio alcalino por 24 horas - BP24 (B) e Pericárdio bovino tratado em meio alcalino por 48 horas - BP 48 (C). Barra = 100 μ m. Fonte: Bet *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2002

Estas modificações não promovem alterações na estrutura da tripla hélice na molécula do colágeno, porém alteram o padrão de auto-agregação de suas microfibrilas e as propriedades dielétricas. Além disso, faz com que o ponto isoelétrico do colágeno seja entre 4,6 e 5,0, inferior ao colágeno nativo que é ao redor de 6,7 e 7,1. Assim, essas matrizes são negativas em pH fisiológico (Plepis *et al.*, 1996; Goissis *et al.*, 1999; Bet *et al.*, 2001). Essas matrizes polianiónicas quando implantadas em animais de experimentação não mostraram resposta inflamatória e apresentaram um aspecto de

biocompatibilidade, indicando que a utilização desses substratos para implantes ósseos pode ser uma alternativa viável (Rocha *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2003).

Experimentos como de Parreira (1999) mostraram que MECas colágeno/elastina carregadas negativamente foram mais compatíveis quando comparadas com a MECa nativa além de se integrar com o tecido natural. Krukowski (1991) mostrou que superfícies carregadas positivamente induziram a formação de tecido conjuntivo, enquanto aquelas carregadas negativamente estimularam a formação de tecido ósseo intramedular.

Davies *et al.* (1986) cultivaram osteoblastos sobre substratos com cargas negativas e positivas e observaram características de metabolismo ativo naquelas com cargas negativas. Rocha *et al.* (2002) observaram que o processo de hidrólise da membrana de colágeno abriu espaços, criando canais e poros na estrutura que permitiram a migração celular. Assim, notaram formação óssea nas matrizes polianiónicas implantadas enquanto na matriz nativa observaram reação inflamatória e centros de reabsorção.

Goissis *et al.* (2003) avaliando o colágeno polianiónico como suporte à reconstrução de tecido ósseo, observaram que este material, *in vitro*, foi capaz de induzir depósito de sais de fosfato de cálcio, sugerindo assim que mudanças dielétricas na matriz colágena pode ter sido o indutor ao processo de mineralização do colágeno como um sistema semelhante ao estágio de mineralização do osso. Rocha *et al.* (2002) observaram boa interação osso-implante e neoformação óssea nas cavidades produzidas na tíbia de ratos que foram preenchidas com colágeno tratado por hidrólise durante um tempo de 24 e 48 horas. Assim, concluíram que o colágeno, devido as suas vantagens como biocompatibilidade e osteocondutibilidade, apresentou-se com um grande

potencial para o tratamento dos defeitos ósseos. Além disso, as modificações do colágeno provocadas pelo tratamento de hidrólise alcalina contribuíram para melhorar suas propriedades biológicas.

Apesar da viável aplicabilidade do colágeno como implante ósseo, existem alguns fatores que podem comprometer os bons resultados já demonstrados na literatura, como por exemplo, as patologias associadas à deficiência de minerais ósseos, como a osteoporose. Segundo Frayssinet (1992), as condições de saúde do osso são fundamentais para a sua interação com o biomaterial quando usado como implante.

OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Diante das vantagens oferecidas pelos biomateriais derivados de colágeno e pelas suas características e propriedades anteriormente descritas, o presente trabalho foi avaliar o processo de neoformação óssea quando membranas de colágeno são implantadas em falhas ósseas produzidas no fêmur osteoporótico de ratas ovariectomizadas.

Objetivos específicos:

- Avaliar qual tipo de membrana de colágeno (nativa- NCM e polianiónicas tratadas 48 e 96 horas em meio alcalino - PCM48 e PCM96, respectivamente) responde melhor ao processo de reparação da falha óssea produzida no fêmur das ratas ovariectomizadas quanto ao volume de osso neoformado;

- Avaliar a resistência mecânica do osso neoformado nas áreas receptoras das membranas de colágeno;

Capítulo 2: **ARTIGO 1.**

OSTEOINTEGRATION OF IMPLANTS POLYANIONIC COLLAGEN MATRIX IN
BONE DEFECTS OF OVARECTOMIZED RATS SUBJECTED TO HORMONE
REPLACEMENT THERAPY

Marcelo R. Cunha^{1,2}, Arnaldo R. Santos Jr^{1,2}, Gilberto Goissis ³, Keico Okino Nonaka⁴,
Selma C Genari^{1,2}.

¹ Department of Cell Biology, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, SP;

² Institute of Biological Science, UNIPINHAL, Espírito Santo do Pinhal, SP;

³ Department of Chemistry and Molecular Physics, Institute of Chemistry, USP, Sao
Carlos, SP, Brazil

⁴ Department of Physiological Sciences, Federal University of Sao Carlos, UFSCar, SP,
Brazil.

Reprint requests to: Marcelo Rodrigues Cunha, Department of Cell Biology, Institute of
Biology, State University of Campinas - UNICAMP, P.O. Box 6109, ZIP 13084-971
Campinas, SP, Brazil, Fax: +55-19-3788-6111, E-mail: sgenari@nutricell.com.br

ABSTRACT

In recent years, there has been a great interest in the development of biomaterials that could be used in the repair of bone defects. Collagen matrix has the advantage that it can be modified chemically to improve its mechanical properties. The aim of the present study was to evaluate the effect of three-dimensional membranes of native or anionic (submitted to alkaline treatment for 48 or 96 h) collagen matrix on the consolidation of osteoporosis bone fractures resulting from the gonadal hormone alterations caused by ovariectomy in rats subjected to hormone replacement therapy. The animals received the implants 4 months after ovariectomy and were sacrificed 8 weeks after implantation of the membranes into 5mm wide bone defects created in the distal third of the femur with a surgical bur. Macroscopic analysis revealed the absence of pathological alterations in the implanted areas, suggesting that the material was biocompatible. Microscopic analysis showed a lower amount of bone ingrowth in the areas receiving the native membrane compared to the bone defects filled with the anionic membranes. In ovariectomized animals receiving anionic membranes, a delay in bone regeneration was observed mainly in animals not subjected to hormone replacement therapy. We conclude that anionic membranes treated with alkaline solution for 48 and 96 h presented better results in terms of bone ingrowth.

Keywords: Bone, osteoporosis, hormonal replacement, collagen, biomaterials

INTRODUCTION

Defects associated with bone loss can be repaired using autogenous grafts since these grafts prevent immunological rejection and provide cells that can immediately start the regeneration process [1]. However, autogenous grafts present disadvantages such as donor site morbidity [2], chronic pain and vascular injuries during surgery [3]. In view of these limitations, biomaterials such as ceramics, metals, silicone, polymethylmethacrylate and polyethylene have been investigated for synthetic bone graft substitutes [4]. However, the cytotoxic effects of these materials contraindicate their use. Additional problems are difficulties in filling the bone defect, the low mechanical resistance of these implants and the occurrence of corrosion when metal implants are used [5].

Polymeric membranes have been explored as an alternative in the area of biomaterials since they act as a barrier, preventing the growth of connective tissue close to the defect and permitting only bone ingrowth. Natural polymers from extracellular matrix include collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and elastin. These polymers play a role in the control of tissue structure and in the regulation of the cellular phenotype, simulating a native extracellular matrix. Particularly collagen, the main organic constituent of bone tissue, has been used in the composition of biomaterials for bone reconstruction [6,7] due to its biological properties such as biocompatibility, biodegradability and bioabsorbability; in addition, collagen presents a weak antigenic reaction and acts as a support for bone-inducing proteins [8]. Collagen influences cell differentiation, possesses sites for cell recognition [9] and stimulates cell

migration and infiltration [10]. These properties are important to facilitate the process of bone regeneration [11].

Among the materials synthesized from collagen, collagen matrices are particularly interesting. Artificial collagen matrices have the advantage that their properties can be altered by the chemical modification of collagen [12,13,14], a fact that might improve the characteristics of collagen in terms of the stimulation of osteogenesis, as well as their piezoelectric properties. An important modification in the structure of these matrices is the removal of carboxamide groups from asparagine and glutamine residues by alkaline hydrolysis and the consequent formation of carboxyl groups [15,16]. These modifications do not alter the triple helix structure of the collagen molecule but change the self-assembled pattern of its microfibrils and its dielectric properties. In addition, the isoelectric point of the collagen is reduced to 4.6-5.0 compared to native collagen whose isoelectric point ranges from 6.7 to 7.1. Thus, these matrices are negatively charged at physiological pH [15,16,17]. When implanted into experimental animals, polyanionic matrices do not induce an inflammatory response and show good biocompatibility, thus indicating that the use of these substrates as bone implants might be a viable alternative [18,19].

Despite the applicability of collagen as a bone implant, some factors, including diseases associated with bone mineral deficiency such as osteoporosis, may compromise the promising results reported in the literature. According to Frayssinet [20], the health conditions of bone are fundamental for its interaction with the implant biomaterial. Factors that increase the risk for the development of osteoporosis include a low calcium intake, smoking, alcoholism, lack of physical activity, and hormonal disorders resulting from early menopause or late menarche [21]. The risk of osteoporosis is also increased

in the case of ovariectomy [22] since female gonadal hormones such as estrogen stimulate bone growth and mineralization [23]. In view of the advantages offered by artificial collagen matrices, the objective of the present study was to evaluate the process of bone ingrowth when polyanionic collagen matrix are implanted into bone defects created in the femur of rats with osteoporosis induced by ovariectomy.

Materials and methods

Preparation of the artificial collagen extracellular matrices

The raw material used for the preparation of the three-dimensional collagen matrix (CM) was bovine pericardium provided by Braile Biomédica S/A (Sao José do Rio Preto, SP, Brazil). The following samples were prepared and provided by the Institute of Chemistry of Sao Carlos, University of Sao Paulo, under the supervision of Prof. Dr. Gilberto Goissis: untreated three-dimensional membranes consisting of native collagen matrix (NCM), and polyanionic collagen matrix (PCM) submitted to alkaline treatment for 48 and 96 h (PCM48 and PCM96, respectively).

Animals

Ninety-six adult female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 12 weeks, weight 300 gr, provided by the Multi-Institutional Animal House of the (CEMIB) State University of Campinas, were used. The animals were divided into the following groups: group 1, non-ovariectomized animals (NO); group 2, unilaterally ovariectomized animals (UO); group 3, bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy (BOWHRT); group 4, bilaterally

ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy (BOHRT). Each group was divided into three subgroups of 8 animals each which received the NCM, PCM48 and PCM96 membrane implants, respectively. Of these, 4 animals were used for histological analysis and 4 for the biomechanical tests.

Ovariectomy

The animals, except the non ovariectomized, were weighed and anesthetized by intramuscular injection of ketamine (Francotar, Sespo Ind. e Com., Jacaré, SP, Brazil) and xylazine hydrochloride (2% Virbaxyl, Virbac Brasil Ind. e Com., Sao Paulo, SP, Brazil) at a proportion of 1:1 and a dose of 0.10 ml/100 g body weight. A 2-cm incision was made in the skin with a scalpel lateral to the spine to completely remove the ovary from the pelvic cavity. The musculature and skin were repositioned and closed with No. 4.0 cotton suture.

Hormone replacement therapy

Estradiol hexahydrobenzoate (Benzogynestryl, Hoechst Marion Roussel) was used for hormone replacement therapy. The drug was diluted in peanut oil (All Chemistry, Sao Paulo, SP, Brazil) and the animals were injected subcutaneously with 20 mg at a mean interval of 48 h from the time of membrane implantation to the day of sacrifice after 8 weeks.

Surgical procedure for the implantation of the collagen matrix

The membranes were implanted 4 months after ovariectomy since, according to Wronski et al. [24], accelerated bone loss occurs within a period of 3 to 4 months after

ovariectomy. After anesthesia as described above, an incision was made in the skin on the medial side of the thigh, exposing the femoral quadriceps muscle. The muscle was sectioned longitudinally in its distal third and separated anterolaterally. With the distal end of the diaphysis of the left femur exposed and the periosteum separated, a bone defect was created with a 5mm surgical bur coupled to the pen of a mini-motor. Next, the defect was filled with the NCM or PCM. The periosteum, musculature and skin were repositioned and closed with No. 4.0 cotton suture. The animals were sacrificed 8 weeks after implantation and the femurs containing the recipient area were removed and submitted to radiological, histological, morphometric and biomechanical analysis.

Radiography and histological analysis

Radiographs of the left femurs were obtained with a Rigaku RU-200 apparatus with a focal point of 0.8 x 0.8 mm. Kodak radiographic films measuring 7.6 x 5.7mm were used. After radiological analysis, the samples were submitted to routine histological processing and semi-serial 5µm cross-sections were stained with hematoxylin and eosin.

Morphometric analysis

Using a square grid with 100 points coupled to the eyepiece of a light microscope, the volume density of newly formed bone at the site of the collagen implant was calculated for each recipient area. Newly formed bone was quantified by stereology according to the Delesse principle cited by Mandarin de Lacerda [25] using the following formula: $V_V = P_P/P_T$ (%), where V_V = volume density or relative volume, P_P =

number of points over newly formed bone, and P_T = total number of points of the system.

Analysis of the biomechanical properties of the femur

The biomechanical parameters were obtained with a mechanical assay using an Instron 4444 universal compression testing machine. A load cell with a maximum capacity of 1 kN was used. Before the assay, the bones were thawed at room temperature and kept in saline until the time of the test. The bone was fixed to a support, and a force was applied perpendicularly to the longitudinal axis of the recipient area in the anteroposterior direction with a cylindric rod equipped with a 3.0-mm roller fixed to its end, using an initial adaptation preload of 5 N. The force was applied exactly to the implant site in the bone defects studied. Next, the load was applied to the recipient area at a constant speed of 2 mm/min until a 2-mm displacement of the support was observed, and the results were recorded. The data were monitored and recorded by the equipment's own software. The design of the biomechanical test is shown in Figure 1.

Statistical analysis

Linear models were fitted to each of the response variables, with the response being the variable analyzed and the factors the group to which the animals belonged (NO, UO, BOWHRT and BOHRT) and the type of implant (NCM, PCM48 and PCM96). The model was also fitted considering the group and type of implant interaction. Significance tests were applied to determine the effect of each factor on the response variable. In cases in which a significant difference of the factors was detected, statistical tests were applied to determine which differences were distinct from the

remaining ones. To guarantee the level of significance in cases of multiple comparisons of the means, the levels of significance ($p < 0.05$) were adjusted using the Tukey-Kramer test [26]. The data were analyzed with the SAS system, version 9.1.3.

Results

Radiography analysis

Apparently, closure of the bone defect tended to be better in the NO, UO and BOHRT groups, especially in animals receiving the polyanionic collagen membranes. In BOWHRT animals, no marked closure of the bone defect was observed, being this closing less pronounced in the animals that received native membrane (Figure 2).

Histological analysis

All animals receiving native collagen samples (NCM), regardless of whether they were ovariectomized or not, presented few characteristics indicative of defect closure. In addition, the bone ingrowth was located marginal to the membrane, projecting from the margins of the defect and containing cavities filled with bone marrow. In rats receiving the PCM48, the bone defect created was almost completely filled with bone ingrowth, especially in non-ovariectomized and unilaterally ovariectomized rats. The newly formed bone presented characteristics of immature (presence of round lacunae harboring osteocytes arranged in various directions) as well as mature (dense texture) bone. In rats in which the bone defect was filled with the PCM96, no apparent defect closure was observed in bilaterally ovariectomized animals and those not submitted to hormone replacement therapy. The other groups

demonstrated good closure of the bone defect through bone formation from the margins. A tendency toward invasion of newly formed bone partially covering the bone defect was noted in animals receiving the PCM48 and PCM96 membranes. No fibrous tissue capsule or inflammatory process in the implant recipient area was observed in any of the groups. A thin layer of no dense cortical bone around the implant was noted in BOWHRT animals, in view of the presence of disorganized bone tissue in the region (Figure 3).

Morphometric analysis

When the results obtained for the implants were first evaluated, a significant difference in the volume of newly formed bone was observed between animals receiving the native collagen matrix (NCM) and those receiving the polyanionic collagen membranes (PCM48 and PCM96), with the results obtained being significantly lower for the native matrix compared to the other membranes. On the other hand, no significant difference was observed between the PCM48 and PCM96 membranes. The same findings were obtained for all groups studied (NO, UO, BOHRT and BOWHRT).

Comparison of the groups studied showed a significantly lower volume of newly formed bone in the BOWHRT group compared to the other groups (NO, UO and BOHRT). The same was observed for the three types of membranes studied. The results are shown in Figure 4.

Biomechanical Properties

Figure 5 shows the mean maximum resistance as a function of type of implant (NCM, PCM48 and PCM96) and animal group (NO, UO, BOWHRT and BOHRT).

Analysis of this variable showed a highly significant group-implant interaction ($p < 0.05$). With respect to the native membrane, a significant difference was observed between all groups, except between groups NO and UO and between groups BOWHRT and BOHRT. Regarding the membranes treated for 48 and 96 h, no significant differences were observed between groups.

Comparison of the three membranes in each group showed no difference between the native and polyanionic membranes in the NO or UO group. Regarding the BOWHRT and BOHRT groups, mechanical resistance was greater in the area receiving the 96 polyanionic membrane compared to the area implanted with the native membrane.

Discussion

Studies involving laboratory animals represent an important tool for advances in the biomedical area. In this respect, laboratory animals provide a good model for the study of questions related to some human diseases, including those resulting from hormonal changes such as osteoporosis. In the literature, rats have been frequently used as an experimental model for the study of osteoporosis related to hormone alterations due to gonadal deficiency. [27,28,29,30,31,32,33,34]. For this reason and because of their appropriate size for the surgical technique used for implantation of the collagen membranes in the bone defects created in the femur, rats were chosen for the present study.

In the present study, the animals were submitted to the surgical procedure for the implantation of the collagen membranes 4 months after ovariectomy. According to Wronski et al. [24], accelerated bone loss occurs within a period of 3 to 4 weeks after ovariectomy. The time of implantation of the membrane was standardized at 8 weeks since Rocha et al. [18] observed good bone neoformation in tibial defects filled with collagen membranes within a period of 4 weeks; however, these authors used normal animals. Since in the present study we used animals with experimentally induced osteoporosis, a period of 8 weeks was adopted to evaluate the velocity of the osteoconductive capacity of collagen in pathological bone tissue.

PCM have been widely used experimentally to fill bone defects. Among these materials, collagen membranes are particularly interesting because of their good mechanical properties. Modifications have been introduced in artificial collagen matrices to increase their mechanical resistance, as well as to reduce their degradation in vivo and to permit better integration with the recipient tissue. These alterations include the chemical modification of collagen which results in positively or negatively charged collagen matrices [12,13,14].

The main characteristic of modifications that change the charge of collagen is the improvement of its dielectric properties compared to native collagen. Krukowski et al. [35] showed that positively charged surfaces induced the formation of connective tissue, whereas negatively charged surfaces stimulated the formation of intramedullary bone tissue. This fact indicates that polyanionic collagen might be useful in implants aimed at bone regeneration. Alkaline treatment for 72, 48, 36 and 24 h results in an increase of 113 ± 15 , 87 ± 17 , 66 ± 12 and 46 ± 12 carboxyl radicals in amino acid residues, respectively [17], decreasing the isoelectric point of collagen to 4.6-5.0

compared to native collagen (6.7-7.1). Thus, these matrices are negatively charged at physiological pH [17], a fact altering the association pattern of the microfibrils, with the microfibrils forming a matrix different from that of native collagen [15,16,17]. An excessive carboxyl group content alters the self-aggregation pattern of the collagen molecules in such a way as to inhibit the formation of microfibrils, thus producing an amorphous matrix. This is observed for matrices submitted to alkaline treatment for 72 h or longer [16,17]. In addition, it has been demonstrated that the preparation of polyanionic collagen matrices results in a “contamination” with $3.2 \pm 1.0\%$ elastin, a value lower than that observed for native collagen membranes whose elastin content is about $4.8 \pm 0.8\%$ [17]. From a biological point of view, the addition of a negative charge is desired to a certain extent since cells generally show a preference for a negatively charged substrate during cell adhesion [18,36]. However, in the case of some cell types an increase in negative charge seems to inhibit or even block adhesion [37].

Anionic collagen matrices have been chemically characterized in previous studies [16]. Matrices treated for 24 h presented an increase in the number of carboxyl groups per collagen molecule of 46 ± 12 , whereas matrices treated for 48 h presented an increase of 87 ± 17 [17]. However, the triple helix structure of collagen was preserved in all membranes, irrespective of the increase in the number of carboxyl groups [38]. In addition, absorption of water by the matrices and their hydrophilic potential were shown to increase linearly with the increasing carboxyl groups [38]. According to Bet et al. [38], these characteristics have a much larger impact on the behavior of cell adhesion to these matrices than their surface morphology. Morphological studies of these matrices have demonstrated that the dense aspect of the native matrix is transformed into a

sponge-like structure with pores of different shapes and diameters after chemical treatment, with this structure being important for osteogenesis [18].

Studies have shown that polyanionic collagen developed as a support for bone tissue reconstruction was able to induce the deposition of calcium phosphate salts *in vitro*. It was thus suggested that dielectric changes in the collagen matrix may have induced a process of collagen mineralization *in vitro* similar to the stage of bone mineralization [39]. When bovine osteoblast cells were cultured on these polyanionic collagen matrices, the matrices promoted the production of alkaline phosphatase, followed by mineralization of the substrates and *in vitro* osteoblast differentiation [40]. *In vivo*, when implanted into experimental animals these polyanionic matrices induced no inflammatory response and presented very good biocompatibility, a fact also observed in the present experiment. These matrices have also been tested in bone tissue engineering studies regarding their ability to promote bone regeneration [18,19], yielding satisfactory results in terms of some aspects [19]. *In vitro* studies have shown that polyanionic collagen membranes present no sign of toxicity and are more receptive to cell adhesion than native collagen [38].

In the present experiment, morphometric analysis showed a better capacity of bone neoformation at sites filled with the polyanionic collagen treated for 48 and 96 h in alkaline medium (PCM48 and PCM96) compared to areas implanted with native collagen, suggesting that the higher the porosity of the material, the improve its capacity to permit cell migration. Similar results have been reported by Rocha et al. [18] and Rosa et al. [19] who implanted polyanionic collagen membrane treated for 24, 36 and 48 h in alkaline medium into the rat tibia. Bone formation was observed for all matrices, especially that treated for 48 h. These data support the thesis that polyanionic collagen

are a promising biomaterial for the regeneration of bone defects because of their biocompatibility and osteoconductivity.

Although the results reported above are highly promising, they have been obtained experimentally in young or adult healthy animals. In humans, most prostheses or substrates used for the stimulation of bone regeneration are implanted in elderly patients or patients with diverse bone diseases. According to Albrektsson et al. [41], a healthy bone condition is essential for the interaction with biomaterial implants, whereas poor bone health can alter the expected results. Thus, the data obtained in studies using healthy animals cannot be directly extrapolated to humans. In this respect, Camilli et al. [42] investigated the effect of alcohol on the osteointegration of hydroxyapatite implanted into the femur of rats and concluded that there is a delay in bone ingrowth in the implanted areas due to the abnormal conditions of bone tissue as a result of the deleterious effects of alcohol consumption. Other factors that cause bone weakness such as smoking, sedentarism and hormonal changes that result in osteoporosis may also compromise bone metabolism and, consequently, the healing process of bone defects. César-Neto et al. [43] studied the healing around titanium implants used to fill bone defects created in the tibia of rats submitted to subcutaneous nicotine administration or cigarette smoke inhalation. The animals were sacrificed after 60 days. The authors observed a negative effect on the degree of bone-to-implant contact due to the presence of fibrous tissue. Similar results have been reported by Nociti et al. [44] who implanted titanium into the tibia of rabbits submitted to subcutaneous nicotine administration, and by Zechner et al. [45] who observed poor bone ingrowth around implants inserted into mandibular defects in patients with a history of smoking.

Studying the bone-implant interaction in cases of osteoporosis induced by hormonal alterations, some investigators performed ovariectomy in rats and then implanted titanium into the bone cavities created in these animals. The results of these studies showed a poor interaction between the implanted material and bone tissue, as well as a low amount of newly formed bone, and were attributed to the osteoporosis-like conditions as a result of gonadal deficiency induced by ovariectomy [28,46,47,48,49,50,51]. Similar results have also been reported by Jung et al. [27], Pan et al. [52], De Benedittis et al. [48], Fini et al. [50] and Hayashi et al. [51] who, however, used hydroxyapatite as implant material.

Wang *et al.* (2005) evaluate the influence of osteoporosis on the middle and late periods of tibia fracture healing process through observing the histomorphological changes, bone mineral density and biomechanical properties in ovariectomized rats. In their results, the ovariectomized group showed endochondral bone formation was delayed and the new bone trabeculae arranged loosely and irregularly. In addition, the osteoporosis influences the fracture healing in the ovariectomized rat. Similar results were obtained in the present study.

The present results showed a significantly smaller volume of bone ingrowth in the implanted areas of BOWHRT animals, irrespective of the type of collagen membrane used. Statistical analysis revealed a mean difference of 11.0694, 19.6875 and 19.4792 between the BOWHRT and the NO, UO and BOHRT groups, respectively, with this difference being significant ($p < 0.001$). This analysis confirms the effects of estrogen deficiency on bone metabolism in response to the implant used. No significant difference was observed between the NO, UO and BOHRT groups. Thus, bone neoformation close to the collagen membrane can be expected even in ovariectomized

animals, but it is slower and the bone volume is smaller. In addition, we noted the presence of trabecular bone in the implanted areas of these animals. Similar results have been reported by Cho et al. [32] who studied the bone-dental implant interface in ovariectomized rats. The authors concluded that osteoporosis-like conditions induced by hormone deficiency may compromise the mechanical stability of the implant in view of the results demonstrating a reduction of the cortical layer and an increase of trabecular bone in the recipient area.

The biomechanical test is important to evaluate bone strength which is associated with a higher susceptibility to pathological fractures, one of the severe risks of osteoporosis induced by hormonal alterations. The biomechanical test permits the assessment of bone quality by analyzing the intrinsic properties of the biological material [54]. However, estrogen deficiency increases bone resorption and alters trabecular bone mass, mainly affecting the mechanical resistance of bone extremities [55].

The mechanical resistance of the areas implanted with the native membrane was higher in intact rats than in ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy. In the present study, we standardized the mechanical tests so that the load would be applied to the periphery of the bone defect from where bone neoformation occurs. This fact might have contributed to the contradictory and unexpected data regarding the mechanical resistance of the implanted area observed between the different types of membranes and in ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy. In addition, bone formation was evaluated 8 weeks after collagen implantation into the bone defects, a period that might have not been sufficient for the formation of mineralized bone to such an extent that its biomechanical

capacity could be analyzed. Saadeh [56] implanted collagen type I into rat mandibular defects and observed no closure of the defect after 6 weeks, although collagen is considered to be a promising material for the reconstruction of bone defects.

Comparison of the membranes in each group showed no difference for the NO and UO groups, whereas a difference was observed for the BOHRT and BOWHRT groups, with the area receiving the 96 polyanionic membrane presenting greater resistance than the area implanted with the native membrane. This finding suggests that the porosity of the polyanionic membranes might have favored the mineralization process and the arrangement of trabecular bone since

The ability of bone to withstand fractures also depends on its geometry and microarchitecture. Ikeda et al. [57] found that the trabecular structure of bone affects its biomechanical strength. Thus, the fact that we implanted the collagen membrane into the distal end of the femur where trabecular bone predominates might explain the contradictory and unexpected results of this study.

We conclude that bone neoformation can occur in bone defects even under pathological conditions of the bone resulting from gonadal deficiency, especially when the defect is filled with polyanionic membranes like those used in the present study. Nevertheless, further studies are necessary since this aspect becomes relevant in some situations, as the time of the experiment and new approaches to evaluate the biomechanical aspects as regards force of traction and compression of the bone.

References

- [1] Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A.. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL–lactic–co–glycolic acid) foam implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1): 1-8.
- [2] Mark DE, Hollinger JO, Hastings Jr C, Chen G, Marden LJ, Reddi AH.. Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone inductive protein. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1990; 86 (4): 623-30.
- [3] Younger EM, Chapman MN. Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma.* 1989; 3: 192-99.
- [4] Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Jamesryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cell. *Plastic Reconstructive Surg.* 1998; 101 (3):567- 81.
- [5] Weiss RE, Reddy AH. Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow. *J Cell Biol.* 1981; 88: 630-36.
- [6] Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 224-29.
- [7] Yang C, Hillas PJ, Báez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, Spiro R, Polarek JW. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *Biodrugs* 2004; 18(2): 103-19.
- [8] Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Cehen TH, Cheng WC, Hu CL, Yao CH. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 2000; 21: 1541-49.

- [9] Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003;13 (5): 264-69.
- [10] Santos Jr AR, Dolder H, Wada MLF. Effects of fetal calf serum and dexamethasone in the differentiation of fibroblastic cells cultured on collagen I gel. *Journal of Submicroscopical Cytology and Pathology* 2003; 35: 35-42.
- [12] Reid GG, Gorham SD, Lackie JM. The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. *J. Mat. Sci.: Materials in Medicine* 1993; 4: 201-09.
- [13] Singh MP, Stefko J, Lumpkin JA, Rosenblatt J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharm. Res.* 1995; 12: 1205-10.
- [14] Tuan TL, Keller LC, Sun D, Nimni ME, Cheung D. Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. *J. Cell Sci.* 1994; 107: 2285 –89.
- [15] Pelpis AMD, Goissis G, Das-Gupta DK. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering and Science* 1996; 36: 2932-38.
- [16] Goissis G, Lacerda C, Barbosas MP, Pinatti A. Surface tension control of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica.* 1999; 15: 55-61.
- [17] Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. *Biomacromolecules* 2001; 2: 1074-79.
- [18] Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002; 23: 449-56.

- [19] Rosa FP, Lia RCC, Souza KOF, Goissis G, Marcantonio Jr E. Tissue response to polyanionic collagen:elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials* 2003; 24: 207-12.
- [20] Frayssinet P. New observation on middle term hydroxyapatite coated titanium alloy hip prostheses. *Biomaterials* 1992; 13 (10): 668-73.
- [21] May H, Murphy S, Khaw KT. Bone mineral density and its relationship to skin color in Caucasian females. *Eur. J. Clin. Invest.* 1995; .25: 85-89.
- [22] Shen V, Birchman R, Wu DD, Lindsay R. Skeletal effects of parathyroid hormone infusion in ovariectomized rats with or without estrogen repletion. *J Bone Miner Res.* 2000; 15 (4): 740-46.
- [23] Lincoln GA, Tyler NJ. Role of oestradiol in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. *J. Reprod. Fertil.* 1999; 115 (1): 167-74.
- [24] Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int.* 1989;45(6): 360-366.
- [25] Mandarim de Lacerda CA. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology. *Braz. J. Morphol.* 1999;16 (2): 131-39.
- [26] Krammer CY. Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications. *Biometrics* 1956; 12: 307-310.
- [27] Jung YC, Han CH, Lee IS, Kim HE. Effects of ion beam-assisted deposition of hydroxyapatite on the osseointegration of endosseous implants in rabbit tibiae. *Int. J. Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(6): 809-18.
- [28] Ozawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura RD, Nishimura I. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration:

- histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone* 2002; 30 (1): 137-43.
- [30] Giavaresi G, Borsari V, Fini M, Martini L, Tschon M, De Terlizzi F, Nicolini A, Carpi A, Giardino R. Different diagnostic techniques for the assessment of cortical bone on osteoporotic animals. *Biomed Pharmacother* 2004; 58(9): 494-99.
- [31] Mukherjee M, Das AS, Mitra S, Mitra C. Prevention of bone loss by oil extract of garlic (*Allium sativum* Linn.) in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Phytother Res.* 2004;18(5): 389-94.
- [32] Cho P, Schneider GB, Krizan K, Keller JC. Examination of the bone-implant interface in experimentally induced osteoporotic bone. *Implant Dent.* 2004; 13(1): 79-87.
- [33] Wang JW, Li W, Xu SW, Yang DS, Wang Y, Lin M, Zhao GF. Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chin J. Traumatol.* 2005; 8(2): 111-16.
- [34] Furue H, Yoshimura M, Ito A. Spinal anti-nociceptive effect of calcitonin in an osteoporotic model rat--functional recovery of descending serotonergic inhibition. *Clin Calcium* 2005; 15(3): 163-67.
- [35] Krukowski M.. Hard and soft connective tissue growth and repair in response to charged surfaces. In: Davies, J.E., ed. *The bone – Biomaterial interface*. Toronto, University of Toronto Press. 1991; 25: 275-84.
- [36] Davies JE, Causton B, Bovell Y, Davy K, Sturt CS. The migration os osteoblasts over substrata of discrete surface charge. *Biomaterials* 1986; 7: 231-33.
- [37] Hsu S, Chen WC. Improved cell adhesion by plasma-induced grafting of L-lactide onto polyurethane surface. *Biomaterial* 2000; 2: 359-67.

- [38] Bet MR, Goissis G, Vargas S, Selistre-de-Araujo HS. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. *Biomaterials* 2003; 24: 131-37.
- [39] Goissis G, Maginador VS, Martins VCA. Biomimetic Mineralization of Charged Collagen Matrices: in vitro and in vivo study. *Artif Organs* 2003; 27: 437- 43.
- [40] Moreira PL, An YH, Santos Jr AR, Genari SC. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. *J. Biomed Mater Res.* 2004; 71B: 229-37.
- [41] Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom, J. Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop. Scand.* 1981; 52: 155-70.
- [42] Camilli JA, Cunha MR, Bertran CA, Kawachi EY. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. *Archives of Oral Biology* 2004; 49: 747-53.
- [43] César Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H, Nociti FH.. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J. Periodontol* 2003; 74 (10): 1454-59.
- [44] Nociti FH, Stefani CM, Sallum EA, Duarte PM, Sallum AW.. Nicotine and bone density around titanium implants: a histometric study in rabbits. *Implant Dent* 2002; 11(2): 176-82.
- [45] Zechner W, Trinkl N, Watzak G, Busenlechner D, Tepper G, Haas R, Watzek G. Radiologic follow-up of peri-implant bone loss around machine-surfaced and rough-surfaced interforaminal implants in the mandible functionally loaded for 3 to 7 years. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19(2): 216-21.

- [29] Li J, Liao EY, Dai RC, Wei QY, Luo XH. Effects of 17 beta-estradiol on the expression of interstitial collagenases-8 and -13 (MMP-8 and MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in ovariectomized rat osteoblastic cells. *J. Mol. Histol.* 2004; 35(8-9): 723-31.
- [46] Lugero GG, De Falco Caparbo V, Guzzo ML, König B, Jorgetti V. Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent.* 2000; 9(4): 303-09.
- [47] Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, Motohashi M, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87 (4): 411-18.
- [48] DeBenedittis A, Mattioli-Belmonte M, Krajewski A, Fini M, Ravaglioli A, Giardino R, Biagini G. In vitro and in vivo assessment of bone-implant interface: a comparative study. *Int. J. Artif. Organs* 1999; 22(7): 516-21.
- [49] Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1997; 55(4): 351-61.
- [50] Fini M, Nicol I, Aldini N, Gandolfi MG, Mattioli Belmonte M, Giavaresi G, Zucchini C, De Benedittis A, Amati S, Ravaglioli A, Krayewski A, Rocca M, Guzzardella GA, Biagini G, Giardino R. Biomaterials for orthopedic surgery in osteoporotic bone: a comparative study in osteopenic rats. *Int. J. Artif. Organs.* 1997; 20(5): 291-97.
- [51] Hayashi K, Uenoyama K, Mashima T, Sugioka Y. Remodelling of bone around hydroxyapatite and titanium in experimental osteoporosis. *Biomaterials* 1994; 15(1): 11-16.

- [52] Pan J, Shirota T, Ohno K, Michi K. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J. Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58 (8): 877-882.
- [53] Wang JW, Li W, Xu SW, Yang DS, Wang Y, Lin M, Zhao GF. Osteoporosis influences the middle and late periods of trabeculae healing in a rat osteoporotic model. *Clin. J. Traumatol.* 2005; 8(2): 111-6.
- [54] Driusso P. Effects of prolactin on bone mass of ovariectomized rat. PhD Thesis, Federal University of São Carlos (UFSCar), Brazil [in portuguese], 2003.
- [55] Ikeda S, Tsurukami H, Ito M, Sakai A, Sakata T, Nishida S, Takeda S, Shiraishi A, Nakamura T. Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats. *Bone.* 2001; 28(6):625-633.
- [56] Saadeh PB; Khosla RK; Mehrara BJ; Steinbrech DS; McCormick SA; DeVore DP; Longaker MT. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *J Craniofac Surg* 2001; 12(6): 573-579.



Figure 1: Instron Universal assay Equipment (model 4444) showing a test of compression on the receiver area of the implant in femur. The picture shows a bone, the cylindrical pole applying force on receiver area of the collagen membranes. The support that the bone is rest no not viewed. Department of Physiological Sciences, UFSCar. Permission Profa. Dra. Keico Okino Nonaka.

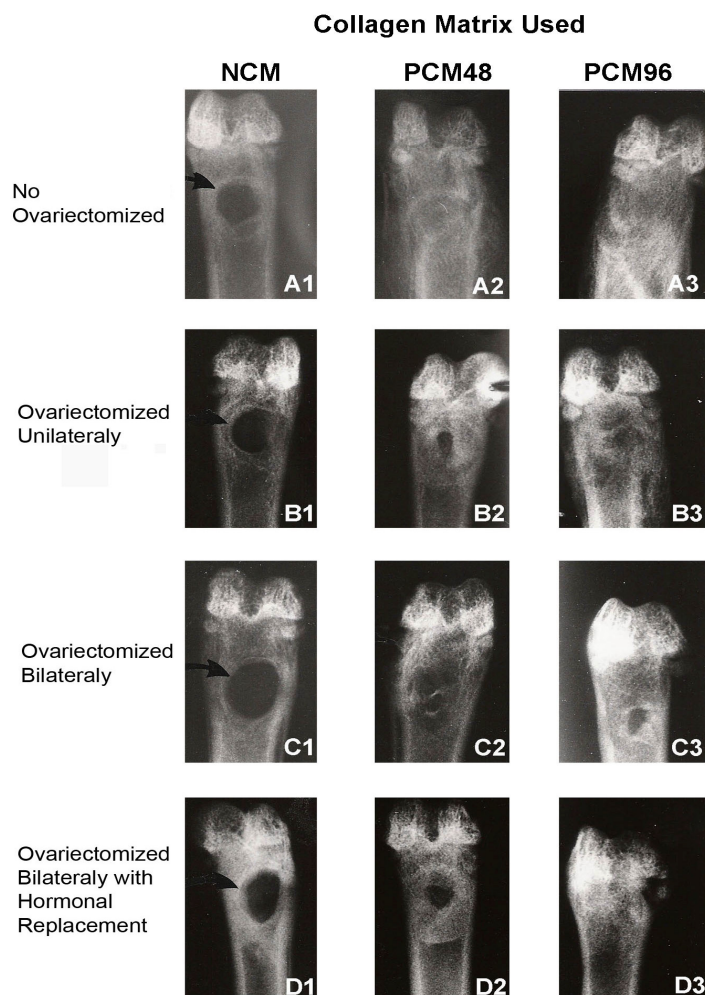


Figure 2. Radiography analysis of animals receiving the different implants under the experimental conditions studied. A, non-ovariectomized animals; B, unilaterally ovariectomized animals; C, bilaterally ovariectomized animals; D, bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy. A1 to D1, implantation of native NCM; A2 to D2, PCM48 membrane; A3 to D3, PCM96 membrane. Note the open bone defect (arrows) in animals receiving the native membrane (A1-D1), mainly in bilaterally ovariectomized animals (C1). The bone defect was reduced in animals receiving the PCM48 membrane (A2-D2), except for bilaterally ovariectomized animals (C2). Apparent macroscopic closure of the bone defect was observed in animals receiving the PCM96 membrane (A3-D3), except for ovariectomized animals (C3). NCM (collagen matrix native); PCM48 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 48 h); PCM96 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 96 h).

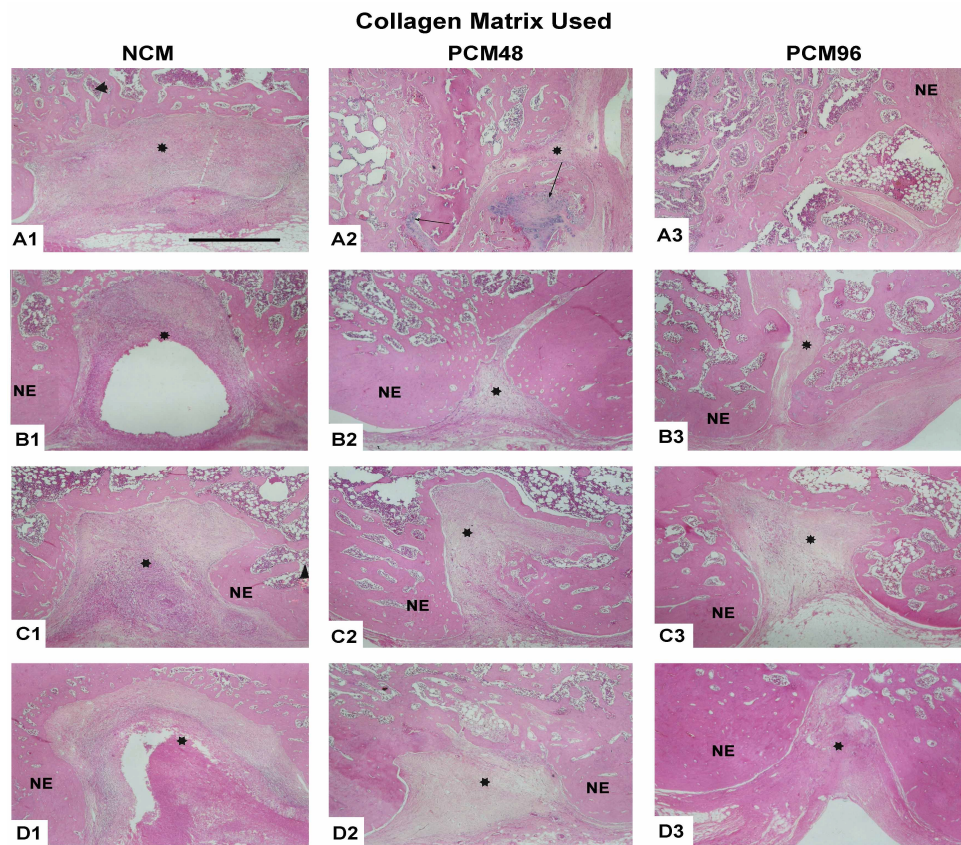


Figure 3. Histological analysis of animals receiving the different implants under the experimental conditions studied. A, non-ovariectomized animals; B, unilaterally ovariectomized animals; C, bilaterally ovariectomized animals; D, bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy. A1 to D1, implantation of NCM; A2 to D2, PCM48 membrane; A3 to D3, PCM96 membrane. Lack of closure of the bone defect and the presence of newly formed bone (NE) around the implant (*) were noted in animals receiving the NCM (A1-D1), with bone thickness being apparently lower in bilaterally ovariectomized animals (C1). In A1 and C1 we could observe a cavities with bone marrow (arrows). Note the formation of new bone (NE) from the margins of the bone defect in the direction of the implant (*) in animals receiving the PCM48 (A2-D2), which was more significant in non-ovariectomized (A2) and unilaterally ovariectomized (B2) animals. In A2 we could see region with cartilage formation (thin arrow). Results similar to those obtained for the A2-D2 group were observed for animals receiving the PCM96 (A3-D3). Scale bar = 40 μ m for all pictures. NCM (collagen matrix native); PCM48 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 48 h); PCM96 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 96 h).

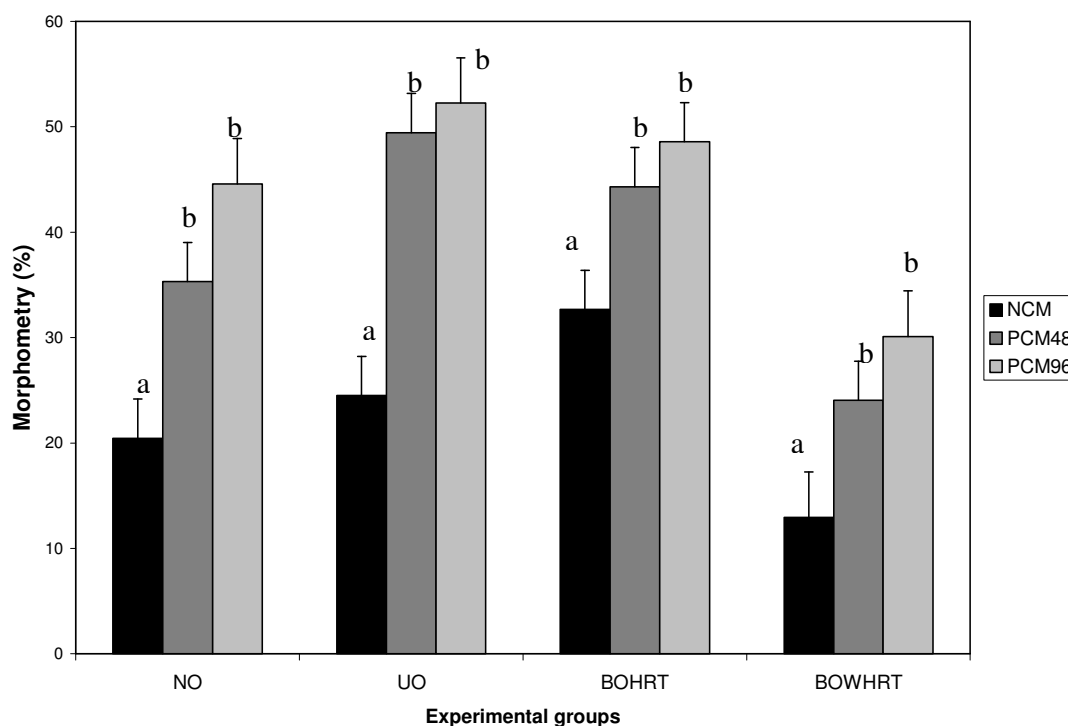


Figure 4. Average quantity of newly formed bone determined by morphometric analysis. A significant difference in the volume of newly formed bone was observed between animals receiving the native collagen matrix (NCM) and those receiving the polyanionic collagen membranes (PCM48 and PCM96), with the results obtained being significantly lower for the native matrix compared to the other membranes. On the other hand, no significant difference was observed between the PCM48 and PCM96 membranes. The same findings were obtained for all groups studied. Comparison of the groups studied showed a significantly lower volume of newly formed bone in the ovariectomized bilaterally group compared to the other groups (no ovariectomized, ovariectomized unilaterally and ovariectomized bilaterally with hormonal replacement). NCM (collagen matrix native); PCM48 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 48 h); PCM96 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 96 h); NO (non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

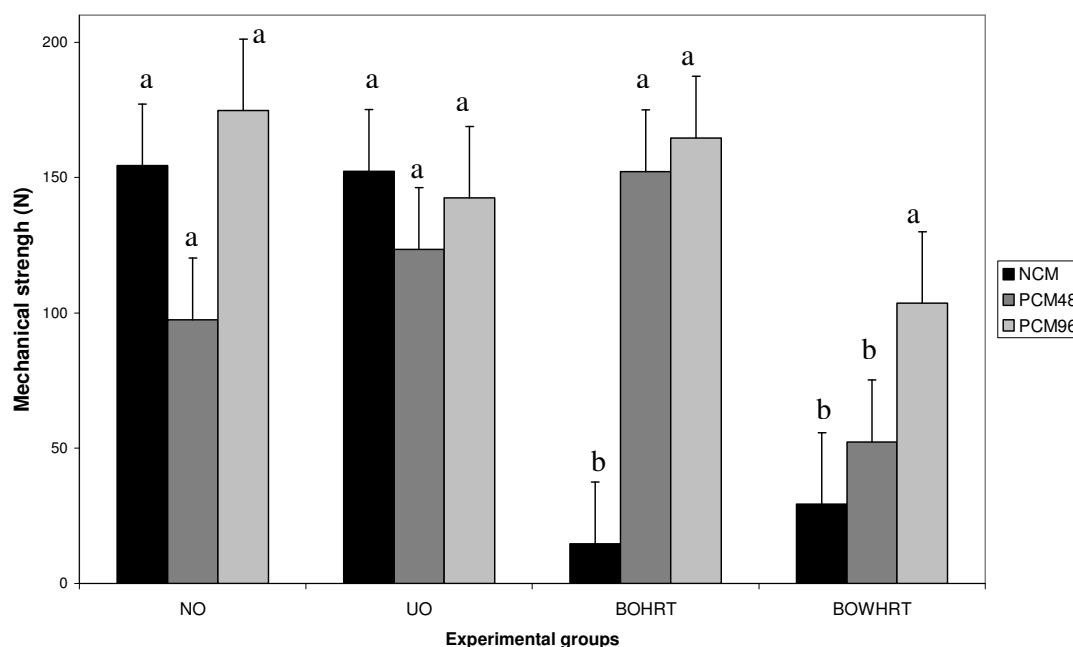


Figure 5. Average of mechanical power of newly formed bone. With respect to the native membrane, a significant difference was observed between all groups, except between the NO and UO groups and between the BOWHRT and BOHRT groups. The mechanical resistance of newly formed bone was considered to be the same for the PCM48 and PCM96. Regarding the BOWHRT and BOHRT groups, mechanical resistance was greater in the area receiving the 96 polyanionic membrane compared to the area implanted with the native membrane. NCM (collagen matrix native); PCM48 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 48 h); PCM96 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 96 h); NO (non-ovariectomized animals); UO(unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

Capítulo 3: **ARTIGO 2**

CHARACTERIZATION OF THE PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES
OF FEMORAL BONE DEFECTS FILLED WITH POLYANIONIC COLLAGEN
MEMBRANES IN OVARECTOMIZED RATS

Marcelo R. Cunha^{1,2}, Arnaldo R. Santos Jr^{2,3} PHD, Gilberto Goissis ⁴ PHD, Keico Okino Nonaka⁵ PHD, Charles Chenwei Wang, Leandro Petinari ^{1,2}, Selma C Genari^{1,2} PHD.

¹ Department of Cell Biology, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, SP;

² Institut of Biological Sciences, UNIPINHAL, Espírito Santo do Pinhal, SP;

³ Department of Applied Biology, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP

⁴ Department of Chemistry and Molecular Physics, Institute of Chemistry, USP, São Carlos, SP, Brazil

⁵ Department of Physiological Sciences, UFSCar, SP, Brazil.

Reprint requests to: Marcelo Rodrigues Cunha, Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas - UNICAMP, P.O. Box 6109, ZIP 13084-971 Campinas, SP, Brazil, Fax: +55-19-3788-6111, E-mail: cunharmr@hotmail.com

ABSTRACT

There has been recent interest in the development and improvement of biomaterials that can be used as replacement of bone tissue or that act as inducers of the healing process in the case of bone fractures or defects. Biomaterials consisting of extracellular matrix elements (aECM) composed of collagen/elastin have the advantage that their properties can be altered by introducing chemical modifications in the collagen that result in positively or negatively charged matrices. These modifications may improve the mechanical and physiological properties of aECM. The objective of the study was to evaluate the effect of aECM membranes consisting of native and polyanionic collagen on the healing process of osteoporotic bone fractures resulting from gonadal hormone changes induced by ovariectomy. Polyanionic membranes were obtained by alkaline hydrolysis of bovine pericardium for 48 and 96 h. Defects were created in the femoral condyle of ovariectomized rats submitted or not to hormone replacement therapy, and the physical and mechanical characteristics of the bone were analyzed. RESULTS: The percent mineral matter and bone mineral density of the femurs was minor in the ovariectomized rat. The mechanical resistance and newly formed bone was greater in the area receiving the 96 polyanionic membrane compared to the area implanted with the native membrane. CONCLUSIONS: In cases of osteoporosis due to hormone deficiency, the 96 polyanionic membrane is the best to be used for bone repair since it provides faster bone growth, as well as good mechanical resistance.

Key words: Polyanionic collagen, osteoporosis, bone healing, hormone deficiency, ovariectomy.

INTRODUCTION

The ovary is an endocrine gland that is responsible for the production of estrogen and progesterone. A decrease in estrogen secretion is observed in cases of early menopause, late menarche [31,37,39] and ovariectomy [42]. Deficiency in this hormone results in uncontrolled bone remodeling characterized by a decrease in osteoblastic activity and bone matrix and reduced deposition of calcium and phosphorus in bone. These alterations can damage the bone microarchitecture, predisposing to the occurrence of osteoporosis [13].

The association between osteoporosis and estrogen deficiency was first described by Albright in 1941 [2], and the current vast amount of information regarding this relationship confirms the importance of estrogen for bone homeostasis in both laboratory animals and humans [11,45].

One of the theories raised to explain the role of estrogens in the suppression of bone loss involves calcitonin. This theory suggests that estrogens act on bone in an indirect manner by stimulating the secretion of calcitonin by medullary thyroid cells, inhibiting osteoclastic activity and thus reducing bone resorption. The lack of estrogen would therefore exacerbate the state of calcitonin deficiency in women, permitting the parathormone to act without an opponent on bone resorption with a consequent reduction in bone mass. The continuous resorption leads to progressive erosion and perforation of trabecular bone, resulting in the manifestation of osteoporosis [14].

Shen *et al.* [42] demonstrated that a reduction in the concentration of estrogen in ovariectomized rats provoked a decrease in bone mineral density and biomechanical changes in the femur, two factors that are important for the prevention of pathological femoral fractures, the most feared event in osteoporosis. Pathological fractures are

generally treated surgically by placement of a total prosthesis or by fixation with pins/screws depending on the type and severity of the fractures [22]. However, biomaterial implants can be used as a complementary method in the treatment of these fractures to fill large bone defects or to treat unhealed fractures.

Among these biomaterials, polymeric membranes consisting of collagen are particularly interesting. Due to its biological characteristics such as biocompatibility, biodegradability, bioabsorbability, weak antigenicity and ability to act as a support for cell proliferation, collagen has become a good alternative as a bone substitute. The use of a collagen matrix also has the advantage that its properties can be altered by chemical modification of the collagen through alkaline hydrolysis, resulting in a positively or negatively charged matrix [20,38,41]. The main characteristic of increased negative charges is the improvement of the piezoelectric properties of collagen which are important for osteogenesis [10]. In addition, this treatment transforms the native collagen matrix into a porous structure and removes cells that could provoke an immunological rejection when used as implants [40].

Polyanionic matrices implanted into experimental animals did not cause any inflammatory response and presented a good degree of biocompatibility, indicating that these substrates may represent a viable alternative for bone implants [40,41]. However, studies have shown that the health status of bone is essential for its interaction with the biomaterials [3] and may alter the expected results. Based on this assumption, Pan et al. [35] investigated the influence of estrogen deficiency on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite implants in the tibia of ovariectomized rats and noted a decrease in both bone volume and implant-bone contact in the recipient area. These results obtained for rats with osteoporosis induced by gonadal hormone deficiency resulting from

ovariectomy may suggest that the prognosis is compromised in women with estrogen deficiency-induced osteoporosis who require some type of biomaterial implant in view of the pathological fractures to which they are predisposed [35].

In an in vivo implant situation, the bone tissue is not always of good quality due to problems of hemorrhage, low oxygenation, necrosis, cancer and osteoporosis, events that might compromise the bone-implant interaction. In view of this fact and of the advantages offered by artificial collagen matrices, the objective of the present study was to evaluate the mechanical resistance and physical properties of femoral defects filled with polyanionic collagen membranes in rats with ovariectomy-induced osteoporosis.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the artificial extracellular matrices (ECM)

The raw material used for the preparation of the three-dimensional collagen/elastin artificial ECM was bovine pericardium provided by Braile Biomédica S/A (São José do Rio Preto, SP, Brazil). The samples were prepared and provided by the Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, under the supervision of Prof. Dr. Gilberto Goissis. The following samples were obtained: untreated native three-dimensional collagen matrices (NCM), and polyanionic three-dimensional collagen matrices obtained by alkaline treatment of the collagen matrix for 48 and 96 h (PCM48 and PCM96, respectively).

Animals

Ninety-six adult female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 12 weeks, weight 300 gr, provided by the Multi-Institutional Animal House of the State University of Campinas, were used. The animals were divided into the following groups: group 1, non-ovariectomized animals (NO); group 2, unilaterally ovariectomized animals (UO); group 3, bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy (BOWHRT); group 4, bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy (BOHRT). Each group was divided into three subgroups which received the NCM, PCM48 and PCM96 membrane implants, respectively. Each subgroup consisted of eight animals.

Ovariectomy

The animals were weighed and anesthetized by intramuscular administration of ketamine (Francotar, Sespo Ind. e Com., Jacareí, SP, Brazil) and xylazine hydrochloride (2% Virbaxyl, Virbac Brasil Ind. e Com., São Paulo, SP, Brazil) at a proportion of 1:1 and a dose of 0.10 mg/100 g body weight. A 2-cm incision was made in the skin with a scalpel lateral to the spine to completely remove both ovaries from the pelvic cavity. The musculature and skin were repositioned and closed with No. 4.0 cotton suture

Hormone replacement therapy

Estradiol hexahydrobenzoate (Benzogynestryl, Hoechst Marion Roussel) was used. The drug was diluted in peanut oil (All Chemistry, São Paulo, SP, Brazil) and the animals were injected subcutaneously with 20 mg at a mean interval of 48 h from the time of membrane implantation to the day of sacrifice after 8 weeks.

Surgical procedure for the implantation of the native and polyanionic collagen matrices

The membranes were implanted 4 months after ovariectomy. After the animals were anesthetized as described above, an incision was made in the skin on the medial side of the thigh, exposing the femoral quadriceps muscle which was sectioned longitudinally in its distal third and separated anterolaterally. With the distal end of the diaphysis of the left femur exposed and the periosteum separated, a bone defect was created with a 5mm surgical bur coupled to the pen of a mini-motor. Next, the defect was filled with the collagen/elastin artificial (aECM). The periosteum, musculature and skin were repositioned and closed with N° 4.0 cotton suture. The animals were sacrificed 8 weeks after implantation and the femurs with the recipient area were

removed, photographed and submitted to mechanical testing and subsequent analysis of their physical properties.

Morphometric analysis

Using a square grid with 100 points coupled to the eyepiece of a light microscope, the volume density of newly formed bone at the site of the collagen implant was calculated for each recipient area. Newly formed bone was quantified by stereology according to the Delesse principle cited by Mandarin de Lacerda [29] using the following formula: $V_V = P_P/P_T$ (%), where V_V = volume density or relative volume, P_P = number of points over newly formed bone, and P_T = total number of points of the system.

Analysis of the biomechanical properties of the femur

After sacrifice of the animals, the left femurs were removed and kept in 0.9% saline at -20°C until the time of analysis.

The biomechanical parameters were obtained by compression testing in an Instron 4444 Universal testing machine. A load cell with a maximum capacity of 1 kN was used.

Before the test, the bones were thawed at room temperature and kept in saline until the time of the test. The bone was fixed to a support and force was applied perpendicularly to the longitudinal axis of the recipient area in the anteroposterior direction using a cylindric rod with a 3-mm roller fixed to its end. A pre-load of 5 N was initially used for accommodation. Next, the load was applied over the recipient area at a constant velocity of 2 mm/min until a 2-mm displacement of the support was

observed, and the data were recorded. The parameters were monitored and recorded by the equipment's own software. On the basis of these data, force-deformation curves were constructed for the different tests and the biomechanical parameters were determined using the Matlab 6.5 software (high-performance software for numerical computation and graphic visualization).

Analysis of the physical properties of the femur

After the mechanical test, the femurs were kept in a desiccator for 24 h to remove air from the osseous pores, and the immersed weight (IW, weight of bone immersed in distilled water (Archimedes Principle) and wet weight (WW, wet weight of bone after 24 h in a desiccator) were then calculated. After this procedure, the bones were dehydrated in an oven at 100°C for 24 h and the dry weight (DW, weight of dehydrated bone after 24 h at 100°C) was calculated. For the determination of mineral composition, the bones were placed in a muffle furnace at 800°C for 24 h and the mineral weight (MW) was determined. All measurements were done with an electronic scale.

Bone and mineral densities of the studied bones were obtained by calculation of the bone volume according to the Archimedes Principle. The bone percentages of water and mineral matter were also calculated using the following formulas [30]:

$$\text{bone volume} = \text{WW} - \text{IW} \text{ (cm}^3\text{)}/\text{water density};$$

$$\text{bone density} = \text{WW}/\text{bone volume (g/cm}^3\text{)};$$

$$\text{bone mineral density} = \text{MW}/\text{bone volume (g/cm}^3\text{)};$$

$$\text{bone percentage of mineral matter} = \text{MW}/\text{WW} \text{ (\%)}.$$

On the basis of the results of the biomechanical compression test and bone mineral density, bone quality was calculated using the following formula:

$$S = F_{\max} / BMD$$

Where S = maximum normalized force (bone quality) $[N/(mg/mm^3)]$, $F_{\max}$ = maximum load applied to the recipient area until the occurrence of a displacement of 2 mm of the support $[N]$ and BMD = bone mineral density (mg/mm^3) .

Statistical analysis

Linear models were fitted to each of the response variables, with the response being the variable analyzed and the factors the group to which the animals belonged (NO, UO, BOWHRT and BOHRT) and the type of implant (NCM, PCM48 and PCM96). The model was also fitted considering the interaction between group and type of implant. Significance tests were applied to determine the effect of each factor on the response variable. In cases in which a significant difference of the factors was detected, statistical tests were applied to determine which differences were distinct from the remaining ones. To guarantee the level of significance in cases of multiple comparisons of the means, the levels of significance ($p < 0.05$) were adjusted using the Tukey-Kramer test [26]. The data were analyzed with the SAS system, version 9.1.3.

RESULTS

Macroscopic and Quantitative Analysis

Macroscopic analysis showed a tendency toward rapid closure of the bone defect in non-ovariectomized animals, mainly those receiving the membrane treated for 96 h (Figure 1).

With respect to the quantity of newly formed bone in the implant area, lower bone formation was observed in the BOWHRT group, irrespective of the type of membrane used. No significant difference in the morphometric data was observed between the NO, UO and BOHRT groups. In addition, the volume of formed bone was lower in areas receiving the NCM than in those treated with the polyanionic membranes (Figure 2).

Biomechanical Properties

Figure 3 shows the mean maximum strength as a function of the type of implant (NCM, PCM48, and PCM96) and group (NO, UO, BOHRT, and BOWHRT). Analysis of this variable showed a highly significant group/implant interaction ($p < 0.05$). With respect to the native membrane, a significant difference was observed between all groups, except between the NO and UO groups and between the BOWHRT and BOHRT groups. No significant differences were observed between groups for the PCM48 or PCM96.

Comparison of the three membranes in each group showed no difference between the native and polyanionic membranes in the NO or UO group. Regarding the BOWHRT and BOHRT groups, mechanical resistance was greater in the area receiving

the 96 polyanionic membrane compared to the area implanted with the native membrane.

Physical Properties

A difference in bone volume was only observed when comparing the NO group with the other groups (UO, BOWHRT and BOHRT). Comparison of the membranes used showed a difference between the NCM and PCM48 membranes (Table 1).

The percent mineral matter (Figure 4) and bone mineral density (figure 5) of the femurs differed between the ovariectomized and non-ovariectomized groups, being minor in the BOWHRT.

For mean bone density, differences were observed between the ovariectomized and non-ovariectomized groups, while similar values were obtained for the different membranes (Figure 6).The bone quality (Figure 7) of the femurs differed between the ovariectomized and non-ovariectomized groups.

With respect to wet weight, dry weight and immersed weight, similar values were obtained when comparing the BOWHRT and NO groups. These results could be found in Table 1.

DISCUSSION

In view of the limitations of autogenous and allogeneous bone grafts, some biocompatible materials have been investigated to replace these grafts in clinical applications, such as metal, ceramic, silicone, polymethylmethacrylate, and polyethylene implants [6]. However, the cytotoxic effects of some of these biomaterials contraindicate their use [48], in addition to the difficulty of the material in molding the contour of the bone defect, low mechanical resistance in cases of porous ceramics, a delay in incorporation into the bone, and corrosion and formation of cartilaginous and fibrous capsules in cases of metal implants. Therefore, some polymers have been studied alone or in combination with other materials in order to replace or improve the quality of these biomaterials.

In addition to their biocompatibility, natural polymers such as collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and elastin participate in the control of tissue structure and in the regulation of the cellular phenotype by simulating ECM. Tissue ECM consists of a network of organized macromolecules including numerous proteins and polysaccharides that fill the interstitial space of cells. These macromolecules aggregate in a fibrillar region consisting of collagen and/or elastic system fibrils and in a non-fibrillar region where glycosaminoglycans and glycoproteins are observed which promote the interaction of different MEC components with cells of different tissues. These components are responsible for the mechanical and physiological properties of the ECM [1]. Thus, artificial ECM may simulate the interstitial space of live tissues, permitting cell adhesion and serving as a support for the growth of new tissue [28] and as a guide for the development and differentiation of new cell types [24]. In view of these characteristics, collagen was chosen as the material to be tested in the present

study in order to improve the process of bone neoformation and the mechanical quality of the graft recipient area.

Functionally, the most important mechanical properties of bone are its strength and rigidity. These and other biometric features are best evaluated by analysis of their behavior under loads, i.e., under the influence of externally applied forces [33]. This fact becomes important when evaluating the quality of bone and of the synthetic graft material for use in cases of pathological fractures which are the most common complications of hormone deficiency-induced osteoporosis.

Several studies have reported the deleterious effects of ovariectomy on bone properties such as a reduction in the resistance to external mechanical forces [7,9,12,17,18,32,34,36,44].

According to Ikeda *et al.* [19], hypoenestrogenemia increases bone resorption and reduces trabecular bone mass, thus affecting the biomechanical strength of bone tissue. The strength of bone depends on bone structure, both in terms of global geometry of the bone and the microscopic pattern of the trabecular network. Modifications in the trabecular organization, include perforations, loss of connectivity and microfractures [5]. Compared to normal bone, osteoporotic bone shows a reduction in the number of trabeculae, thinning of the trabeculae, and loss of connectivity of the trabeculae. The overall result is deterioration of bone strength and an increase in the susceptibility to fracture [15]. However, the authors cited above did not use any type of implant. On the other hand, Ozawa *et al.* [34] placed titanium implants into bone defects created in the femur of ovariectomized rats. Biomechanical tests performed 2 weeks later showed that the mechanical resistance of the recipient area in ovariectomized rats was only half the value found in non-ovariectomized animals. However, this difference was not observed

between animals sacrificed 4 weeks after implantation. Similar results were obtained in the present study, although we used another type of implant and the animals were analyzed 8 weeks after implantation. We found no difference in mechanical resistance between the groups receiving the polyanionic membranes despite a higher concentration of newly formed bone in non-ovariectomized animals. The rapid loss of metaphyseal trabecular bone due to the effects of ovariectomy on the imbalance between bone resorption and formation may have had a negative influence on the mechanical quality of the recipient area in polyanionic membranes, since the implant was placed at the distal end of the femur where the concentration of trabecular bone is higher. Besides the time of the implant also may not have been sufficient for the organization of the trabeculae bone in the area receiver.

The mechanical resistance of the areas implanted with the native membrane was higher in intact animals compared to ovariectomized rats not submitted to hormone replacement therapy. However, an increase in bone strength and rigidity does not necessarily indicate improvement in the biomechanical properties of bone tissue [23].

In the present study, during the mechanical tests the load was always applied to the periphery of the bone defect where new bone started to form. This fact might explain the contradictory and unexpected data in terms of mechanical resistance of the implanted area obtained for the different types of membranes and for ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy. In addition, the time of implantation may not have been sufficient for the newly formed bone to develop its mechanical characteristics in the area receiving the polyanionic membranes.

Trabecular architecture is considered important in osteoporosis and has been quantified by variety of mean parameters characteristic of a whole specimen. Variations

within a specimen, however, have been mostly ignored. Further, the age, disease or drug treatments increase trabecular thickness variation, this may be detrimental to mechanical properties [46].

Comparison of the membranes in each group showed no difference for the NO and UO groups, whereas a difference was observed for the BOHRT and BOWHRT groups, with the area receiving the 96 polyanionic membrane presenting greater resistance than the area implanted with the native membrane. This finding suggests that the porosity of the polyanionic membranes might have favored the mineralization process and the arrangement of trabecular bone since, according to IKEDA *et al.* [19], mechanical strength depends on the presence of trabecular bone.

According to Lepola *et al.* [27], bone mineral content is one of the determinants of bone biomechanical strength and, according to Westerlind *et al.* [49], ovariectomy causes a loss of bone mineral content especially in trabecular areas. Katsumata *et al.* [23] e Shen *et al.* [42] observed a decrease of bone mineral content and density in the femur of ovariectomized rats compared to the intact group, but there was no difference between groups in terms of resistance to fracture and rigidity. Wang *et al.* [47] evaluate the influence of osteoporosis on the middle and late periods of tibia fracture healing process through observing the histomorphological changes, bone mineral density and biomechanical properties in ovariectomized rats. In theirs results, bone mineral density and callus failure stress was lower in ovariectomized group compared with the sham operation group. In the present study, we observed a decrease in bone mineral density and percent mineral matter in ovariectomized rats not submitted to hormone replacement therapy, but there was no difference in the mechanical resistance of the area receiving the polyanionic membranes between these groups.

Ovariectomized animals are frequently used as models in the study of postmenopausal osteoporosis; however, some discrepancies exist in the literature regarding bone-implant interaction when biomaterials such as titanium and ceramics are used. For example, some studies reported significant bone loss around these biomaterials, whereas others found no difference in bone growth in the recipient areas in ovariectomized animals. This divergence might be due to the difficulty in standardizing methods for the correct quantification of bone formed above the implant [34]. Furthermore, there are no studies analyzing how collagen biomaterials behave in terms of the quantity and mechanical resistance of the newly formed bone when introduced into bone defects created in ovariectomized rats. We therefore conducted the present study based on the need to standardize bone growth on these collagen membranes which are currently showing good results in terms of the volume of newly formed bone and mechanical strength when implanted into non-ovariectomized animals.

Analysis of some physical properties of the femurs revealed a significant difference between intact animals and ovariectomized rats not submitted to hormone replacement therapy. Similar results have been reported by Hietala [15], Kalu [21] and Nordsletten *et al.* [32] who noted a reduction in femoral bone density and volume in ovariectomized rats. However, in the present experiment bone volume was higher in ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy, although the wet weight, a variable used to calculate bone volume and density, was similar among groups. These controversial data regarding an unchanged wet weight have also been reported in other studies [25,32,36]. Although different methods have been used in these studies and in the present investigation, the differences might be attributed to peculiarities of bone tissue and of the age of each animal. Barengolts *et al.* [4] observed

reduced ash and calcium concentrations in elderly rats after ovariectomy. Furthermore, we observed similar wet and immersed weights in animals of the ovariectomized and non-ovariectomized groups, in agreement with the results of Driusso [8].

In the present experiment, macroscopic and quantitative analysis showed that the sites of implantation of the PCM treated for 48 and 96 h in alkaline medium (PCM48 and PCM96) presented the best interaction and capacity of bone neoformation compared to areas implanted with the native collagen membrane. This finding suggests that the greater the porosity of the material, the higher its capacity to permit cell migration. Similar results have been reported by Rocha *et al.* [40] and Rosa *et al.* [41] who implanted PCM treated for 24, 36 and 48 h in alkaline medium into the tibia of rats intact and observed bone neoformation in all cases, especially when the 48 h-treated membrane was used. In addition, we observed better resistance in areas implanted with the 96 polyanionic membranes in ovariectomized cases.

These data suggest that polyanionic membranes are a promising biomaterial for the regeneration of bone defects due to their qualities such as biocompatibility, osteoconductivity and good mechanical resistance. In cases of osteoporosis due to hormone deficiency, the 96 polyanionic membrane is the best to be used for bone repair since it provides faster bone growth, as well as good mechanical resistance.

REFERENCES

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Cell junction, cell adhesion and the extracellular matrix. In: *Molecular Biology of the Cell*. Pp. 1065-1127. Garland Science: New York.
2. Albright F (1941) Postmenopausal osteoporosis. *JAMA*. **116**, 2465-74.
3. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J (1981) Osseointegrated titanium implants. *Acta Orthop. Scand*. **52**, 155-70.
4. Barengolts EI, Gajardo HF, Rosol TJ, Danza JJ, Pena M, Botsis J, Kukkeja SC (1990) Effects of progesterone on postovariectomy bone loss in aged rats. *J. Bone Miner Res*. **5**(11), 1143 – 47.
5. Benhamou CL, Lespessailles E, Royant V (1996) Bone structure and mechanical resistance of the bone tissue. *Presse Med*. **25**(6), 249-54.
6. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Jamesryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT (1998) Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured peristeal cell. *Plastic and Reconstructive Surgery*. **101**(3), 567- 81.
7. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B (1992) Cortical bone mass, composition, mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int*. **52**, 26-33.
8. Driusso P (2003) Efeitos da prolactina sobre a massa óssea de ratas ovariectomizadas. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 75 p.

9. Fonseca D, Ward WE (2004) Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. *Bone*. **35**(2), 489-97.
10. Fukada E (1988) Piezoelectricity of natural biomaterials. In: *Medical Applications of Piezoelectric Polymers*. pp.1-26. Gordon and Breach: New York.
11. Gennari L, Merlotti D, Martini G, Gonnelli S, Franci B, Campagna S, Lucani B, Dal Canto N, Valenti R, Gennari C, Nuti R (2003) Longitudinal association between sex hormone levels, bone loss, and bone turnover in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. **88**(11), 5327-33.
12. Giavaresi G, Borsari V, Fini M, Martini L, Tschon M, De Terlizzi F, Nicolini A, Carpi A, Giardino R (2004) Different diagnostic techniques for the assessment of cortical bone on osteoporotic animals. *Biomed Pharmacother*. **58**(9), 494-99.
13. Gyton AC, Hall JE (2002) Fisiologia Feminina Antes da Gravidez e Hormônios Femininos. In: *Tratado de Fisiologia Médica*. (Guanabara Koogan, ed.) pp. 867 – 882. W.B. Saunders Company: Philadelphia.
14. Halbe HW (2000) Osteoporose. In: *Tratado de Ginecologia*. (Roca, ed.). pp. 1259-1273. São Paulo.
15. Hawker GA (1996) The epidemiology of osteoporosis. *J Rheumatol Suppl*. **45**, 2-5.
16. Hietala EL (1993) The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. *Bone Miner*. **20**, 57-65.
17. Hodgkinson A (1979) Effects of calcium deprivation and archidectomy on bone composition in the rat. *Horm Metab. Res*. **11**, 516-519.

18. Hu YY, Xia WB, Liu HC, Meng XW, Zhou XY, Xing XP (2003) Changes of urinary deoxypyridinoline crosslink/creatinine in rats after ovariectomy and anti-osteoporotic intervention. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* **25**(3), 271-74.
19. Ikeda S, Tsurukami H, Ito M, Sakai A, Sakata T, Nishida S, Takeda S, Shiraishi A, Nakamura T (2001) Effects of trabecular bone contour on ultimate strenght of lumbar vértebra after bilateral ovariectomy in rats. *Bone.* **28**(6), 625-633.
20. Jayakrishnam A, Jamela SR (1996) Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthese and drug delivery matrices. *Biomaterials.* **17**, 471-84.
21. Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* **15**, 171-92.
22. Kanis JA (1996) Consequences of osteoporosis. In: *Textbook of Osteoporosis* (Kanis JA, ed.). pp. 200-225. Blackwell: London.
23. Katsumata T, Nakamura T, Ohnishi H, Sakurama T (1995) Intermittent cyclical etidronate treatment maintains the mass, structure and the mechanical property of bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* **10**(6), 921-31.
24. Kim BS, Mooney DJ (1998) Development of biocompatible syntetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **16**, 224-29.
25. Kiebzak GM (1988) Bone status of senescent female rats: chemical, morphometric and biomechanical analysis. *Journal of Bone and Mineral Research.* **3**, 439-46.
26. Krammer CY (1956) Extension of multiple range tests to groups means with unequal number of replication. *Biometric.* **12**, 307-10.

27. Lepola VT, Hannuniemi R, Kippo K, Lauren L, Jalovaara P, Vaananen HK (1996) Long term effects of clodronate on growing rat bone. *Bone*. **18**(2), 191-96.
28. Ma PX, Zhang, R (1999) Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*. **46**, 60-72.
29. Mandarim de Lacerda CA (1999) Whats is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The exemple of the stereology. *Braz. J. Morphol Sci*. **16**(2), 131-39.
30. Martin RB (1990) Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. *J. Bone Miner Metab*. **21**, 91-97.
31. May H, Murphy S, Khaw KT (1995) Bone mineral density and its relationship to skin color in Caucasian females. *Eur. J. Clin. Invest*. **25**, 85- 89.
32. Nordsletten L, Kaastad TS, Madsen JE, Reikeras O, Ovstebo R, Stromme JH, Falch J (1994) The development of femoral osteopenic in ovariectomized rats in no reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. *Calcif Tissue int*. **55**, 436-43.
33. Nordin M, Frankel VH (2003) *Biomecânica do Osso*. In: *Biomecânica Básica do Sistema Musculoesquelético*. (Guanabara Koogan, ed.). pp. 22-49. Rio de Janeiro.
34. Ozawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura RD, Nishimura I (2002) Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone*. **30**(1), 137-43.

35. Pan J, Shirota T, Ohno K, Michi K (2000) Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J. Oral Maxillofac Surg.* **58**(8), 877-82.
36. Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jamsa T, Vaananen HK (1994) The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone.* **15**, 523-32.
37. Rasgon N, Shelton S, Halbreich U (2005) Perimenopausal mental disorders: epidemiology and phenomenology. *CNS Spectr.* **10**(6), 471-78.
38. Reid GG, Gorham SD, Lackie JM (1993) The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. *J. Mat. Sci. Mater Med.* **4**, 201-09.
39. Rehman HU, Masson EA (2005) Neuroendocrinology of female aging. *Gend Med.* **2**(1), 41-56.
40. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA (2002) Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials.* **23**, 449-56.
41. Rosa FP, Lia RCC, Souza KOF, Goissis G, Marcantonio Jr E (2003) Tissue response to polyanionic collagen:elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials.* **24**, 207-12.
42. Shen V, Birchman R, Wu DD, Lindsay R (2000) Skeletal effects of parathyroid hormone infusion in ovariectomized rats with or without estrogen repletion. *J Bone Miner Res.* **15**(4), 740-46.
43. Singh MP, Stefko J, Lumpkin JA, Rosenblatt J (1995) The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharm. Res.* **12**, 1205-10.

44. Sogaard LH, Mosekilde LI, Thomsen JS, Richards A, Mcosker JE (1997) A comparison of the effects of two anabolic agents on ash density and bone strength assessed in osteopenic rat model. *Bone*. **20**, 439-49.
45. Szejnfeld VL (2000) Terapia de Reposição Hormonal e Análogos. In: *Osteoporose. Diagnóstico e Tratamento*. (Sarvier, ed.). pp. 337-352. São Paulo.
46. Yeh OC, Keaveny TM (1999) Biomechanical effects of intraspecimen variations in trabecular architecture: a three-dimensional finite element study. *Bone*. **25**(2), 223-8.
47. Wang JW, Li W, Xu SW, Yang DS, Wang Y, Lin M, Zhao GF (2005) Osteoporosis influences the middle and late periods of trabeculae healing in a rat osteoporotic model. *Clin. J. Traumatol*. **8**(2), 111-6.
48. Weiss RE, Reddy AH (1981) Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow. *J Cell Biol*. **88**, 630-36.
49. Westerlind KC, Wronski TJ, Ritman EL, Luo ZP, An KN, Bell NH, Turner RT (1999) Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. *Physiology*. **94**, 4199-04.

Table 1 – Physical parameters of bone that received collagen implants.

Animal group	Conditional experiment analyzed											
	Wet weight			Dry weight			Immersed weight			Bone volume		
	NCM	PCM48	PCM96	NCM	PCM48	PCM96	NCM	PCM48	PCM96	NCM	PCM48	PCM96
Non-ovariectomized	0.8328±	0.8257±	0.9214±	0.5365	0.5024±	0.5768±	0.3115±	0.2894±	0.3370±	0.5213±	0.5363±	0.5844±
	0.05104	0.05104	0.05894	0.03026	0.03026	0.03494	0.01757	0.01757	0.02029	0.03554	0.03554	0.04104
Unilaterally ovariectomized	1.1396±	0.9331±	0.9343±	0.6870	0.5741±	0.5805±	0.3115±	0.3320±	0.3352±	0.7435±	0.6012±	0.5991±
	0.05104	0.05104	0.05894	0.03026	0.03026	0.03494	0.01757	0.01757	0.02029	0.03554	0.03554	0.04104
Bilaterally ovariectomized	0.9652±	0.9213±	1.0158±	0.5483	0.5465±	0.5969±	0.3023±	0.3011±	0.3310±	0.6630±	0.6201±	0.6848±
	0.05104	0.05104	0.05104	0.03026	0.03026	0.03026	0.01757	0.01757	0.01757	0.03554	0.03554	0.03554
Bilaterally ovariectomized with hormone	1.0767±	0.9447±	1.0792±	0.6465	0.5758±	0.6876±	0.3668±	0.3276±	0.3858±	0.7099±	0.6171±	0.6934±
	0.05894	0.05104	0.05894	0.03494	0.03026	0.03494	0.02029	0.01757	0.02029	0.04104	0.03554	0.04104

Mean bone volume. Note the difference between the NO group and the other groups (UO, BOHRT and BOWHRT). Mean wet weight. Similar values were observed when comparing the BOHRT and the NO group. Mean dry weight. Similar values were observed when comparing the BOWHRT group and the NO group. Mean immersed weight. Similar values were observed when comparing the BO , BOHRT and the NO group. BO (ovariectomized bilaterally); NO (non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy).

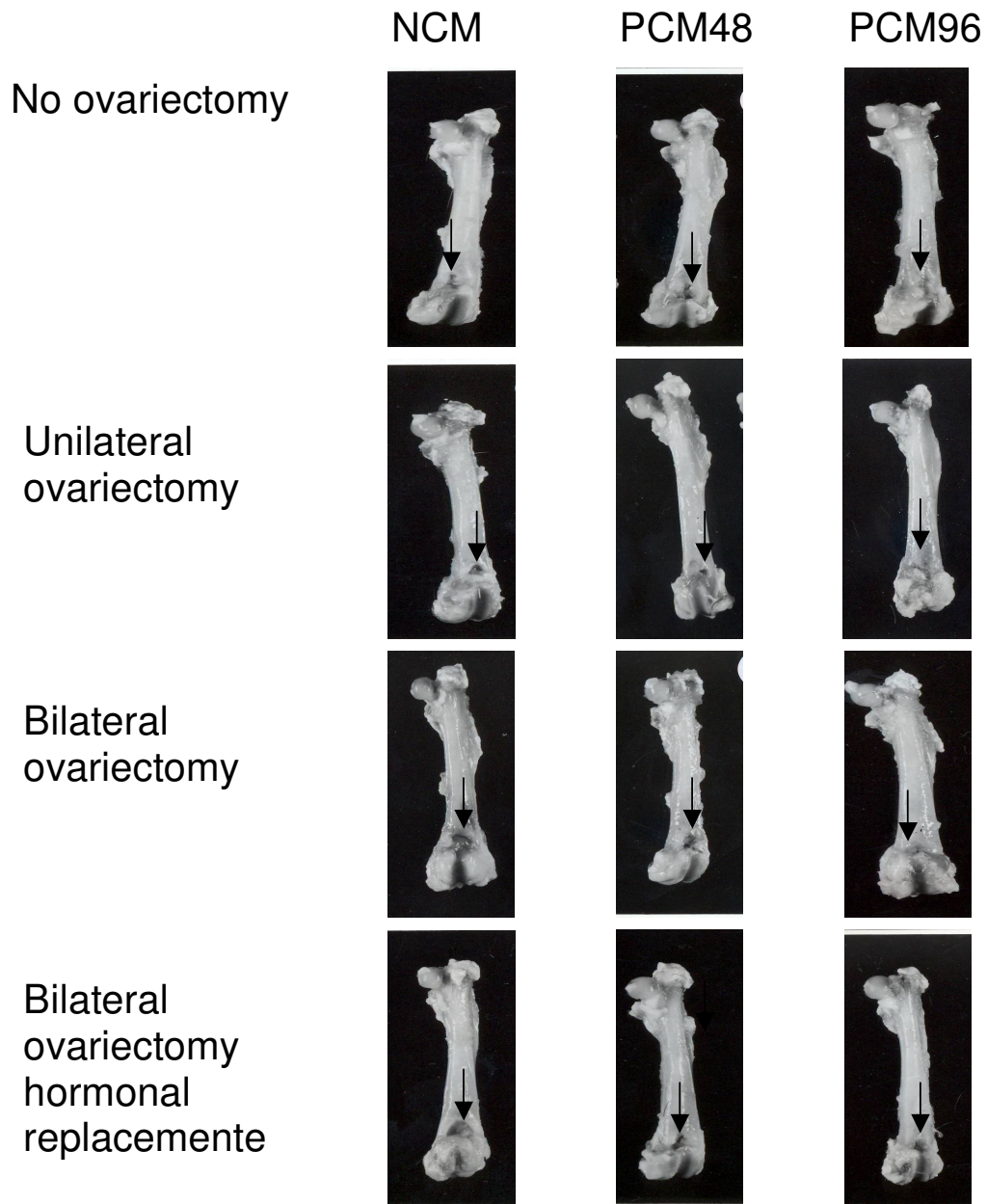


Figure 1. Macroscopic analysis of the implant recipient areas. Better closure of the bone defect was noted in animals receiving the PCM96 as graft. NCM (collagen matrix native); PCM48 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 48 h); PCM96 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 96h). A: no ovariectomy; B: unilateral ovariectomy; C: bilateraly ovariectomy; D: bilateraly ovariectomy hormonal replacemente.

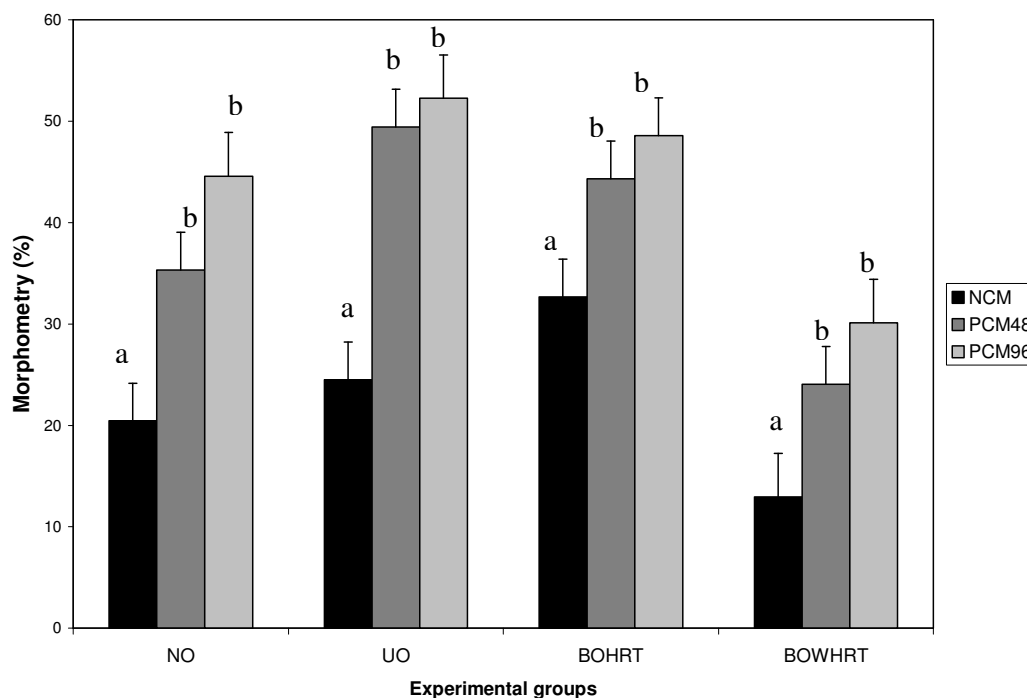


Figure 2. Average quantity of newly formed bone determined by morphometric analysis. The quantity of newly formed bone was significantly lower in animals receiving the NCM membrane compared to those implanted with the other collagen membranes. The amount of newly formed bone was considered to be the same for the PCM48 and PCM96. NCM (collagen matrix native); PCM48 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 48 h); PCM96 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 96 h); NO (non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

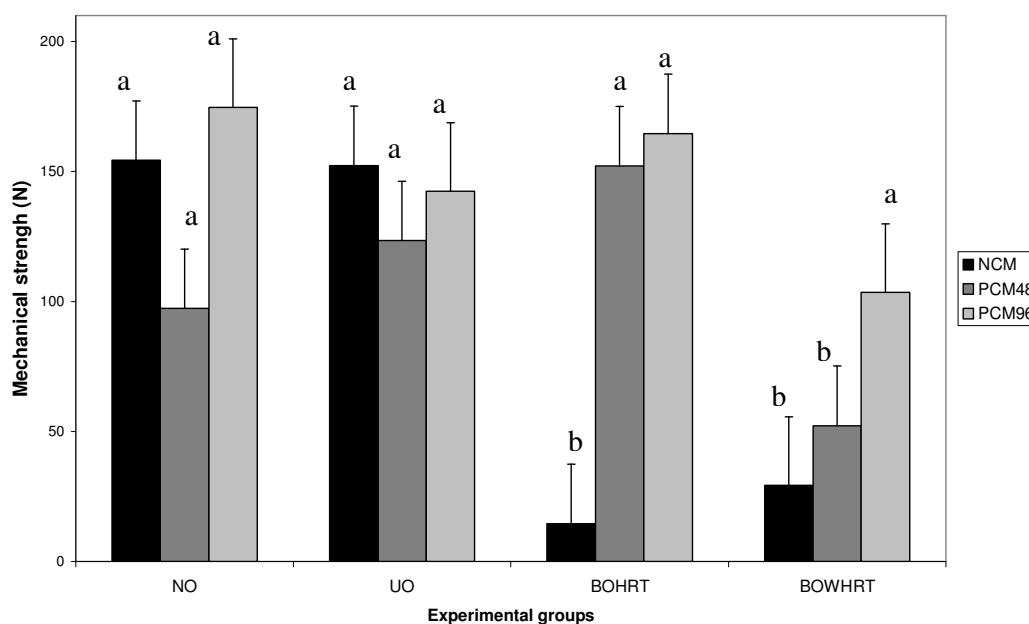


Figure 3. Average mechanical resistance of newly formed bone. With respect to the native membrane, a significant difference was observed between all groups, except between the NO and UO groups and between the BOWHRT and BOHRT groups. The mechanical resistance of newly formed bone was considered to be the same for the PCM48 and PCM96. Regarding the BOWHRT and BOHRT groups, mechanical resistance was greater in the area receiving the 96 polyanionic membrane compared to the area implanted with the native membrane. NCM (collagen matrix native); PCM48 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 48 h); PCM96 (polyanionic collagen matrix submitted to alkaline treatment for 96 h); NO(non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

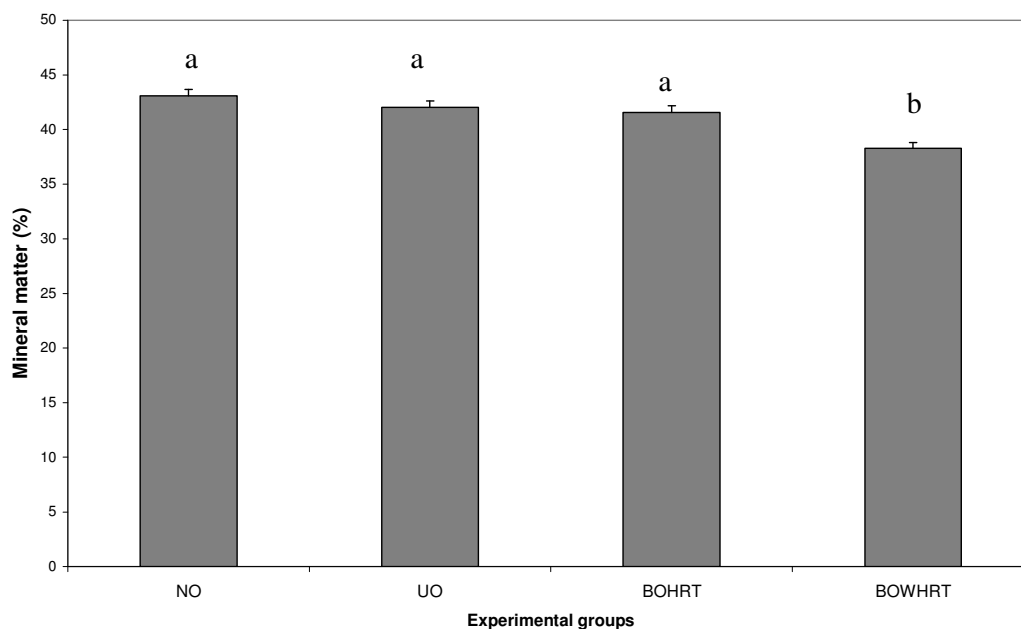


Figure 4. Mean percent mineral matter. Differences were observed between the ovariectomized and non-ovariectomized groups. The value for the group BOWHRT was minor compared with the others groups. Similar values were obtained for the different membranes. NO (non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

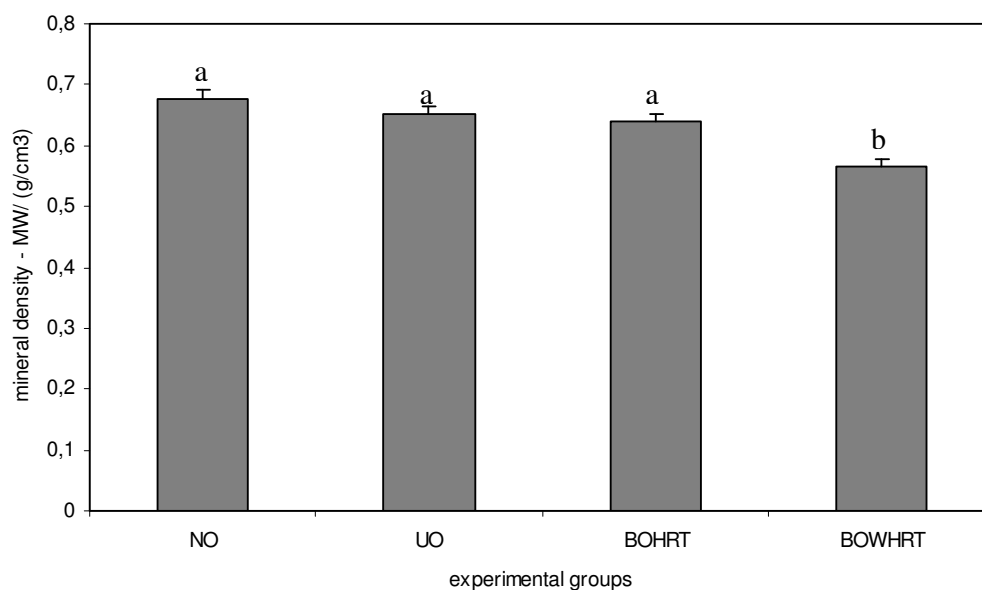


Figure 5: Mean mineral density. Differences were observed between the ovariectomized and non-ovariectomized groups. The value for the group BOWHRT was minor compared with the others groups. NO (non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

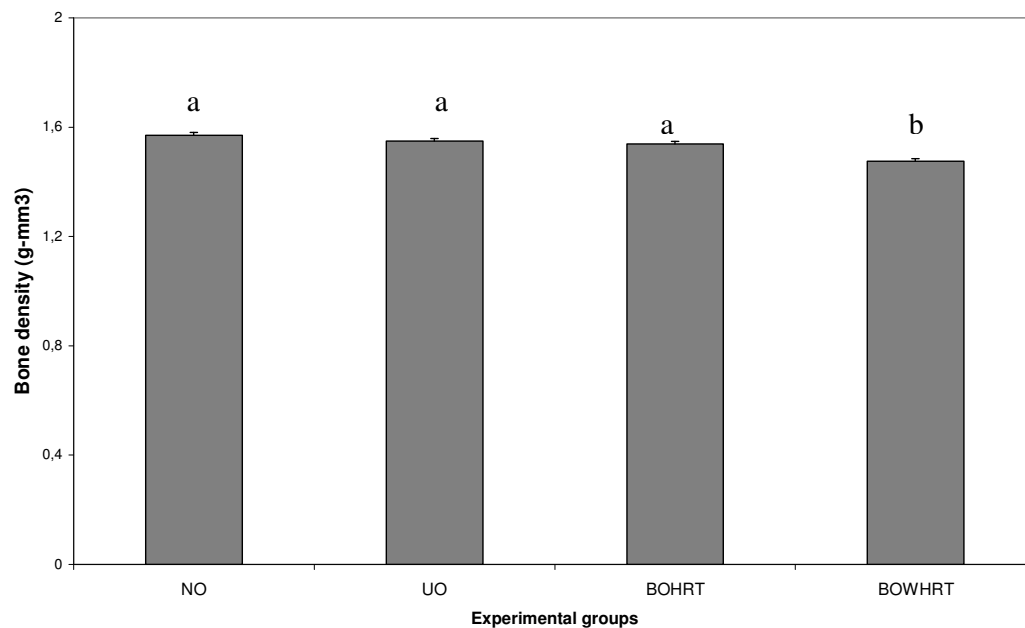


Figure 6. Mean bone density. Differences were observed between the ovariectomized and non-ovariectomized groups. The value for the group BOWHRT was minor compared with the others groups. Similar values were obtained for the different membranes. NO (non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

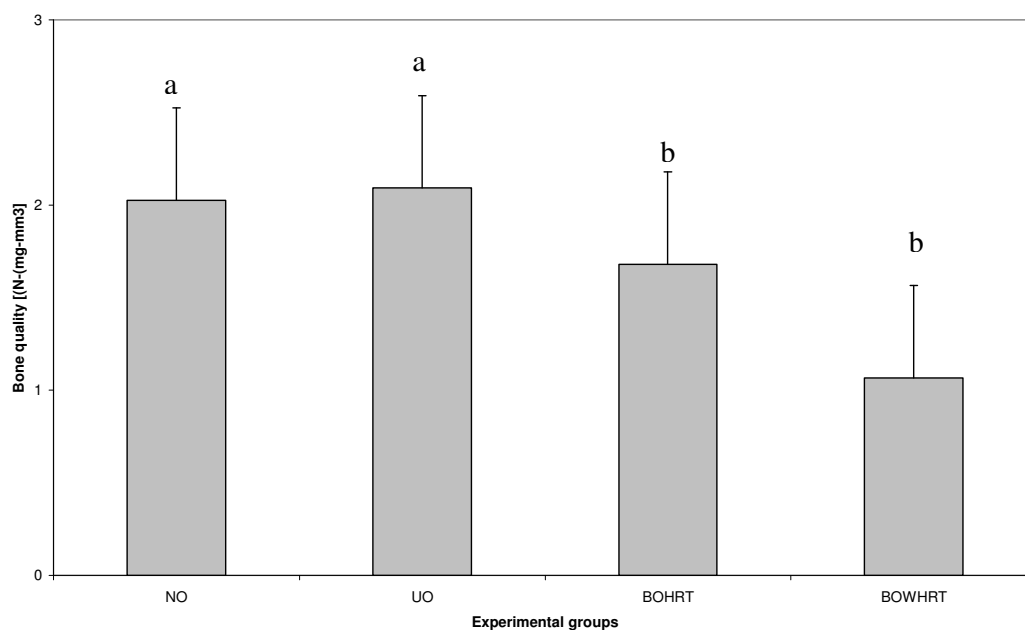


Figure 7. Average bone quality. Differences were observed between the ovariectomized and non-ovariectomized groups, while similar values were obtained for the different membranes. Medium similar occurred between NO and OU and between BOHRT and BOWHRT. The others comparisons were different. NO (non-ovariectomized animals); UO (unilaterally ovariectomized animals); BOWHRT (bilaterally ovariectomized animals not submitted to hormone replacement therapy); BOHRT (bilaterally ovariectomized animals submitted to hormone replacement therapy). Different letters indicate significantly different means.

Capítulo 4: **CONCLUSÕES da TESE**

1 – Houve formação óssea nos locais das falhas ósseas dos grupos não ovariectomizado (NO), ovariectomizado unilateralmente (OU) e ovariectomizado bilateralmente com reposição hormonal (BOHRT), principalmente nos animais que receberam membranas de colágeno polianiónico (PCM48 e PCM96). Os biomateriais PCM48 e PCM96 apresentaram melhor capacidade de neoformação óssea em relação às áreas implantadas com colágeno nativo (NCM).

2 – A neoformação óssea pode ser esperada junto a membrana de colágeno mesmo quando implantada em animais ovariectomizados, no entanto, em menor volume.

3- Nos casos de osteoporose por deficiência hormonal, a melhor membrana a ser utilizada em um reparo ósseo é a PCM96, pois proporciona maior crescimento ósseo e de boa qualidade mecânica nas áreas receptoras.

4- O colágeno polianiónico constitui um promissor biomaterial na regeneração dos defeitos ósseos por causa da sua biocompatibilidade e osteocondutividade, mesmo em situações onde o osso receptor apresenta parâmetros de osteoporose.

Capítulo 5: REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

Alberts B, Bray D, Lewis S, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the cell, 3ed. Garland Publising, New York-London, 1994.

Alberts B. Biologia molecular da célula. Porto Alegre : Artmed, 2002.

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson Ha, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Acta Orthop. Scand, 1981; 52: 155-70.

Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. J. Am. Med. Assoc. 1940; 116: 2465-74.

Bagi CM, DeLeon E, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Histo-anatomy of the proximal femur in rats: impact of ovariectomy on bone mass, structure, and stiffness. Anat Rec 1996; 245(4):633-44.

Bechman MJ, Shields KJ, Diegelmann RF. Collagen. In: Wnek GE, Bowlin GL, editors, Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering 2004: 324-34.

Bernales DM, Caride F, Lewis A, Martin L. Membranas de colágeno polimerizado: Consideraciones su uso em técnicas de regeneracion tisular y osea guiadas. Cubana Invest Biomed. 2004; 23 (2): 65-74.

Bet MR, Goissis G, Lacerda CA. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. *Biomacromolecules* 2001; 2: 1074-79.

Bet M, Goissis G, Vargas S, Selistre-de-Araujo H. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. Biomaterials 2003; 24: 131-137.

Braidman IP, Davenport LK, Carter DH, Selby PL, Mawer EB, Freemont AJ. Preliminary in situ identification of estrogen target cells in bone. *J. Bone Miner. Res.* 1995; 10: 74-80.

Brown MD, Mailinin TI, David PB. A roentgenographic evaluation of frozen allografts versus autografts in anterior cervical spine fusions. *Clin. Orthop.* 1976; 119: 213-236.

Chang KP, Center JR, Nguyen TV, Eisman JA. Incidence of hip and other osteoporotic fractures in elderly men and women: Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *J Bone Miner Res* 2004; 19(4):532-6.

Chao Z, Wenjian W, Xuliang D, Kui C, Xinggang L, Piyi D, Ge S, Gaorong H. Preparation and characterization of porous tricalcium phosphate/collagen composites with an integrated structure. *Biomaterials* 2005; 26: 5276-84.

Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Cehen TH, Cheng WC, Hu CL, Yao CH. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 2000; 21: 1541-48.

Cho P, Schneider GB, Krizan K, Keller JC. Examination of the bone-implant interface in experimentally induced osteoporotic bone. *Implant Dent* 2004; 13(1):79-87.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE. Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am. J. Med.* 1993; 94: 646-50.

Col NF, Bowlby LA, McGarry K. The role of menopausal hormone therapy in preventing osteoporotic fractures: a critical review of the clinical evidence. *Minerva Med* 2005; 96(5):331-42.

Coraça, DC. Osteointegração de implantes de Poli (L-acido lático) PLLA e da blenda de Poli (L-acido lático) PLLA/Poli (óxido de etileno) PEO na tibia de ratos Tese de Doutorado., 74f. Campinas, SP : [s.n.], 2002

Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359:1761-7.

Dargent-Molina P. Epidemiology and risk factors for osteoporosis. *Rev Med Interne* 2004; 25 Suppl 5: S517-25.

Davies JE, Causton B, Bovell Y, Davy K, Sturt CS. The Migration Of osteoblasts over substrata of discrete surface charge. *Biomaterials* 1986; 7: 231-33.

Dennison E, Cole Z, Cooper C. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17(4): 456-61.

Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 24: 84-86.

Fini M, Nicol I, Aldini N, Gandolfi Mg, Mattioli Belmonte M, Giavaresi G, Zucchini C, De Benedittis A, Amati S, Ravaglioli A, Krayewski A, Rocca M, Guzzardella GA, Biagini G, Giardino R. Biomaterials for orthopedic surgery in osteoporotic bone: a comparative study in osteopenic rats. *Int J Artif Organs* 1997; 20 (5); 291-97.

Frayssinet P. New observation on middle term hydroxyapatite coated titanium alloy hip prostheses. *Biomaterials* 1992; 13 (10): 668-73.

Fogarty P; O'Beirne B; Casey C. Epidemiology of the most frequent diseases in the European a-symptomatic post-menopausal women. Is there any difference between Ireland and the rest of Europe? *Maturitas* 2005;52 Suppl 1:S3-6.

Fujiwara S. Radiation Effects Research Foundation, Japan. Epidemiology of osteoporosis. Clin Calcium 2005; 15(4): 577-82.

Gennari L, Merlotti D, Martini G, Gonnelli S, Franci B, Campagna S, Lucani B, Dal Canto N, Valenti R, Gennari C, Nuti R. Longitudinal association between sex hormone levels, bone loss, and bone turnover in elderly men. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88(11): 5327-33.

Goissis G, Piccirilli L, Goes J, Plepis A, Das-Gupta D. Anionic collagen: polymer composites with improved dielectric and rheological properties. Artif Organs 1998; 22: 203-09.

Goissis G, Marcantonio EJR, Marcantonio RA, Lia RC, Cancian DC, De Carvalho WM. Biocompatibility studies of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. Biomaterials 1999; 20: 27-30.

Grazio S. Effect of physical and athletic activity on spinal deformities due to osteoporosis. Reumatizam 2002; 49(1):10-9.

Gregg EW, Kriska AM, Salamone LM, Roberts MM, Anderson SJ, Ferrell RE, Kuller LH, Cauley JA. The epidemiology of quantitative ultrasound: a review of the relationships with bone mass, osteoporosis and fracture risk. Osteoporos Int 1997; 7(2):89-99.

Goissis G, Maginador VS, Martins VCA. Biomimetic Mineralization of Charged Collagen Matrices: in vitro and in vivo study. Artif Organs 2003; 27: 437- 43.

Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ. Integrin expression and function on human osteoblast-like cell. J. Bone Miner. Res. 1997; 12: 1189-97.

Halbe, HW. Tratado de Ginecologia São Paulo : Roca, 2000

Hardesty RA, Marsh JL. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology orientation and embryonic origin. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1990; 85 (1): 5-14

Hawker GA. The epidemiology of osteoporosis. *J. Rheumatol Suppl* 1996; 45: 2-5.

Heaney RP, Recker RR, Stegman MR, Moy AJ. Calcium absorption in women: relationships to calcium intake, estrogen status and age. *J. Bone Miner Res*. 1989; 4: 469-75.

Hench LL. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; 19: 1419-23.

Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DL, Shannon R, Johnson SP, Zegzula HD, Wozney J. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res*. 1998; 43: 356-64.

Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (DL-lactic-co-glycolic acid foam) implanted into the rat mesentery. Student Research award in the doctor? Degree Candidate Category, Society for Biomaterials 23 rd Annual Meeting, New Orleans, L.A., April, 30 - May 4, 1997.

Ito A, Kumamoto E, Takeda M, Shibata K, Sagai H, Yoshimura M. Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT_{1A}-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *J Neurosci* 2000; 20(16): 6302-8.

Ito M, Nishida A, Koga A, Ikeda S, Shiraishi A, Uetani M, Hayashi K, Nakamura T. Contribution of trabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters. *Bone* 2002; 31(3): 351-8.

Jayakrishnam A, Jamela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthesis and drug delivery matrices. *Biomaterial* 1996; 17: 471-84.

Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 1993; 120: 577-85.

Junqueira, LCA. *Biologia celular e molecular* Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1997.

Kalu, ND, IuU, CC, Salerno E. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 β -estradiol. *Bone Miner.* 1991; 14: 175-87.

Kanis JA. Consequences of osteoporosis. In: Kanis JA (ed). *Textbook of Osteoporosis*. London, Blackwell Ltd, 1996, p. 200-225. and in German normals: influence of sex, age and anthropometric parameters. *Eur. J. Clin. Invest.* 1994; 25: 366-70.

Kanis JA. Consequences of osteoporosis. In: Kanis JA (ed). *Textbook of Osteoporosis*. London, Blackwell Ltd, 1996, 200-25.

Kanis, JA. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. *Bone* 1998; 19(5): 185-190.

Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 224-30.

Kim MS, Lee YS. Effects of soy isoflavone and/or estrogen treatments on bone metabolism in ovariectomized rats. *J Med Food* 2005; 8(4):439-45.

Konn BS, Terdening CT, Benz DJ. Estrogen binding receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 1988; 24: 81-88.

Krukowski M. Hard and soft connective tissue growth and repair in response to charged surfaces. In: J.E. Davies (ed.), *The bone - Biomaterial interface*, pp. 275-84, University of Toronto Press, Toronto, 1991.

Lacerda C, Plepis AMG, Goissis G. Selective hydrolysis of carboxiamides of asparagine and glutamine residues of collagen: preparation and characterization of anionic collagen matrices for biomaterial applications. *Quim Nova* 1998; 21: 267-71.

Lane NE, Thompson JM, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat in vivo. *J Bone Miner Res* 1998;13(2):229-36.

Lane NE, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Early estrogen replacement therapy reverses the rapid loss of trabecular bone volume and prevents further deterioration of connectivity in the rat. *J Bone Miner Res* 1999;14(2): 206-14.

Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194(2 Suppl):S3-11.

Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221: 1-22.

Lincoln GA, Tyler NJ. Role of oestradiol in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. *J Reprod Fertil*. 1999; 115 (1): 167-74.

Lormeau C, Soudan B, D'herbomez M, Pigny P, Duquesnoy B, Cortet B. Sex hormone-binding globulin, estradiol, and bone turnover markers in male osteoporosis. *Bone* 2004; 34 (6): 933-39.

Ma PX, Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*. 1999; 46: 60-72.

Malaval L, Chenu C, Delmas PD. Proteines de l'os. Maladies métaboliques osseuses de l'adulte. Kuntz D, editors. Paris: Flammarion Médecine Sciences: 17-35, 1996.

Mark DE, Hollinger JO, Hastings CJr, Chen G, MArden LJ, Reddi AH. Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone inductive protein. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1990; 86(4): 623-630.

Maugars Y, Berthelot JM, Delécrin J, Trécant M, Passuti N, Daculsi G, Prost A. Dual-energy X-ray absorptiometry: value in orthopedics. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1995; 81 (4): 326-32.

May H, Murphy S, Khaw Kt. Bone mineral density and its relationship to skin color in Caucasian females. *Eur. J. Clin. Invest*. 1995; 25: 85-89.

Melton LJ. How many women have osteoporosis now? *J. Bone Miner Res*. 1995; 10: 175-77.

Mochizuki K, Inoue T. Effect of salmon calcitonin on experimental osteoporosis induced by ovariectomy and low-calcium diet in the rat. *J Bone Miner Metab* 2000;18(4):194-207.

Moreira C., Carvalho MAP. *Reumatologia. Diagnóstico e tratamento*. Ed. Medsi, 2 edição, 2001.

Moreira PL, Santos AR, Genari SC. In vitro analysis of Anionic collagen scaffolds for bone repair. *J. Biomed. Mater. Res*. 2004; 71: 229-37.

Moreira PL, An YH. Collagen-based scaffolds for bone and cartilage repair. *Mus Orthopaedic Journal* 2002; 5: 1-5.

Nakagawa T, Tagawa T. Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs-collagen complex implanted into an ectopic site. *Oral Dis*. 2000; 6: 172-79.

Nawroth P, Pirzer R, Fohr B, Schilling T, Ziegler R, Bierhaus A, Kasperk C. Osteoporosis and cardiovascular disease--two sides of the same coin?]. *Med Klin (Munich)* 2003; 98(8):437-46.

Ozawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura Rd, Nishimura I. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone* 2002; 30 (1):137-43.

Pan J, Shiota T, Ohno K, Michi K. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58 (8): 877-82.

Parreira DR. Resposta tecidual de implantes de colágeno aniônico com densidade de carga negativa variável. ALUNO: Diderot Rodrigues Parreira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – SP) . Processo nº: 99/05313-8.

Peck WA, Riggs BL, Bell NH, Wallace RB, Johnston JRCC, Gordon SL. Research directions in osteoporosis. *Am. J. Med.* 1988; 84: 275-82.

Plepis AMG, Goissis G, Das-Grupta DK. Dielectric and Pyroelectric Characterization of anionic and native collagen. *Polym Eng Science* 1996; 36: 2932-38.

Pollack, S.T., Symposium on Electrically Induced Osteogenesis. Vol. 15, W.B. Daunders Company, Pennsylvania (1984).

Raiz LG. Perspective: the osteoporosis revolution. *Ann. Intern Med.* 1997; 126: 458-62.

Reid GG, Gorham SD, Lackie JM. The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. *J. Mat. Sci. Materials in Medicine* 1993; 4: 201-09.

Riggs BL, Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, Melton LJ. Evidence that type I osteoporosis results from enhanced responsiveness of bone to estrogen deficiency. *Osteoporos Int.* 2003; 14(9): 728-33.

- Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002; 23: 449-56.
- Rosa FP, Lia RCC, Souza KOF, Goissis G, Marcantonio JrE. Tissue response to polyanionic collagen:elastin matrices implanted in rat calvaria. *Biomaterials* 2003; 24: 207-12.
- Schlegel AK, Mohler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane. *Biomaterials* 1997; 18: 535- 38.
- Shen V, Birchman R, Wu DD, Lindsay R. Skeletal effects of parathyroid hormone infusion in ovariectomized rats with or without estrogen repletion. *J Bone Miner Res.* 2000; 15 (4): 740-46.
- Singh MP, Stefko J, Lumpkin JA, Rosenblatt J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharm. Res.* 1995; 12: 1205-10.
- Szejnfeld VL. Osteoporose. Diagnóstico e tratamento. Ed. Sarvier, São Paulo, 1 ed., 2000.
- Stromsoe K. Fracture fixation problems in osteoporosis. *Injury* 2004; 35(2):107-13.
- Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K. 1988. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin. Ortoped.* 1988; 234: 250-54.
- Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res* 2002; 37(2):161-5.
- Tuan TL, Keller LC, Sun D, Nimni ME, Cheung D. Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. *J. Cell Sci.* 1994; 107: 2285 -89.

Turner Rt, Riggs Lb, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev.* 1994; 275-00.

Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, Motohashi M, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87 (4): 411-18.

Yamamura, K, Iwata H, Osada T, Yano K, Yotsuyanagi, T, Nabeshima T. prevention of bone loss by percutaneous estradiol implants in ovariectomized rats. *Journal of Biomedical Materials Research* 2005; 29: 1249-53.

Yang C, Hillas PJ, Báez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, Spiro R, Polarek JW. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *Biodrugs* 2004; 18(2): 103-19.

Younger EM, Chapman MN. Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma.* 1989; 3: 192-195.

Zheng MH, Holloway W, Fan Y. Evidence that humam osteoclast-like cells are not the major estrogen target cells. *Bone* 1995; 16: 93S.

Wang JW, Li W, Xu SW, Yang DS, Wang Y, Lin M, Zhao GF. Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chin J Traumatol* 2005; 8(2): 111-6.

Wark JD. Osteoporotic fractures: background and prevention strategies. *Maturitas* 1996; 23(2):193-207.

ANEXO: ARTIGO PUBLICADO

CULTURA DE OSTEOLASTOS SOBRE MEMBRANAS DE COLÁGENO
POLIANIÔNICO: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL DE INDUÇÃO
DA FORMAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO VISANDO REPARAÇÃO TECIDUAL

Bol. Med. Vet. – UNIPINHAL – Espírito Santo do Pinhal - SP, v. 01, n. 01, jan./dez.
2005

Marcelo R. Cunha¹, Arnaldo R. Santos Jr.¹, Selma C. Genari²

¹ Docentes do Instituto de Ciências Biológicas, Centro Regional Universitário de
Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL), Espírito Santo do Pinhal, SP. CEP 13990-000,
Espírito Santo do Pinhal, SP.

² Autor para envio de correspondência. e-mail: sgenari@nutricell.com.br

Palavras chave: Colágeno polianiónico, regeneração tecidual, cultura de células,
osteoblastos, tecido ósseo.

RESUMO

Atualmente, observa-se a alta de incidência de lesões provocadas por traumas e choques mecânicos causados por diferentes fatores, caracterizadas principalmente pelas fraturas ósseas. Desta maneira, existe um interesse no desenvolvimento de biomateriais que possam ser utilizados como implantes no do tecido ósseo, e que atuem como indutores do processo de reparação óssea. Matrizes extracelulares tridimensionais compostas de colágeno apresentam a vantagem de poder ser modificadas em suas propriedades mecânicas e fisiológicas por métodos físicos ou químicos, resultando em matrizes carregadas positivo ou negativamente. O presente trabalho visa avaliar a capacidade das membranas tridimensionais de colágeno polianiónico e nativo no processo de consolidação de fraturas com perda de massa óssea. Utilizamos osteoblastos cultivados sobre esses biomateriais antes do implante no crânio de ratos linhagem Rowett nude. Observamos que os osteoblastos cultivados sobre o colágeno polianiónico foram capazes de formar tecido semelhante ao ósseo nas membranas e preencher a área lesada nos implantes realizados nos animais. Concluimos que as membranas de colágeno polianiónico são uma alternativa viável para a reconstrução tecidual e engenharia de tecidos.

ABSTRACT

At present, There are a high of incidence of wounds promoted by traumas and mechanical shocks caused by different factors, characterized mainly by bone fractures. Of this way, exist an interest in the development of biomaterials that can be used as implants in bone tissue for bone repair. Three-dimensional extracellular matrices composed of collagen present the advantage of be able to will be modified in his physiological and mechanical estates by physical or chemical approaches, resulting in positive or negatively loaded matrices. The present work is going to evaluate the capacity of the three-dimensional membranes of native and polyanionic collagen in the fractures consolidation trial with loss of bone mass. We used osteoblasts cultured on those biomateriais before of its implants in the skull of Rowett nude lineage mice. We observe that the osteoblasts cultured on polyanionic collagen were capable to form a bone-like tissue structure in the membranes and fill the damaged area in implants carried out in animals. We conclude that the polyanionic collagen membranes are a viable alternative for the tissue reconstruction and engineering.

INTRODUÇÃO

Defeitos com perda de massa óssea resultante de fraturas patológicas ou traumáticas, desenvolvimento anormal do esqueleto e ressecção de tumores, freqüentemente são reparados com utilização de enxertos ósseos autógenos. Os enxertos ósseos autógenos são considerados vantajosos uma vez que evitam complicações de rejeição imunológica e fornecem células que podem imediatamente começar o processo regenerativo (ISHAUG-RILEY ET AL., 1997). No entanto, eles apresentam algumas desvantagens como: morbidade da área doadora, reabsorção pós-operatório, contornos irregulares dos enxertos angulares (MARK ET AL., 1990) e complicações como dor crônica e lesões vasculares durante o procedimento cirúrgico (YOUNGER E CHAPMAN, 1989). Além disso, a incorporação deste enxerto pode sofrer influências de outros fatores como presença ou ausência do perióstio, orientação do enxerto, viabilidade do enxerto ósseo vascularizado, tipo de fixação, posição do enxerto em relação ao stress mecânico e origem embrionária (HARDESTY E MARSH, 1990). Outro ponto negativo dessa técnica é a difícil obtenção do enxerto, quando solicitado em grande quantidade (BROWN ET AL., 1976; RISH ET AL., 1976). Diante das limitações da utilização dos enxertos ósseos autógenos, alguns materiais biocompatíveis vêm sendo pesquisados para substituí-los na aplicação clínica, tais como as cerâmicas, metais, silicone, polimetilmetacrilato, polietileno (BREITBART ET AL., 1998). Contudo, os efeitos citotóxicos de alguns desses biomateriais constitui uma contra-indicação ao seu uso (WEISS E REDDY, 1981), além da dificuldade do material em moldar o contorno do defeito ósseo, baixa resistência mecânica, demora na incorporação com o osso, estando também sujeitos ao processo de corrosão nos casos dos implantes metálicos, aumentando assim o prognóstico à reparação total da falha óssea. O colágeno é

considerado um dos mais proveitosos biomateriais (CHEN ET AL., 2000). A boa biocompatibilidade e segurança devido as suas características biológicas tornam-o um recurso fundamental à aplicação médica. Devido a sua atividade osteoindutiva, o colágeno é considerado um bom substituto ósseo. Além disso, a matriz colagênica estimula a migração e infiltração celular, suporta a proliferação celular, ou seja, possui propriedades importantes para facilitar o processo regenerativo (TUAN ET AL., 1994). Uma atenção especial está voltada para membranas de colágeno na forma de Matrizes Extracelulares artificiais (MECa) devido a sua indução a mineralização e a síntese de células osteogênicas além de sua biocompatibilidade, características essenciais para um biomaterial quando utilizado como enxerto ósseo.

A utilização de MECa composta de colágeno/elastina ainda apresenta a vantagem de sofrer alterações nas propriedades por modificações químicas do colágeno que trazem melhora nas propriedades mecânicas e fisiológicas do MECa (SINGH ET AL., 1995; JAYATHRISHNAM E JAMELA, 1996). Com as vantagens das membranas poliméricas naturais, como o colágeno, em relação aos demais tipos de enxertia, o presente trabalho visa avaliar a capacidade das membranas tridimensionais de MECa de colágeno/elastina nativa e membranas de colágeno aniônico/elastina no processo de consolidação de uma fratura com perda de massa óssea, como será simulado em animais experimentais, definindo assim, as propriedades destes tipos de materiais e a sua respectiva viabilidade como substituto ósseo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos materiais – MECa

A matéria prima utilizada para a preparação das membranas tridimensionais de colágeno/elastina para a obtenção das Matrizes Extracelulares artificiais (MECa), foi

obtida a partir de Pericárdio Bovino (PB), fornecido pela Braile Biomédica S/A de São José do Rio Preto. A MECa foi preparada e fornecida pelo Instituto de Química de São Carlos, da USP, sob supervisão do Prof. Dr. Gilberto Goissis. As amostras obtidas sob as quais serão cultivados osteoblastos são: membranas tridimensionais de MECa de colágeno/elastina aniônicas com tempo de tratamento alcalino de 48 horas.

Cultura Celular

As células utilizadas nesse trabalho foram a OF COLL II (linhagem de osteoblastos de camundongo, fornecidos pelo Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro). Essas células foram cultivadas em meio Ham F-12 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO - USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Nutricell, Campinas, SP - Brasil) a 37°C e mantidas no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP. As células foram cultivadas sob membranas tridimensionais de MECa de colágeno/elastina aniônicas com tempo de tratamento alcalino de 48 horas.

Estudo *in vivo*

No presente trabalho utilizou-se animais da linhagem Rowett nude, fornecidos pelo CEMIB da UNICAMP. Para o procedimento cirúrgico, inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com solução de Ketamina (Francootar) e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) na proporção 1:1 e na dose 0,10 ml/100 gramas de massa corporal, via muscular. Com os animais posicionados em decúbito ventral e com auxílio de bisturi, realizou-se uma incisão longitudinal mediana na pele da calota craniana. Com o osso parietal esquerdo exposto, foi feita uma falha no mesmo usando uma broca trefina de 6

mm de diâmetro acoplado a um mini-motor. Em seguida, a falha foi preenchida com uma membrana de colágeno com células osteoblásticas (ver cultura celular) em forma de disco tendo cerca de 7 mm de diâmetro. A pele foi reposta e suturada usando fio de algodão 4.0.

Estudo macroscópico

Imediatamente ao sacrifício, as calotas cranianas foram retiradas e fotografadas para observar a presença de sinais de rejeição ao implante e também o comportamento da membrana quanto a sua integração com o tecido ósseo.

Estudo histológico

Após 8 semanas, os animais foram sacrificados e as calotas cranianas retiradas e submetidas aos métodos histológicos de rotina (fixação, inclusão e corte) e coloração com hematoxilina e eosina. As amostras obtidas foram fotografadas em microscópio óptico Olympus modelo CX40.

Estudo radiográfico

As radiografias dos crânios dos animais foram feitas em um aparelho radiográfico Rigaku RU-200 com ponto focal de 0,8 x 0,8mm, com utilização de películas radiográficas odontológicas oclusais Kodak de tamanho 7,6 x 5,7mm.

RESULTADOS

Análise macroscópica

Não se observou a formação de calo ósseo após 8 semanas do implante. A membrana de colágeno/elastina implantada pôde ser facilmente identificada, sem evidências de alterações patológicas locais (Fig. 1). Assim sendo, pelos aspectos macroscópicos, este tipo de biomaterial colagênico demonstra apresentar uma boa interatividade com o tecido ósseo.

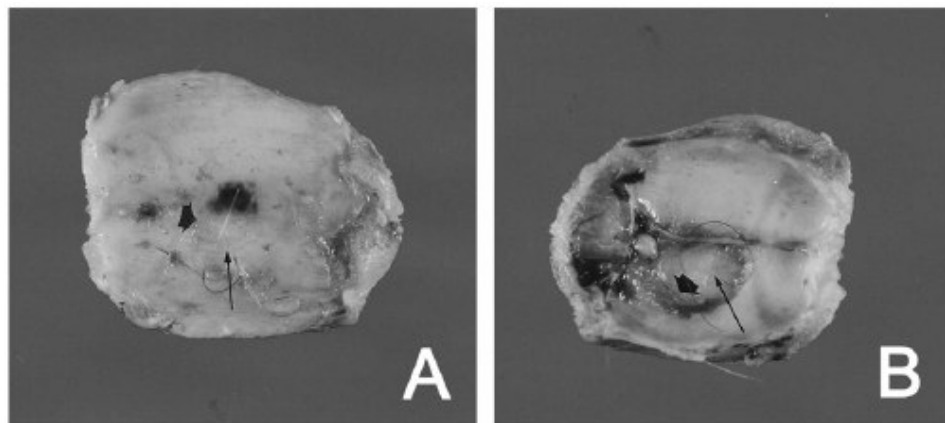


Figura 1. Calota craniana vista superior (A) e inferior (B). Notar o implante de membrana de colágeno com tempo de tratamento alcalino de 48 horas (seta fina) e a sua completa integração (seta espessa) com a margem óssea do osso parietal. Não há sinais de rejeição imunológica ao implante.

Análise radiológica

Nos animais que receberam por 8 semanas implantes de membranas de colágeno com 48 horas de tratamento alcalino ficou evidente, uma depressão na calota craniana devido à falha óssea produzida. Neste sítio pôde ser observada uma linha óssea radiopaca na parte superior unindo as margens ósseas do osso parietal, o que comprova a neoformação óssea e o início da reparação óssea. Na margem anterior da área receptora, observa-se também um ponto ósseo mais radiopaco e espesso (Fig. 2).

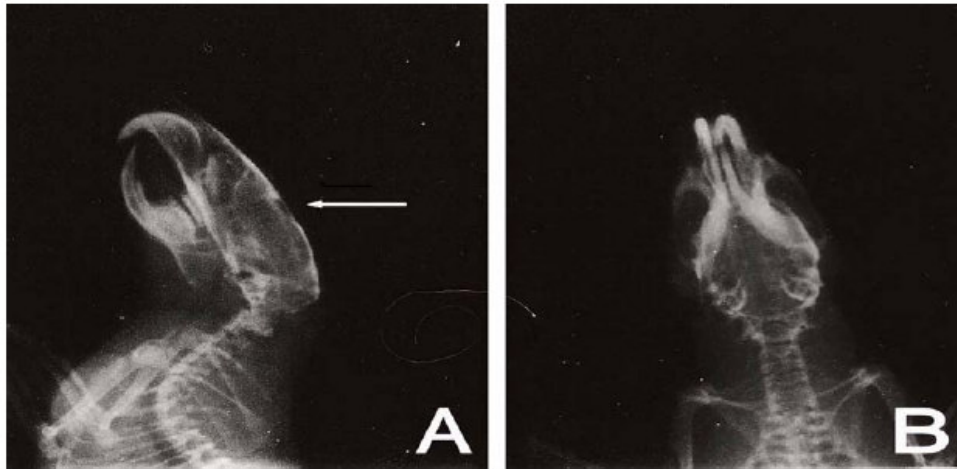
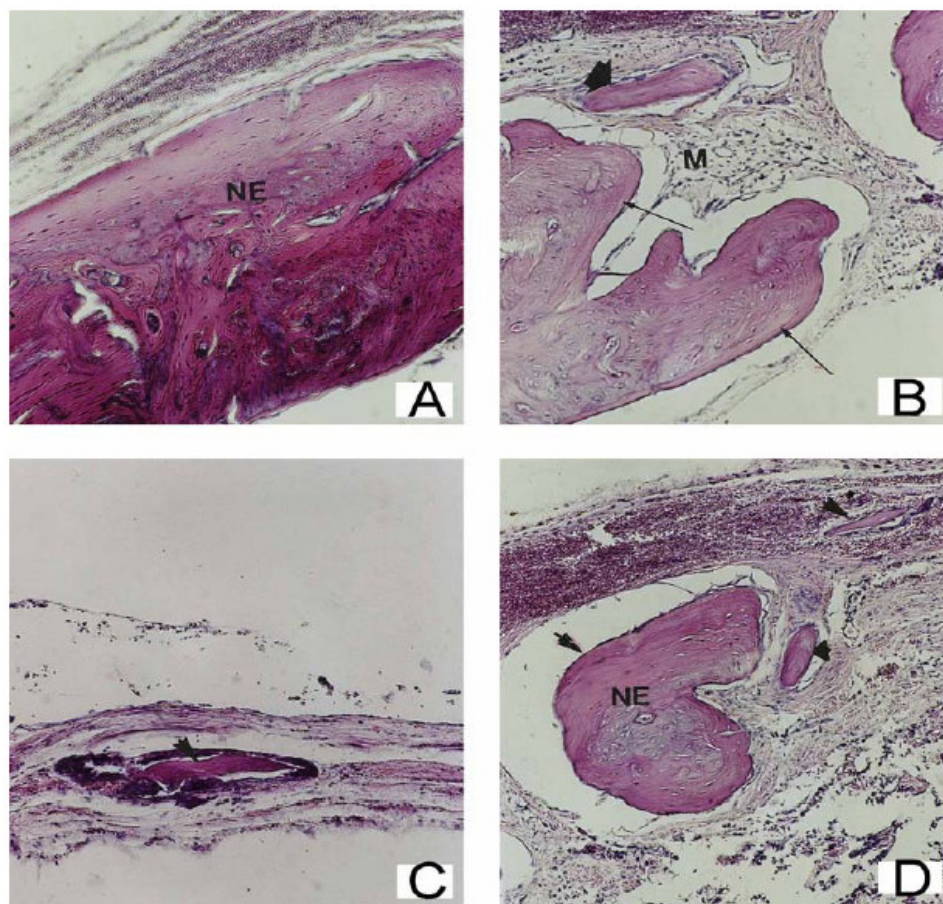


Figura 2 (A e B). Imagem radiográfica dos animais com 8 semanas de implante das membranas de colágeno de 48 horas de tratamento alcalino. Observe a vista lateral (A) e superior (B) da implantação na calota craniana. Note a depressão óssea (seta pequena) na calota craniana e pontos mais radiopacos do osso na parte anterior da falha óssea (seta espessa). Notar a linha óssea unindo a margem anterior com a posterior na área receptora (cabeça da seta).

Análise histológica.

Após 8 semanas da implantação da membrana de colágeno/elastina, notou-se a neoformação de tecido ósseo na área receptora. Nas margens da falha óssea observou que o osso jovem apresentava-se volumoso quando comparado com a cortical óssea do parietal. O osso formado apresentava características de osso imaturo, ou seja, com osteócitos volumosos, arredondados que se dispunham próximos uns aos outros e em várias direções, sem orientação definida. Em outras regiões, o osso neoformado apresentou características de osso maturo, com osteócitos achatados, dispostos organizadamente e em pequena proporção (Fig. 3A). O osso formado projetava-se em direção a membrana de colágeno, obtendo assim uma boa osteointegração. Verificaram-

se também pequenos pontos isolados de neoformação óssea no interior da membrana de colágeno (Fig. 3B e 3C). Em outros pontos do local do implante, puderam ser observados no interior das membranas, grandes pontos de neoformação óssea (Fig. 3D).



Figuras 3. Corte transversal do osso parietal do animal após 8 semanas da implantação de membrana de colágeno 48 horas de tratamento alcalino, corados com HE. Na figura 3A, notar osso neoformado (NE) volumoso comparado com a cortical do parietal (C). Na figura 3B, observar projeção (setas finas) do osso formado em direção a membrana de colágeno (M) e pontos ósseos isolados (setas espessas) no interior da membrana. Nas figuras 3C e 3D, verificar pequenos e grandes pontos (cabeças das setas) de neoformação óssea (NE) na membrana de colágeno (aumento 200x).

DISCUSSÃO

Atualmente, observa-se uma alta de incidência de lesões provocadas por traumas e choques mecânicos causados por diferentes fatores, sendo que pelo menos 2/3 das lesões que acometem o homem envolvem o sistema músculo-esquelético. Essas lesões são caracterizadas principalmente por fraturas ósseas e são responsáveis por grandes investimentos no setor da saúde (SALTER, 2001). Desta maneira, existe um interesse no desenvolvimento e aperfeiçoamento de biomateriais que possam ser utilizados na substituição do tecido ósseo, e mais ainda, que atuem como indutores do processo de reparação óssea. Grande interesse se apresenta também no desenvolvimento de metodologias que possibilitem melhor regeneração do osso lesado. Dentre essas novas tecnologias, a engenharia de tecidos tem obtido destaque.

As aplicações da bioengenharia de tecidos vêm permitindo a utilização de células autógenas (do próprio paciente) cultivadas sobre moldes de materiais biocompatíveis, os quais são posteriormente reimplantadas ao tecido lesado. Essa metodologia abre grandes perspectivas de aplicação na área médica, permitindo a realização de implantes de enxertos em tecidos lesados com maior benefício ao paciente, pois pela utilização desta metodologia, apenas um pequeno número de células será necessário inicialmente, as quais serão expandidas *in vitro*, e também pelo fato de que evitará problemas imunológicos como a rejeição dos transplantes não autógenos (TEMENOFF E MIKOS, 2000).

Desde 1960, membranas poliméricas têm sido usadas em animais para facilitar o reparo de defeitos ósseos. Tem sido aceito que essas membranas agem como barreira na prevenção do crescimento de tecido conjuntivo junto ao defeito, permitindo somente a

neoformação óssea. Ultimamente, as aplicações de membranas poliméricas têm sido direcionadas ao tratamento de grandes defeitos na diáfise óssea. Essas membranas podem ser usadas de forma isolada ou associadas a substâncias osteogênicas. Tais membranas podem ser preparadas usando polímeros bioabsorvíveis ou não. Polímeros naturais como colágeno, proteoglicanos, glicosamionoglicanos e elastina além de biocompatível, participam no controle da estrutura do tecido e na regulação do fenótipo celular. Assim, o colágeno, principal composto orgânico do tecido ósseo, vem sendo amplamente usado como material na fabricação de biomateriais (KIM E MOONEY, 1998).

Considerando que a matriz extracelular envolve as células e promove a integração morfofuncional dos tecidos, a utilização de implantes que simulam essa matriz é uma tendência na área de biologia regenerativa. A matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colagênicas (97% colágeno tipo I e 3% colágeno tipo V) e 10 % de proteínas não colágenas (osteocalcina, osteonectina, proteoglicanos, fibronectina, fatores de crescimento, proteínas morfogénéticas, e outros). Todas essas proteínas são sintetizadas por osteoblastos e muitas estão envolvidas na adesão. Num estudo clínico, membranas de colágeno foram implantadas em fissuras bucais de pacientes com o intuito de avaliar a ossificação do defeito ósseo após cirurgia na boca. Dentro de um período de 9 meses, observou maior formação óssea na membrana comparado com o controle. Além disso, a membrana não induziu resposta imunológica. Este resultado sugere essas membranas como uma nova ferramenta à aplicação em cirurgias dentais e guia para regeneração óssea (SCHLEGEL ET AL., 1997).

A utilização de uma MECa composta de colágeno/elastina ainda apresenta a vantagem de sofrer alterações nas propriedades por modificações químicas do colágeno,

resultando em matrizes carregadas positivo ou negativamente (REID ET AL., 1993; SINGH ET AL., 1995; JAYAHIRISHNAM E JAMELA, 1996). Tais modificações podem melhorar as propriedades mecânicas e fisiológicas do MECa. A principal característica do aumento de cargas negativas está no melhoramento das propriedades dielétricas em relação às encontradas no colágeno nativo. Krukowski (1991) mostraram que superfícies carregadas positivamente induziram a formação de tecido conjuntivo. Por outro lado, quando carregadas negativamente estimularam a formação de tecido ósseo intramedular.

O colágeno em combinação com outros polímeros vem sendo usado como implante visando à correção de defeitos ortopédicos, promoção da regeneração de fraturas, ou em processos de osteosíntese. Em um experimento clássico, colágeno obtido de osso desmineralizado foi usado, como material de enxertia óssea para o tratamento de alterações ósseas congênitas e adquiridas, na forma nativa ou em combinação com hidroxiapatita. O resultado deste estudo mostrou que o colágeno de osso desmineralizado enxertado em combinação com a hidroxiapatita, foi um excelente material osteoindutivo, podendo assim, ser usado como substituto ósseo (Takaoka et al, 1988).

Goissis et al. (2003) avaliando colágeno polianiónico como suporte à reconstrução de tecido ósseo, observou que colágeno aniônico in vitro foi capaz de induzir depósito de sais de fosfato de cálcio, sugerindo assim que mudanças dielétricas na matriz colagênica pode ter sido o indutor ao processo de mineralização do colágeno in vitro, como um sistema semelhante ao estágio de mineralização do osso.

Nesse trabalho observamos que as membranas de colágeno aniônico, submetidos a um tratamento alcalino por 48h, foram capazes de sustentar o crescimento de osteoblasto

por cerca de 8 semanas. Além disso, observamos a formação de tecido ósseo no interior dessas membranas, sugerindo que as mesmas estimulam a formação de matriz óssea por parte dos osteoblastos. Com estes resultados pode-se notar que a membrana de colágeno apresenta osteocondutividade, caracterizando assim um método alternativo e promissor na área clínica de implantologia e na engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BREITBART, A.S.; GRANDE, D.A.; KESSLER, R.; JAMES, RYABY, J.T.; FITZSIMMONS, R.J.; GRANT, R.T. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured peristeal cell. *Plastic Reconstruct. Surg*, v. 101, n.3, p.567-581, 1998.
- BROWN, M.D.; MAILLIN, T.I.; DAVID, P.B. A roentgenographic evaluation of frozen allografts versus autografts in anterior cervical spine fusions. *Clin. Orthop.*, v.119, p. 231-236, 1976.
- CHEN, Y.S.; HSIEH, C.L.; TSAI, C.C.; CHEN, T.H.; CHENG, W.C.; HU, C.L.; YAO, C.H. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*, v.21, p. 1541, 2000
- GOISSIS, G.; MAGINADOR, S.V.S.; MARTINS, V.C.A. Biomimetic mineralization of charged collagen matrix: in vitro and in vivo study. *Artif Organs*, v.27, p.437-443, 2003.
- HARDESTY, R.A.; MARSH, J.L. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology orientation and embryonic origin. *Plastic Reconstruct. Surg*, v.85, n°1, p.5-14, 1990.

ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE, G.M.; GURLEK, A.; MILLER, M.J.; YASKO, A.W.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(L-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J. Biomed. Mater. Res*, v.36, p.1-8, 1997.

JAYAKRISHNAM, A.; JAMELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprosthesis and drug delivery matrices. *Biomaterials*, v.17, p.471-484, 1996.

KIM, B.S.; MOONEY, D.J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol.*, v.16, p. 224-29, 1998.

KRUKOWSKI, M. Hard and soft connective tissue growth and repair in response to charged surfaces. In: DAVIES, J.E., ed. *The bone – Biomaterial interface*. Toronto, University of Toronto Press, 1991. Cap.25, p.275-284.

MARK, D.E.; HOLLINGER, J.O.; HASTIGS, C. Jr.; CHEN, G.; MARDEN, L.J.; REDDI, A.H. Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone inductive protein. *Plastic Reconstruct. Surg.*, v.86, n°4, p.623-630 1990.

REID, G.G.; GORHAM, S.D.; LACKIE, J.M. The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. *J. Mat. Sci. Mater. Med.*, v.4, p.201-209, 1993.

RISH, B.L., McFADDEN, J.T., PENIX, J.O. Anterior cervical fusion using homologous bone grafts. A comparative study. *Surg. Neurol.*, v.5, p.119- 121, 1976.

SALTER, R.B. Distúrbios e lesões do sistema musculoesquelético, 3º edição, ed. MEDSI, cap. 15, 2001.

SCHLEGEL, A.K.; MOHLER, H.; BUSCH, F.; MEHL, A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane. *Biomaterials*, v. 18, p. 535- 538, 1997.

SINGH, M.P.; STEFKO, J.; LUMPKIN, J.A.; ROSENBLATT, J. The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices. *Pharm. Res.*, v.12, p.1205-1210, 1995.

TAKAOKA, K.; NAKAHARA, H.; YOSHIKAWA, H.; MASUHARA, K.; TSUDA, T.; ONO, K. 1988. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin. Orthoped.*, v. 234, p.250-254, 1988.

TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, v.21, p.431-440, 2000.

TUAN, T.L.; KELLER, L.C.; SUN, D.; NIMNI, M.E.; CHEUNG, D. Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. *J. Cell Sci.*, v.107, p. 2285–2289, 1994.

WEISS, R.E.; REDDY, A.H. Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow, *J. Cell Biol.*, v.88, p.630-636, 1981.

YOUNGER, E.M.; CHAPMAN, M.N. Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma*. v.3, p.192-195, 1989.