

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS EM TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Data de aceite: 03/07/2023

Amanda dos Santos Cavalcanti

Unidade de Pesquisa Experimental em Ortopedia, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0002-8792-7524

Pablo Corrêa Costa de Almeida

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0009-0006-0684-8960

João Antônio Matheus Guimarães

Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ
ORCID 0000-0002-4088-044X

(Figura 1). Neste capítulo, vamos abordar de forma geral algumas dessas patologias e detalharemos os cuidados com os animais no dia a dia da Unidade de Pesquisa Experimental em Ortopedia do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, hospital referência nacional para ortopedia e traumatologia do Ministério da Saúde (Brasil).

1 | USO DE MODELOS ANIMAIS EM ORTOPEDIA

A pesquisa pré-clínica na área de Traumatologia e Ortopedia se baseia em biomodelos que mimetizam as situações clínicas. As principais patologias ósseas modeladas em animais são osteoporose, tumores ósseos, lesões na cartilagem, osteomielite e infecções associadas a implantes e fraturas e perdas e ósseas

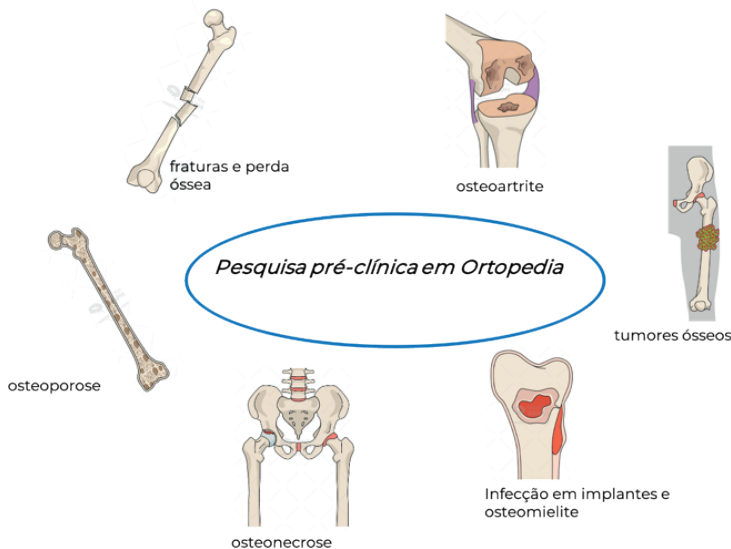


Figura 1. Principais patologias e condições clínicas da Ortopedia e Traumatologia modeladas em animais.

Fonte: Esquema criado pelos autores com www.mindthegraph.com

1.1 Fraturas e perda óssea

Na cirurgia ortopédica, os defeitos segmentares críticos são abordados com as técnicas de distração osteogênica ou o transporte ósseo interno com fixador externo, com o uso de enxertos ósseos vascularizados e por meio da técnica da membrana induzida descrita por Alain Masquelet (MASQUELET; BEGUE, 2010). Com a modelagem em animais de laboratório, é possível reproduzir situações para testes de novos biomateriais para substituir o uso de enxertos autólogos e a técnica da membrana induzida.

São diversas as situações em que é necessário o uso de enxerto ósseo autólogo, não só para reposição de perdas ósseas extensas, como também para indução da consolidação óssea em fraturas, pseudoartroses, artodeses vertebrais, dentre outras. Classicamente, para ocorrer a regeneração óssea, são necessários três componentes: osteoindução, osteocondução e osteogênese. Os substitutos ósseos em si oferecem boa osteocondução, mas a osteogênese e osteoindução são alcançadas mediante estímulo biológico. Apesar de o enxerto ósseo autólogo ser considerado o padrão-ouro, sua obtenção é um procedimento cirúrgico que apresenta limitações, como complicações no sítio doador como infecção, formação de seroma, hematoma, dor crônica, instabilidade pélvica e hérnias em até 21,8% dos pacientes (TZIOUPIS; GIANNOUDIS, 2007). Além disso, há limitação da quantidade de enxerto e o aumento do tempo cirúrgico para obtê-lo. Desta forma, o desenvolvimento de substitutos ósseos sintéticos, bem como de tecnologias da medicina regenerativa, são objetos de intensa investigação com o intuito de substituir o uso enxerto ósseo autólogo.

Para tanto, testes *in vivo* são realizados em modelos animais de perda óssea.

A mimetização da perda óssea depende da criação de um defeito de “tamanho crítico”, ou seja, aquele que, apesar da estabilização cirúrgica, não cicatriza espontaneamente e requer intervenção cirúrgica adicional. Os principais modelos animais aplicados nessa área do conhecimento/de pesquisa são o defeito em calvária, os defeitos ósseos segmentares e o defeito cortical parcial.

Os defeitos ósseos segmentares e em calvária são os mais amplamente descritos e usados na literatura. A regeneração de ossos da calvária é, em muitas situações, um desafio na medicina (RAY *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2018). Fraturas de crânio derivadas de quedas, acidentes automobilísticos e outras etiologias estão presentes entre 30% e 70% de todos os traumas envolvendo adultos (SITTITAVORNWONG; MORLANDT, 2013). Além disso, defeitos segmentares no crânio podem resultar, ainda, de procedimentos cirúrgicos como craniotomias e craniectomias de descompressão em pacientes que tiveram aumento da pressão intracraniana (ALKHAIBARY *et al.*, 2020). Esse contexto direciona os esforços para a busca de estratégias que acelerem o processo de regeneração óssea. O defeito em calvária consiste na criação de uma incisão circular na calvária – mais comumente no osso parietal - abrangendo toda a profundidade do osso. O tamanho de defeito crítico varia com a espécie e localização do defeito (Figura 2).

Na nossa prática, realizamos a criação do defeito usando uma broca trefina com irrigação salina para prevenir danos ao osso hospedeiro circundante. Senos e Hankenson refinaram o tradicional modelo realizado com broca manual, substituindo-o pelo uso de equipamento piezoelétrico (Piezosurgery® GP, Mectron Medical Technology, Carasco, Itália), reduzindo drasticamente as complicações advindas do modelo original (SENOS; HANKENSON, 2020). O disco ósseo excisado é removido cuidadosamente para evitar danos à dura-máter. O substituto a ser testado é colocado no defeito e o periósteo é, então, reposicionado e o retalho de pele sobrejacente é fechado com suturas. Esse modelo é utilizado como prova de conceito da capacidade de indução da regeneração óssea de novos substitutos após os testes *in vitro*.

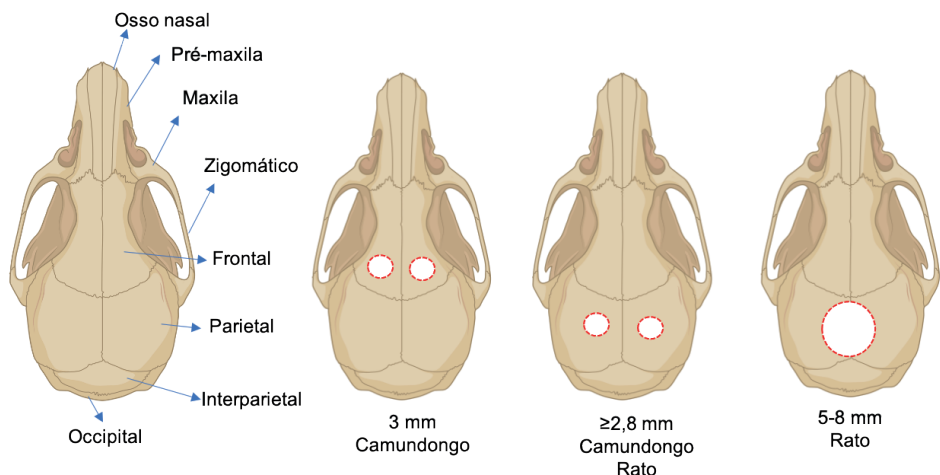


Figura 2. Criação de defeito calvária em ratos e camundongos.

Fonte: Esquema criado pelos autores em www.BioRender.com

Os defeitos segmentares em ossos longos consistem na criação de um defeito de tamanho crítico (CSD, do inglês *critical-sized defect*), usando uma abordagem de osteotomia em que uma broca ou serra é usada para remover o segmento necessário de um local predeterminado no osso (Figura 3). Em ossos longos, é geralmente aceito que o tamanho do defeito deve ser de 2 a 2,5 vezes o diâmetro do osso longo (LINDSEY *et al.*, 2006). No entanto, um CSD não é apenas determinado por seu tamanho, mas também por outros fatores, como a idade e espécie do animal, o defeito da localização, estrutura óssea, presença do periósteo, carga aplicada e a condição metabólica e sistêmica do animal, bem como pelo dispositivo de fixação usado para estabilizar o osso defeito e para permitir um retorno precoce à mobilidade (GLATT; MATTHYS, 2014).

Em nosso laboratório, estabelecemos modelo com fixação rígida com placa posicionada na face cranial do fêmur; a placa é fixada com parafusos bloqueados, o que provê uma boa estabilização mecânica. Uma vez fixada a placa, é realizada a osteotomia para criação do defeito crítico no terço médio da diáfise femoral de 5 mm em ratos e de 2,5mm em camundongos.

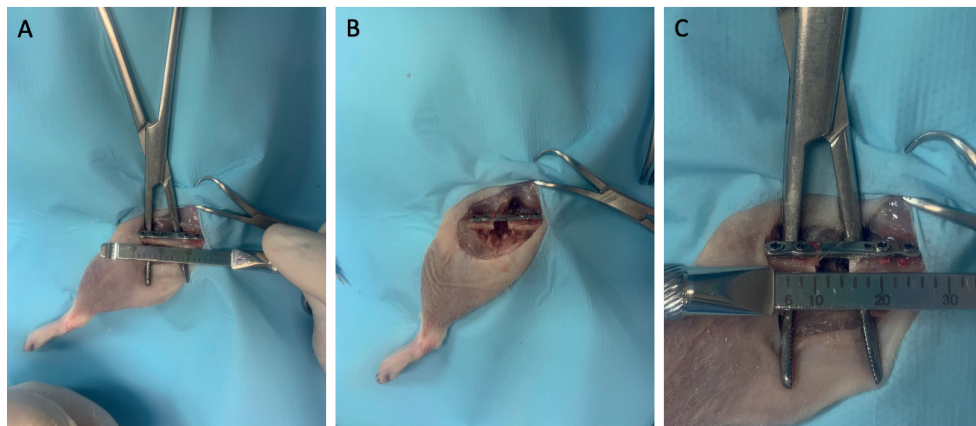


Figura 3. Modelo de defeito crítico segmentar realizado na Unidade de Pesquisa Experimental do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia. (A) Fixação da placa com parafusos bloqueados em fêmur de rato. (B) Criação do defeito de tamanho crítico. (C) Mensuração do defeito.

Fonte: Acervo INTO.

No modelo de defeito parcial, um orifício incompleto é perfurado na lateral do osso para criar uma área para colocação do substituto teste. O orifício geralmente penetra no osso cortical e pode se estender até o osso esponjoso subjacente ou a cavidade da medula óssea. Nesse modelo, geralmente apenas um lado do osso é usado e é aplicado para avaliação de materiais sem a necessidade de material de síntese (placas e parafusos) em ossos longos, que são modelos mais adequados para o tipo de ossificação que ocorre em membros em humanos (MCGOVERN; GRIFFIN; HUTMACHER, 2018).

Já para a mimetização da técnica da membrana induzida, após a ressecção da porção central da diáfise do fêmur, criamos o defeito crítico seguido da fixação com haste intramedular e preenchimento do defeito com espaçador de cimento ósseo. Após seis semanas do procedimento cirúrgico, há a formação da membrana induzida semelhante à observada em humanos (GUIMARÃES *et al.*, 2023, no prelo).

1.2 Osteoporose

A Osteoporose é uma doença silenciosa, de difícil diagnóstico e que, conjuntamente a outros fatores, aumenta o risco de fraturas e necessidade de procedimentos cirúrgicos. Fraturas osteoporóticas são de difícil resolução clínica, resultando em altos índices de morbidade e mortalidade. A doença é a causa mais comum de fraturas vertebrais causadas por traumas de baixa energia, as chamadas fraturas osteoporóticas ou fraturas por fragilidade óssea (TOMÉ-BERMEJO; PIÑERA; ALVAREZ-GALOVICH, 2017).

Uma gama de intervenções farmacológicas tem se mostrado relevante para a redução do risco de fraturas em mulheres na pós-menopausa com osteoporose, todas objetivando

reduzir a reabsorção óssea. Porém, muitas vezes a osteoporose é identificada durante exames médicos de avaliação de uma fratura já ocorrida. O uso de modelos experimentais animais permite não só a elucidação dos mecanismos patológicos dessa doença, como também o estudo de agentes farmacológicos para seu tratamento (LELOVAS *et al.*, 2008).

O modelo animal de osteoporose em ratas induzido por ooforectomia (remoção dos ovários) é um modelo consolidado, reprodutível e amplamente estudado, sendo o modelo animal de osteoporose mais frequentemente utilizado (OHEIM *et al.*, 2016). Esse modelo mimetiza o efeito da privação do estrogênio sobre o tecido ósseo, reproduzindo as alterações ósseas observadas na menopausa e na ooforectomia em mulheres. Tal modelo utiliza ratas com maturidade sexual e esquelética que respondem de forma adequada à depleção de estrogênio, causada pela remoção dos ovários, manifestando as alterações ósseas decorrentes dessa depleção em aproximadamente 1 mês (BONUCCI; BALLANTI, 2014).

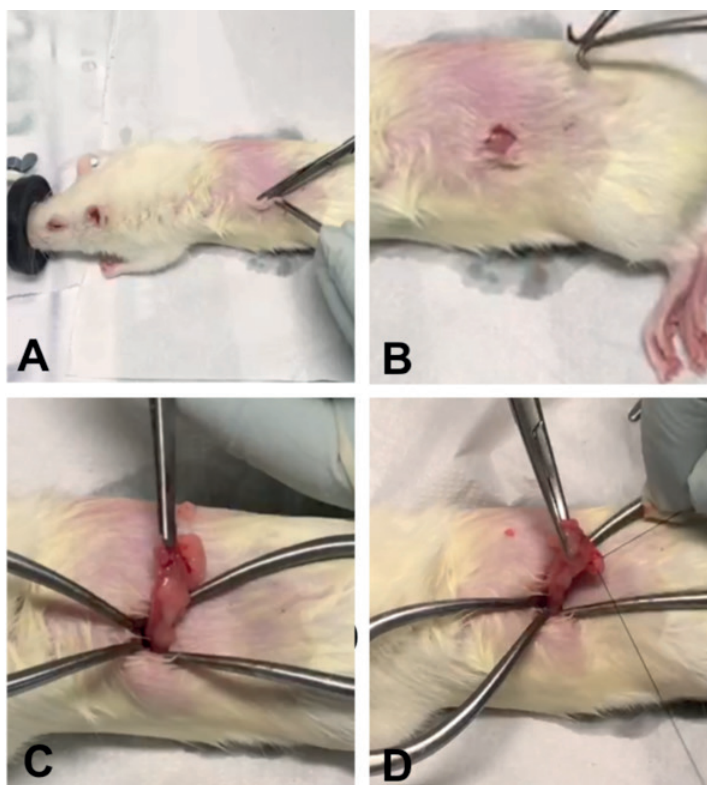


Figura 4. Ooforectomia em ratas. (A) Rata sob anestesia inalatória posicionada para ooforectomia. (B) Acesso, plano subcutâneo e visualização de musculatura. (C) Exposição do ovário e tuba uterina. (D) Ligadura e exérese do ovário.

Fonte: Acervo INTO.

1.3 Tumores ósseos

Na pesquisa oncológica translacional, os biomodelos são a principal ferramenta para ampliar o conhecimento sobre as neoplasias malignas. Eles são a base de estudos pré-clínicos com alvo no desenvolvimento racional de novas estratégias terapêuticas e sua validação antes da fase de ensaio clínico. A maior parte dos relatos em biomodelos de sarcomas ósseos deriva de experimentos realizados com células de tumores humanos expandidas *in vitro*. Contudo, há diversas limitações, como o baixo controle das condições experimentais, que resulta na contaminação das culturas com outras subpopulações celulares, e seleção de clones tumorais específicos nas passagens, com a consequente perda das propriedades biológicas intrínsecas do tumor (ARLETT, 2001; GILLET *et al.*, 2011).

Os modelos de tumor de xenoenxerto derivado do paciente (PDX, do inglês *patient-derived xenograft*) são obtidos por meio do transplante de fragmentos integrais de tumores humanos em animais imunodeficientes, sem expansão prévia das células neoplásicas. São considerados os modelos pré ou paraclínicos mais confiáveis pelo potencial em manter a heterogeneidade da população celular e as características moleculares do tumor original (TENTLER *et al.*, 2012). Dessa forma, é imperativo usar modelos que reproduzam com precisão o padrão e a biologia do crescimento do tumor humano (SAYLES *et al.*, 2019). O conjunto dessas características confere aos PDXs importância única para desenvolver novas estratégias terapêuticas e como ser utilizado como ferramenta preditora de resultados clínicos (HE *et al.*, 2019; HIGUCHI *et al.*, 2019). Por representar fielmente a heterogeneidade intra e intertumoral, o cenário pré-clínico de maior relevância para os PDXs são os testes com novos medicamentos.

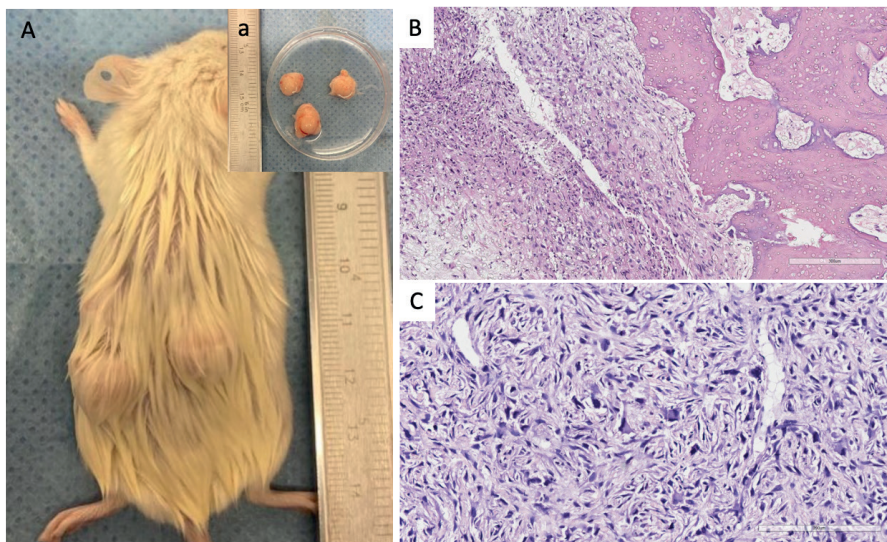


Figura 5. Modelo de tumor de xenoenxerto derivado do paciente (*Patient-derived xenograft* ou PDX). (A) Animal com fragmentos tumorais no tecido subcutâneo (modelo heterotópico). (a) Coleta dos tumores após eutanásia. (B) Aspecto microscópico do tumor parental (do paciente) evidenciando o subtipo histológico osteossarcoma clássico central caracterizado pela proliferação de células malignas pleomórficas e produção de matriz osteóide. (C) O pleomorfismo celular foi mantido até a segunda passagem no PDX.

Fonte: Acervo INTO.

2 | PRINCIPAIS ASPECTOS QUE IMPACTAM O BEM-ESTAR ANIMAL EM MODELOS ORTOPÉDICOS

Na maioria dos modelos citados, os pontos que mais preocupam e impactam o bem-estar animal são o procedimento cirúrgico em si e a necessidade de isolamento dos animais após o procedimento. Para minimizar o impacto desses procedimentos, alguns aspectos devem ser considerados antes, durante e após os procedimentos, para o correto planejamento experimental e controle das condições experimentais.

2.1 Planejamento experimental

Nosso planejamento experimental começa na elaboração do formulário para submissão na Comissão de Ética do uso de Animais do instituto. Um dos aspectos é o planejamento amostral considerando o desfecho e destino das amostras que serão coletadas e analisadas (Figura 6), principalmente quando não forem possíveis duas análises na mesma amostra.

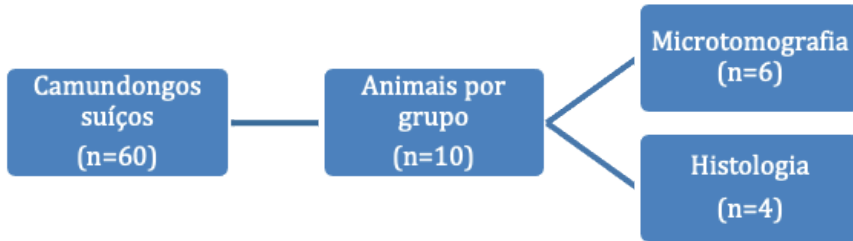


Figura 6. Exemplo do planejamento das análises experimentais após os procedimentos.

Fonte: Acervo INTO.

Procuramos, também, elaborar o cálculo amostral com base em estudos anteriores do grupo, ou mesmo em estudos que analisem o mesmo desfecho de interesse. A título de exemplo, em estudo do nosso grupo para estabelecimento de tumores derivados de pacientes e posterior análise de marcadores de resistência quimioterápica, consideramos o desfecho de crescimento tumoral. Segundo a experiência prévia do grupo (MEOHAS *et al.*, 2019; FORTUNA-COSTA *et al.*, 2020), cerca de 40% das amostras de osteossarcoma enxertadas em camundongos se desenvolvem no animal. Assim, esses tumores podem ser repassados a novos animais. Para conseguirmos dez amostras para as análises subsequentes (expressão proteica e expressão gênica), calculamos a necessidade de coletar 25 amostras parentais de osteossarcoma e enxertar em 50 animais (2 animais com fragmentos do mesmo paciente) com taxa de sucesso de 40% (Figura 7).

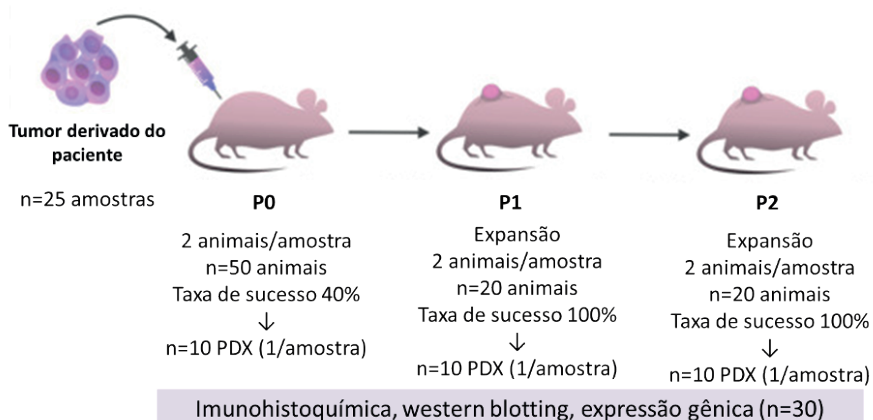


Figura 7. Exemplo de planejamento experimental e cálculo amostral para estabelecimento de modelo de tumor derivado de paciente (PDX).

Fonte: Acervo INTO.

Em outro estudo, em que pretendemos avaliar a regeneração óssea de um novo biomaterial em modelo de defeito crítico em calvária, consideramos os resultados prévios de um estudo anterior. Desta forma, obtivemos os dados do desfecho principal - volume ósseo sobre volume total do tecido (BV/TV) - e aplicamos os valores de média e desvio padrão dos grupos controle e tratado nesse experimento anterior no site *Overview of Power and Sample Size.com Calculators*¹ para análise de dados quantitativos por ANOVA, e obtivemos o resultado de seis animais por grupo para avaliação do volume ósseo por microtomografia com poder de 80% e erro alpha 0,05 (Figura 8).

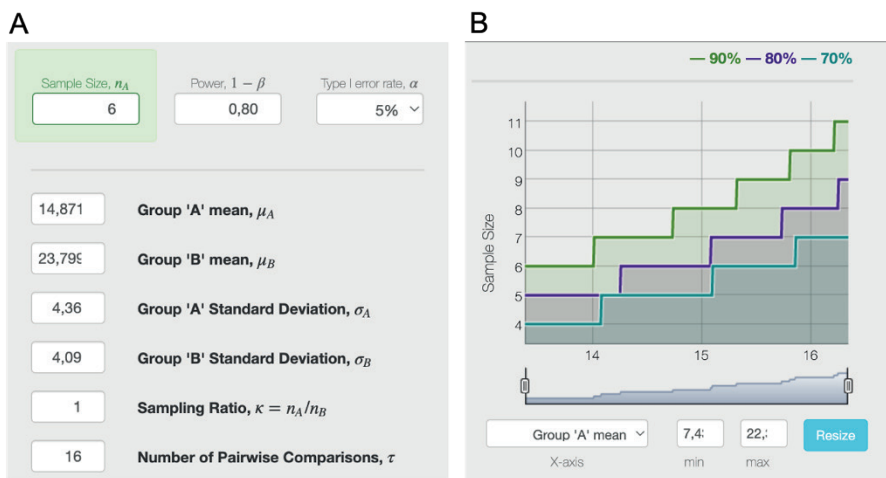


Figura 8. Resultado do cálculo amostral realizado com base em dados anteriores do grupo para o desfecho volume ósseo.

Fonte: *Print* de tela do cálculo amostral realizado no site *Overview of Power and Sample Size.com Calculators*.

Planejamento (Figura 9) e randomização também são fatores que devem ser considerados. Não apenas a randomização de grupos, mas também a randomização das gaiolas/mini-isoladores na estante/rack durante o experimento e para a mensuração de desfechos não terminais. Para tal, o bioterista deve ser orientado e treinado de forma que compreenda a importância dessa prática.

¹ <http://powerandsamplesize.com/Calculators/>

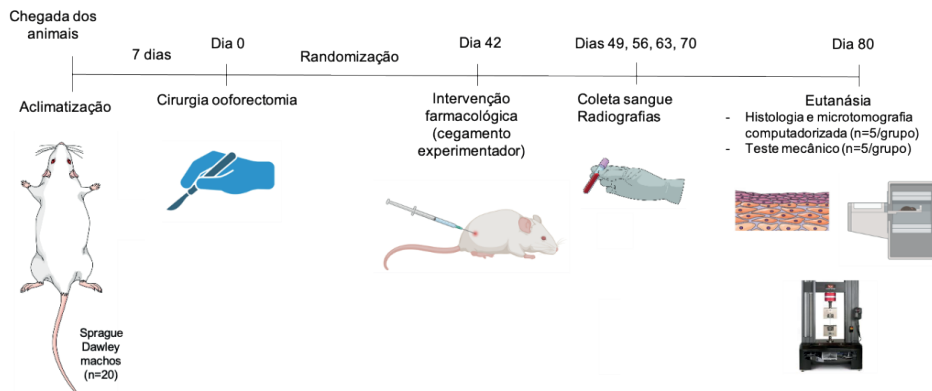


Figura 9. Fluxograma de planejamento de um estudo com ratas ovariectomizadas para teste de fármacos

Fonte: Esquema criado em www.BioRender.com

2.2 Aspectos pré e intraoperatórios

O melhor controle dos aspectos pré e intraoperatórios é o refinamento das técnicas, resultando na minimização do impacto no bem-estar animal. Na nossa prática, buscamos controlar os fatores desde o recebimento dos animais. Ao serem recebidos no INTO, os camundongos são mantidos em grupos de até cinco animais em racks ventiladas com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade média de 70% e ciclos de luz de 12 horas dia/noite por um período mínimo de sete dias para adaptação ao ambiente e à rotina do novo biotério. Para ratos, mantemos em estantes ventiladas com até três animais por caixa. Se forem animais com mais de 350g, mantemos em grupos de dois. Enriquecimento ambiental é fornecido aos animais com rolinhos de papelão, palitos de madeira e sementes de girassol.

Todos os procedimentos cirúrgicos são realizados sob anestesia inalatória, iniciados em câmara de indução com concentração alveolar de isoflurano de 4 a 5%. O animal é, então, transferido para máscara facial e a manutenção é realizada com concentração de 2% a 3%. Uma vez na mesa sobre colchão térmico, é realizada analgesia preemptiva associando cetoprofeno e cloridrato de tramadol por via subcutânea ou intraperitoneal - com esquemas que variam dependendo do procedimento. Um lubrificante ocular é aplicado para prevenir a ressecção da córnea do animal. A tricotomia é realizada com creme depilatório por cerca de cinco minutos, o excesso de pelos é removido com gaze umedecida e a pele é limpa com clorexidina 10%. O campo cirúrgico é protegido por plástico estéril - quando possível, deve-se usar plástico transparente para facilitar o monitoramento respiratório (Figura 10).

transparente para facilitar monitoramento respiratório.



Figura 10. Preparo da pele e proteção do campo cirúrgico com plástico estéril

Fonte: Acervo dos autores.

A identificação dos animais é necessária para manutenção dos grupos no período pós-operatório após o tempo de isolamento. Utilizamos o sistema de identificação auricular realizado por meio de furador. A identificação dos animais é feita pelo número da gaiola e número do furo dentro de cada gaiola. Dessa forma, usamos os números 1, 2, 3, 10, 20 e 30 (Figura 11). Assim, por exemplo, os animais da gaiola 10 serão identificados como C10M1, C10M2 etc.



Figura 11. Sistema de identificação dos animais para reagrupamento na mesma gaiola após período de isolamento.

Fonte: Acervo INTO. Esquema criado pelos autores em www.BioRender.com

Ainda no período intraoperatório, o monitoramento da frequência respiratória é um parâmetro da profundidade da anestesia. Assim, realizamos monitoramento e registro dos parâmetros monitorados, conforme discriminado (Quadro 1). A frequência respiratória normal no camundongo é de 80 a 230 respirações por minuto, e a do rato, de 85. A porcentagem de isoflurano é ajustada de acordo com a contagem que deve ser realizada por um auxiliar, e não pelo cirurgião principal, de acordo com o Quadro 1 (EWALD *et al.*, 2011). Para auxiliar o monitoramento durante a cirurgia e anotar dados durante cada procedimento, elaboramos a ficha de monitoramento intraoperatório (ANEXO 1). Idealmente, a saturação de oxigênio deve ser mensurada também servindo como parâmetro de monitoramento, entretanto nem sempre o equipamento está disponível nas unidades experimentais.

Anestesia	Frequência respiratória
Ótima	~55-65 respirações por minuto
Plano anestésico muito profundo	<50 respirações por minuto
Plano anestésico muito superficial	>70 respirações por minuto

Quadro 1. Parâmetros para monitoramento intraoperatório da frequência respiratória.

2.3 Aspectos pós-operatórios e critérios de ponto final

Imediatamente após a cirurgia, cada animal é colocado isoladamente em mini-isolador ou gaiola sobre colchão térmico para observação contínua até a recuperação total da anestesia. A presença de comportamentos relevantes para a dor (espasmos, arqueamento das costas, cambalear ou cair e contorcer-se) é observada por 10 minutos após a cirurgia. Também é monitorada a ingestão de alimentos e a atividade locomotora ou exploratória. Em geral, nesse período imediato de observação não há retorno da ingestão de água ou alimentos. As caixas só retornam à estante ou mini-isolador na sala de animais quando o animal estiver totalmente acordado e ativo. Na nossa rotina, os animais são mantidos separados (isolamento social) por cinco dias para evitar arranhões e mordidas na ferida cirúrgica por outros animais. Após cinco dias, são reagrupados respeitando-se os grupamentos anteriores aos procedimentos. No reagrupamento, a continuidade da observação pelo bioterista é essencial para identificar quaisquer brigas.

No período pós-operatório não imediato, o estado de saúde animal é monitorado duas vezes ao dia durante três dias pós-operatórios, e uma vez ao dia depois disso. Os animais são pesados a cada dois ou três dias. Animais com sinais de infecção ou abscesso não intencional, letargia, dor, perda excessiva de peso (>15%) são eutanasiados. Os dados são registrados em fichas de monitoramento pós-operatório (ANEXO 2). Recomendamos

que a ficha contenha todos os espaços e critérios para preenchimento conforme planejado no projeto aprovado pela comissão de ética em um sistema semiquantitativo de avaliação, auxiliando, desta forma, a tomada de decisão para a eutanásia precoce. Nesse sistema, o escore de avaliação 3 para qualquer uma das seguintes observações clínicas: atividade, movimento / marcha, respiração, estado de alerta resulta em eutanásia precoce, bem como a perda de peso corporal igual ou superior a 20%. Para as pontuações de 2 a 3 em todos os parâmetros, é necessário tratamento veterinário imediato. A ficha de monitoramento deve ser mantida sob guarda no biotério para verificação pelo responsável técnico.

Especificamente nos modelos tumorais PDX, os animais serão acompanhados semanalmente por pelo menos seis meses. Ao longo desse período, monitoramos o peso dos animais e o volume tumoral com paquímetro $[(\text{maior eixo}^2) \times \text{menor eixo} / 2]$. O volume de 1800mm^3 é considerado ponto final humanitário. Quando, após oito meses, não apresentam volume mínimo de 200mm^3 , são considerados como insucesso de enxertia e os animais são submetidos à eutanásia. Os dados são anotados em fichas de monitoramento (ANEXO 3).

CONCLUSÕES

Embora haja muitos avanços no sentido de substituir animais na pesquisa científica, em algumas situações os modelos animais ainda são necessários. No estudo das doenças em traumatologia e ortopedia, muitos modelos são cirúrgicos, portanto, o principal aspecto que pode afetar o bem-estar é a dor. Desta forma, o planejamento pré-operatório, o monitoramento intraoperatório e pós-operatório cuidadosos, associados a um protocolo analgésico multimodal, são imperativos.

REFERÊNCIAS

ALKHAIBARY, A.; ALHARBI, A.; ALNEFAIE, N.; OQALAA ALMUBARAK, A.; ALORAIDI, A.; KHAIRY, S. Cranioplasty: A Comprehensive Review of the History, Materials, Surgical Aspects, and Complications. **World Neurosurgery**, [s. l.], v. 139, p. 445–452, 2020.

ARLETT, C. F. The use of dubious cell lines in research: is trust enough? **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 467, 2001.

BONUCCI, E.; BALLANTI, P. Osteoporosis-bone remodeling and animal models. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 957–969, 2014.

GILLET, J.-P.; CALCAGNO, A. M.; VARMA, S.; MARINO, M.; GREEN, L. J.; VORA, M. I.; PATEL, C.; ORINA, J. N.; ELISEEVA, T. A.; SINGAL, V.; PADMANABHAN, R.; DAVIDSON, B.; GANAPATHI, R.; SOOD, A. K.; RUEDA, B. R.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 46, p. 18708–18713, 2011.

GLATT, V.; MATTHYS, R. Adjustable stiffness, external fixator for the rat femur osteotomy and segmental bone defect models. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, [s. l.], n. 92, p. e51558, 2014.

GUIMARÃES, J. M.; SCORZA, B. J. B.; PERINI, J. A.; CAVALCANTI, A. S.; DUARTE, M. E. L. Caracterização da membrana induzida pela técnica de Masquelet em modelo murino de defeito ósseo segmentar. **Revista Brasileira de Ortopedia**, xx, xx, 2023. *no prelo*.

HE, C.; SUN, Z.; HOFFMAN, R. M.; YANG, Z.; JIANG, Y.; WANG, L.; HAO, Y. P-Glycoprotein Overexpression Is Associated With Cisplatin Resistance in Human Osteosarcoma. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 1711–1718, 2019.

HIGUCHI, T.; SUGISAWA, N.; MIYAKE, K.; OSHIRO, H.; YAMAMOTO, N.; HAYASHI, K.; KIMURA, H.; MIWA, S.; IGARASHI, K.; KLINE, Z.; BOUVET, M.; SINGH, S. R.; TSUCHIYA, H.; HOFFMAN, R. M. Pioglitazone, an agonist of PPAR γ , reverses doxorubicin-resistance in an osteosarcoma patient-derived orthotopic xenograft model by downregulating P-glycoprotein expression. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, [s. l.], v. 118, p. 109356, 2019.

LELOVAS, P. P.; XANTHOS, T. T.; THOMA, S. E.; LYRITIS, G. P.; DONTAS, I. A. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. **Comparative Medicine**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 424–430, 2008.

LINDSEY, R. W.; GUGALA, Z.; MILNE, E.; SUN, M.; GANNON, F. H.; LATTA, L. L. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 1438–1453, 2006.

MASQUELET, A. C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. **The Orthopedic Clinics of North America**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 27–37; table of contents, 2010.

MCGOVERN, J. A.; GRIFFIN, M.; HUTMACHER, D. W. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. **Disease Models & Mechanisms**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. dmm033084, 2018.

OHEIM, R.; SCHINKE, T.; AMLING, M.; POGODA, P. Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation? **Injury**, [s. l.], v. 47 Suppl 1, p. S3-9, 2016.

RAY, A.-C.; PHILANDRIANOS, C.; BERTRAND, B.; MÉLOT, A.; ROCHE, P.-H.; JALOUX, C.; CASANOVA, D. Two-stage free flap reconstruction of the scalp and calvaria for large neurosurgical resections. **Microsurgery**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 331–336, 2020.

SAYLES, L. C.; BREESE, M. R.; KOEHNE, A. L.; LEUNG, S. G.; LEE, A. G.; LIU, H.-Y.; SPILLINGER, A.; SHAH, A. T.; TANASA, B.; STRAESSLER, K.; HAZARD, F. K.; SPUNT, S. L.; MARINA, N.; KIM, G. E.; CHO, S.-J.; AVEDIAN, R. S.; MOHLER, D. G.; KIM, M.-O.; DUBOIS, S. G.; HAWKINS, D. S.; SWEET-CORDERO, E. A. Genome-Informed Targeted Therapy for Osteosarcoma. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 46–63, 2019.

SENOS, R.; HANKENSON, K. D. Calvaria critical-size defects in rats using piezoelectric equipment: a comparison with the classic trephine. **Injury**, [s. l.], v. 51, n. 7, p. 1509–1514, 2020.

SITTITAVORNWONG, S.; MORLANDT, A. B. P. Reconstruction of the scalp, calvarium, and frontal sinus. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 105–129, 2013.

TENTLER, J. J.; TAN, A. C.; WEEKES, C. D.; JIMENO, A.; LEONG, S.; PITTS, T. M.; ARCAROLI, J. J.; MESSERSMITH, W. A.; ECKHARDT, S. G. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 338–350, 2012.

TIAN, T.; ZHANG, T.; LIN, Y.; CAI, X. Vascularization in Craniofacial Bone Tissue Engineering. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 97, n. 9, p. 969–976, 2018.

TOMÉ-BERMEJO, F.; PIÑERA, A. R.; ALVAREZ-GALOVICH, L. Osteoporosis and the Management of Spinal Degenerative Disease (I). **The Archives of Bone and Joint Surgery**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 272–282, 2017.

TZIOUPIS, C.; GIANNOUDIS, P. V. Prevalence of long-bone non-unions. **Injury**, [s. l.], v. 38 Suppl 2, p. S3-9, 2007.