

## Matrizes poliméricas para a regeneração óssea. Revisão da literatura

**Victor Augusto Ramos Fernandes<sup>1,2\*</sup>, Tiago Negrão de Andrade<sup>1</sup>, Marcelo Paulini<sup>1</sup>, Amilton Iatecola<sup>1,2</sup>, Marcel Fernando Cardozo Inacio<sup>1,2</sup>, Patrícia Canossa Gagliardi<sup>3</sup>, Erick Eduardo da Silveira<sup>3</sup>, Anassilton Moreira de Andrade Junior<sup>3</sup>, Helen Baptista Abud<sup>3</sup>, Caio Biasi<sup>4</sup>, Marcelo Rodrigues da Cunha<sup>1,2</sup>**

1. Departamento de Morfologia e Patologia Básica. Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), Jundiaí/SP, Brasil.
2. Laboratório de Anatomia. Centro Universitário Nossa Senhora do Patrocínio - CEUNSP Artigo de revisão – Ciências da Saúde. Salto/SP, Brasil.
3. Laboratório de Anatomia. Centro Universitário Padre Anchieta. UniAnchieta, Jundiaí/SP, Brasil.
4. Universidade Federal da Bahia - UFBA

\* Autor para Correspondência: Dr. Victor Augusto Ramos Fernandes. Departamento de Morfologia e Patologia Básica. Faculdade de Medicina de Jundiaí E-mail: dr.victoraugustofernandes@gmail.com

### Resumo

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de biomateriais que auxiliem no reparo ósseo e que possam parcialmente substituir os enxertos autólogos vem avançando nos últimos anos pela engenharia tecidual. Diversas membranas poliméricas foram desenhadas, estruturadas, avaliadas a viabilidade e aplicadas em modelos de animais de laboratório e em cultura de células. Alguns desses materiais se destacam pelos resultados de osteoindução, neoformação óssea e imunocompatibilidade. As membranas de colágeno e elastina, associadas ou não à proteína morfogenética óssea, quitosana ou à hidroxiapatita estão sendo extensamente estudadas para o estabelecimento de um potencial tratamento ideal no reparo e regeneração óssea. Neste sentido, o objetivo da presente revisão integrativa da literatura é apresentar os principais aspectos que estão envolvidos com essas membranas e com outras que também apresentaram resultados interessantes frente ao uso em modelos *in vivo*. O método utilizado se desenvolveu a partir de buscas na base de dados da biblioteca virtual da saúde, BVS portal regional, nos quais foram utilizados os descritores “*hydroxyapatite*”; “*polymer*”; “*fillers*”; “*bone tissue*”. A partir das buscas e critérios de seleção, 8 artigos foram selecionados e descritos. Identificou-se que as membranas poliméricas de colágeno, elastina e policaprolactona apresentam substancial capacidade de estimular a regeneração óssea compatibilidade com o

hospedeiro. Entretanto, o processo de regeneração óssea ainda continua sendo um desafio para a medicina regenerativa.

**Palavras chave:** Matrizes poliméricas, Colágeno, Elastina, Regeneração tecidual, Enxertos ósseos.

## **Polymeric matrices for bone regeneration: literature review**

### *Abstract*

The development and improvement of biomaterials that assist in bone repair and that can partially replace autologous grafts has been advancing in recent years through tissue engineering. Several polymeric membranes were designed, structured, evaluated the viability and applied in models of laboratory animals and cell culture. Some of these materials stand out for the results of osteoinduction, new bone formation and immunocompatibility. Collagen and elastin membranes, whether or not associated with bone morphogenetic protein, chitosan or hydroxyapatite are being extensively studied to establish a potentially ideal treatment for bone repair and regeneration. In this sense, the objective of the present integrative literature review is to present the main aspects that are involved with these membranes and with others that also presented interesting results when compared to the use in in vivo models. The method used was developed from searches in the database of the virtual health library, regional portal VHL, in which the keywords "hydroxyapatite" were used; "Polymer"; "Fillers"; Bone tissue. From the searches and selection criteria, 8 articles were selected and described. It was identified that the polymeric membranes of collagen, elastin and polycaprolactone have substantial capacity to stimulate bone regeneration compatible with the host. However, the bone regeneration process remains a challenge for regenerative medicine.

**Key words:** Polymeric blend, Collagen, Elastin, Tissue regeneration, Bone grafts.

## **Introdução**

As ocorrências de desordens ósseas figuram entre as causas mais comuns em atendimentos hospitalares e, dentre esses fenômenos, observa-se com frequência as fraturas cominutivas de alta energia<sup>1</sup>, as deformidades congênitas<sup>2</sup>, neoplasias tumorais, osteotomias e ressecções cirúrgicas extensas<sup>3</sup>.

Independente da etiologia da fratura ou da lesão óssea acentuada, para que o indivíduo apresente qualidade de vida, redução das complicações nos pós-cirúrgicos e recuperação da motricidade adequada, há a necessidade de enxertos ósseos<sup>2</sup>. Dentre esses, os autólogos, que são aqueles provenientes do próprio paciente, continua sendo o mais usual em cirurgias ortopédicas e considerados como padrão-ouro<sup>4</sup>. Porém, esta técnica

apresenta suas limitações, tais como indisponibilidade do material ósseo do paciente, ou seja, reduzida oferta de tecido em casos de lesões ou fraturas extensas, possibilidade de reações inflamatórias associadas à contaminação do material durante a implantação, lesões neurovasculares durante o procedimento de retirada, necrose e dor na área doadora e cirurgias adicionais que trazem desconfortos e riscos aos pacientes<sup>4,5</sup>. Neste sentido, a engenharia de tecidos avança em conjunto com os métodos de análises biológicas para o desenvolvimento de biomateriais capazes de estimular o reparo ósseo e também contemplar as demais variáveis associadas à regeneração deste tipo de tecido, tais como a estimulação osteogênica, osteocondução, diferenciação celular, imunocompatibilidade com o hospedeiro e absorção do biomaterial enxertado, assim tentando estabelecer alternativas no reparo ósseo e rápido retorno da qualidade de vida e motricidade aos pacientes<sup>5,6</sup>.

A diferenciação celular e a osteogênese são propriedades que se associam ao início do processo de regeneração óssea<sup>7</sup>. Deste modo, verifica-se que um biomaterial que seja osteocondutor poderá viabilizar o reparo

ósseo por meio da diferenciação destas células pluripotentes em linhagens especializadas<sup>8</sup>. Não obstante, em conjunto a isso, a osteogênese se caracteriza pelo avanço do osso neoformado ocasionado pela diferenciação de células que são capazes de secretar os componentes orgânicos elementares da matriz óssea, como o colágeno e derivados, que normalmente se iniciam nas margens da fratura e progride para as áreas centrais<sup>9</sup>.

Os aspectos imunológicos associados aos biomateriais enxertados também devem ser levados em consideração, haja vista a inerente necessidade de biocompatibilidade com o hospedeiro<sup>10</sup>. Deste modo, os biomateriais não devem apresentar reações imunológicas adversas tais como inflamação tecidual local com o aumento de fagócitos mononucleares que invadem o tecido enxertado, assim como também manter uma reduzida presença de osteoclastos durante o processo de manutenção do tecido ósseo<sup>11</sup>.

Assim, alguns biomateriais apresentam tais características básicas que viabilizam o seu uso em modelos animais, sendo que, conforme será verificado adiante, possuem uma promissora capacidade de administração em lesões ósseas humanas<sup>11</sup>. Dentre

esses, os biomateriais oriundos de matrizes poliméricas estão entre os mais descritos na literatura atual até pelo fato de poderem sofrer modificações estruturais por hidrólise alcalina, tornando-as aniônicas e melhorando ainda a sua porosidade que é essencial para o crescimento ósseo e vascular<sup>12</sup>. Deste modo, a presente revisão da literatura objetiva verificar os principais biomateriais estudados, suas propriedades básicas relacionadas a capacidade de neoformação óssea e biocompatibilidade com o tecido ósseo e suas potencialidades associadas a biomecânica do osso em reconstrução.

## **Métodos**

O presente estudo trata-se de uma revisão integrativa da literatura a qual foi desenvolvida a partir de buscas na base de dados BVS regional (Bireme), que contempla outras bases, tais como, MEDLINE, Scielo, Lilacs. Os descritores utilizados, apenas na língua inglesa, foram “*hydroxyapatite*”; “*polymer*”; “*fillers*”; “*bone tissue*”. O corte temporal aplicado foi de 10 anos, sendo aceitos artigos publicados integralmente nos meses de janeiro de 2010 até maio do ano de 2020. Foram excluídos artigos de revisão, relatos de caso, cartas ao editor, ensaio clínicos e manuscritos que estivessem fora do

escopo deste estudo. Também, não foram incluídos resumos de congresso ou comunicações curtas.

## **Resultados**

Após as buscas iniciais, aplicação dos filtros e leitura dos resumos (*abstracts*) dos artigos indexados nas bases de dados descritas no item material e método, oito manuscritos foram selecionados para a presente revisão integrativa da literatura. O quadro 1 indica os autores, os biomateriais utilizados, os procedimentos e modelos experimentais e dos resultados encontrados pelos pesquisadores destes artigos que foram lidos integralmente. Além disso, foram notados também que alguns critérios dos artigos avaliados, quanto aos métodos de análise da formação óssea, foram comuns e, dentre esses, destacam-se: porosidade e tipo de superfície do material, processos físico-químico que melhoram a estrutura tridimensional das membranas poliméricas, tempo de hidrólise alcalina das matrizes, origem endocondral e intramembranoso dos sítios de implantação, tamanho crítico do defeito ósseo experimental, ação biomecânica da área cirúrgica, compatibilidade do material com o tecido receptor, capacidade de reabsorção do produto concomitante a

velocidade de neoformação óssea, quantidade de osso formado em relação vascularização local, morfologia e a curto tempo de implantação.

<b>Autores e ano</b>	<b>Biomaterial utilizado</b>	<b>procedimentos e modelo experimental</b>	<b>Resultados</b>
Cardoso et al, 2019 <sup>13</sup>	Policaprolactona	Aplicação de policaprolactona associada ou não à hidroxiapatita em defeitos ósseos (causados cirurgicamente) na tíbia e osso parietal de ratos Wistar.	Neoformação óssea presente; Variação entre os tipos de ossos, devido a fatores mecânicos (aplicação das cargas) e vascularização.
dos Santos et al, 2019 <sup>14</sup>	Membrana de colágeno proveniente da serosa intestinal porcina e membrana de elastina proveniente da cartilagem auricular bovina.	Lesões de 3mm nos fêmures de ratos Wistar. Aplicação das membranas sobre a lesão em associação ou não a laser de baixa frequência.	Foi observado a neoformação óssea no local da lesão, partindo das margens da lesão e indo em direção ao centro. Os volumes ósseos nas lesões foram maiores nos tecidos tratados em associação ao laser de baixa frequência. Não foram identificados infiltrados inflamatórios.
de Moraes et al, 2019 <sup>15</sup>	Membrana polimérica de elastina em associação a proteína morfogenética óssea (BMP).	Lesões cirúrgicas na calvaria de ratos Wistar com idade de 12 semanas. Aplicação do biomaterial sobre a lesão.	Os animais apresentaram regeneração óssea partindo das margens da lesão em direção ao centro; Não foi identificada a presença de infiltrados inflamatórios; O grupo tratado com a membrana polimérica de elastina à 37°C por 96 horas em associação a BMP apresentou os melhores resultados de neoformação óssea e maturação tecidual.
Pettian et al, 2018 <sup>16</sup>	Membranas de colágeno (nativas e aniônicas).	Lesões cirúrgicas na calvária (osso parietal) de ratos Wistar. Aplicação das membranas de colágeno (nas diferentes condições	Na área cirúrgica dos grupos tratados com as membranas de colágeno observou-se a neoformação óssea, principalmente nos animais com matrizes de colágeno aniônicas. Foi observada uma boa densidade de fibras

*Matrizes poliméricas para a regeneração óssea: revisão da literatura*

		descritas) sobre o local da lesão.	colágeno tipo I. Identificou-se por imunofluorescência a expressão de osteocalcina por osteócitos no tecido ósseo neoformado.
Cunha et al, 2017 <sup>17</sup>	Quitosana associada à hidroxiapatita ou não.	Lesões cirúrgicas na calvária (osso parietal) de ratos Wistar. Aplicação da Quitosana juntamente com a hidroxiapatita ou de modo isolado (nas diferentes condições descritas) sobre o local da lesão.	Foi identificado que não houve reações imunológicas adversas, porém, uma reduzida neoformação óssea. Identificou-se que os grupos os quais estiveram com a presença dos biomateriais sobre a lesão, apresentaram envolvimento do tecido conjuntival, sem uma adequada biodegradação.
Hirata et al, 2015 <sup>18</sup>	Membranas de colágeno derivadas do pericárdio e da serosa intestinal bovina.	Lesões cirúrgicas na calvária (osso parietal) de ratos Wistar. Aplicação das membranas de colágeno (nas diferentes condições descritas) sobre o local da lesão. Em associação a isso, os animais (fêmeas) estavam organizados em dois grupos: ovariectomizadas e não ovariectomizadas.	Identificou-se que a ovariectomia causa modificações na homeostase do osso, devido a uma resposta substancialmente abaixo da neoformação óssea no comparativo entre os grupos, estando ambos com as mesmas membranas de colágeno. As membranas de colágeno oriundas de ambas origens apresentaram estimulação osteogênica e osteoindução.
Franco et al, 2012 <sup>19</sup>	Uso da hidroxiapatita associada à estimulação de laser de baixa frequência.	Lesões cirúrgicas realizadas nas epífises distais dos fêmures de ratos Wistar, os quais eram ou não submetidos ao tabaco de modo passivo (via ventilação da fumaça de cigarros por 9 meses).	Os grânulos de hidroxiapatita foram absorvidos de modo adequado, sem a presença de infiltrações inflamatórias no tecido ósseo. Observou-se a presença de trabéculas ósseas recém-formadas nos grupos que não foram expostos ao tabaco. Todavia, os grupos expostos apresentaram uma neoformação óssea substancialmente reduzida.
Souza Munhoz et al, 2020 <sup>20</sup>	Membranas de elastina associadas à hidroxiapatita ou à proteína	Lesões cirúrgicas realizadas nas epífises distais dos fêmures de ratos Wistar.	Não foi observada a reconstituição completa da lesão em nenhum grupo, todavia, observou-se a presença de trabéculas ósseas recém-formadas e tecido ósseo neoformado. Não foram

	morfogenética óssea (BMP).		identificados infiltrados inflamatórios. Os grupos que fizeram uso associado de hidroxiapatita ou isolado da membrana de elastina apresentaram os melhores resultados de desenvolvimento do tecido ósseo local.
--	----------------------------	--	---

## Discussão

A identificação de biomateriais que possam auxiliar no reparo tecidual ósseo viabiliza uma possibilidade de tratamento diante dos casos de intercorrências que causam fraturas ou lesões graves neste tecido<sup>20</sup>. As membranas poliméricas, devido as suas características estruturais, se apresentam como potenciais agentes de estimulação osteogênica e de osteocondução<sup>18,19</sup>.

A policaprolactona é um polímero frequentemente utilizado como aditivo de resinas para aumento das propriedades elásticas e de resistência a impactos<sup>13</sup>. Seu ponto de fusão é relativamente baixo, aproximadamente 60°C. Sua temperatura de transição vítrea, por sua vez, chega a -60°C. A policaprolactona é obtida por meio da polimerização da caprolactona, um éster cíclico membro da família das lactonas de aspecto incolor e miscível com a maioria dos solventes orgânicos. Cardoso *et al*<sup>13</sup> observaram os efeitos do uso de matrizes poliméricas de

policaprolactona (ε-caprolactone) com 80kDa de massa molar, fabricadas pela empresa Sigma Aldrich®, em diferentes condições de lesões induzidas por cirurgias em animais Wistar. Desta forma, foram realizadas lesões de 3mm nas epífises proximais das tíbias e de 5mm na calota craniana para que fossem implantadas membranas de policaprolactona em associação ou não à hidroxiapatita sobre os sítios cirúrgicos. As eutanásias ocorreram após 32 dias<sup>13</sup>. Os resultados observados indicaram que o uso associado da membrana de policaprolactona à hidroxiapatita facilitaram a osteocondução por condicionar a superfície da lesão a uma melhor aderência entre as células teciduais. Todavia, foi identificado que houve um comportamento diferenciado entre os ossos avaliados neste estudo, sendo que a tíbia, um osso longo, amplamente vascularizado, localizado no membro inferior e sujeito a cargas de compressão de modo frequente, apresentou uma neoformação óssea substancialmente maior (60%) que o



osso parietal (28%)<sup>13</sup>. Outro fato relevante a interpretação destes resultados se atribuiu ao tamanho dos poros do biomaterial utilizado. Estudos encontraram que *scaffolds* devem apresentar estrutura tridimensional e proporcionar uma grande área de superfície interna para a osteocondução efetiva<sup>7,24,25</sup>.

O tamanho dos poros dos biomateriais é um dos temas mais controversos ainda na linha de estudo de bioregeneração óssea<sup>26</sup>, pois autores já identificaram que poros diminutos dos biomateriais (até 50 $\mu$ m) e poros substancialmente grandes (500 $\mu$ m) apresentaram efeitos positivos de neoformação tecidual<sup>24,25</sup>. Munhoz<sup>20</sup> apresenta que resultados interessantes vêm sendo identificados em estudos que utilizaram *scaffolds* constituídos por diferentes poros. Outro aspecto altamente relevante identificado nos estudos é a possibilidade de realizar modificações estruturais das matrizes poliméricas que melhorem a sua bioatividade, tais como a hidrólise alcalina<sup>7</sup>. Este processo é capaz de melhorar a superfície e o tamanho dos poros das membranas, aumentando assim a capacidade de suporte para o crescimento e proliferação óssea e vascular essencial para o reparo da lesão.

Observou-se que membranas de colágeno tratadas em hidrólise alcalina são consideradas ótimas para o emprego em fraturas ósseas, pois apresentam biocompatibilidade, são biodegradáveis, biorreabsorvíveis e permitem a osteocondução<sup>14</sup>. O mesmo pode ser identificado com membranas de elastina tratadas por meio deste método de modificação morfológica e estrutural do biomaterial<sup>15</sup>.

A remoção de colágeno e elastina de sítios anatômicos de *espécimes* que sejam diferentes do hospedeiro representa um avanço significativo na bioengenharia<sup>15,16,17,20</sup>. Este processo inicialmente consiste, basicamente, em remoção de tecidos porcino e bovino como tendões, pericárdio, cartilagem auricular e intestino delgado, sendo posteriormente submetidos aos processos físico-químico para remoção de todas as células, tornando um biomaterial acelularizado para que não promova reação imunológica ao implantar no tecido receptor, geralmente, em ratos dos experimentos<sup>16,20</sup>.

O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular<sup>20-28</sup>, sendo constituído basicamente por três cadeias denominadas de  $\alpha$ , organizadas de modo a parecer uma tripla-hélice



quase que na estrutura quaternária inteira desta proteína. Assim, essas cadeias são basicamente organizadas por três tipos de aminoácidos, sendo a glicina o mais frequente e a hidroxiprolina e prolina os outros dois. Observa-se que a hidroxiprolina presente na constituição do colágeno é glicosilada durante a formação da proteína, fato que confere ao colágeno um tamanho ideal e uma capacidade funcional ideal ao tecido no qual ele se encontra<sup>28</sup>. Outro biomaterial polimérico descrito amplamente na literatura e com potencialidades para a regeneração óssea é a elastina<sup>7-9</sup>, uma proteína de função estrutural com dimensões reduzidas quando comparada ao colágeno<sup>14</sup>. Sua presença é comum no pavilhão da orelha externa, no meato acústico externo e nas cartilagens da laringe (aritenóidea, corniculada, cricóidea e tireóidea)<sup>15</sup>. A principal propriedade física da elastina é sua capacidade elástica, ou seja, de retornar ao estado original antes da aplicação de uma força tensional ou de tração. O desenvolvimento das membranas de elastina é bastante semelhante ao desenvolvimento descrito para as

membranas de colágeno. Todavia, os estudos consultados utilizaram de modo frequente cartilagens auriculares bovinas para o isolamento da elastina<sup>14,15</sup> com efeitos satisfatórios no processo de regeneração óssea.

Nesta revisão observou-se também uma discussão importante sobre o processo de regeneração óssea em relação ao tamanho crítico da lesão óssea experimental, sendo diferente nos ossos de origem endocronal tais como o fêmur<sup>13,14,19,20</sup> e a tíbia<sup>13</sup> quando comparado aqueles de desenvolvimento intramembranoso como o crânio<sup>15-18</sup>. Em comum a essas pesquisas, a espécie *Rattus norvegicus var albinus* está devidamente padronizada para o modelo de estudo do reparo ósseo<sup>13-20</sup>.

## Conclusão

Os achados dessa revisão indicaram que todas os produtos citados são promissores na medicina regenerativa e com indicação na ortopedia. Entretanto, o tratamento de lesões com perda acentuada de tecido ósseo ainda continua sendo um desafio para a engenharia tecidual.

## Referências

1. Wei G, Yang L, Jingwen H, Feng H, Zhou D, Zengming X. Treatment strategy of unstable atlas fracture: A retrospective study of 21 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(18): e20153.
2. Wiratnaya I, Eka G, Susila I, Wayan Restu B, Sindhughosa DA. Tuberculous Osteomyelitis Mimicking a Lytic Bone Tumor: Report of Two Cases and Literature Review. *Rev. Bra. Ortop.* 2019; 54(6): 731-735.
3. Soares CBG, Araújo ID, Pádua BJ, Vilela JCS, Souza RHR, Teixeira LEM. Pathological fracture after radiotherapy: systematic review of literature. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1992; 65(6).
4. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*. 2007; 38: 2-7.
5. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011; 42(2): 16-21.
6. Mauffrey C, Seligson D, Lichte P, Pape HC, AlRayyan M. Bone graft substitutes for articular support and metaphyseal comminution: what are the options? *Injury*. 2011; 42: S35-S39
7. Velasco MA, Narváez-Tovar CA, Garzón-Alvarado DA. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Research International*. 2015; 2015: 1-21.
8. Tang Y, Wu C, Wu Z, Hu L, Zhang W, Zhao K. Fabrication and in vitro biological properties of piezoelectric bioceramics for bone regeneration. *Sci Rep* 2017; 7(43360).
9. Sophyan I, Mel M, Ramesh S, Khalid KA. Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2007; 8(1-2):116-123.
10. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 2017; 2: 224-247.
11. Pobloth AM, Johnson KA, Schell H, Kolarczik N, Wulsten D, Duda GN, et al. Establishment of a preclinical ovine screening model for the investigation of bone tissue engineering strategies in cancellous and cortical bone defects. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 17: 1-12.
12. Sohn HS, Oh JK. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res*. 2019; 23: 4-10.
13. Cardoso GBC, Chacon EL, Maia LR, Zavaglia AC, Cunha MR. The importance of understanding differences in a critical size model: a preliminary in vivo study using

- tibial and parietal bone to evaluate the reaction with different biomaterials. *Materials Research*. 2019; 22(1): e20180491.
14. dos Santos DA, Plepis AMG, Martins VCA, Cardoso GBC, Santos Jr AR, Iatecola A, et al. Effects of the combination of low-level laser therapy and anionic polymer membranes on bone repair. *Lasers in Medical Science*. 2019; 16.
  15. de Moraes R, Plepis AMdG, Martins VdCA, Duarte MAH, Alcade MP, Buchain RL, et al. Suitability of the use of an elastin matrix combined with bone morphogenetic protein for the repair of cranial defects. *Am. J. Transl. Res*. 2019; 11(8): 5261-5271.
  16. Pettian MS, Plepis AMG, Martins VCA, dos Santos GR, Pinto CAL, Galdeano WA, et al. Use of an anionic collagen matrix made from bovine intestinal serosa for in vivo repair of cranial defects. *PLoS ONE*. 2018; 13(7): e0197806.
  17. Cunha MR, Alves MC, Calegari ARA, Iatecola A, Galdeano EA, Galdeano TL, et al. In vivo study of the osteoregenerative potential of polymer membranes consisting of chitosan and carbon nanotubes. *Materials Research*. 2017; 20(3): 819-825.
  18. Hirata HH, Munhoz MA, Plepis AM, Martins VC, Santos GR, Galdeano EA, Cunha MR. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats. *Injury*. 2015; 46(7): 1215-1222.
  19. Franco GR, Laraia IO, Maciel AAW, Miguel NM, dos Santos GR, Frabrega-Carvalho CA, et al. Effects of chronic passive smoking on the regeneration of rat femoral defects filled with hydroxyapatite and stimulated by laser therapy. *Injury*. 2013; 44: 908-913.
  20. Munhoz MdAeS, Pomini KT, Plepis AMdG, Martins VdCA, Machado EG, de Moraes R, et al. Elastin-derived scaffolding associated or not with bone morphogenetic protein (BMP) or hydroxyapatite (HA) in the repair process of metaphyseal bone defects. *PLoS ONE*. 2020; 15 (4):e0231112.
  21. Tampieri A, Sprio S, Sandri M, Valentini F. Mimicking natural bio-mineralization processes: A new tool for osteochondral scaffold development. *Trends Biotechnol*. 2011; 29: 526-535.
  22. Mantripragada V, Jayasuriya A. Bone regeneration using injectable BMP-7 loaded chitosan microparticles in rat femoral defect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 63: 596-60
  23. Schindeler A, Mills RJ, Bobyn JD, Little DG. Preclinical models for orthopedic research and bone tissue engineering. *J Orthop Res*. 2018; 36: 832-840.

24. Chen F, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci.* 2016; 53: 86-168.
25. Bolaños MAC, Buttigieg J, Triana JCB. Development and characterization of a novel porous small intestine submucosa-hydroxyapatite scaffold for bone regeneration. *Materials Science and Engineering* 2017; C(72): 519-525.
26. da Luz Moreira P, Genari SC, Goissis G, Galembeck F, An YH, Santos AR Jr. Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: an ultrastructural and immunocytochemical study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013; 101(1): 18.
27. Billström GH, Blom AW, Larsson S, Beswick AD. Application of scaffolds for bone regeneration strategies: current trends and future directions. *Injury.* 2013; 44: S28-S33.
28. Miguel FB, Barbosa Júnior Ade A, de Paula FL, Barreto IC, Goissis G, Rosa FP. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2013; 24: 2567-2575.