

**AMANDA PEREIRA DOS ANJOS**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MEMBRANA SINTÉTICA NA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Emily Correna Carlo Reis

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A599d  
2021 Anjos, Amanda Pereira dos, 1992-  
Desenvolvimento de uma membrana sintética na  
regeneração óssea / Amanda Pereira dos Anjos. – Viçosa, MG,  
2021.

1 tese eletrônica (88 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Emily Correna Carlo Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 73-88.

DOI: <https://doi.org/1047328/ufvbbt.2021.110>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ossos - Regeneração. 2. Materiais Biocompatíveis.  
3. Engenharia Tecidual. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em  
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.089715

Bibliotecário(a) responsável: Fabio Jaderson Miguel Reis CRB-6/3030

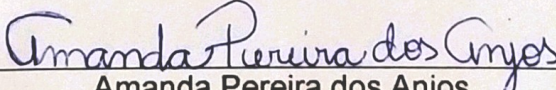
AMANDA PEREIRA DOS ANJOS

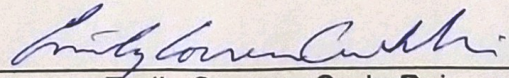
DESENVOLVIMENTO DE UMA MEMBRANA SINTÉTICA NA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de agosto de 2021.

Assentimento:

  
Amanda Pereira dos Anjos  
Autora

  
Emily Correna Carlo Reis  
Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a DEUS, por sempre guiar meus caminhos.

À minha família por estar sempre me apoiando, dando força e incentivo.

À minha mãe, Vanuza, que é a razão do meu viver e existir, Amo você.

Ao meu namorado, Higor, por todo amor, apoio e companheirismo.

As minhas queridas amigas Denise Miranda e Ingrid Castilho, que mesmo distantes se fizeram presente me apoiando e incentivando nessa caminhada.

Aos meus colegas de trabalho, Fernanda, Aline, Paulo Henrique e Gabriela. Sem vocês este trabalho não seria possível.

A Mariá, por toda ajuda durante o cultivo celular.

Agradeço a minha orientadora, Professora Emily Correna Carlo Reis, por ter aceitado o convite em me orientar, pela dedicação, paciência, por contribuir grandiosamente para a realização do experimento e para meu crescimento profissional. Sou eternamente grata.

Agradeço aos meus coorientadores, Professora Andréia e Professor Fabrício, pela coorientação e contribuir para a realização do experimento.

À JHS laboratório químico e a Dra Sheyla Maria de Castro Máximo pela confiança e parceria desse experimento.

Ao Professor Maurício Fontes do Departamento de Solos-UFV, por tornar possível à difração de raios-x e ao Arthur por me auxiliar na análise.

Ao Professor Guilherme Jorge pela parceria nas análises de microtomografia-UFOP

Aos colaboradores Cláudio e Adão, imprescindíveis no processamento histológico.

Ao técnico José Francisco da Silva (Juquinha) do departamento de zootecnia-UFV, por todo ensinamentos e disponibilidade.

À técnica Cristiane do Carmo, e ao núcleo de microscopia e microanálise-UFV.

Aos estagiários e alunos de iniciação científica, pela ajuda no trabalho.

Agradeço também a todos os professores e funcionários do Departamento de Veterinária da UFV pela amizade e pelo auxílio na minha formação profissional.

A Universidade Federal de Viçosa, pelo curso de doutorado oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

DOS ANJOS, Amanda Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2021. **Desenvolvimento de uma membrana sintética na regeneração óssea.** Orientador: Emily Correna Carlo Reis.

Os reparos de perdas ósseas, como no caso de fraturas, representam um desafio na rotina cirúrgica ortopédica, uma vez que exige o desenvolvimento de sistemas que contribuem para promoção da regeneração do tecido perdido, permitindo o completo retorno à função. A utilização de enxertos autógenos e alógenos é uma alternativa de tratamento para essas situações, entretanto existem os riscos de infecções cirúrgicas, dificuldade para reposicionamento do animal no trans-cirúrgico, da dor pós-operatória, e a quantidade do material coletado, na maioria das vezes, torna-se insuficiente para realização do procedimento. Por isso, as pesquisas e novos métodos, como a engenharia de tecidos ósseos e medicina regenerativa, visam aumentar sua disponibilidade, reduzir o tempo de recuperação, os custos relacionados e melhorar a regeneração tecidual. Neste contexto, as terapias com biomateriais sintéticos e biodegradáveis como biocerâmicas e polímeros demonstram um grande potencial para a regeneração óssea. Entretanto, existe um grande desafio ao se combinar diferentes materiais a fim de obter a interação desses com o meio biológico e minimizar reações indesejáveis, adequando o tempo de degradação e a taxa de crescimento tecidual no local de implantação. Além da combinação adequada dos materiais, o método de processamento para a obtenção de matrizes porosas é importante. Os materiais de fosfato de cálcio são comumente usados na engenharia de tecidos ósseos, e desses materiais, a hidroxiapatita (HAP) é frequentemente usada, pois é o principal componente dos ossos, com capacidade osseocondutora. Já a policaprolactona (PCL) é um dos polímeros mais atraentes para regeneração óssea, com excelentes propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Dessa forma, pretendeu-se com esse trabalho realizar três capítulos: O primeiro que é avaliar a influência dos tipos de tratamentos e fatores predisponentes a complicações na consolidação de fraturas de rádio e ulna em cães por meio de uma revisão sistemática; O segundo, obter o perfil epidemiológico de cães com fraturas de rádio e ulna atendidos no hospital veterinário-ufv; e por último, desenvolver e caracterizar uma membrana de

hidroxiapatita e policaprolactona e analisar sua utilização na regeneração óssea em modelo experimental de ostectomia de rádio em coelhos.

Palavras-chave: Medicina Regenerativa. Engenharia de Tecidos. Biomateriais.

## ABSTRACT

DOS ANJOS, Amanda Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2021.  
**Development of a synthetic membrane in bone regeneration.** Adviser: Emily Correna Carlo Reis.

The repair of bone loss represent a challenge in the orthopedic surgical routine, as it requires the development of systems that contribute to promoting the regeneration lost tissue, allowing complete return to function. The use of autogenous and allogeneic grafts is an alternative treatment for these situations, however there are risks of surgical infections, difficulty in repositioning the animal in the trans-surgical period, postoperative pain, and the amount of material collected in most cases becomes insufficient to perform the procedure. Therefore, research and new methods, such as bone tissue engineering and regenerative medicine, aim to increase its availability, reduce recovery time, related costs and improve tissue regeneration. In this context, therapies with synthetic and biodegradable biomaterials such as bioceramics and polymers demonstrate a great potential for bone regeneration. However, there is a major challenge by combining different materials in order to get (to obtain) their interaction with the biological environment and minimize undesirable reactions, adjusting the degradation time and tissue growth rate at the implantation site. In addition to the appropriate combination of materials, the processing method for obtaining porous matrices is important. Calcium phosphate materials are commonly used in bone tissue engineering, and of these materials, hydroxyapatite (HAP) is often used as it is the main component of bone with an osteoconductive capacity. Polycaprolactone (PCL) is one of the most attractive polymers for bone regeneration, with excellent mechanical properties, good biocompatibility and biodegradability. Thus, this work intended to carry out three chapters: The first is to assess the influence of types of treatments and predisposing factors to complications in the healing of fractures of the radius and ulna in dogs through a systematic review; The second is to obtain the epidemiological profile of dogs with radius and ulna fractures treated at the ufv-veterinary hospital; and finally, to develop and characterize a hydroxyapatite and polycaprolactone membrane and analyze its use in bone regeneration in an experimental model of radius ostectomy in rabbits.

Keywords: Regenerative Medicina. Tissue Engineering. Biomaterials.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**I CAPÍTULO:** Influência dos tipos de tratamento e fatores predisponentes nas complicações da consolidação de fraturas de rádio e ulna em cães: revisão sistemática

Figura 1. Fluxograma de seleção dos estudos.....	20
Figura 2. Causas das fraturas de rádio e ulna em cães nos artigos selecionados.....	26
Figura 3. Complicações de fraturas de rádio e ulna em cães. ....	28

**CAPÍTULO II:** Perfil epidemiológico de cães com fraturas de rádio e ulna atendidos no Hospital Veterinário da UFV

Figura 1. Principais causas das fraturas de rádio e ulna nos cães do Hospital Veterinário da UFV.....	37
Figura 2. Raças acometidas por fraturas de rádio e ulna nos cães do Hospital Veterinário da UFV.....	38

**CAPÍTULO III:** Desenvolvimento e caracterização de membrana de hidroxiapatita e policaprolactona e sua utilização na regeneração óssea

Figura 1. Procedimento cirúrgico para realização do defeito experimental no rádio de coelho.....	52
Figura 2. Membrana de HAP e PCL.....	56
Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão e varredura da membrana de HAP-91 e PCL... ..	57
Figura 4. Difratoograma correspondente ao compósito de hidroxiapatita sintética associada a policaprolactona na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X representada pelos valores das distâncias Interplanares .....	58
Figura 5. Viabilidade celular em cultivo de linhagem contínua de Vero.....	59
Figura 6. Radiografias com projeção crânio-caudal dos grupos controle (A) e tratado com membrana de HAP-91+PCL (B) do rádio e ulna de coelhos submetidos à realização do defeito na diáfise distal do rádio.....	61

Figura 7. Densidade radiográfica média e desvio padrão obtidos na análise da região do defeito ósseo no dia 0, 30, 90 dias dos grupos HAP+PCL e controle. ....	62
Figura 8. Imagens de tomografia microcomputadorizada em secções transversais do rádio de coelhos dos grupos controle e tratado aos 90 dias .....	63
Figura 9. Reconstrução tridimensional por tomografia microcomputadorizada de duas amostras analisadas do rádio de coelho após realização do defeito segmentar e reparação por 90 dias .....	64
Figura 10. Fotomicrografia da região do defeito realizado no rádio de coelho 90 dias de pós-operatório submetidos à implantação da membrana de hidroxiapatita e policaprolactona. ....	65
Figura 11. Fotomicrografia da região do defeito realizado no rádio de coelho 90 dias de pós-operatório do grupo controle. ....	66

## LISTA DE TABELAS

**I CAPÍTULO:** Avaliação da influência dos tipos de tratamentos e fatores predisponentes a complicações na consolidação em fraturas de rádio e ulna em cães: revisão sistemática

Tabela 1. Trabalhos relacionados às fraturas de rádio e ulna em cães. ....23

**CAPÍTULO II:** Perfil epidemiológico de cães com fraturas de rádio e ulna atendidos no hospital veterinário-UFV

Tabela 1. Distribuição dos animais quanto ao gênero e idade. ....36

Tabela 2. Distribuição dos animais quanto ao peso. ....36

Tabela 3. Distribuição quanto ao tipo de fratura. ....39

**CAPÍTULO III:** Desenvolvimento e caracterização de membrana de hidroxiapatita e policaprolactona e sua utilização na regeneração óssea

Tabela 1. Média e desvio padrão (em  $\mu\text{m}$ ) do diâmetro dos poros ..... 56

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	13
CAPÍTULO I .....	15
Avaliação da influência dos tipos de tratamento e fatores predisponentes a complicações na consolidação de fraturas de rádio e ulna em cães: revisão sistemática .....	15
RESUMO.....	16
INTRODUÇÃO .....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	19
RESULTADOS .....	20
DISCUSSÃO .....	29
CONCLUSÃO.....	32
CAPÍTULO II .....	33
Perfil epidemiológico de cães com fraturas de rádio e ulna atendidos no Hospital Veterinário da UFV .....	33
RESUMO.....	34
INTRODUÇÃO .....	34
MATERIAL E MÉTODOS .....	35
RESULTADOS .....	36
DISCUSSÃO .....	39
CONCLUSÃO.....	43
CAPÍTULO III .....	44
Desenvolvimento e caracterização de membrana de hidroxiapatita e policaprolactona e sua utilização na regeneração óssea .....	44
RESUMO.....	45
INTRODUÇÃO .....	46
MATERIAL E MÉTODOS .....	48
Análise da regeneração óssea .....	50
Tomografia microcomputadorizada .....	54
Análise histológica .....	55
RESULTADOS .....	55
Desenvolvimento da membrana e estudos <i>in vitro</i> .....	55
Estudo <i>in vivo</i> .....	59
DISCUSSÃO .....	67
CONCLUSÃO.....	71

AGRADECIMENTOS .....	72
CONCLUSÕES GERAIS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, os enxertos e substitutos ósseos estão sendo frequentemente utilizados com a finalidade de favorecer a regeneração óssea (Rodella et al., 2015; (Maimaitiyiming et al., 2015) em defeitos desencadeados por qualquer tipo de lesão, como as fraturas ósseas (Moraes et al., 2004; Zhou, 2007). As fraturas ósseas são frequentemente observadas em animais de companhia, sendo que as fraturas de rádio e ulna compreendem o terceiro tipo que mais acometem os cães (Jain et al., 2018). Essas fraturas são responsáveis por altas taxas de complicações, como a não união ou união óssea retardada, principalmente em animais de pequeno porte (Kang et al., 2016), podendo dessa forma esses animais se beneficiarem de tratamentos com biomateriais.

Os biomateriais podem ser definidos como material sintético ou natural que tem capacidade de interagir com sistemas biológicos, com a função de tratar, acrescentar ou substituir qualquer tecido (Daris; Knez, 2020). São classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, o que dependerá do seu comportamento fisiológico, da sua natureza química e da sua origem, dentre outros (Chen; Thouas, 2015). Quanto a sua origem, os biomateriais podem ser autólogos ou autógenos, que são obtidos do próprio indivíduo receptor, os homólogos ou alógenos, obtidos de outro indivíduo da mesma espécie, e os heterólogos ou xenógenos, que são adquiridos de espécies diferentes (Oréfice; Pereira, Mansur, 2006), além dos biomateriais aloplásticos, que são materiais produzidos sinteticamente (Dinopoulos et al., 2012).

De todos os enxertos e substitutos ósseos disponíveis, o que apresenta maior potencial osteogênico, osteoindutor e osteoprogenitor é o autógeno, pois é obtido do próprio organismo contendo células osteoprogenitoras e fatores osteoindutores. Entretanto, a quantidade do material coletado na maioria das vezes é insuficiente para realização do enxerto, além dos maiores riscos de infecções cirúrgicas no local doador assim como a dor pós-operatória e a dificuldade para reposicionamento do animal no trans-cirúrgico (Bhatt; Rozental, 2012). Outra possibilidade são os enxertos alógenos que tem como desvantagem a possibilidade de resposta antigênica (Rodella et al., 2015) bem como maiores riscos de transmissão de doenças (Roos, Camisa Júnior e Michelin, 2000; Binte Atique; Khalil; Masudur, 2014).

Devido a essas limitações, os biomateriais sintéticos estão sendo amplamente utilizados. Estes possuem ampla disponibilidade, não incitam respostas imunológicas e não estão associados a um local doador e, portanto, não apresentam morbidade associada ao local doador ou tempo adicional de cirurgia. Dentre os biomateriais utilizados está o grupo das biocerâmicas (Vallet-Regí; Salinas, 2019), principalmente os fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita (HA). A sua ampla utilização ocorre devido à semelhança destes materiais com a fase mineral dos ossos e dentes, compostos basicamente por íons de cálcio e fosfato, que não induzem respostas a corpo estranho, inflamações, toxicidade local ou sistêmica (Kawachi, 2000; Hui; Wang, 2014). Como a HA é frágil e de difícil elaboração em diferentes formatos, sua associação com polímeros como a policaprolactona (PCL), com finalidade de obter melhores taxas de reabsorção e resistência mecânica após a implantação, têm demonstrado resultados satisfatórios na regeneração óssea (Ogueri et al., 2019; Rozila et al., 2021).

Portanto, pretendeu-se com este trabalho, estudar o processo de regeneração óssea em um modelo de fratura com perda óssea, utilizando uma membrana desenvolvida com HA e PCL. Para tal, optou-se por três capítulos. O primeiro capítulo é uma revisão sistemática avaliando a influência dos tipos de tratamento e fatores predisponentes a complicações na consolidação de fraturas de rádio e ulna em cães. Este teve por objetivo conhecer os principais fatores que predispõe fraturas às complicações na regeneração óssea. Com o segundo capítulo objetivou-se demonstrar o perfil epidemiológico de cães com fraturas de rádio e ulna atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HVT-UFV), buscando conhecer a realidade no local de execução do trabalho. O terceiro capítulo aborda a proposta de tratamento com a membrana topograficamente complexa desenvolvida com HA e PCL, com a finalidade de favorecer a regeneração óssea.

## **CAPÍTULO I**

### **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE TRATAMENTOS E FATORES PREDISPOSTOS A COMPLICAÇÕES NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DE RÁDIO E ULNA EM CÃES: REVISÃO SISTEMÁTICA**

Amanda Pereira dos Anjos et al.

## **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS TIPOS DE TRATAMENTO E FATORES PREDISPOENTES A COMPLICAÇÕES NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS DE RÁDIO E ULNA EM CÃES: REVISÃO SISTEMÁTICA**

### **RESUMO**

O objetivo com o presente estudo foi revisar sistematicamente a literatura atual sobre a avaliação da influência dos tipos de tratamentos e fatores predisponentes a complicações na consolidação em fraturas de rádio e ulna em cães. Foi realizado um levantamento bibliográfico de estudos nas bases PubMed, Scielo e Science direct. Foram incluídos os estudos com cães que apresentavam delineamento do tipo randomizado, estudo retrospectivo, estudo prospectivo ou ensaios clínicos publicados entre os anos de 2010 e 2020, estudos que apresentavam animais com fratura de rádio e/ou ulna, que relatassem tratamento e complicações de fraturas de rádio e ulna e que avaliaram a consolidação óssea de acordo com fatores mecânicos ou biológicos. Foram eliminadas revisões de literatura, relatos de casos e trabalhos com cães politraumatizados e com comorbidades. Dessa forma, treze estudos retrospectivos foram incluídos na revisão sistemática.

Observou-se que as fraturas de rádio e ulna acometem principalmente animais jovens e de pequeno porte, com localização distal, as principais fraturas são do tipo transversais e oblíquas. O tratamento de escolha em sua maioria é o cirúrgico, com utilização de fixadores externos, cerclagens ou placas. A utilização de placas demonstrou nesse estudo terem menores taxas de complicações. A localização da fratura, tipo da fratura, peso, idade do animal, fatores biomecânicos, infecção, estado geral, escolha do tratamento bem como local que o animal vive e cuidados pós-operatórios influenciarão diretamente no sucesso da consolidação óssea. Com estudos heterogêneos, não foi possível realizar meta-análise nessa revisão. Propõe-se que seja elaborada uma revisão com tratamentos homogêneos para uma melhor comparação entre os fatores predisponentes a complicações e a influência do tratamento utilizado nas fraturas de rádio e ulna.

**Palavras-chave:** osteossíntese, pequeno porte, complicações, regeneração óssea.

## INTRODUÇÃO

As fraturas de rádio e ulna são muito comuns em animais de companhia (Phillips et al., 1979; Brianza et al. 2006; Kang et al., 2016; Guiot e Guillou, 2018) sendo considerado o terceiro tipo mais frequente em cães (Jain et al., 2018), principalmente naqueles de pequeno porte (Aikawa et al., 2019). Dentre as principais causas destacam-se acidentes automobilísticos e quedas (Libardoni et al., 2016; Bierens et al., 2017).

Sabe-se que vários fatores podem influenciar o processo de consolidação óssea, sendo eles fatores associados ao paciente, à fratura e a fatores externos. Quanto àqueles associados ao paciente, pode-se citar peso (Libardoni et al., 2016; Ramírez; Macías, 2016), idade (Jain et al., 2018; Ramanauskaitė et al., 2017), estado nutricional (Minar et al., 2013) e possíveis doenças sistêmicas associadas (Karim; Bouxsein, 2016). Quanto aos associados à fratura, pode-se citar o tamanho do defeito ósseo quando existentes, a deformação relativa (strain) (Ramanauskaitė et al., 2017), o suprimento sanguíneo local, o tipo e local da fratura (Minar et al., 2013; Ramírez; Macías, 2016; Jain et al., 2018) e a presença de infecção (Hayes; Harris; Langley-hobbs, 2019). Já aqueles relacionados às condições externas estão: à qualidade da redução e estabilidade da fratura (Ramírez; Macías, 2016), interferência iatrogênica, (Manchi et al., 2017) bem como o local no qual o animal vive e os cuidados pós operatórios (Aikawa et al., 2019).

Evidências mostram que fraturas em animais de pequeno porte resultam em maiores complicações como atraso na regeneração óssea ou não união óssea, e acredita-se que isso ocorra devido principalmente à menor quantidade de tecido adjacente e reduzida vascularização (Brianza et al., 2006; Ramírez; Macías, 2016; Gilbert et al., 2017; Nelson; Strom, 2017). A consolidação óssea fica prejudicada, pois os tecidos que circundam a fratura permitem a revascularização e o suprimento sanguíneo adequado para o transporte de nutrientes, oxigênio, fatores de coagulação que contribuem diretamente no reparo da fratura (Marsell; Einhorn et al., 2011; Einhorn; Gerstenfeld et al., 2015).

Comumente, utiliza-se no tratamento cirúrgico nas fraturas de rádio e ulna os fixadores externos modificados (Bierens et al., 2017; Aikawa et al., 2019), cerclagens (Manchi et al., 2016) e placas bloqueadas como alternativa do método com placas convencionais (Barnhart; Maritato, 2018). Além disso, têm-se relatos de sucesso na

utilização de técnicas de estabilização de fraturas minimamente invasivas, pois permitem a preservação do coágulo no foco da fratura, observando-se resultados promissores no processo de consolidação (Gilbert et al., 2017; Hudson; Lewis e Pozzi, 2020; Peirone et al., 2020).

Considerando a maior dificuldade de consolidação óssea de fraturas de rádio e ulna em cães de pequeno porte e todos os fatores que podem afetar esse processo, nesse trabalho buscou-se revisar dados sobre essas fraturas. Com isso, pretendeu-se responder o seguinte questionamento: Qual a influência do tipo de tratamento na consolidação de fraturas de rádio e ulna em cães e quais os fatores que podem predispor a complicações?

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento bibliográfico de estudos nas bases PubMed, Scielo e Science direct. A partir da pergunta de pesquisa foram selecionadas as seguintes palavras booleanas para busca nas bases de dados informatizadas: (((((fracture healing) AND radius fracture) OR radial fracture) and ulna fracture) or ulna fractures) and dogs. Os artigos foram incluídos de acordo com os critérios de inclusão: (i) estudos que apresentavam delineamento do tipo randomizado, estudo retrospectivo, estudo prospectivo ou ensaio clínico publicados entre os anos de 2010 e 2020; (ii) estudos que apresentavam animais com fratura de rádio e/ou ulna; (iii) estudos que relatassem tratamento e complicações de fraturas de rádio e ulna; (iv) estudos que avaliaram a consolidação óssea de acordo com fator mecânico (estabilização) ou biológicos (células sanguíneas, mediadores inflamatórios, células osteogênicas e células de preenchimento); (v) estudos que envolvessem apenas cães. Foram eliminadas revisões de literatura, relatos de casos, animais com comorbidades e trabalhos com cães politraumatizados.

A coleta e análise dos dados foram realizadas por dois revisores independentes, sendo que todos os estudos identificados foram avaliados pelos critérios de inclusão/exclusão iniciais. Duplicatas de artigos encontrados nas estratégias de busca nos bancos de dados foram excluídas. Inicialmente foram selecionados por meio de uma abordagem em duas etapas, primeiro foi analisado o título, seguido da análise do resumo. Seguiu-se para análise do texto completo para elegibilidade, quando finalmente, os estudos identificados foram classificados como incluídos na revisão sistemática. Foram extraídos dados qualitativos de todos os artigos incluídos: tipo de estudo, número de fraturas, classificação das fraturas, sexo, causa das fraturas, localização das fraturas, peso, idade, tipo de tratamento, principais complicações, tempo para instituição do tratamento, tipo de avaliação e resultados.

As listas de estudos obtidas nas bases de dados foram baixadas e carregadas no Software StArt (State of the Art por Systematic Review), que é uma ferramenta de apoio ao planejamento, execução e sumarização dos dados, tornando a revisão mais ágil, precisa e replicável.

## RESULTADOS

A partir da busca foram encontrados 318 artigos relacionados ao tema, sendo 48 artigos no PubMed, no Scielo foram 17 e 253 artigos no Science Direct. Destes, 35 artigos foram selecionados a partir do título e resumo que apresentavam texto em inglês de acordo com os fatores de inclusão e exclusão. Esses 35 artigos foram analisados para elegibilidade por completo e foram incluídos 13 artigos para síntese (Figura 1). Dados relevantes dos artigos selecionados foram extraídos e gerenciados com informações pertinentes e analisados no presente manuscrito. A tabela 1 detalha os artigos e dados extraídos.

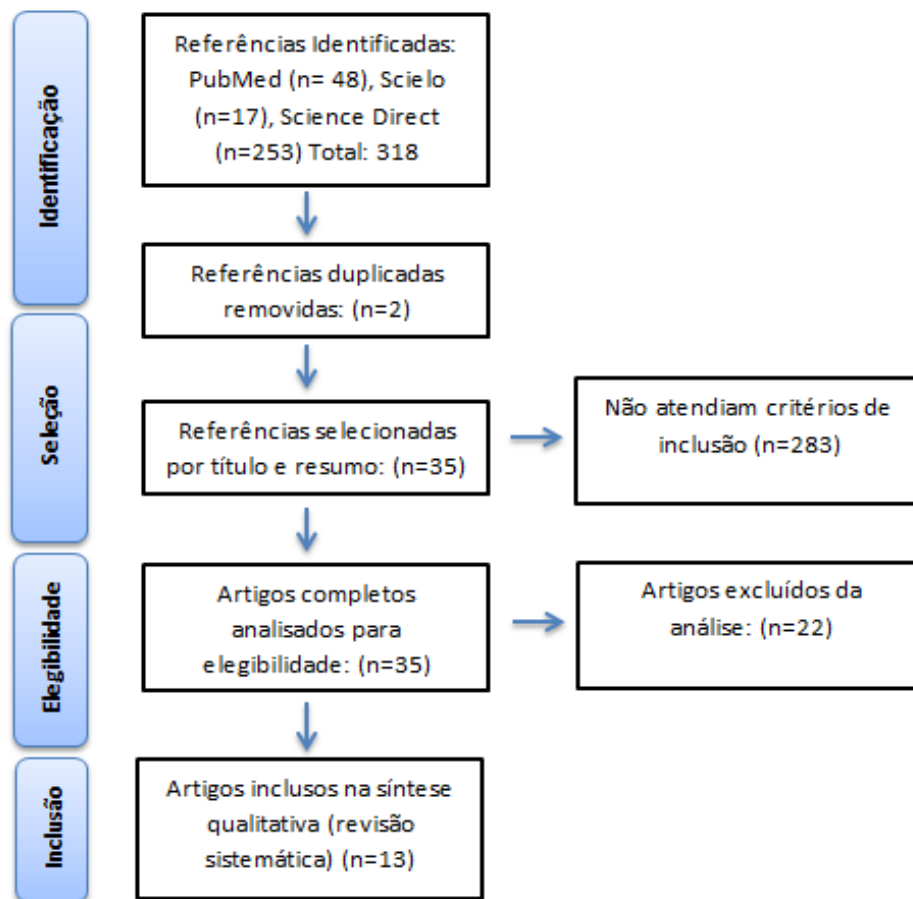


Figura 1. Fluxograma de seleção dos estudos.

Após o levantamento bibliográfico foram incluídos 13 trabalhos para responder a pergunta de pesquisa, os artigos excluídos na análise da elegibilidade foram animais politraumatizados e animais com comorbidades. Outros estudos

foram excluídos porque os resumos não eram claros inicialmente, mas na revisão do texto completo eles foram revisados.

Todos os artigos selecionados tiveram como critério de inclusão fraturas de localização distal, sendo a maioria das fraturas fechadas totalizando 98,7%, com 1,2% para as fraturas abertas. Não foi informado em dois estudos se analisaram fraturas abertas ou fechadas (Pozzi et al.,2013; Munakata et al., 2018). As fraturas bilaterais dos estudos totalizaram 3% (Aiawa et al., 2019; Bierens et al., 2017; De arbun Parent et al., 2017).

Tabela 1. Trabalhos relacionados às fraturas de rádio e ulna em cães

<i>Autor/Ano/País</i>	<i>Fraturas</i>	<i>Classificação</i>	<i>N/sexo</i>	<i>Causas</i>	<i>Localização</i>	<i>Idade(meses) Peso</i>	<i>Tipo de Fratura</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Complicações</i>
<b>GIBERT; RAGETLY; BOUDRIEAU, 2015</b>  <b>EUA</b>	20	20 fechadas	20 Não informado	Quedas (17); Brincadeiras (1); Automobilístico (1)	Distal	6 a 86 Média:24  <6kg Média: 3kg	Oblíqua (11); Transversal (8); Cominutiva (1)	Placa bloqueada; Placa reta (8); Placa T (10)	Osteomielite
<b>KANG et al., 2016</b>  <b>EUA</b>	14	14 fechadas	12 7M 5F	Não informado	Distal	7 a 36 Média: 13,5  <2,5kg- Média:1,8kg	Transversal (9); Oblíqua (5)	Placa bloqueada Reta (12) e T (2) Autoenxerto/matriz óssea desmineralizada/ proteína morfogenética com hidroxiapatita	Ferida pele; Osteopenia; Deformidade de angulação;
<b>MANCHI et al., 2017</b>  <b>EUA</b>	17	17 fechadas	17 9M 8F	Quedas (11); Brincadeiras (4); Desconhecida (2)	Distal	5 a 49 Média:9  <3,5kg- média: 2,1kg	Transversal (11); Oblíqua (6)	Cerclagem e placa	Úlceras; Necrose de pele interfalângica; Falha implante/instabilidade da fratura/refratura por erro cirúrgico- Não união - falha distal cerclagem;
<b>AIKAWA et al, 2018</b>  <b>Japão</b>	65	65 fechadas	62 29M 33F	Não informado	Distal	3 a 96 Média:11  <7kg- média:3kg	Não informado	Placa convencional	Deiscência pele ; Úlceras por curativo; Afrouxamento parafuso; Exposição placa/remoção; Osteopenia/ remoção; Ulceração repetitiva/ Remoção placa;

<i>Auto/Ano/País</i>	<i>Fraturas</i>	<i>Classificação</i>	<i>N/ Sexo</i>	<i>Causas</i>	<i>Localização</i>	<i>Idade(meses) Peso</i>	<i>Tipo de Fratura</i>	<i>Tratamento Cirúrgico</i>	<i>Principais Complicações</i>
<b>AIKAWA et al., 2019</b>  <b>Japão</b>	140	135 fechadas 5 abertas	119 52M 67F	Não informado	Distal	2 a 132 Média: 11  <7 kg- média: 2,2 kg	Transversal (78); Obliqua (60); Cominutiva (1); Salter Harris (1)	Fixador Externo Multiplanar tipo II	Inflamação tecido mole; Afrouxamento do implante; Ulceração associada ao curativo; Fraturas ipsilateral /remoção implante; Refratura ipsilateral /remoção implante; Penetração iatrogênica do pino; Osteomielite; Desalinhamento; União atrasada;
<b>BIERENS et al., 2017</b>  <b>EUA</b>	41	41 fechadas	37 19M 18F	Saltos/quedas (26); Pisadas (3); Brincadeiras (2); Automobilístico (1); Queda de veículos (1); Acidente com porta (1); Mordedura (1)	Distal	3 a 73 Média:8  <6,8kg – Média: 2,2kg	Não informado	Fixador externo circular	Desalinhamento; Osteólise/ refratura; Inflamação tecido mole; Infecção incisional; Redução da amplitude do movimento do carpo; Reabsorção de ulna; Sinostose; Refratura; Fratura ipsilateral; Não união;
<b>DE ARBURN PARENT et al., 2017</b>  <b>Canadá</b>	102	102 fechadas	105 50M 52F	Saltos/quedas (92); Brincadeiras e Desconhecida (10)	Distal	2 a 69 Média: 13,5  <7kg – Média: 3,1kg	Transversal (66); Obliqua (39)	Placa –ORIF Placa T Placa de compressão dinâmica	Irritação ou ferida superficial; Desalinhamento; Infecção do sítio cirúrgico; Remoção implante; Refratura;

<i>Autor/Ano/País</i>	<i>Fraturas</i>	<i>Classificação</i>	<i>N/sexo</i>	<i>Causas</i>	<i>Localização</i>	<i>Idade(meses) Peso</i>	<i>Tipo de Fratura</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Complicações</i>
<b>MUNAKATA et al., 2018  Japão</b>	15(não união)	8 infectadas; 7 não infectadas	14 8M 6F	Não informado	Distal	12 a 69 Média:26  Média: 2,5kg	Não informado	Placa convencional e aloenxerto com FGF-2	Remoção do implante;
<b>PIRAS et al., 2011  Itália</b>	20	19 fechadas	16 5M 11F	Traumas (20)	Distal	4 a 50 meses Média:14,7  <4,5kg- Média: 3,2kg	Transversal (11) Oblíqua (9)	Fixação externa circular	Fratura ipsilateral; Secreção inflamatória pinos e fios; Sinostose; Reabsorção ulnar;
<b>POZZI et al., 2013  EUA</b>	30	Não informado	30 Não informado	Não informado	Distal	5 a 144 Média: 31 Média:10,6kg  5 a 105 Média:30 Média: 8,8kg	Não informado	Placa convencional; ORIF (15) Aloenxerto(5) Autógeno(2);  MIPO (15);	Osteomielite/Retirada da Placa;

<i>Autor/Ano/País</i>	<i>Fraturas</i>	<i>Classificação</i>	<i>N/sexo</i>	<i>Causas</i>	<i>Localização</i>	<i>Idade(meses) Peso</i>	<i>Tipo de Fratura</i>	<i>Tratamento</i>	<i>Complicações</i>
<b>RAMÍREZ; MACÍAS, 2016</b>  <b>Espanha</b>	15	Fechadas	15 8M 7F	Saltos/quedas (15)	Distal	4 a 72 Média:7  <4kg Média: 2kg	Oblíquas (15)	Placa convencional	Úlceras de pele ; Osteopenia;
<b>REE; BALTZER; NEMANIC, 2018</b>  <b>EUA</b>	23	Fechadas	23 12M 11F	Não informado	Distal	3,6 a 120 Média: 24 Média:3,5kg (BG)  4,8 a 120 Média: 20 Média:3,3kg (OG)	Transversal (6) Oblíqua (17)	Placa convencional – enxerto ósseo Autólogo (BG)  Placa convencional- Omento Autólogo (OG)	Edema, eritema e secreção serosa; Edema, eritema e secreção serosa; Deiscência incisional/osteopenia grave/ não união atrófica de ulna/remoção do implante/refratura/amputação;
<b>NELSON; STROM, 2017</b>  <b>EUA</b>	6	Fechadas	6 Não informado	Saltos/quedas (5) Desconhecido (1)	Distal	4,8 a 146,28 meses Média:17 Meses; <4kg – média:2,54kg	Transversal (2) Oblíqua(4)	Placa de compressão dinâmica	Reabsorção ulnar/quebra placa/falha implante; Afrouxamento de parafuso/falha implante; Fratura sítio do parafuso; Refratura;

\*FGF-2- Fator de crescimento de fibroblasto 2; OG: Omento autólogo; BG: Aloenxerto ósseo; ORIF: Redução aberta e fixação interna; MIPO: osteossíntese minimamente invasiva com placa; EUA: Estados Unidos da América.

A principal causa de fraturas de rádio e ulna foram saltos e quedas, seguida de causas desconhecidas, brincadeiras, “pisoteios”, acidentes automobilístico, acidentes com portas e mordeduras (Figura 2).

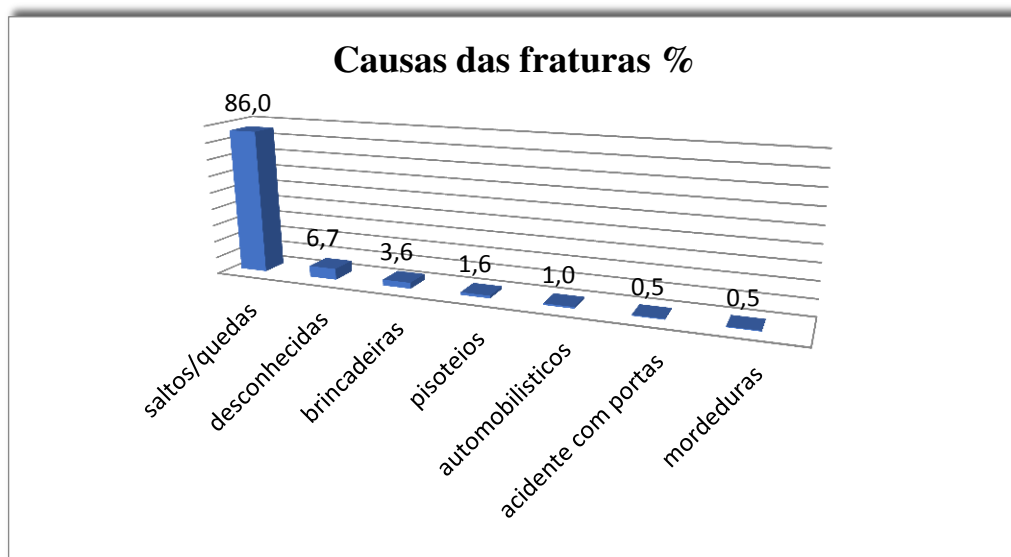


Figura 2. Causas das fraturas de rádio e ulna em cães nos artigos selecionados.

Em relação ao sexo, a maioria dos animais eram fêmeas (52%), contudo, três trabalhos não relataram os sexos dos animais estudados (Pozzi et al., 2013; Gibert; Ragetly; Boudrieau, 2015; Nelson; Strom, 2017).

A idade e o peso médios dos animais nos estudos foram de  $17,31 \pm 8,01$  meses e  $3,58 \pm 2,55$ kg respectivamente, tendo como intervalos de 2 meses a 12,19 anos para idade e 1 a 10,6kg para peso. Entretanto, alguns estudos tiveram como critério de inclusão o peso dos cães: estudos por Aikawa et al., (2018), De Arburn Parent et al., (2017) e Aikawa et al., (2019), apenas cães que pesavam igual ou abaixo de 7kg; <6,8kg (Bierens et al., 2017), <4kg (Nelson; Strom, 2017; Ramírez; Macías, 2016), <6kg (Gibert; Ragetly; Boudrieau, 2015),  $\leq 6$ kg (Ree; Baltzer; Nemanic, 2018).  $\leq 5$  kg (Piras et al., 2011),  $\leq 4$ kg (Ramírez; Macías, 2016),  $\leq 3,5$ kg (Manchi et al., 2017),  $\leq 2,5$ kg (Kang et al., 2016), exceto Pozzi et al., (2013) e Munakata et al., (2018) que não relataram peso específico como critério de inclusão animais. Os animais do estudo de Munaka et al., (2017) já tinham passado por procedimento cirúrgico e sofrido complicações de não união óssea. Apesar de não terem usado critério de seleção, os animais tiveram peso  $\leq 4,1$ kg. Em relação à idade dos animais, apenas um artigo adotou como critério de inclusão animais com 6

meses ou mais (Gibert et al.,2015). As fraturas de rádio e ulna estudadas em sua maioria acometeram animais jovens e de pequeno porte.

O principal tipo de fratura foi o transversal com 53%, o segundo maior foram às fraturas oblíquas totalizando 46,1%, seguido das fraturas cominutivas 0,6% e por último Salter Harris 0,3%. Apenas um estudo adotou um critério de inclusão de fraturas transversais e oblíquas (Kang et al., 2016).

O tempo entre a lesão até o momento do procedimento cirúrgico variou nos estudos de 1 a 15 dias, com tempo médio de  $6,48 \pm 5,36$  dias (Piras et al., 2011; Bierens et al., 2017; Ramírez; Macías, 2016; De Arbutun Parent et al., 2017).

Os tratamentos utilizados variaram grandemente, tendo sido relatados: fixador externo multiplanar tipo II, fixador externo circular, placa convencional associada ao enxerto autólogo, placa convencional associada ao omento e aloenxerto, placa convencional sem associação, placa convencional com aloenxerto e FGF-2 (Fator de crescimento de fibroblasto 2), placa de compressão dinâmica, cerclagem, placa bloqueada associada à autoenxerto, matriz óssea desmineralizada e proteína morfogenética com hidroxapatita.

As principais complicações nos tratamentos com fixadores externos nos 201 animais foram 29,85% inflamação dos tecidos moles, 9,95% afrouxamento do implante e remoção do implante devido à fraturas ipsilateral 8,95%, desalinhamentos ósseos com 6,46% e ulcerações devido a curativo 5,9%, 4,47% dos animais tiveram reabsorção ulnar, 30% desses animais tiveram inicialmente infecção incisional com redução da amplitude da movimentação do carpo e após a reabsorção ulnar ocorreu a sinostose do radio e ulna seguido de refratura. Outras complicações em menores proporções foram observadas como refraturas ipsilateral em 1,49% dos casos, refratura ipsilateral com remoção do implante em 1,49%, osteólise em seguido de refratura 0,49%, 0,49% penetração iatrogênica do pino, 0,49% osteomielite e 0,49% de união atrasada (Piras et al., 2011; Bierens et al., 2017; Aikawa et al., 2019).

O tratamento com placa em 343 animais tiveram como principais complicações associadas aos tecidos moles com 9,32%, sinostose em 2,91%, remoção do implante em 2%, devido a infecções e dor com claudicação leve, desalinhamentos ósseos em 1,74%. osteopenia em 1,45%, ulceração por curativo em 1,45%, osteomielite em 0,87%, 0,58% nos casos de exposição de placa, e 0,29% em cada complicação como reabsorção ulnar com falha do implante, refratura por

remoção de placa, fraturas no sítio do parafuso e falha na fixação. (Piras et al., 2011; Gilbert; Ragetly; Boudriau, 2015; Manchi et al., 2016; Kang et al., 2016; Ramírez; Macías, 2016; De Aburn Parent et al., 2017; Nelson;Strom, 2017; Aikawa et al., 2018; Ree; Baltzer;Nemanic et al., 2018).

A placa convencional associada à aloenxerto utilizadas em 15 fraturas retratadas com ocorrência de não união tiveram como complicação a remoção do implante em 87,5% das fraturas não infectadas, e 71,42% das fraturas não infectadas (Munakata et al., 2018). Já a utilização da cerclagem associada a placa em 17 animais causou em 17,64% refratura por erro cirúrgico, ulceração devido a curativos em 11,76% e não união em 5,88% dos pacientes (Manchi et al. 2017).

De forma geral as principais complicações dos estudos foram relacionadas aos tecidos moles (infecção do sítio cirúrgico, ulcerações, deiscência de pele, secreções inflamatórias), afrouxamento do implante, desalinhamentos ósseos, e fraturas ipsilateral (Figura 3).

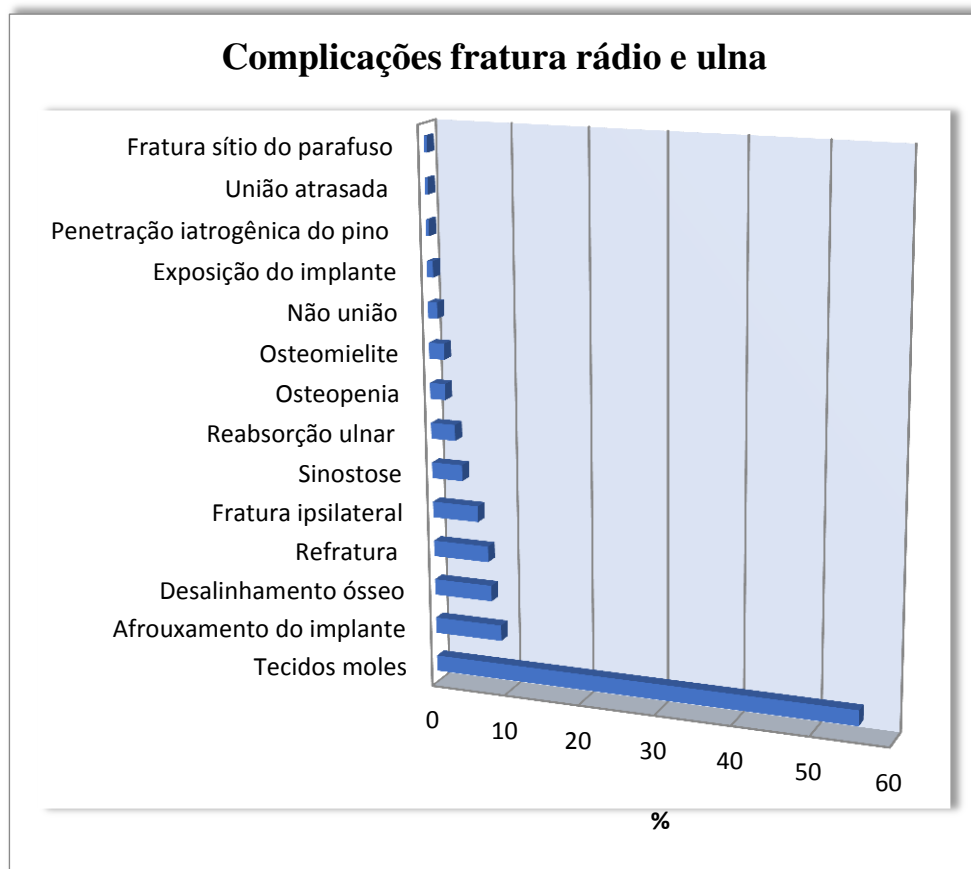


Figura 3. Complicações de fraturas de rádio e ulna em cães.

## DISCUSSÃO

No que se refere aos fatores predisponentes a complicações na consolidação de rádio e ulna, sabe-se que animais de pequeno porte têm maiores chances de serem acometidos, devido principalmente a menor quantidade de tecidos moles periósseos, contato limitado da superfície óssea no local da fratura em virtude do tamanho pequeno com conseqüente reduzido suprimento sanguíneo (Barnhart; Maritato, 2018).

Em relação ao peso dos animais, 12 de 13 artigos utilizaram critérios de exclusão para o peso dos animais dos artigos selecionados, e por isso não foi possível fazer uma comparação das complicações de animais de pequeno, médio e grande porte. Entretanto, um estudo sem critério de peso e que avaliou fraturas não consolidadas e demonstrou que os animais tinham peso  $\leq 4,1$ kg, reforçando que animais de pequeno porte podem sofrer de não união óssea mais frequentemente que animais de maior porte (Munaka et al., 2017).

De acordo com Akaiwa et al., (2017), a fixação de placas é o método de fixação mais utilizado devido ao rápido retorno à função e da ausência de cuidados pós-operatórios extensos. As placas bloqueadas utilizadas em substituição às placas convencionais podem ser promissoras na consolidação óssea, garantindo uma maior estabilidade para fratura, com mínimo de contato entre implante e osso, minimizando o prejuízo do suprimento vascular (Kang et al., 2016). Já a cerclagem em fraturas radiais e ulnares de cães de raça pequenas é uma técnica cirúrgica viável. No entanto, existem altas taxas de complicações quando não associada a outros métodos (Manchi et al., 2017). A técnica minimamente invasiva pode causar uma limitação da observação do osso e conseqüentemente do não alinhamento intraoperatório excelente (Aikawa et al., 2019). Entretanto, permitem preservar o foco da fratura com mínima agressão aos tecidos (Pozzi et al., 2013).

Bierens et al., (2017) discutem utilização de fixador circular externo modificado pode ser uma alternativa nos tratamentos de fraturas de rádio e ulna com taxas de consolidação e complicações similares a outros implantes. Outra vantagem da fixação externa é a remoção após a consolidação óssea e dessa forma evita possíveis complicações em longo prazo como acontece com as placas (Aikawa et al., 2019), mas exige maiores cuidados no pós operatório e treinamento avançado do

cirurgião devido a dificuldade do posicionamento adequado dos pinos externos em cães pequenos, além disso pode causar fraturas no momento da sua remoção (Bierens et al., 2017).

Em outro estudo, todos os animais já tinham sido operados inicialmente com placas ou pinos intramedulares, com resultados de fraturas não consolidadas e tiveram resultados favoráveis após a utilização de placa, aloenxerto ósseo e fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) (Munakata et al., 2018). Outras associações de placas com omento e autoenxertos ósseos (Ree; Baltzer; Neamanic et al., 2018), matriz óssea desmineralizada, proteína morfogenética com hidroxapatita podem ser promissoras na consolidação óssea, principalmente de fraturas em cães pequenos (Kang et al., 2016).

As principais complicações nesses estudos foram associadas à inflamação dos tecidos moles e acredita-se que acontece devido tanto ao volume limitado dos tecidos em cães de pequeno porte quanto pode estar associada a bandagens pós-operatórias (Meeson; Davidson; Arthurs, 2011; Aikawa et al., 2018; De Arburn Parent et al., 2017). Em contrapartida, outras complicações maiores podem ser evitadas com a utilização dessas bandagens como técnicas de Robert-Jones com tala (Aikawa et al., 2019). Adicionalmente, a estabilidade inicial permite a seleção de implantes menores e, portanto reduz a chance da sua remoção posterior (De Arburn Parent et al., 2017). Outra forma de prevenir futuras complicações é restrição dos exercícios no pós-operatório, visto a importância da estabilidade da fratura no processo de reparo ósseo (Aikawa et al., 2019).

A fixação rígida das placas (Aikawa et al., 2018) e fixadores externos podem desencadear à proteção contra estresse do tecido ósseo e conseqüentemente levar a osteopenia e reabsorções ósseas, e um maior risco de refratura (Bierens et al., 2017), dessa forma placas de tamanhos adequados podem reduzir a ocorrência transitória de osteopenia resultando menor proteção contra estresse (De Arburn Parent et al., 2017; Ramirez; Macías, 2016; Manchini et al., 2017; Kang et al., 2016). A refratura também pode acontecer devido ao erro cirúrgico ou remoção do implante (Manchi et al., 2016).

Aikawa et al., (2019) relataram que formação insuficiente de calo ósseo também pode ser atribuída à rigidez do implante. E aborda que apesar da dinamização poder resultar em perda precoce da estabilidade causando um atraso

ou não união óssea esse estudo obteve resultados positivos na consolidação óssea. As complicações relatadas no estudo podem ser causadas devido à orientação dos fios, reabsorção óssea ao redor do fio, tamanho dos fios ou colocação dos fios em região de menor diâmetro do osso. Já em outro estudo a dinamização causou um retardo na consolidação óssea (Bierens et al., 2016).

Outro fator importante, é que os implantes podem causar o comprometimento vascular do cortex ósseo e serem responsáveis por essas complicações (Gauthier et al., 2011; Aikawa et al., 2018) bem como fraturas crônicas que já foram tratadas anteriormente com reparo cirúrgico (De Arburn Parent et al., 2017) podem causar uma redução do fluxo sanguíneo e lesão nos tecidos moles circundantes causando maiores taxas de falha na consolidação óssea (Kang et al., 2017). O tempo entre a lesão até o momento do procedimento cirúrgico também influenciam diretamente no sucesso da consolidação óssea, visto que, de acordo com Griffiths et al., (2013) quando a correção cirúrgica ultrapassa 72 horas a chances de complicações aumentam consideravelmente podendo causar um atraso na consolidação óssea.

Além disso, a dificuldade de obter redução anatômica devido à tendência dos músculos flexores do carpo e digital de criar deslocamento caudolateral do fragmento ósseo distal, espaço limitado disponível para implantes (Piras et al., 2011; Akaiwa et al., 2017), e aposição incompleta dos fragmentos ósseos devido a predisposição a fraturas transversais e oblíquas podem ser fatores predisponentes a complicações (Bierens et al., 2017). Outro fator importante é a presença de infecção, no qual foi responsável por retardar a consolidação óssea (Aikawa et al., 2019) e ser necessário a remoção dos implantes (De Arburn Parent et al., 2017).

Observou-se que a utilização de placas causaram menores complicações nos animais estudados, devido ao menor tamanho do implante principalmente utilizados em cães de pequeno porte e em casos de fraturas distais permitindo deambulação adequada e melhor estabilização do foco fratura do que se comparado a fixadores externos (De Arburn Parent et al., 2017; Ramirez; Macías, 2016) .

De maneira geral, a maioria dos casos tiveram como principal complicações mais frequentes injúrias relacionadas aos tecidos moles, fraturas e refraturas associadas principalmente à remoção dos implantes e proteção contra estresse. Maiores complicações são observadas em tratamentos que utilizaram fixadores externos, cerclagem e placas convencionais. Observou-se que a utilização de placas

causaram menores complicações nos animais estudados, devido ao menor tamanho do implante principalmente utilizados em cães de pequeno porte e em casos de fraturas distais permitindo deambulação adequada e melhor estabilização do foco fratura do que se comparado a fixadores externos (De Arburn Parent et al., 2017; Ramirez; Macías, 2016

Técnicas de aprimoramento como enxertos autólogos ou alógenos (Manakata et al., 2017), biomateriais sintéticos como hidroxiapatita e fatores de crescimento como a proteína morfogenética óssea (Kang et al., 2016), associadas ao método adequado de fixação e experiência do cirurgião podem ser promissores na consolidação óssea.

## **CONCLUSÃO**

As fraturas de rádio e ulna nos artigos selecionados foram em sua maioria de animais jovens e de pequeno porte, com localização distal, do tipo transversal e oblíqua, com causas principais relacionadas a acidentes como saltos e quedas. O tratamento de escolha em sua maioria é o cirúrgico, com utilização de fixadores externos, cerclagens e placas. De maneira geral a maiorias dos casos tiveram como principal complicação injúrias relacionadas aos tecidos moles, fraturas e refraturas associadas principalmente à remoção dos implantes. A localização da fratura, tipo da fratura, peso, idade do animal, bem como a escolha do tratamento para uma melhor coaptação dos fragmentos e estabilização da fratura influenciará diretamente o sucesso da consolidação óssea. Nesse estudo, a utilização de placas demonstrou terem menores taxas de complicações, entretanto é importante ressaltar que a escolha do implante e da técnica cirúrgica utilizada devem seguir critérios anatômicos, biológicos, mecânicos e fatores clínicos individuais de cada paciente.

## **CAPÍTULO II**

### **PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CÃES COM FRATURAS DE RÁDIO E ULNA ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO-UFV**

Amanda Pereira dos Anjos et al.

## **PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE CÃES COM FRATURAS DE RÁDIO E ULNA ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO-UFV**

### **RESUMO**

Objetivou-se com presente estudo retrospectivo analisar o perfil epidemiológico dos cães em relação a fraturas de rádio e ulna atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa-UFV. Foi realizado um estudo transversal, descritivo, de caráter epidemiológico, com coleta de dados de base documental. A pesquisa foi realizada no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, localizado no Município de Viçosa, Minas Gerais. A amostra foi composta de 87 cães, machos e fêmeas, com histórico de fraturas de rádio e ulna, atendidos na instituição no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2019. Os dados foram coletados por meio da pesquisa dos prontuários e as variáveis estudadas foram as seguintes: sexo, idade, peso, causa da fratura, raças, membro acometido, quanto à fragmentação, tipo e localização da fatura e tratamento clínico.

Nesse estudo as fraturas de rádio e ulna afetaram cães jovens, de pequeno porte, que sofreram principalmente por quedas ou atropelamentos. Animais sem raça definida, Pinscher, Poodles e Sptiz Alemão foram mais acometidos. As localizações de diáfise distal, do tipo transversa e oblíqua tiveram maior importância nesse estudo. Apesar de o tratamento cirúrgico ser na maioria dos casos a escolha mais indicada, deve-se considerar uma avaliação do paciente de forma única para que os resultados na consolidação da fratura sejam alcançados.

**Palavras-chave:** Fraturas distais, pequeno porte, canino.

### **INTRODUÇÃO**

As fraturas de rádio e ulna representam 18% da casuística total das fraturas em pequenos animais (Brown et al., 2016; De Arburn Parent et al., 2017; Jain et al., 2018), sendo considerado o terceiro tipo mais frequente em cães (Minar et al., 2013;

Jain et al., 2018). Dentre as causas mais comuns, destacam-se acidentes automobilísticos (Libardoni et al., 2016) e pequenos traumas como saltos e quedas (Phillips, 1979), principalmente em raças miniatura (Gilbert et al., 2017). Animais de pequeno porte são mais comumente acometidos em relação aos cães de médio e grande porte, devido provavelmente às diferenças da densitometria e geometria óssea (Brianza et al. 2006; Planner, Feichtner e Meyer-Lindenberg, 2021).

As fraturas diafisárias, especialmente no terço distal do osso, são mais frequentes (Milovancev e Ralphs, 2004) e, na maioria dos casos, a fratura envolve tanto rádio quanto a ulna (Phillips, 1979). Em cães jovens de médio à grande porte, geralmente possui satisfatória regeneração óssea, enquanto que nas raças de pequeno porte, nota-se maior frequência de complicações como a união retardada e não-união (Brianza et al., 2006; Ramírez; Macías, 2016; Gilbert et al., 2017; Nelson; Strom, 2017). Diferentes fatores têm sido apontados como responsáveis pelas complicações, como fatores biomecânicos com alta frequência de fraturas oblíquas curtas com fragmento de fratura distal limitado, dificultando a redução anatômica. Outro fator importante é a pouca vascularização disponível para o processo de consolidação devido à cobertura limitada de tecido mole e vascularização local reduzida (Ramírez e Macías, 2016; Gilbert et al., 2017; Barnhart; Maritato, 2018).

Nesse sentido, objetivou-se com presente estudo retrospectivo analisar o perfil epidemiológico dos cães com fraturas de rádio e ulna atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado um estudo transversal, descritivo, com levantamento de dados dos animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HVT-UFV), localizado no Município de Viçosa, Minas Gerais, com diagnóstico de fraturas de rádio e/ou ulna. Como critérios de inclusão no estudo, tem-se ser cão, de ambos os sexos, com histórico de fraturas de rádio e/ou ulna, atendidos na instituição no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2019. Os dados foram coletados por meio da pesquisa dos prontuários e as variáveis estudadas foram as seguintes: sexo, idade, peso, causa da fratura, raças, membro acometido, classificação da fratura (quanto à fragmentação, tipo e localização) e tratamento

implementado. Foram excluídos pacientes politraumatizados e fraturas patológicas (causadas por neoplasias, infecções e doenças metabólicas). Os resultados obtidos foram expressos e analisados mediante a distribuição de frequências e respectivas porcentagens.

## RESULTADOS

A amostra total foi constituída por 87 cães, sendo 46 % (n=40) machos e 54% (n=47) fêmeas. A maioria dos animais apresentava idade de até 2 anos com percentual de 56,3%, como ilustrado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos animais quanto ao gênero e idade.

<b>Variáveis</b>	<b>Frequência (n)</b>	<b>Percentual (%)</b>
<b>Gênero</b>		
Macho	40	46
Fêmea	47	54
<b>Idade</b>		
Até 2 anos	49	56,3
3 a 8 anos	22	25,3
Acima de 8 anos	3	3,4
Indefinida	13	14,9
<b>Total:</b>	100	100

Em relação à exposição óssea, três animais (3,4%), apresentaram fratura exposta e 84 (96,6%) fratura fechada. Desses três animais, dois eram machos e um fêmea. Quanto ao peso dos animais, a maioria tinha até 6kg (50,6%), em seguida, animais com peso entre 7 a 12kg compreendendo 26,4% do total, 13 a 19kg com 17,2%, e acima de 20kg com cinco animais (5,7%), como descrito na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos animais quanto ao peso.

<b>Peso</b>	<b>Frequência (N)</b>	<b>Percentual (%)</b>
Até 6 kg	44	50,6
7 a 12 kg	23	26,4
13 a 19 kg	15	17,2
>20 kg	5	5,7
<b>Total:</b>	87	100

No que concerne às causas das fraturas, as quedas foram o principal motivo contando com 31 (35,6%) dos animais acometidos. A segunda maior causa foi o atropelamento com 25 animais (28,7%), seguido de causas indefinidas com 19 (21,8%), mordedura com quatro (4,6%), pisoteamento com três (3,4%) e outras causas totalizando cinco (5,7%) como acidentes com arma de fogo, enxada, madeira e chutes, de acordo com a figura 1.

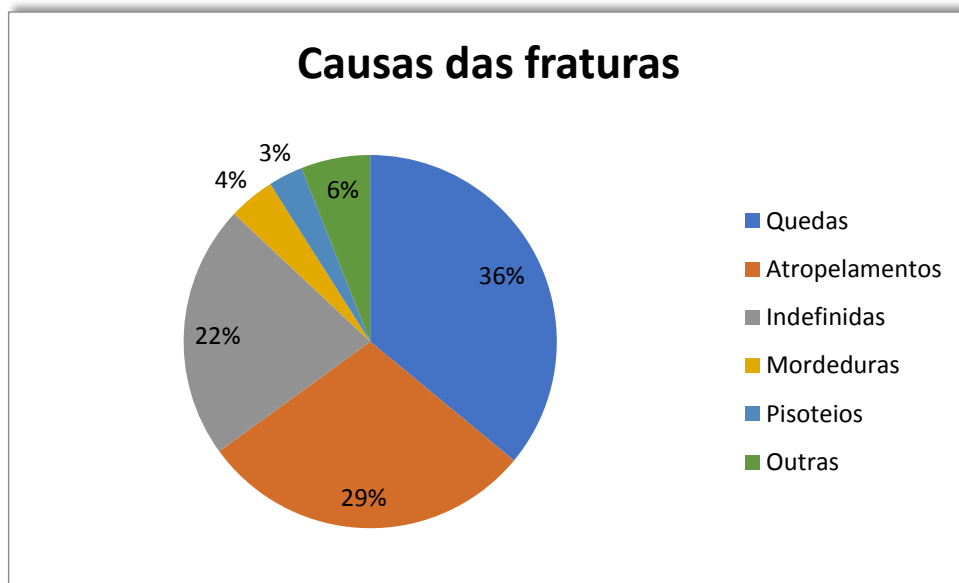


Figure 1. Principais causas das fraturas de rádio e ulna nos cães do Hospital Veterinário-UFV.

Em relação às raças, verificou-se que 42 (48,3%) não possuíam raça definida (SRD), 28 (32,2%) eram da raça Pinscher, seguido pelo Poodle e Sptiz Alemão com três indivíduos cada (3,4%), Pastor Alemão e Red Heeler com dois animais cada (2,3%), e outras raças totalizando sete (8%) animais, como pode ser observado na figura 2.

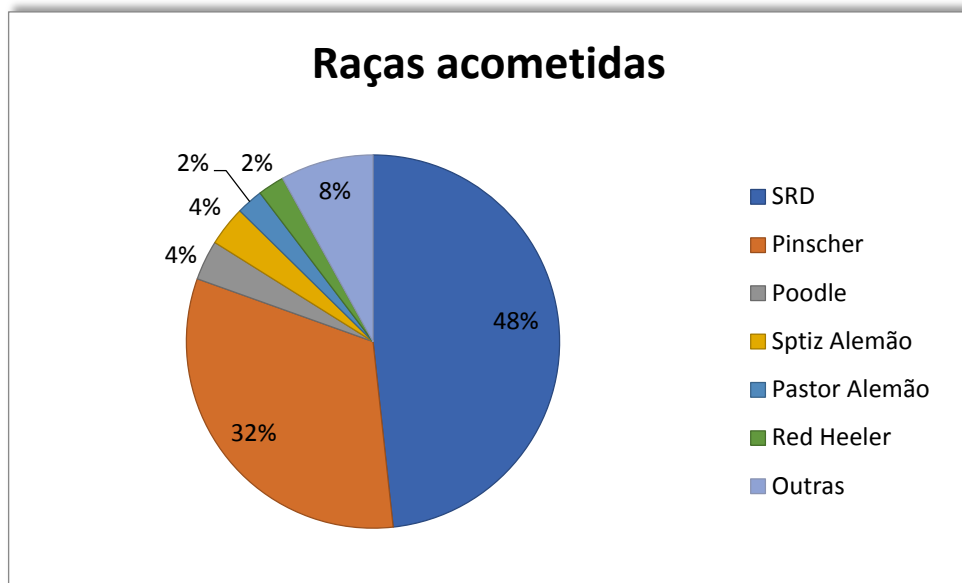


Figure 2. Raças acometidas por fraturas de rádio e ulna nos cães do Hospital Veterinário-UFV.

De todas as fraturas de rádio e ulna, 83 (95,4%) acometeram ambos os ossos e quatro (4,6%) apenas a ulna. Os membros torácicos direito e esquerdo foram acometidos com 44,8% e 43,7%, respectivamente. Animais com fraturas bilaterais representaram 11,5% dos casos (10 indivíduos). Destas dez fraturas bilaterais, quatro animais eram da raça pinscher, quatro SRD, um Sptiz Alemão, um Terrier Brasileiro, com peso médio de  $3,68\text{kg} \pm 2,37$ . Destes oito animais pesavam menos de 6kg (8,7% dos animais nessa faixa de peso, oito de 44 casos) e as principais causas das fraturas foram queda (cinco indivíduos) seguida de atropelamento (dois indivíduos) e ainda um sem causa conhecida e um pisoteado.

Quanto à classificação das fraturas, a maioria foi simples com 92% (80), seguida de cominutiva 5,7%. O sentido da linha de fratura mais observado nesse estudo, foi a transversa com 47 (48,5%), discretamente maior que oblíqua 45 (46,4%). A fratura espiral, fissura, e em forma de cunha, representaram um total de três (3,1%), um (1%), e um (1%), respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição quanto ao tipo de fratura.

	<b>Frequência (N)</b>	<b>Percentual (%)</b>
<b>Membro</b>		
Transversa	47	48,5
Oblíqua	45	46,4
Espiral	3	3,1
Fissura	1	1
Forma de cunha	1	1
<b>Total:</b>	<b>97</b>	<b>100</b>

Sobre a localização da fratura, 51(58,6%) foram de diáfise distal, 16 (18,4%) diáfise média, nove (10,3%) na diáfise proximal, cinco (5,7%) metáfise distal e o mesmo número na epífise distal 5 (5,7%) e uma Salter Harris tipo 1 (1,1%). O tratamento cirúrgico foi indicado em (96,5%) dos pacientes, sendo que apenas três animais receberam tratamento conservador. Dentre os 87 animais avaliados, 40 animais não tiveram acompanhamento e dos 47 animais, 30 tiveram o seu último acompanhamento com a fratura em processo de consolidação, quatro animais com fratura completamente consolidada, oito animais apresentaram não união óssea, e má união foram constatadas em três animais. Outra complicação relatada foi osteomielite em dois pacientes.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho fornece um panorama geral das características dos animais acometidos por fraturas de rádio e ulna atendidos no HVT – UFV. Quanto às características dos animais acometidos, observou-se que os resultados se assemelham aos dados de Giglio et al., (2007) obtidos no Brasil, que também observou discreta predominância de fêmeas (53,2%) e animais jovens até 2 anos (69,7%). Em outro estudo na Lituânia, animais com idade entre 1 e 5 anos, assumiram 56% (Ramanauskaitė et al., 2017). Os cães mais jovens foram os mais acometidos, e isso provavelmente se deve ao fato de que esses animais são mais ativos (Jain et al., 2018), que acabam sendo mais suscetíveis a lesões (Shapiro et al., 2008; Minar et al., 2013), bem como possui incapacidade de lidar com perigos em relação ao cão mais velho (Vidane et al., 2014; Jain et al., 2018). Além disso,

cães mais jovens possuem corticais ósseas comparativamente mais finas em relação a cães adultos (Jain et al., 2018).

O predomínio de animais de até 6kg (50,6%) também está foi observado em outros estudos, como de Meirelles, (2015), no Brasil, que dos 310 cães, 140 (45,16%) pesavam até 5 kg e 59 (19,03%) entre 5 e 10 kg. Os cães de pequeno porte acabam sendo mais acometidos a fraturas apendiculares provavelmente devido à reduzida cobertura muscular dos membros (Milovancev; Ralphs, 2004) e por apresentarem diferenças significativas na geometria óssea do rádio e da ulna ao terem a área transversal do osso menor, bem como por apresentarem valores de inércia significativamente inferiores, que expõe essas raças a maiores estresses locais, com uma menor tolerância a forças compressivas e de flexão (Brianza et al., 2006).

No que se referem às causas das fraturas, as principais foram às quedas e os atropelamento, assim como relatado também em outros levantamentos realizados na Irlanda, Brasil e Índia (Mccartney; Kiss; Robertson, 2010, Libardoni et al., 2015, Meirelles, 2015, Jain et al., 2018). Essas causas acontecem também para os demais tipos de fraturas, que representaram 43% acidentes de trânsito e 28,5% por quedas em estudo por Minar et al., (2013) na Coreia do Sul. Autores como Libardoni et al., (2015) alertam sobre a necessidade de medidas de proteção contra quedas nas residências e a de limitar o acesso dos cães às vias públicas.

Nesse estudo, as principais raças acometidas foram Pinscher e Poodle, além dos animais sem raça definida. Esses dados estão de acordo com o encontrados por Giglio et al., 2007, no qual 40,2% dos animais eram sem raça definida, 22,2% dos animais da raça Pinscher e 20,3% da raça Poodle. Em outro estudo, também foi identificado os mesmos resultados, em que a maioria eram animais sem raça definida com 38,06%, Pinscher com 22,9% e Poodle com 22,58%. Foi observado também que 51,29% das raças pertenciam à raça de pequeno porte (Meirelles, 2015).

Sugere-se que o maior número de fraturas em cães SRD pode ser justificado devido estes cães refletirem a maioria dos animais atendidos no HTV-UFV. Contudo as três raças mais acometidas, que foram Pinschers, Poodles e Sptiz Alemão, apresentam pequeno porte com 39,2% do total e conseqüentemente maior vulnerabilidade a experiências traumáticas como já discutido. Esses dados

corroboram com Gligio et al., (2007), que observaram a mesma ocorrência para cães sem raça definida, seguido de animais de pequeno porte (45,7% do total).

Nesse estudo, o membro torácico direito foi de forma discreta mais acometido que o membro torácico esquerdo e uma pequena parcela de acometimento bilateral assumindo valores são compatíveis com Giglio et al., 2007, no qual foi observado o acometimento do membro torácico direito com 46,6% casos, e o esquerdo com 43,9%, seguido do bilateral com 25 (9,5%) dos casos. No presente estudo, a fratura bilateral ocorreu em sua maioria em animais de raça de pequeno porte, com peso inferior a 6kg, sendo a principal causa a queda. De forma semelhante, Meirelles, (2015) relatou 18 casos (5,8%), sendo que 15 destes animais pesavam menos de 5 kg (10,71% dos animais com essa faixa de peso), sendo a queda a principal causa atingindo um total de 12 em 15 animais.

A maioria das fraturas de rádio e ulna (95,4%) acometeu ambos os ossos e quatro (4,6%) apenas a ulna, dados semelhantes a Gligio et al., (2007) com 87,1% e Meirelles, (2015) com 86,13%, esses resultados estão relacionados à biomecânica do apoio no membro, uma vez que o rádio é o osso que sustenta a maior parte do peso do antebraço, portanto, está mais sujeita a fraturas (Decamp et al., 2015).

Quanto a fragmentação a maioria foi simples 80 (92%), seguida de cominutiva 7(8%), demonstrando que as fraturas de rádio e ulna não apresentam particularidades em relação aos ossos longos em geral, nos quais 84% foram simples e 16% cominutivas em estudo por Minar et al., (2013).

Os tipos de fraturas mais observado nesse estudo, foi a transversa com 47 (48,5%), discretamente maior que oblíqua 45 (46,4%). No estudo de Giglio et al., 2007 as fraturas transversas, seguida de oblíqua foram mais comumente observadas, e isso acontece devido à força aplicada no momento do trauma, visto que principais causas que levaram a fraturas de rádio e ulna nesse estudo resultaram em forças de flexão e compressão, e, portanto desencadeando fraturas transversais e oblíquas (Brianza et al., 2006).

Sobre a localização da fratura, as principais foram a diáfise distal, seguida de diáfise média e diáfise proximal. Esses resultados se assemelham com Giglio et al., (2007), em que a fratura de terço distal foi predominante, seguido de terço médio e terço proximal. Resultados semelhantes foram observados em outras avaliações retrospectivas (McCartney et al., 2010; Piras et al., 2011; de Souza et al. 2011, Ben

Ali, 2013; Minar et al. 2013; Gibert et al., 2015), uma vez que o rádio é o osso que sustenta a maior parte do peso do antebraço, a região distal é a que recebe os maiores impactos, aumentando dessa forma, as chances de fraturas nessa região (Decamp et al., 2015).

Nessa pesquisa o tratamento cirúrgico foi adotado na grande maioria dos animais, e apenas três animais receberam tratamento com imobilização e tala, um desses animais devido aos custos do procedimento o tutor optou por esse tratamento e os outros dois animais tiveram fissura de ulna e fratura de terço médio de rádio com fissura proximal em rádio, respectivamente.

Sugere-se que a escolha pelo método cirúrgico, se deve ao fato de possuir resultados mais satisfatórios na consolidação óssea devido a uma maior estabilização e coaptação dos fragmentos ósseos (Nelson; Strom, 2017; De Arburn parent et al., 2017; Ree; Baltzer; Nemanic, 2018), visto que as fraturas de rádio e ulna possuem altas taxas de complicações associadas a não-união e má união, sobretudo as de localização distal e em raças pequenas (Munakata et al., 2018), como observado no presente estudo, em que dos oito casos de não união óssea todos eram animais de pequeno porte, dos quais sete eram raça pinscher e um sem raça definida, dos três casos de má união dois animais também eram animais de pequeno porte.

Essas complicações podem ser explicadas devido ao não alinhamento correto das extremidades ósseas e da instabilidade inadequada no foco da fratura, associado ao tamanho pequeno do osso com reduzido suprimento vascular em região diafisária-metáfisária distal, pouco tecido mole adjacente e uma forte tensão que é exercida pelos músculos flexor carpal e flexor digital, que deslocam os fragmentos caudal e lateralmente (Decamp et al., 2015). O suprimento sanguíneo adequado faz com que o transporte de nutrientes, oxigênio, fatores de coagulação e crescimento ósseo que contribuem diretamente no reparo da fratura (Marsell; Einhorn et al., 2011; Einhorn; Gerstenfeld et al., 2015).

A osteomielite foi relatada em dois animais, que foram vítimas de atropelamento com presença de fratura exposta e dessa forma sendo uma fonte exógena para contaminação, nos casos de fraturas abertas (Gibert; Ragetly; Boudrieau, 2015). Sugere-se que a ausência das complicações menores, como por

exemplo relacionadas à tecidos moles, podem não ter sido relatadas nas fichas dos pacientes.

No presente estudo, poucos animais retornaram para o acompanhamento da fratura, e de acordo com Meirelles, 2015 a ausência do acompanhamento da maioria dos pacientes se deve ao fato de que muitos proprietários continuam o tratamento com veterinários das cidades de origem ou somente retornam quando há dificuldade de deambulação ou sinais de infecção. Sugere-se também o não retorno do paciente para o tratamento adequado.

## **CONCLUSÃO**

As fraturas de rádio e ulna acometem os animais domésticos, sobretudo os cães jovens, de pequeno porte, que sofreram principalmente quedas ou atropelamentos. Animais sem raça definida, Pinscher, Poodle e Sptiz Alemão foram mais acometidos, assim como a localização mais comum foi a diáfise distal, com linha de fratura transversa e oblíqua tiveram maior frequência. O tratamento cirúrgico foi realizado na maioria dos casos e a complicação mais comum observada foi de não união óssea em cães de pequeno porte.

### **CAPÍTULO III**

## **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE HIDROXIAPATITA E POLICAPROLACTONA E SUA UTILIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Amanda Pereira dos Anjos et al.

## DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANA DE HIDROXIAPATITA E POLICAPROLACTONA E SUA UTILIZAÇÃO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

### RESUMO

A terapia com biomateriais tem potencial para o tratamento de defeitos ósseos desencadeados por lesões, comumente as fraturas. Estudos demonstraram que a utilização de biomaterial no local do defeito ósseo pode funcionar como um arcabouço para a migração celular, característica da sua capacidade osteocondutora. Considerando que o coágulo sanguíneo formado após a fratura no espaço a ser regenerado é essencial para a sinalização celular, nesse projeto foi desenvolvida uma membrana porosa para utilização ao redor do defeito, com o objetivo de proteger tanto o coágulo quanto o espaço do defeito. Assim, utilizou-se a associação da hidroxiapatita sintética (HAP-91) com o polímero policaprolactona (PCL) para o desenvolvimento dessa membrana. Inicialmente dois tipos de membranas foram desenvolvidos com diferentes solventes e proporções da HAP-91 e da PCL. Essas membranas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX) para avaliar sua topografia de superfície e cristalinidade, respectivamente. Dessa forma, foi estabelecida a escolha da membrana que apresentava as características desejadas. O processo de regeneração óssea no período pós-operatório foi acompanhado através da avaliação densitométrica das imagens radiográficas, tomografia microcomputadorizada e histologia óssea. A membrana escolhida apresentou fácil aplicação, maleabilidade e resistência favorável. Na análise de MEV, observou-se na membrana uma topografia complexa, com a presença de microporos e macroporos variando de  $66,56 \pm 22,94$  a  $275 \pm 49,23 \mu\text{m}$ . Na análise de DRX, o compósito apresentou alta cristalinidade. Na análise da radiodensidade óssea foi possível detectar diferenças significativas no decorrer do tempo ( $P < 0,05$ ) para o grupo tratado assim como os animais que receberam a membrana apresentaram densidade radiográfica significativamente maior em relação ao grupo controle em 90 dias. Na avaliação da microtomografia óssea (MicroCT), não houve diferenças significativas  $p (< 0,05)$  entre os grupos tratado e controle para os seguintes parâmetros: BV (volume ósseo neoformado),

Tb.N (número de trabéculas), Tb.Sp (separação entre as trabéculas). Para Tb.Th (espessura média das trabéculas) foi significativamente maior no controle. No grupo tratado com membrana de HAP+PCL foi possível observar crescimento de tecido ósseo em quase todo o defeito, com trabéculas ósseas recém-formadas, delgadas, em crescimento centrípeto. Em contrapartida, nos animais que não receberam a membrana foi possível à observação de menor quantidade de formação de trabéculas, a neoformação óssea se restringiu às bordas do defeito. Na histologia óssea os animais do grupo tratado foi observado um tecido ósseo mais organizado com maior irrigação sanguínea e tecido conjuntivo frouxo se comparado aos animais do grupo controle. Esses resultados podem sugerir que a membrana pode ser favorável na progressão da regeneração óssea, visto que a membrana pode ser utilizada como um protetor do coágulo sanguíneo e transportador promissor para células ou fatores de crescimento e deve ser mais explorado em diferentes configurações e fraturas ósseas.

**Palavras-chave:** medicina regenerativa; engenharia de tecido ósseo; defeitos ósseos; arcabouço; compósitos; biomateriais.

## INTRODUÇÃO

No tratamento de fraturas ósseas encontra-se muitas vezes a necessidade de reparar lesões com perda tecidual, visando à estabilidade mecânica, continuidade óssea com suporte por uma matriz e estímulo exercido por citocinas e fatores de crescimento. Sendo assim, busca-se o desenvolvimento de sistemas que contribuem para promoção da regeneração do tecido perdido com base nesses pontos, objetivando o completo retorno à função. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado resultados promissores em favorecer a regeneração óssea utilizando os biomateriais (Causa et al., 2006; Chuenjitkuntaworn et al., 2010; Aragon et al., 2017; Wang et al., 2017; Surmenev et al., 2019).

Atualmente os fosfatos de cálcio são os mais utilizados, principalmente a hidroxiapatita (HAP), devido às suas características biológicas e químicas que se assemelha com a fase mineral dos ossos e dentes. A HAP (Hui et al., 2014; Ozawa et al., 2018) é uma cerâmica biocompatível que possui capacidade osteocondutora

(Borges et al., 2000; Legeros, 2002; Vallet-regi, González-calbet, 2004; Carlo et al., 2009). Ainda são também caracterizadas por bioatividade e biodegradabilidade (Andreiotelli; Wenz; Kohal, 2009; Sabree et al., 2015), podendo também conferir propriedades de osteointegração quando utilizadas em superfícies ósseas (Valente, 2016). Devido a essas características, a HAP é utilizada objetivando manter a continuidade óssea e suporte à migração de células osteoprogenitoras, processo no qual ela é absorvida e substituída por um novo tecido ósseo (Zhou; Lee, 2011).

Entretanto a HAP possui alto módulo de elasticidade em relação ao osso e baixa tenacidade à fratura, o que limita seu uso em formatos específicos de implantes para preenchimento de grandes defeitos e membranas para regeneração tecidual guiada. Contudo, em associação com polímeros (Neuendorf et al., 2008; Reis et al., 2011) pode formar compósitos com melhor resistência mecânica (Wan et al., 2006). Tais associações têm sido exploradas, como o trabalho de Cho et al., (2019), que utilizando HAP+PCL em modelos de defeitos experimentais em ratos demonstraram benefício no grupo tratado. A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético, pertencente à família dos poliésteres poli- $\alpha$ -hidroxil (Oliveira et al., 2007), biocompatível, biodegradável, semicristalino, com baixo custo (Baker et al., 2016), boa solubilização em solventes orgânicos voláteis (Safaei et al., 2018). Além disso, é capaz de oferecer suporte para fixação de células endoteliais e osteoblásticas (Makarov et al., 2010; Yao et al., 2017).

Dessa forma, a utilização da HAP associada à PCL torna-se promissora na regeneração óssea, permitindo melhor adaptação do biomaterial às diferentes configurações de defeitos ósseos, mantendo a capacidade de fornecer suporte para diferenciação e proliferação celular (Chuenjitkuntaworn et al., 2010; Wen et al., 2020). Contudo, a forma principal de utilização dos biomateriais é o preenchimento do defeito ósseo (Alt et al., 2016; Groppo et al., 2017; Zhou et al., 2018) no intuito de promover a osteocondução (Bigham-Sadegh et al., 2018). Entretanto, os vasos sanguíneos que se rompem com a fratura enchem o local de sangue, formando o coágulo, pela ativação de plaquetas e organização de uma rede de fibrina rica em fatores de crescimento e citocinas que desencadeiam a formação óssea (Lam et al., 2011). O coágulo sanguíneo também fará o papel de um suporte, favorecendo a migração e proliferação celular no local da fratura (Davies et al., 1996; Gerstenfeld et al., 2015). Além disso, são liberados fatores derivados do periósteo, medula óssea e

dos tecidos adjacentes bem como fatores osteogênicos e angiogênicos importantes para a formação de novo osso (Marsell; Einhorn, 2011; Gerstenfeld et al., 2015).

Considerando a importância do coágulo na sinalização para a formação óssea o projeto teve como objetivo o desenvolvimento de uma membrana de HAP com PCL (HAP+PCL) porosa, flexível e absorvível que fosse capaz de envolver o defeito ósseo de forma a preservar o coágulo no foco da fratura e aliado a isso, servir de ponte entre os fragmentos da fratura, com sua capacidade osteocondutora facilitando a regeneração de fraturas com grande perda óssea no qual a aposição perfeita dos fragmentos não é possível.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia deste trabalho utilizando animais experimentais foi analisada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, aprovada e protocolada como processo nº 61/2018.

Objetivou-se no desenvolvimento da membrana, obter uma face com topografia complexa (estruturas nas escalas macro, micro e nanométricas) e uma face lisa (Carlo Reis et al., 2011), maleável para permitir a adaptação ao redor do rádio. Foram desenvolvidos protótipos com diferentes proporções de policaprolactona (PCL) e hidroxiapatita (HAP) sintética - JHS Laboratório Químico, Belo Horizonte (HAP-91®) nas dimensões de 1 mm de espessura, 15 mm de largura e 20 mm de comprimento. Para tal, a PCL e a HAP foram pesadas nas proporções 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, respectivamente. As amostras de HAP e PCL foram acondicionadas juntas em um recipiente para diluição da PCL em diferentes solventes, separadamente em cada um: clorofórmio, éter e DMSO com quantidades suficientes até a completa homogeneização do compósito. Para formação dos poros foram utilizadas duas técnicas. Na primeira, a sacarose foi adicionada imediatamente após a dissolução da PCL e mistura da HAP (M1). Em seguida, sobre uma placa forrada com papel alumínio, 0,5 ml de quantidade do biomaterial em sua forma líquida foi depositada com auxílio de uma espátula para formação de cada membrana. Na segunda técnica (M2), sacarose foi pulverizada sobre a face da membrana voltada para cima. Posteriormente, todas as membranas passaram por

um processo de secagem natural durante 24 horas. Após a etapa de secagem, foi realizada a lavagem das membranas para retirada total da sacarose utilizando água destilada. Foram realizadas duas lavagens de 24 e 48 horas, respectivamente. Após a lavagem das membranas e total retirada da sacarose, as membranas foram colocadas em uma bancada e o processo de secagem se deu naturalmente durante 48 horas. Após estarem totalmente secas, as membranas foram esterilizadas por radiação gama, com auxílio da JHS Laboratório Químico, Belo Horizonte.

A estrutura microscópica da superfície das membranas foi avaliada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Três amostras de cada membrana foram fixadas em um suporte metálico sobre uma fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro (metalização), utilizando um Sputter Coater BAL-TEC/ com um sistema de deposição “sputtering balzer”. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura da marca LEO, modelo 1430VP, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

As imagens obtidas com a microscopia eletrônica de varredura foram digitalizadas e analisadas pelo programa Phytom Imaging Livbrary. A topografia de superfícies das membranas foram avaliadas quanto à: topografia com macro, micro e nanoestruturas de acordo com Kikuchi et al. (2005); distribuição e formato dos cristais de HAP expostos na superfície das amostras, se existentes; presença ou não de poros e, quando presentes, os diâmetros médios (medindo-se o menor e o maior diâmetro de cinco poros escolhidos ao acaso em cinco imagens de cada amostra, obtendo-se posteriormente média e desvio padrão). Foi possível avaliar, assim, o tamanho dos poros obtidos e analisar a adequação desses tamanhos ao desenvolvimento do tecido ósseo com base na literatura.

Com o intuito de avaliar a cristalinidade, os compósitos foram submetidos à difração de raios-X no Laboratório de Mineralogia do Departamento de Solos da UFV. Para isso, uma amostra de cada membrana foi moída com o intuito de reduzi-la a partículas menores e permitir a adequação ao porta-amostra. O material permaneceu 12 horas em temperatura ambiente para secagem. Após este período, foi realizada a análise de difratometria de raios X no difratômetro multifuncional Panalytical X'Pert Pro PW 3040/60 equipado com tubo de cobalto (radiação  $\text{Co-K}\alpha$ ,  $\lambda = 1,79026 \text{ \AA}$ ), operado com uma diferença de potencial de 40 kV e uma corrente elétrica de 30 mA. As varreduras foram realizadas no modo passo a passo em

intervalo de 15 a 50° 2 $\theta$  com 0.05° de incremento e 2 segundos de contagem de tempo em cada passo. Os difratogramas obtidos foram apresentados por meio de gráficos e analisados de forma descritiva.

A citotoxicidade das membranas de HAP+PCL foi avaliada realizada pelo teste de azul de triazol (MTT) com base na capacidade da enzima desidrogenase oxidar sal de tetrazólio (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil-tetrazólio) em um produto insolúvel azul, avaliando-se a viabilidade celular. Foram utilizadas amostras do biomaterial, de náilon como controle negativo (não citotóxico), látex como controle positivo (citotóxico) e meio (controle). Células da linhagem contínua VERO foram cultivadas a uma densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/mL (75  $\mu$ L) em meio  $\alpha$ -MEM (425  $\mu$ L) a uma temperatura de 37°C numa atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> num ambiente com 100% de umidade. Após 24 horas de adesão à placa, um fragmento de um fragmento de aproximadamente 3 mm x 3 mm do biomaterial foi adicionado a cada poço da placa de 24 poços, assim como os grupos controles, exceto o fio de náilon que recebeu um segmento de 3mm. Foram realizados quatro poços para grupo com membrana, assim como para os grupos controle. Após 72 horas de incubação, o biomaterial foi removido e foi acrescentado 200  $\mu$ L de uma solução de MTT (3-{4,5- dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio bromido) (0,5 mg/mL) a 37°C durante 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e acrescentado 400 $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) que atuou por 30 minutos. Após essa etapa, foi realizada a leitura dos cristais de formazana, com leito ELISA Spectra Count em um leitor de placas com densidade óptica em um comprimento de onda de 570 nm. A geração do produto azul é proporcional à atividade oxidativa da enzima desidrogenase e os valores obtidos na absorvância a 570 nm, proporcionais à viabilidade celular. A citotoxicidade do biomaterial foi calculada por meio de uma regressão não-linear log [Grupos] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células viáveis), utilizando os programas GraphPad Prisma® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®, submetida a análise de variância seguido do teste de Dunnett.

### **Análise da regeneração óssea**

Para o procedimento experimental, foram utilizados 14 coelhos adultos fêmeas, da raça Nova Zelândia, brancos, com idade média de doze meses, pesando

entre 5,0-5,5kg. Os animais foram obtidos do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFV. Os mesmos foram mantidos em gaiolas padronizadas, próprias para animais desta espécie, presentes na Coelheira do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV). Os animais receberam aproximadamente 250g/dia ração comercial, água e feno ad libitum durante os períodos de adaptação e experimental.

Como medicação pré-anestésica foi utilizado diazepam (1,0 mg/kg) com associação de cetamina (12,5 mg/kg) por via intramuscular. Após efeito da medicação, foi realizada a tricotomia da orelha esquerda e a veia marginal foi canulada para a administração de fluídos (Ringer Lactato) a uma taxa de 10 ml/kg/hora. Uma máscara anestésica foi utilizada para manutenção da anestesia, contendo isofluorano a 1L/min O<sub>2</sub>. De maneira profilática, foi administrado cefazolina (20mg/kg) por via intramuscular, uma hora antes do procedimento.

Em seguida a tricotomia foi realizada no membro torácico direito desde região axilar até a porção distal das falanges. Cada animal foi posicionado em decúbito lateral direito de forma que a face medial do membro que foi trabalhado permaneceu para cima, paralelo à mesa cirúrgica. O membro esquerdo foi tracionado e fixado caudalmente, permitindo livre acesso ao local da cirurgia. Uma vez o animal em plano anestésico, adequada antisepsia, foi realizado bloqueio do plexo braquial com bupivacaína (3 mg/kg) e lidocaína (7 mg/kg). Em seguida, a região dos metacarpos e falanges foi isolada com o auxílio de uma atadura estéril.

Confirmada a ausência dos reflexos de dor, e com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº10, foi realizada uma incisão craniomedial para acessar o rádio em sua porção distal da diáfise. De acordo com a técnica preconizada por Decamp et al., (2015) afastadores de Farabeuf foram utilizados para retração e proteção do tendão dos músculos extensor digital comum, extensor radial do carpo, abductor polis longo e flexor radial do carpo, e exposição do periósteo ósseo. Após correta medição com o auxílio de uma régua milimetrada estéril, a 10 mm da articulação radiocarpal, foi realizada uma ostectomia total do rádio de um fragmento de 8mm de comprimento.

Utilizou-se para isso uma caneta de alta rotação e broca odontológica Diamond 1014 sob constante irrigação de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Figura 1A). A ulna foi mantida intacta. Para a realização do experimento, os animais foram divididos em dois grupos, contendo sete animais cada grupo, a saber: Grupo I

(controle) – defeito ósseo preenchido com coágulo formado naturalmente; Grupo II – defeito ósseo com coágulo protegido com a membrana de HAP+PCL envolvendo o defeito ósseo e fixada nas extremidades distal e proximal do defeito no rádio com náilon 3-0 com duas suturas simples uma na parte superior e outra na parte inferior da membrana em torno dos fragmentos distal e proximal do rádio (Figura 1B).



Figura 1. Procedimento cirúrgico para realização do defeito experimental no rádio de coelho. A- Realização do defeito 10mm acima da articulação rádio-carpal com broca odontológica acoplada a caneta de alta voltagem sob irrigação com solução de cloreto de sódio a 0,9%. B. Fixação da membrana envolvendo o defeito em uma amostra óssea de rádio e ulna.

Em seguida musculatura e fáscia foram aproximadas com fio 3-0 (náilon) em sutura contínua e a pele com o mesmo fio em sutura Wolf. A metodologia para confecção da ostectomia foi modificada de Lyons et al (2014); Ye et al., (2017); Maiti et al., (2018) e Minto et al., (2021).

Findo o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos anestesiados para a realização das imagens radiográficas pós-operatórias imediatas, para documentação e avaliação dos defeitos ósseos. Como cuidados pós-operatórios foram realizadas a administração de cloridrato de tramadol (10 mg/kg) a cada 8 horas e meloxicam (0,2 mg/kg) a cada 24 horas, ambos por via subcutânea, durante o período de 5 e 2 dias, respectivamente. Foi realizado aquecimento do animal quando necessário, avaliação da frequência cardíaca e da frequência respiratória. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no mesmo local onde se encontravam previamente, monitorados por uma equipe treinada, até que voltassem

com movimento deambulatório. Diariamente foram observados ingestão de água e alimento, vocalização, piloereção, postura dos animais e deambulação. A ferida cirúrgica foi avaliada quanto à presença de edema, inflamação e infecção a partir de inspeção visual. Cada membro foi avaliado quanto à claudicação, de acordo com o apoio da extremidade com os escores: 0- sem claudicação; 1- apoio com claudicação; 2- ausência completa de apoio.

O processo de regeneração óssea no período pós-operatório foi acompanhado através da avaliação da radiodensidade óssea. Para cada membro operado, foram realizadas duas incidências radiográficas: mediolateral e craniocaudal. Para isso, os animais foram sedados com diazepam (1,0 mg/kg) e cetamina (12,5 mg/kg) por via intramuscular. Foram utilizados o equipamento de raio-X móvel marca Raycenter, modelo Omega 200T, e o sistema computadorizado (CR C Prima e FCR Prima), Hospital Veterinário, DVT/UFV. Foram realizadas radiografias no pós-operatório imediato (dia 0), 30 e 90 dias utilizando-se da técnica radiográfica de 50kVp, 100mA e 5s. Todas as radiografias foram tomadas com um penetrômetro de alumínio, constituído por cinco degraus, com espessura de 3 mm entre cada um deles, posicionado próximo ao rádio e a ulna. As imagens digitalizadas foram analisadas no programa Image J de acordo com Araújo et al., 2018, que forneceu valores médios dos níveis de cinza para cada região selecionada. Em cada degrau foi selecionada uma área de 25 x 200 pixels, com auxílio da ferramenta de seleção retangular, sendo então aferida a tonalidade média de cinzas. Os valores obtidos foram armazenados sob a forma de tabelas para cada imagem analisada, a fim de que cada uma tivesse a sua própria escala padrão. Posteriormente, a ferramenta de seleção de área retangular foi utilizada para obtenção do valor do grau de cinza da região do defeito no rádio. Estes valores foram registrados nas tabelas, juntamente com as informações de suas respectivas escalas de alumínio, para, então, serem convertidos à unidade de mm Al, mediante a construção de um gráfico e sua regressão linear, obtidos com base no penetrômetro, no programa Excel. A da radiodensidade foi submetida à análise de variância (ANOVA) de dois fatores para medidas repetidas considerando o tratamento (grupos tratados e controle) e tempo (pós-operatório, 30 e 90 dias) como variáveis independentes.

## Tomografia microcomputadorizada

Após 90 dias do pós-operatório, os animais foram submetidos à eutanásia através do uso de sobredose anestésica de propofol pela via intravenosa seguido de cloreto de potássio pela mesma via. Após confirmação da perda dos sinais vitais, foram realizadas as coletas das amostras, através da desarticulação das articulações proximal e distal em relação ao local a ser analisado, imersos em formol 10% por 72 horas, e mantidas em álcool 70% até o processamento final.

A análise por tomografia microcomputadorizada foi realizada de acordo com Reis et al (2010). Todos os fragmentos foram escaneados utilizando o sistema SkyScan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT Kontich, Belgium) com resolução de 21  $\mu\text{m}$ , 90kV e 111 $\mu\text{A}$ , e filtro de alumínio de 0,5mm + Cobre 0,038 mm que se encontra localizado no Nanolab (Microscopia Eletrônica e outras técnicas) da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP. As imagens foram obtidas através de reconstrução pelo software NRecon (SkyScan, versão 1.7.0.4) e analisadas através do software CTAn (SkyScan, versão 1.16) para os seguintes parâmetros: BV (volume ósseo neoformado), Tb.N (número de trabéculas), Tb.Th (espessura média das trabéculas) e Tb.Sp (separação entre as trabéculas). Para isso, em cada amostra foi selecionada uma região de interesse (ROI), visualizando o centro do defeito e selecionando os *slice* 4 mm na direção proximal e 4 mm da região distal. Além disso, após definir o ROI, foi necessário definir um valor limiar para binarização (*threshold*). Após obter o *threshold* que mais se assemelhou à imagem original para cada amostra, foi feita a média dos valores obtidos. Dessa forma, foi determinado um limite inferior em 60 e um limite superior em 180 (*grayscale threshold* 0 – 255), sendo a mesma binarização utilizada para todas as amostras. Adicionalmente, os cortes bidimensionais foram utilizados para avaliação qualitativa da presença de união óssea entre os fragmentos e trabéculas presentes no defeito. Os parâmetros da tomografia foram submetidos ao teste t quando a distribuição normal e homogênea. O teste Mann-Whitney foi realizado quando as condições de normalidade e homegeneidade não foram cumpridas. Em caso de significância para todas as avaliações, foi procedido o teste de Tukey com nível de significância a 5%.

## **Análise histológica**

A análise histológica foi realizada após as análises por tomografia microcomputadorizada. As amostras foram inicialmente descalcificadas com ácido fórmico 10% e citrato de sódio durante três semanas. Em seguida, foram desidratadas em álcool a 70, 80, 90 e 100% por aproximadamente 12 horas em cada etapa, com repetição no álcool absoluto e diafanizadas em dois banhos de xilol por 2 horas cada. Os fragmentos foram incluídos em parafina e posteriormente seccionados em cortes de 8µm no micrótomo rotativo e montados em lâmina de vidro. De cada bloco de parafina foram obtidos pelo menos dois cortes histológicos, que foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina, visando à análise histológica da amostra em microscópio óptico. Na análise qualitativa, foram avaliadas áreas de formação de novo osso em toda extensão do defeito, sendo observadas as características das trabéculas ósseas, remodelação das mesmas e espaços medulares. Além disso, avaliou-se a presença de tecido fibroso e presença de células osteoprogenitoras.

## **RESULTADOS**

### **Desenvolvimento da membrana e estudos *in vitro***

Dentre os solventes utilizados, o que apresentou melhor dissolução da HAP com PCL foi o clorofórmio, seguido do DMSO e por último o éter, realizando-se, assim, as etapas seguintes com o clorofórmio. Durante o desenvolvimento das membranas, observou-se que aquelas contendo 50%, 40% e 30% de HAP mostraram-se demasiadamente frágeis. Já os compósitos contendo 10% e 20%, mostraram-se maleáveis e mais resistentes à manipulação (Figura 2 A), o que favorece a colocação e adequação da membrana no defeito ósseo (Figura 2 B). Como o compósito com 20% possui a maior proporção de HAP, cerâmica com resultados favoráveis já demonstrados para regeneração óssea (Sidane et al. 2017; Torres et al. 2017; Akhbar et al. 2018; Araújo et al.,2018) com característica desejável para manipulação, esta proporção foi escolhida para os testes subsequentes.

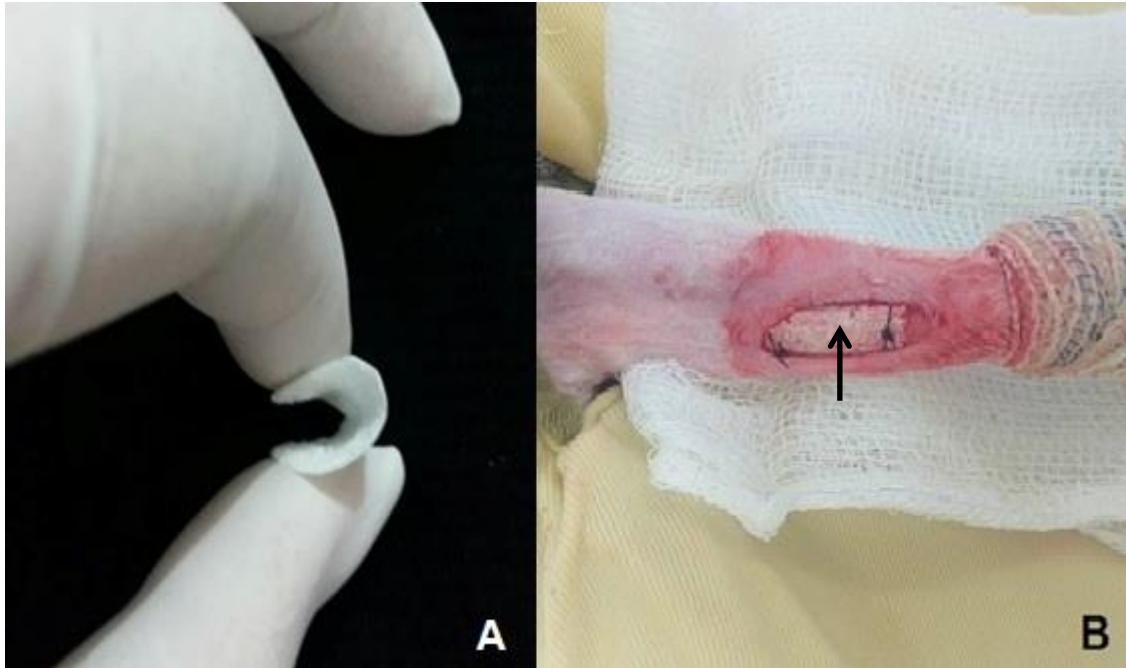


Figura 2. Membrana de HAP-91 e PCL. A- Maleabilidade da membrana. B- Membrana (seta) envolvendo o defeito de 8mm do rádio distal.

A técnica de homogeneizar a sacarose juntamente com o compósito (M1) proporcionou a formação de uma camada de polímero e HAP envolvendo os grânulos de sacarose, dificultando sua remoção na lavagem e impedindo a formação dos poros adequados (Figura 3A). A técnica de formação dos poros que permitiu remoção completa da sacarose nas etapas de lavagem da sacarose foi a de pulverização (M2), como formação de poros macroscópicos como mostrado na Figura 3B. Na análise microscópica, pode ser observado (Figura 3 C) a presença dos poros do compósito de HAP+PCL. O tamanho dos poros variaram de  $66,56\mu\text{m} \pm 22,94$  e  $275\mu\text{m} \pm 49,23$  (Tabela 1) para microporos e macroporos, respectivamente.

Tabela 1. Média e desvio padrão (em  $\mu\text{m}$ ) do diâmetro dos poros

	<b>Membrana 80:20</b>	<b>Poros (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Microporos</b>	PCL e HAP	$66,56 \pm 22,94$
<b>Macroporos</b>	PCL e HAP	$275 \pm 49,23$

Pode-se notar ainda, a superfície da membrana (Figura 3 D) com a presença dos cristais da HAP na matriz da PCL. Diferentemente do que pode ser observado na membrana desenvolvida com a sacarose homogeneizada no compósito, na qual

nota-se uma superfície compacta, lisa e sem definição das estruturas. Esta membrana não foi selecionada para o estudo *in vivo* por não possuir superfície topográfica ideal para regeneração óssea.

De acordo com as análises das características macroscópicas e microscópicas, optou-se pela membrana de HAP+PCL na proporção de 80:20 dissolvida no clorofórmio, com técnica de pulverização da sacarose para formação dos poros.

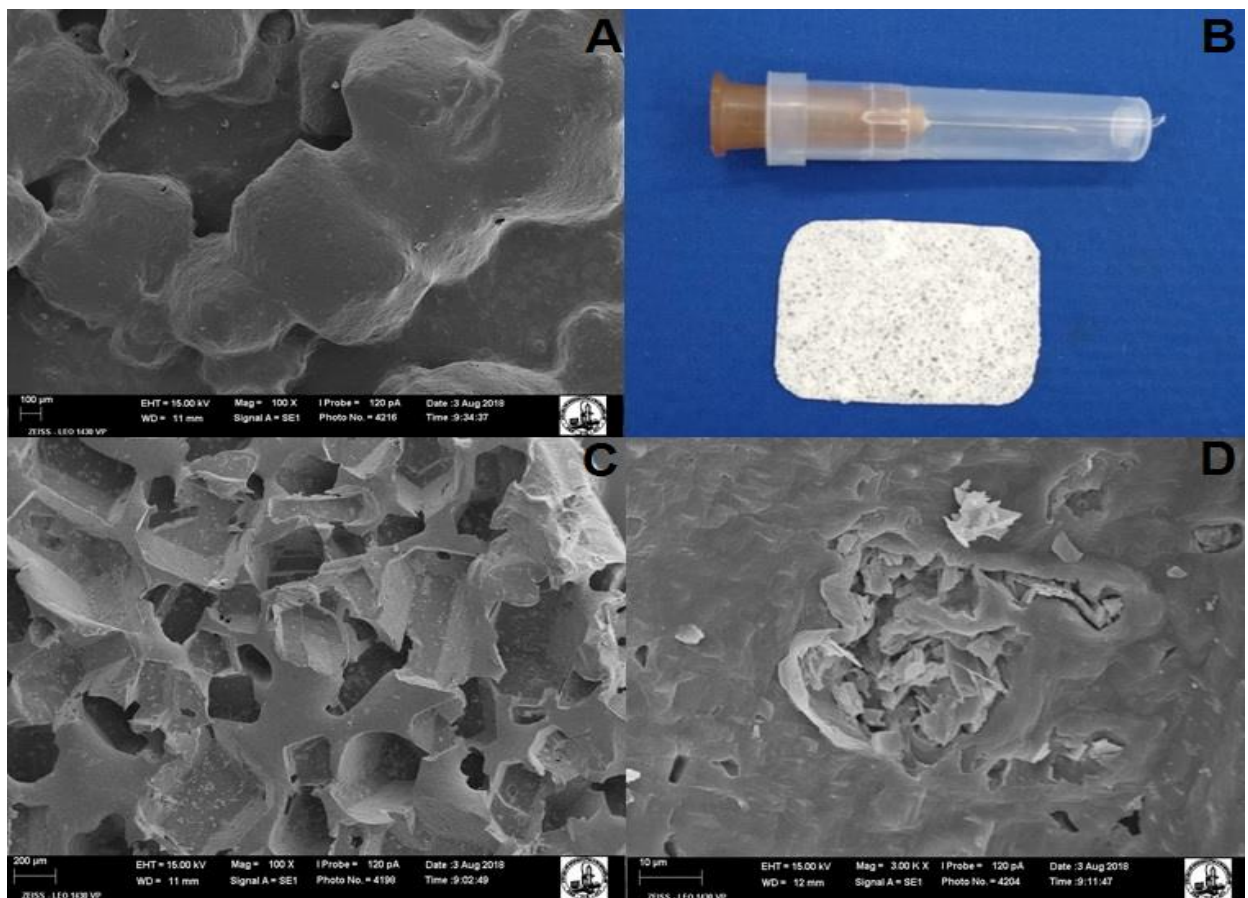


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão e varredura da membrana de HAP-91 e PCL. A- MEV da superfície da membrana 20% HAP+PCL pela técnica de homogeneização da sacarose com compósito. Observa-se que o compósito forma uma película sobre a sacarose (seta). B- Protótipo da membrana com presença de macroporos. C- MEV da superfície da membrana 20% HAP+PCL pela técnica de pulverização da sacarose após a fabricação. Observa-se presença dos poros (setas) de HAP na matriz de PCL. D- Em maior aumento, podem ser observados os cristais de HAP (setas) em meio a matriz lisa de PCL (asterisco) e a diferença de topografia dos biomateriais.

O difratograma da membrana está demonstrado na figura 4. Podem ser observados picos altos e agudos da HAP (Chen, Wolke, De Grot, 1994; Reis et al., 2012) e PCL (Bittiger; Marchessault; Niegisch, 1970; Milovac et al., 2014; Trakoolwannachai; Kheolamai; Ummartyotin et al, 2019). Os valores foram consistentes com CPDS Card para HA (Mincrust, 2019) e como a PCL Baji, 2007; Quian et al., 2009; Chen J, 2014).

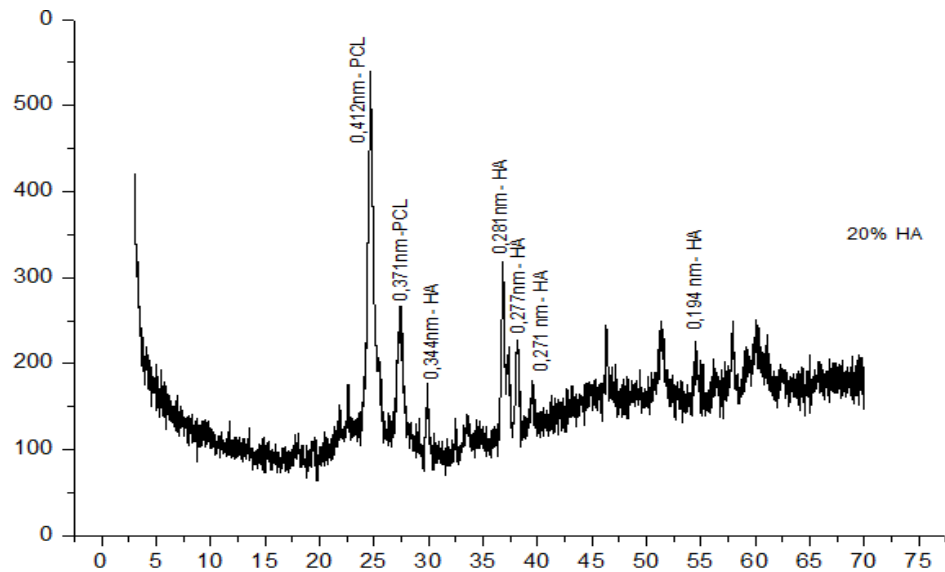


Figura 4. Difratograma do compósito de hidroxiapatita sintética associada a policaprolactona na avaliação de sua cristalinidade por difração de raios X representada pelos valores das distâncias Interplanares (d).

O teste de biocompatibilidade das membranas de HAP+PCL tiveram como resultados diferenças significativas no tempo de 72 horas (Figura 5) para o látex em relação ao biomaterial, náilon e controle com  $p < 0,05$  de significância. O biomaterial apresentou viabilidade celular, semelhante ao controle e ao náilon.

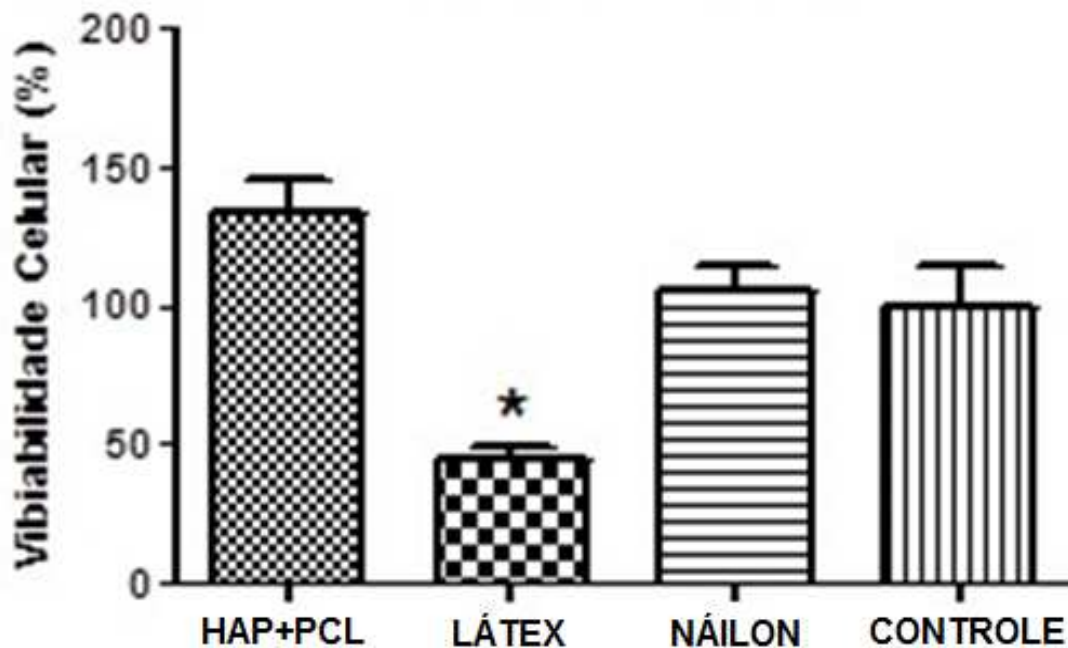


Figura 5. Viabilidade celular em cultivo de linhagem contínua de Vero. O asterisco (\*) demonstra a diferenças do latex entre os grupos.

### Estudo *in vivo*

No pós-operatório os animais apresentaram edema do membro e claudicação grau 1 em ambos os grupos por aproximadamente cinco dias. Os animais não apresentaram deiscência ou infecção da ferida cirúrgica em 90 dias de avaliação. Um animal do grupo controle apresentou fratura distal de ulna no 14º dia do pós-operatório, confirmada com exame radiográfico, e imediatamente foi realizada a eutanásia desse animal. Dois animais do grupo controle apresentaram automutilação discreta das falanges distais sem apoio do membro no dia 20º e 30º dia pós-procedimento cirúrgico, e, portanto foi realizado curativo no membro durante 10 dias, até o momento da cicatrização da ferida.

Durante a avaliação das radiográficas do pós-operatório imediato no grupo controle observou-se o defeito de aproximadamente 8 mm e bordas bem delimitadas (Figuras 6 A1). Nos dias 30 e 90 ainda foi possível visualizar o defeito ósseo sem alteração significativa na radiodensidade (Figura 6 A2 e A3). A avaliação dos animais no grupo tratado demonstrou que no pós-operatório imediato também foi observado a presença do defeito ósseo com as bordas delimitadas e 8mm de

tamanho (Figura 6 B1). Nos dias 30 (Figura 6 B2) e 90 (Figura 6 B3) ainda foi possível visualizar o defeito ósseo, com uma redução do tamanho do defeito principalmente aos 90 dias.



Figura 6. Radiografias com projeção crânio-caudal dos grupos controle (A) e tratado com membrana de HAP-91+PCL (B) do rádio e ulna de coelhos submetidos à realização do defeito na diáfise distal do rádio. Pós-operatório (A1 e B1), com 30 dias (A2 e B2) e 90 dias (A3 e B3). As setas indicam local do defeito.

Na comparação entre os valores médios de mmAl do defeito no grupo controle não houve diferenças significativas na radiodensidade óssea no pós-operatório imediato em relação aos 30 e 90 dias. Também não foram observadas diferenças significativas entre 30 e 90 dias. Notou-se que os animais que receberam a membrana de HAP+PCL tiveram incremento da radiodensidade óssea em todos os tempos avaliados ( $P < 0,05$ ). Além disso, os animais que receberam a membrana apresentaram radiodensidade óssea significativamente maior em relação ao grupo controle ( $P = 0,0228$ ) aos 90 dias (Figura 7).

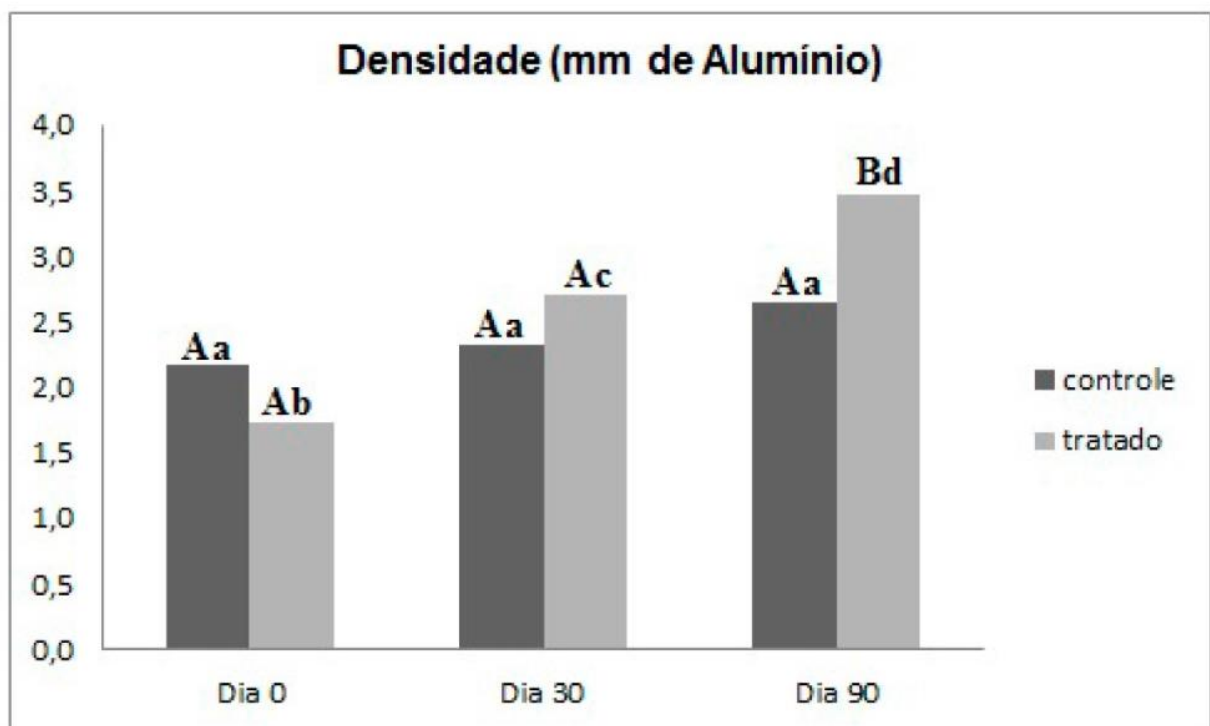


Figura 7. Densidade radiográfica média e desvio padrão obtidos na análise da região do defeito ósseo no dia 0, 30, 90 dias dos grupos HAP-91+PCL e controle. Letras maiúscula diferentes (entre grupos dentro de uma mesma data) e letras minúsculas diferentes (entre datas dentro do grupo e entre os grupos em datas diferentes) denotam diferença significância ( $p < 0,05$ ) na análise de variância (ANOVA) de dois fatores para medidas repetidas.

Na avaliação qualitativa da tomografia microcomputadorizada aos 90 dias após a cirurgia, foi possível observar no grupo tratado com membrana de HAP+PCL, o crescimento de tecido ósseo em quase todo o defeito (Figura 8 A), com trabéculas ósseas recém-formadas, delgadas, em crescimento centrípeto e evidente reação periosteal. No grupo tratado quatro animais tiveram união do fragmento do defeito.

Em contrapartida, nos animais que não receberam a membrana é possível observar que a formação óssea se restringiu às bordas do defeito e formação discreta de trabéculas (Figura 8 B), com apenas dois animais com união dos fragmentos ósseos. É possível observar que houve uma perda na regularidade da borda do defeito, sugestivo de formação de tecido ósseo em ambos os grupos. Na análise estatística não houve diferenças significativas  $p (<0,05)$  entre o grupo tratado e controle para os seguintes parâmetros: BV (volume ósseo neoformado), Tb.N (número de trabéculas), Tb.Sp (separação entre as trabéculas). Para Tb.Th (espessura média das trabéculas) o resultado demonstrou ser maior no grupo controle.

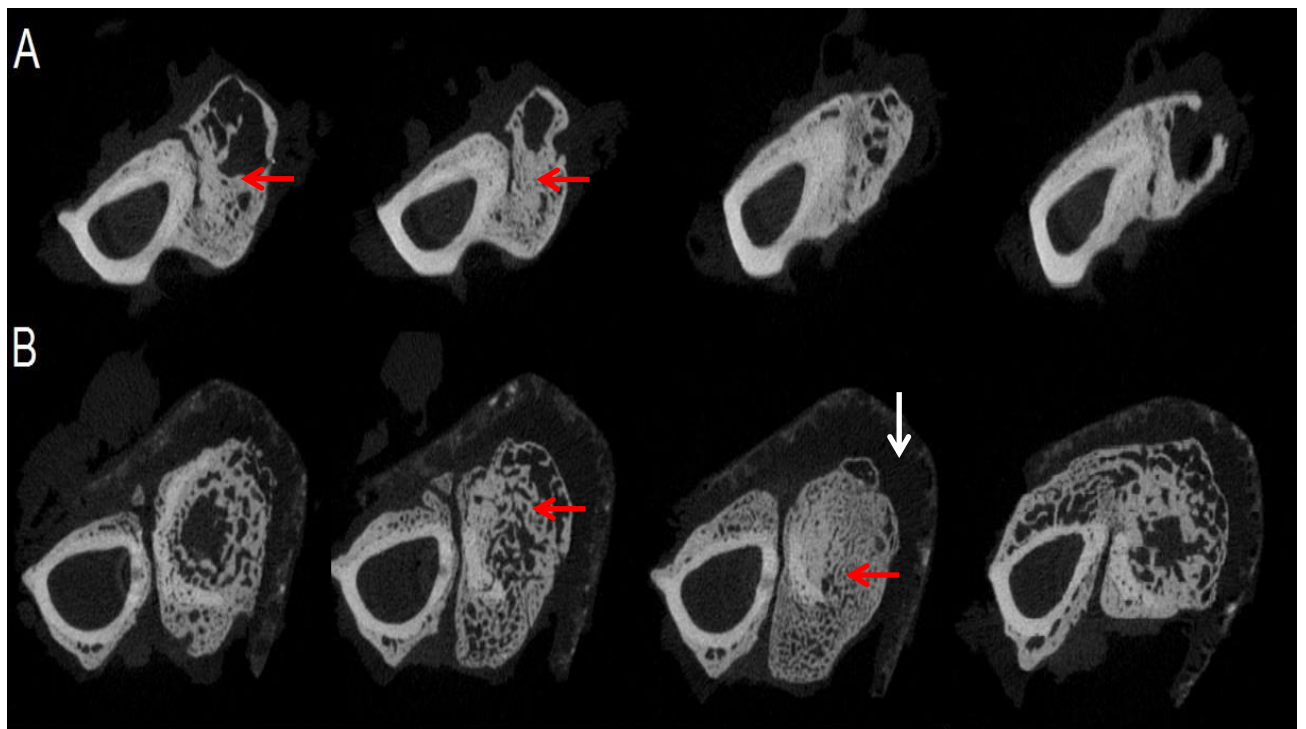


Figura 8. Imagens por tomografia microcomputadorizada de secções transversais do rádio de coelho aos 90 dias. A - Rádio de animal que não recebeu nenhum compósito (grupo controle), apresentando poucas trabéculas, restrita à borda do defeito (seta vermelha). B - Rádio de animal que recebeu a membrana de HAP+PCL (seta branca), preenchido por trabéculas ósseas recém-formadas (seta vermelha).

Foi possível distinguir o osso neoformado do biomaterial, uma vez que o padrão visualizado na regeneração óssea do defeito foi característico de osso trabecular como descrito por Bouxsein et al., (2010) e Araújo et al., (2015), enquanto como pode ser observado na imagem 3D, diferente do grupo controle (Figura 9 A) o

biomaterial foi visualizado como grânulos radiopacos, ao redor do defeito nos animais do grupo tratado (Figura 9 B).

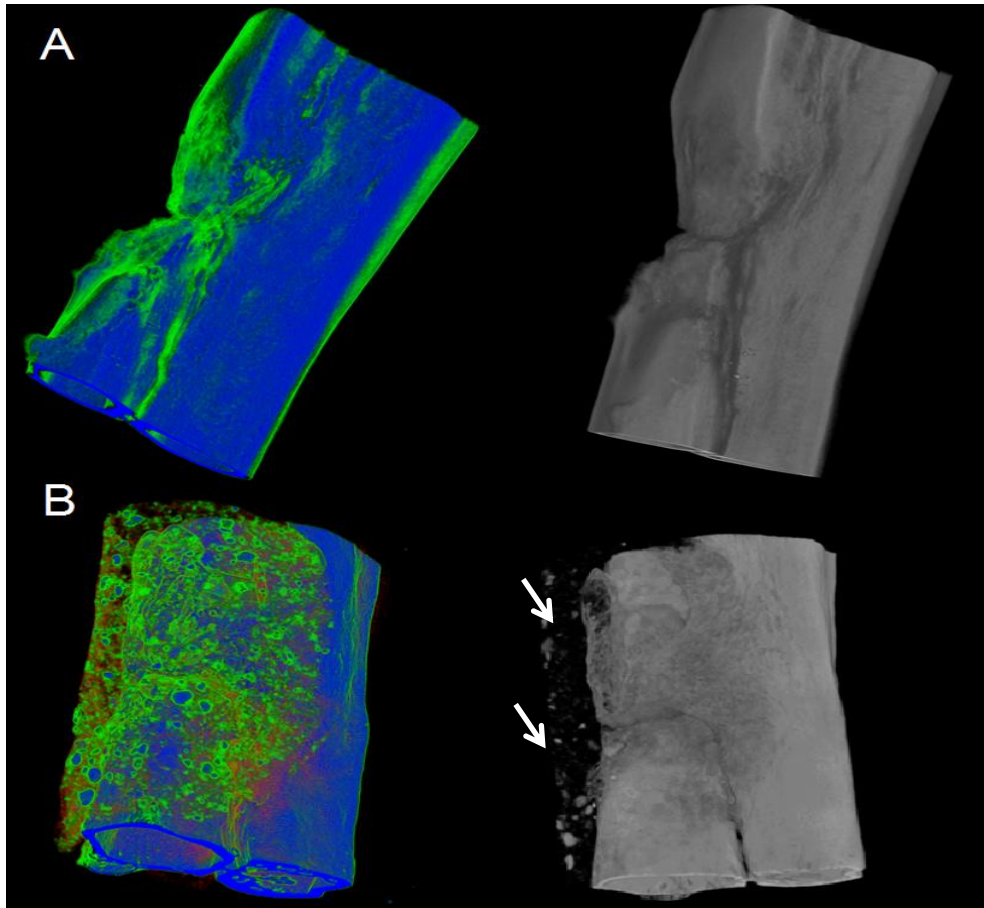


Figura 9. Reconstrução tridimensional por tomografia microcomputadorizada de duas amostras analisadas do rádio de coelho após realização do defeito segmentar e reparação por 90 dias. A. Grupo controle. B. Grupo com membrana de HAP+PCL (grânulos radiopacos de HAP – setas brancas).

Na histologia óssea, o grupo com membrana apresentou tecido conjuntivo frouxo na parte externa formando uma cápsula de tecido conjuntivo e uma matriz provisória mais espessa na parte interna da membrana com superfície irregular com intensas células ativas entre membrana e o tecido ósseo (Figura 10 A), com presença de tecido conjuntivo denso (Figura 10 B) e região de medula óssea (Figura 10 C) com intensa vascularização. Observou-se tecido ósseo lamelar mais organizado (Figura 10 D), com presença de trabéculas ósseas neoformadas contendo osteócitos e osteoblastos ativos.

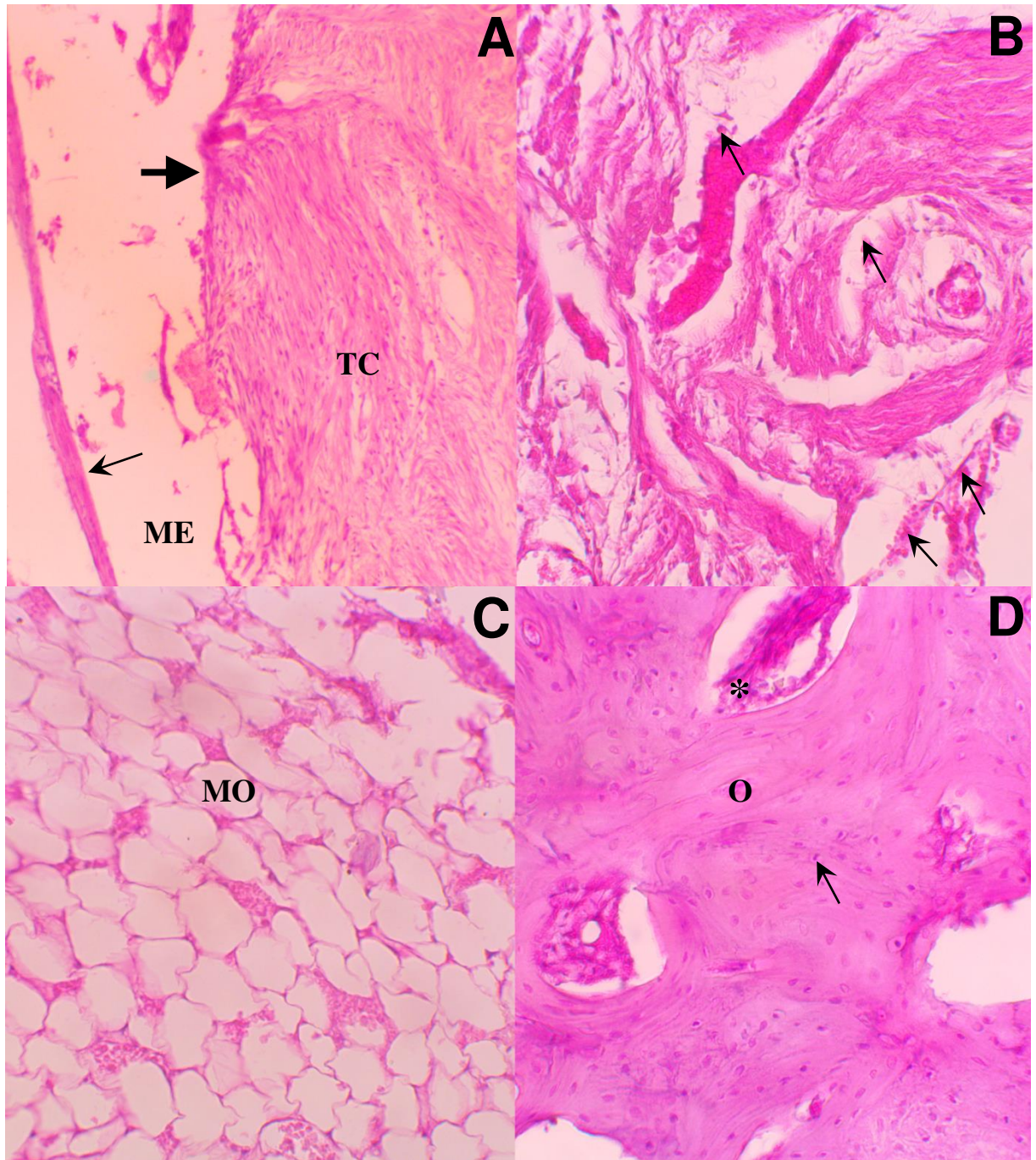


Figura 10. Fotomicrografia da região do defeito realizado no rádio de coelho 90 dias de pós-operatório submetidos à implantação da membrana de hidroxiapatita e policaprolactona. A. Interface (seta fina) da região externa da membrana (ME) com uma fina camada de tecido conjuntivo e intensa matriz de tecido conjuntivo (TC) com presença de borda irregular (seta larga) aderido à face porosa da membrana voltada para o defeito ósseo. HE, 100x. B. Tecido conjuntivo denso vascularizado. HE, 200x. C. Medula óssea vascularizada (MO). HE, 200x. D. Tecido ósseo (O) mais organizado com presença de osteócitos (seta) e osteoblasto ativo (asterisco). HE, 200x.

O grupo controle apresentava menor quantidade de matriz provisória de tecido conjuntivo frouxo (Figura 11 A), presença de tecido ósseo lamelar desorganizado (Figura 11 B), presença de osso trabecular com irrigação sanguínea menos densa (Figura 11 C). Em ambos os grupos foi observado presença de osteoblastos ativos (Figura 11 D) com formação óssea, ausência de células gigantes e processo inflamatório.

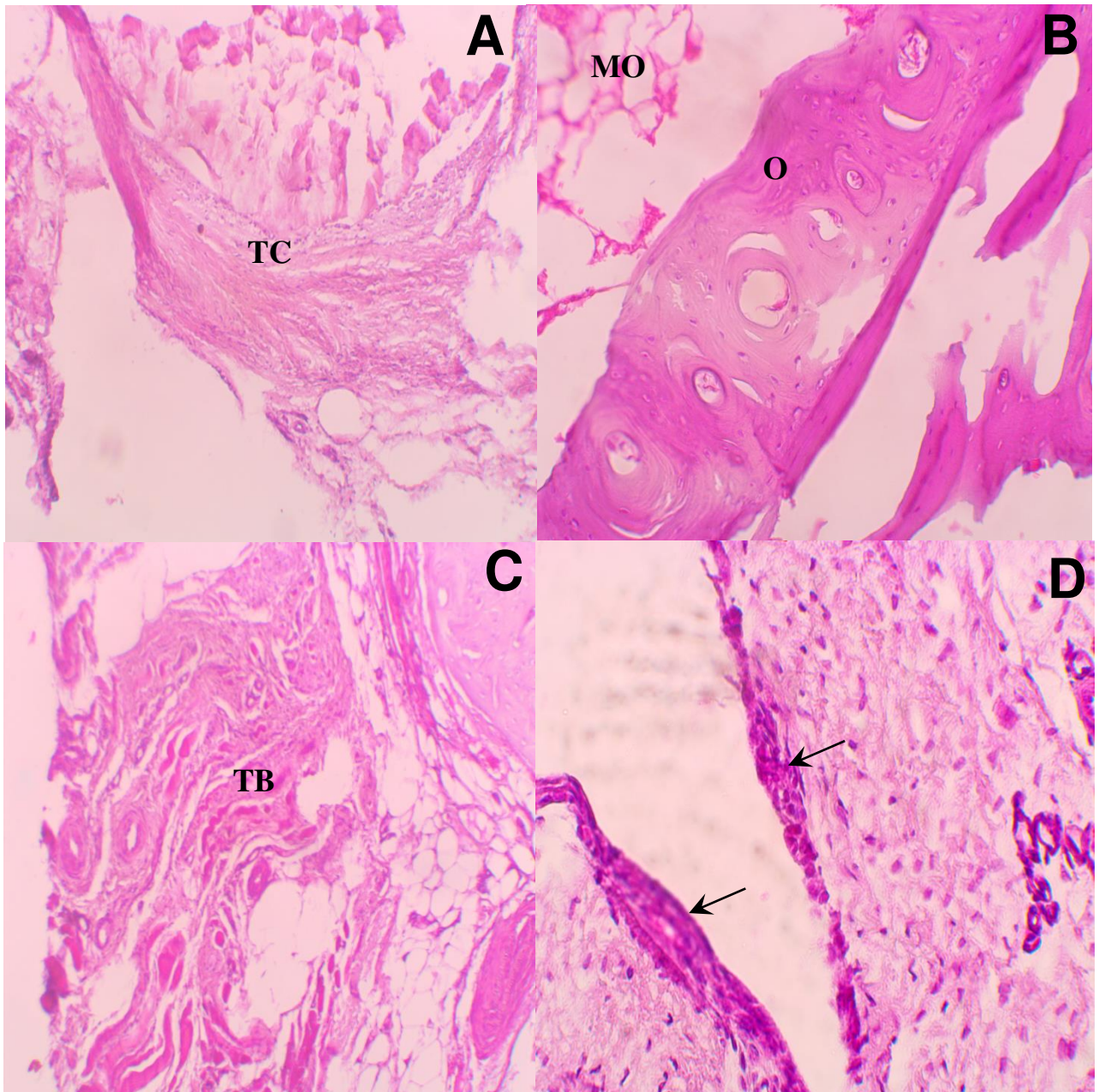


Figura 11. Fotomicrografia da região do defeito realizado no rádio de coelho 90 dias de pós-operatório do grupo controle. A. Matriz delgada de tecido conjuntivo (TC). HE, 100x. B. Tecido ósseo desorganizado (O). HE, 200x. C. Osso trabecular. HE, 200x. D. Osteoblastos ativos (setas). HE, 200x.

## DISCUSSÃO

Com desenvolvimento da engenharia de tecidos, a associação de polímeros com cerâmicas, como a HAP com a PCL, tem sido utilizada na regeneração óssea. Nesse estudo, uma membrana de HAP+PCL foi desenvolvida a fim de melhorar as propriedades mecânicas, de degradação, interação e adesão biológica. Além disso, a membrana foi planejada com o intuito de promover a osteocondução e ser suporte para neovascularização e conseqüentemente favorecer a formação óssea.

Nesse estudo, as membranas desenvolvidas que possuíam maiores concentrações de HAP-91® apresentaram-se mais frágeis. Esse fato pode ser explicado devido a HAP ter alto módulo de elasticidade e por conseqüência, baixa tenacidade à fratura (Shishatskaya et al., 2004; Neuendorf et al., 2008). Estudo por Doyle, Tanner e Bonfield (1991) com compósitos de HAP associada à polihidroxibutirato demonstrou que valores de resistência são inversamente proporcionais à porcentagem de HAP nos compósitos, o que posteriormente também foi demonstrado com outras associações de polímeros e cerâmicas (Fabri et al., 2010; Minto et al., 2021). Dessa forma, quanto maior a proporção de HAP maior será a fragilidade do compósito. A membrana escolhida com proporção 20:80 (HAP+PCL), apresentou a maior concentração de HAP com excelente maleabilidade de forma a permitir adaptação a defeitos ósseos e no caso do presente estudo, envolver o defeito ósseo como realizado no modelo *in vivo* utilizado.

O mecanismo de ação da membrana desenvolvida se baseia em três premissas: (i) proteção do local do defeito; (ii) proteção do volume do coágulo; e (iii) osteocondução. Considerando as duas primeiras premissas, a importância do envolvimento do defeito ósseo é preservar o coágulo sanguíneo no local do defeito, impedindo a interposição de outros tecidos entre os fragmentos da fratura e a proteção do volume do coágulo para que preencha todo o defeito, diminuindo a contração da matriz formada pelo coágulo em organização (Reis et al., 2011). Assim, deve-se favorecer a ativação plaquetária e adesão da rede de fibrina rica em fatores de crescimento e citocinas que são primordialmente os fatores iniciadores e perpetuadores da formação óssea (Lam et al., 2011) em todo o defeito ósseo, diferentemente de outros estudos que preencheram o defeito ósseo (Ochoa et al., 2013; Rezaei; Mohammadi, 2013, Perdigão et al., 2015; Chuenjitkuntaworn et al., 2016; Valente et al., 2016; Araújo et al., 2018) . Por sua vez, a superfície da

membrana foi desenvolvida com o objetivo de favorecer a adesão e ativação plaquetárias, além da adesão da rede de fibrina (Oprea et al., 2003; Kikuchi et al., 2005; Tripathi et al., 2012; Wen et al., 2020) dentro dessas duas primeiras premissas.

A superfície da membrana também trata da terceira premissa, a da osteocondução. É importante ressaltar que o coágulo sanguíneo também é responsável por fazer o papel de um “scaffold” (Gerstenfeld et al., 2003; Einhorn; Gerstenfeld, 2015) favorecendo ainda mais a migração, adesão e proliferação celulares (Davies et al., 1996). Mas, adicionado a isso, está à superfície interna da membrana servindo de ponte entre os fragmentos ósseos, se apresentar as características de uma superfície osteocondutora. A topografia de superfície da membrana desenvolvida pode ser caracterizada como de alta complexidade pela presença de macro e micro poros de acordo com Kikuchi et al., (2005) o que se torna ideal na regeneração de tecidos, pois favorece uma maior adesão da matriz de fibrina do coágulo, maior adesão plaquetária, migração e adesão de osteoblastos (Trakoolwannachai; Kheolamai; Ummartyotin, 2019). A potencialização da migração celular, ou seja, característica de osteocondução acontece também devido a maior área de contato oferecida pelo compósito com superfície complexa para atuações celulares contribuindo também para melhor interação interface óssea-compósito na regeneração óssea (Thomas et al., 2018; Fan, 2019). Além do mais, as partículas expostas da HAP observadas na membrana, promovem a regeneração óssea devido a capacidade bioativa (Cho et al., 2019) permitindo a liberação dos íons de cálcio do arcabouço que podem ser usados pelas células osteogênicas para formação óssea (Ryan et al., 2015; Cho et al., 2017).

O tamanho dos poros obtidos na membrana corroboram com trabalho de Shokrollahi et al. (2010), em que membranas composta por HAP, associada à polímeros, apresentaram superfície de membrana extremamente complexa, com presença de macroporos definidos como aqueles maiores do que 100  $\mu\text{m}$  e microporos entre 1 a 20  $\mu\text{m}$ .

Foi sugerido que o tamanho do poro ideal mínimo necessário para favorecer a condutividade óssea deve ser entre 100 e 500  $\mu\text{m}$  (Jin et al., 2000; Tampieri et al., 2001; Fan, 2019). De acordo com Ghomi et al. (2016) o tamanho mínimo deve ser de 200  $\mu\text{m}$ . Em contrapartida, Aragon et al. (2017) obtiveram resultados promissores com nanopartículas de hidroxiapatita associadas a nanofibras de PCL

com presença de microporos entre 50-90  $\mu\text{m}$ , que favoreceram a adesão e proliferação celular. Assim, percebe-se que o tamanho ideal dos poros e estruturas na superfície de membranas ainda não é um consenso, contudo, é consenso que uma superfície topograficamente complexa é essencial para a osteocondução e ativação plaquetária. Dessa forma, os resultados obtidos em relação à superfície da membrana e ao diâmetro dos poros foram compatíveis com a literatura, e a membrana foi considerada promissora quanto à osteocondução.

A cristalinidade de um biomaterial é de grande relevância uma vez que influencia sua capacidade de absorção assim como nas suas propriedades mecânicas. Sabe-se que polímeros semicristalinos têm suas regiões amorfas absorvidas mais rapidamente do que regiões cristalinas, devido à maior suscetibilidade de penetração da água nestas regiões (Pinster et al., 1994; Middleton; Tipton, 2000). Apesar de a degradação ser mais lenta em biomateriais cristalinos como a HAP (Reis et al., 2012), sugere-se que a adição da HAP aumente a hidrofiliabilidade da matriz de PCL, conseqüentemente potencializando a degradação por hidrólise do compósito (Ang et al., 2006; Davachi et al., 2016).

Outra característica importante é o biomaterial ser biocompatível como demonstrado no teste *in vitro* da viabilidade celulares resultados nesse estudo corroboram com Fabbri et al., (2010); Andrade et al., (2019) e Smaida et al., (2020) no qual foram observadas adesão e proliferação celular nos compósitos de HAP+PCL. Em outro estudo realizado por Chuenjitkuntaworn et al., (2016), o “scaffold” de HAP associado à PCL permitiu crescimento, expressão gênica e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMSCs), células tronco da polpa dentária (DPSCs) e célula tronco de origem adiposa (ADSCs).

A similaridade dos grupos tratados e controle para claudicação durante cinco dias do pós-operatório indica que ocorreu devido ao próprio ato cirúrgico e não devido ao compósito, assim como ausência de infecção e desicência. Estudos realizados com HAP-91® em tíbia de cães (Borges et al., 2000), e ulna de coelhos (Vital et al., 2008) também tiveram resultados semelhantes, assim como por Carlo et al., (2009) ao avaliar HAP-91® associada ao polímero polihidroxibutirato em ulna de coelhos. Dessa forma presença das membranas de HAP+PCL parece não ter interferido nos sinais clínicos dos animais.

Na avaliação da radiodensidade óssea, os resultados do presente estudo foram diferentes dos encontrados por Duarte et al., (2007); Reis et al., (2010) e Araújo, (2018), no qual os valores de radiodensidade dos grupos tratados foram maiores em relação ao grupo controle em todos os tempos avaliados. Esses autores discutem como sendo o resultado do alto número atômico da HAP presente, bem como com a maior formação óssea causada pelo biomaterial. A diferença para o presente estudo está provavelmente na pequena proporção de HAP utilizada na membrana e na resultante menor quantidade no local do defeito. Corrobra com isso a ausência de diferença significativa na radiodensidade entre os grupos tratado e controle no pós-operatório imediato, demonstrando que a HAP na membrana não foi suficiente para alterações na radiodensidade. .

As diferenças significativas observadas no grupo tratado entre as datas quanto ao incremento da radiodensidade óssea, assim como a diferença significativa aos 90 dias entre os grupos, é provavelmente resultado da maior formação óssea. A característica osteocondutora da membrana de HAP+PCL, junto da proteção do coágulo sanguíneo, como já mencionado anteriormente permite dessa forma que o processo de regeneração de forma discretamente mais rápida e/ou eficiente (De Azevedo et al. 2012, Vital et al. 2006 e Miranda et al. 2005, Araújo et al. 2016, Valente et al. 2016). Esse resultado foi semelhante ao estudo de Ochoa et al. (2013) que aos 90 dias, notou-se maior radiopacidade no grupo tratado em relação ao controle. Os dados indicaram que a membrana de HAP+PCL favoreceu o crescimento ósseo na região do defeito de 8 mm em comparação com defeitos sem tratamento, demonstrando sua característica osteocondutora do biomaterial.

Nas análises da tomografia microcoputarizada, os resultados foram semelhantes ao de Araújo et al. (2015), no qual não apresentaram diferenças significativas entre grupo controle e tratado com HAP91 associada à PCL aos 42 dias em defeito de olecrano de coelho. Em outro estudo para BV total regenerado não houve diferenças entre grupo tratado com HAP e grupo controle (Guda et al., 2011).

Entretanto, a partir da análise da variação individual das imagens da tomografia microcomputadoriza, sugere-se que a HAP+PCL pode ser vantajosa na progressão da regeneração óssea, visto que a membrana pode ser utilizada como

um protetor do coágulo sanguíneo e transportador promissor para células ou fatores de crescimento.

Os resultados da histologia óssea demonstraram que a membrana serviu de suporte para adesão e proliferação celular, permitindo a formação óssea sem incitar respostas biológicas indesejáveis, assim como tecido ósseo mais organizado, maior presença de matriz provisória de tecido conjuntivo frouxo com maior irrigação sanguínea. De forma semelhante ao observado por Ochoa et al., (2003) percebeu-se que a formação de osso novo com intensa neovascularização foram mais evidentes na no grupo tratado com a presença da hidroxiapatita bem como um tecido ósseo mais desenvolvido.

Esses resultados foram diferentes ao de Araújo et al. (2018), que observou padrões histológicos semelhantes no grupo controle e tratado com HAP-91+PCL. Entretanto, de acordo com Chuenjitkuntaworn et al. (2018) um “scaffold” 3D de HA+PCL foi responsável por apoiar o crescimento celular, expressão gênica e diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais. A ausência de infiltrado inflamatório sugere a biocompatibilidade da membrana de HAP + PCL, corroborando com os dados clínicos.

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se que foi possível desenvolver a membrana de HAP e PCL utilizando clorofórmio como solvente pela técnica de pulverização da sacarose. A membrana apresentou alta cristalinidade, com superfície complexa com presença de nano, micro e macroporos e cristais de hidroxiapatita expostos nessa superfície. O compósito de HAP+PCL mostrou-se biocompatível. A membrana desenvolvida, utilizada em defeito segmentar de 8 mm em diáfise de osso longo em coelho, favoreceu o processo de formação óssea, demonstrando resultados evidentes aos 90 dias. Assim, entende-se que este biomaterial é promissor e deve ser mais explorado em diferentes configurações e fraturas ósseas.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer a CAPES (Código Financeiro 001), FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro. Além disso, o Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM-UFV) para suporte em microscopia eletrônico de varredura, Laboratório de Análise de Solos (Departamento de Solos) para análise de difração de raios-X, ao Nanolab (Microscopia Eletrônica e outras técnicas) da Universidade Federal de Ouro Preto-UFOP para análise microtomografia óssea e ao Laboratório de cultivo celular (Departamento de Física) por fornecer o laboratório de cultura de células.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

A associação da HAP+PCL é responsável por favorecer a regeneração óssea, devido à capacidade osteocondutora que permite migração, adesão e proliferação celular no local do defeito ósseo. Nesse estudo, a membrana de HAP+PCL desenvolvida teve como finalidade proteger o coágulo sanguíneo, que é rico em fatores de crescimento e citocinas que desencadeiam a formação óssea, e servir de suporte para as células que participam desse processo. Acredita-se que a membrana pode ser benéfica na consolidação óssea, principalmente nos casos em que envolve complicações como retardo na união, não união óssea ou fraturas com grande perda óssea na qual a aposição perfeita dos fragmentos não é possível.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKAWA, T. et al. Clinical outcomes and complications after open reduction and internal fixation utilizing conventional plates in 65 distal radial and ulnar fractures of miniature-and toy-breed dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 31, n. 03, p. 214-217, 2018.
- AIKAWA, T. et al. Clinical outcomes of 119 miniature-and toy-breed dogs with 140 distal radial and ulnar fractures repaired with free-form multiplanar type II external skeletal fixation. **Veterinary Surgery**, v. 48, n. 6, p. 938-946, 2019.
- AKHBAR, Suffiyana et al. Performance of Polycaprolactone/Hydroxyapatite (PCL/HA) Composite Blended by Ultrasound Assisted Melt Blending. **Journal of Mechanical Engineering** v 5, n.5, p. 235-250, 2018.
- ALT, V. et al. Bone formation and degradation behavior of nanocrystalline hydroxyapatite with or without collagen-type 1 in osteoporotic bone defects—an experimental study in osteoporotic goats. **Injury**, v. 47, p. S58-S65, 2016.
- ANDRADE, T. M. et al. In vitro and in vivo evaluation of rotary-jet-spun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) with high loading of nano-hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 2, p. 19, 2019.
- ANDREIOTELLI, M.; WENZ, H. J.; KOHAL, R.J. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. s4, p. 32-47, 2009.
- ANG, K. C. et al. Compressive properties and degradability of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 80.3: 655-660, 2007.
- ARAGON, Javier et al. Laser-treated electrospun fibers loaded with nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. **International journal of pharmaceutics**, v. 525, n. 1, p. 112-122, 2017.

ARAÚJO, F. R. et al. Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato na regeneração de defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos com osteoporose induzida. 2018.

BAJI, A. et al. Morphological and X-ray diffraction studies of crystalline hydroxyapatite-reinforced polycaprolactone. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 81, n. 2, p. 343-350, 2007.

BAKER, S. R. et al. Determining the mechanical properties of electrospun poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 203-212, 2016.

BARNHART, M. D.; MARITATO, K. C. (Ed.). **Locking Plates in Veterinary Orthopedics**. John Wiley & Sons, 2018.

BEN ALI, L.M. Incidence, occurrence, classification and outcome of small animal fractures: a Retrospective Study (2005-2010). **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**, v.7, n.3, p.519-524, 2013.

BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone graft substitutes. **Hand clinics**, 28.4:457-468, 2012.

BIERENS, D. et al. Radius and ulna fracture repair with the IMEX miniature circular external skeletal fixation system in 37 small and toy breed dogs: A retrospective study. **Veterinary surgery**, v. 46, n. 4, p. 587-595, 2017.

BIGHAM-SADEGH, A. et al. Effects of Honey and Hydroxyapatite on Bone Healing in Rats. **Trauma Monthly**, n. In Press, v. 23, n. 4 2018.

BINTE ATIQUE, Fahmida; KHALIL, Rahman; MASUDUR, Md. The bacterial contamination of allogeneic bone and emergence of multidrug-resistant bacteria in tissue bank. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

BITTIGER, H.; MARCHESSAULT, R. H.; NIEGISCHE, W. D. Crystal structure of poly- $\epsilon$ -caprolactone. **Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 1923-1927, 1970.

BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MELO, E. G.; NÓBREGA NETO, P. I. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: Aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 616–620, 2000.

BOUXSEIN, M. L.; BOYD, S. K.; CHRISTIANSEN, B. A.; GULDBERG, R. E.; JEPSEN, K. J.; MÜLLER, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.

BRIANZA, S. Z. M et al. Cross-sectional geometrical properties of distal radius and ulna in large, medium and toy breed dogs. **Journal of Biomechanics**, v. 39, n. 2, p. 302-311, 2006.

BROWN, G. et al. Highly comminuted, articular fractures of the distal antebrachium managed by pancarpal arthrodesis in 8 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 45, n. 1, p. 44-51, 2016.

CARLO, E. C. et al. Compósito para fabricação de implantes reabsorvíveis para osteossíntese: avaliação da biocompatibilidade em coelhos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 135-140, 2009.

CARLO, E. C. **Compósitos de hidroxiapatita e polihidroxibutirato em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos**. Tese Mestrado. Viçosa, MG, Brasil: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária. 2007.

CAUSA, F. et al. Poly- $\epsilon$ -caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: In vitro characterization and human osteoblast response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian**

**Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 76, n. 1, p. 151-162, 2006.

CHEN, J. et al. Green poly ( $\epsilon$ -caprolactone) composites reinforced with electrospun polylactide/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) blend fiber mats. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 9, p. 2102-2110, 2014.

CHEN, J.; WOLKE, J. G. C.; DE GROOT, K. Microstructure and crystallinity in hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, v. 15, n. 5, p. 396-399, 1994.

CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, 87:1-57, 2015

CHO, Y. S. et al. The fabrication of well-interconnected polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds, enhancing the exposure of hydroxyapatite using the wire-network molding technique. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 8, p. 2315-2325, 2017.

CHO, Yong Sang et al. Assessment of osteogenesis for 3D-printed polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced exposure of hydroxyapatite using rat calvarial defect model. **Composites Science and Technology**, v. 184, p. 107844, 2019.

CHUENJITKUNTAWORN, B. et al. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94, n. 1, p. 241-251, 2010.

CHUENJITKUNTAWORN, Boontharika et al. The efficacy of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold in combination with mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 1, p. 264-271, 2016.

DARIŠ, B.; KNEZ, Ž. P. (3-hydroxybutyrate): Promising biomaterial for bone tissue engineering. **Acta Pharmaceutica**, 70.1: 1-15, 2020.

DAVACHI, S. M. et al. In-vitro investigation and hydrolytic degradation of antibacterial nanocomposites based on PLLA/triclosan/nano-hydroxyapatite. **Polymer**, 83: 101-110, 2016.

DAVIES, J. E. In vitro modeling of the bone/implant interface. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, 245.2: 426-445, 1996.

DE ARBURN PARENT, R. et al. Open reduction and cranial bone plate fixation of fractures involving the distal aspect of the radius and ulna in miniature-and toy-breed dogs: 102 cases (2008–2015). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 250, n. 12, p. 1419-1426, 2017.

DE AZEVEDO, Adílio Santos et al. Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos: estudo clínicocirúrgico, radiológico e histológico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 12-18, 2012.

DE SIQUEIRA, L. et al. Influence of PLLA/PCL/HA scaffold fiber orientation on mechanical properties and osteoblast behavior. **Materials**, v. 12, n. 23, p. 3879, 2019.

DECAMP, C. E. et al. **Brinker, Piermattei and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair**. Elsevier Health Sciences, 2015.

DÍAZ, E; SANDONIS, I; VALLE, M. B. In vitro degradation of poly (caprolactone)/nHA composites. **Journal of Nanomaterials**, v. 2014, p. 185, 2014.

DINOPOULOS, H.; DIMITRIOU, R.; GIANNOUDIS, P. V. RETRACTED: Bone graft substitutes: What are the options?. **The Surgeon**, 10.4: 230-239, 2012.

DOYLE, C.; TANNER, E. T.; BONFIELD, W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 12, n. 9, p. 841-847, 1991.

DUARTE, T. S. et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 114-118, 2007.

EINHORN, A.; GERSTENFELD, L. C. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45, 2015. Gerstenfeld et al., 2015).

FABBRI, P. et al. Porous scaffolds of polycaprolactone reinforced with in situ generated hydroxyapatite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 1, p. 343-351, 2010.

FAN, X. Preparation and performance of hydroxyapatite/Ti porous biocomposite scaffolds. **Ceramics International**, 2019.

GAUTHIER, C. M. et al. In vitro comparison of stiffness of plate fixation of radii from large-and small-breed dogs. **American journal of veterinary research**, v. 72, n. 8, p. 1112-1117, 2011.

GERSTENFELD, Louis C. et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 88, n. 5, p. 873-884, 2003.

GHOMI, H.; EMADI, R.; JAVANMARD, S. H. Preparation of nanostructure bioactive diopside scaffolds for bone tissue engineering by two near net shape manufacturing techniques. **Materials Letters**, v. 167, p. 157-160, 2016.

GIBERT, S.; RAGETLY, G. R.; BOUDRIEAU, R. J. Locking compression plate stabilization of 20 distal radial and ulnar fractures in toy and miniature breed dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 28, n. 06, p. 441-447, 2015.

GIGLIO, R. F. et al. Estudo retrospectivo de radiografias com fraturas rádio e ulna em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 122-124, 2007.

GILBERT, E. D. et al. Comparison of two external fixator systems for fracture reduction during minimally invasive plate osteosynthesis in simulated antebrachial fractures. **Veterinary Surgery**, v. 46, n. 7, p. 971-980, 2017.

GROPPO, M. F. et al. The effect of a hydroxyapatite impregnated PCL membrane in rat subcritical calvarial bone defects. **Archives of oral biology**, v. 82, p. 209-215, 2017.

GUDA, T. et al. In vivo performance of bilayer hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration in the rabbit radius. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 3, p. 647-656, 2011.

GUIOT, L. P.; GUILLOU, R. P. Radius/Ulna Fractures. **Locking Plates in Veterinary Orthopedics**, p. 111-119, 2018.

HAYES, G.; HARRIS, K.; LANGLEY-HOBBS, S. Post-Traumatic Septic Bone Sequestration in Three Dogs. **VCOT Open**, v. 2, n. 02, p. e9-e15, 2019.

HUDSON, C.C.; LEWIS, D. D.; POZZI, A. Minimally Invasive Plate Osteosynthesis: Radius and Ulna. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 50, n. 1, p. 135-153, 2020.

HUI, J.; WANG, X. Hydroxyapatite nanocrystals: colloidal chemistry, assembly and their biological applications. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 215-225, 2014.

JAIN, R. et al. Incidence of fracture in dog: a retrospective study. **Veterinary Practitioner**, v. 19, n. 1, p. 63-65, 2018.

JIN, Q. M. et al. Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 51, n. 3, p. 491-499, 2000.

KANG, B.J. et al. Clinical evaluation of a mini locking plate system for fracture repair of the radius and ulna in miniature breed dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 29, n. 06, p. 522-527, 2016.

KARIM, L.; BOUXSEIN, M. L. Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties. **Bone**, v. 82, p. 21-27, 2016.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova, São Paulo**, v. 23, n.4, p. 518-522, fev. 2000.

KIKUCHI, L. et al. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. **Biomaterials**, v. 26, n. 26, p. 5285-5295, 2005.

LAM, W. A. et al. Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening. **Nature materials**, v. 10, n. 1, p. 61, 2011.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.395, p.81-98, 2002.

LIBARDONI, R. D. N. et al. Doenças ortopédicas de etiologia traumática do sistema locomotor de cães: 1.200 casos (2004-2013). 2015.

LIBARDONI, R. N. et al. Appendicular fractures of traumatic etiology in dogs: 955 cases (2004-2013). **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 542-546, 2016.

LIU, Li et al. Porous polycaprolactone/nanohydroxyapatite tissue engineering scaffolds fabricated by combining NaCl and PEG as co-porogens: Structure, property, and chondrocyte–scaffold interaction in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 4, p. 956-966, 2012.

LYONS, F. G. et al. Novel microhydroxyapatite particles in a collagen scaffold: a bioactive bone void filler?. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 472, n. 4, p. 1318-1328, 2014.

MAIMAITIYIMING, A. et al. Treatment of the femoral shaft nonunion with double plate fixation and bone grafting: A case series of 14 patients. **Injury**, 46.6:1102-1107, 2015.

MAITI, S. K. et al. Mesenchymal stem cells of different origin-seeded bioceramic construct in regeneration of bone defect in rabbit. **Tissue engineering and regenerative medicine**, v. 15, n. 4, p. 477-492, 2018.

MAKAROV, C. et al. In situ synthesis of calcium phosphate-polycaprolactone nanocomposites with high ceramic volume fractions. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 6, p. 1771-1779, 2010.

MANCHI, G. et al. Radial and ulnar fracture treatment with paraosseous clamp- cerclage stabilisation technique in 17 toy breed dogs. **Veterinary record open**, v. 4, n. 1, p. e000194, 2017.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 551-555, 2011.

MCCARTNEY, W.; KISS, K.; ROBERTSON, I. Treatment of distal radial/ulnar fractures in 17 toy breed dogs. 2010.

MEESON, R. L.; DAVIDSON, C.; ARTHURS, G. I. Soft-tissue injuries associated with cast application for distal limb orthopaedic conditions. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 24, n. 02, p. 126-131, 2011.

MEIRELLES, Adriana Érica Wilkes Burton. **Fraturas de rádio e ulna em cães no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2011**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. São Paulo, p.61, 2013.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, 2000.

MILOVAC, D. et al. PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 34, p. 437-445, 2014.

MILOVANCEV, M.; RALPHS, S.C. Radius/ulna fracture repair. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.19, n.3, p. 128-133, 2004.

MINAR, M. et al. Retrospective study on fractures in dogs. **Journal Biomedical Research**, v.14, n.3, p.140-144, 2013.

MINCRYST, CPDS-2086. <online>. Disponível em: [http://database.iem.ac.ru/mincryst/s\\_carta.php?HYDROXYLAPATITE](http://database.iem.ac.ru/mincryst/s_carta.php?HYDROXYLAPATITE) Acessado: em 01 de outubro de 2021.

MINTO, B. W. et al. Three-dimensional printed poly (L-lactide) and hydroxyapatite composite for reconstruction of critical bone defect in rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 36, 2021.

MIRANDA, E. S. et al. Estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 13, n. 5, p. 245-248, 2005.

MOEINI, S.; MOHAMMADI, M. R.; SIMCHI, A. In-situ solvothermal processing of polycaprolactone/hydroxyapatite nanocomposites with enhanced mechanical and biological performance for bone tissue engineering. **Bioactive materials**, v. 2, n. 3, p. 146-155, 2017.

MORAES, P. C., et al. Biocompatibilidade do cimento de fosfato de cálcio implantado no rádio de coelhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 19.4:351-359, 2004.

MUNAKATA, S. et al. Clinical efficacy of bone reconstruction surgery with frozen cortical bone allografts for nonunion of radial and ulnar fractures in toy breed dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 31, n. 03, p. 159-169, 2018.

NELSON, T. A; STROM, A. Outcome of Repair of Distal Radial and Ulnar Fractures in Dogs Weighing 4 kg or Less Using a 1.5-mm Locking Adaption Plate or 2.0-mm Limited Contact Dynamic Compression Plate. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 30, n. 06, p. 444-452, 2017.

NEUENDORF, R. E. et al. Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1288-1296, 2008.

NOWWAROTE, N. et al. Characterization of a bioactive Jagged1-coated polycaprolactone-based membrane for guided tissue regeneration. **Archives of oral biology**, v. 88, p. 24-33, 2018.

OCHOA, C. C. R. **Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato em defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos. 2013. 43f. 2013. Tese de**

Doutorado. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

OGUERI, Kenneth S. et al. Polymeric biomaterials for scaffold-based bone regenerative engineering. **Regenerative engineering and translational medicine**, v. 5, n. 2, p. 128-154, 2019.

OKADA, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. **Progress in polymer science**, v. 27, n. 1, p. 87-133, 2002.

OLIVEIRA, J. T. et al. A cartilage tissue engineering approach combining starch-polycaprolactone fibre mesh scaffolds with bovine articular chondrocytes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 2, p. 295-302, 2007.

OPREA, Wanda E. et al. Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 14, n. 3, p. 292-300, 2003.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Biomateriais: fundamentos e aplicações. In: **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. 2006.

OZAWA, Y. et al. Comparison of the bone augmentation ability of absorbable collagen sponge with that of hydroxyapatite/collagen composite. **Journal of oral science**, p. 17-0465, 2018.

PLANNER, F.; FEICHTNER, F.; MEYER-LINDENBERG, A. Comparative microcomputed tomographic structural analysis of the trabecular and cortical bone architecture of radius and ulna in toy dog breeds. **Research in Veterinary Science**, v. 136, p. 324-335, 2021.

PEIRONE, B. et al. Minimally Invasive Plate Osteosynthesis Fracture Reduction Techniques in Small Animals. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 50, n. 1, p. 23-47, 2020.

PERDIGÃO, Ana Paula Lima et al. Compósito de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos. 2015.

PHILLIPS, I. R. A survey of bone fractures in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 20, n. 11, p. 661-674, 1979.

PIRAS, L. et al. Treatment of fractures of the distal radius and ulna in toy breed dogs with circular external skeletal fixation: a retrospective study. **Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology**, v. 24, n. 3, p. 228, 2011.

PISTNER, H. et al - Poly (L-Lactide):A Long-Term Degradation Study In Vivo. **Biomaterials**, v.14, n.9, p.671-677, 1992.

POZZI, A. et al. Retrospective comparison of minimally invasive plate osteosynthesis and open reduction and internal fixation of radius-ulna fractures in dogs. **Veterinary surgery**, v. 42, n. 1, p. 19-27, 2013.

QUIAN, Y., LI, X., SU, Y., KE, Q., MO, X. Fabrication and Characterization of Polycaprolactone/Chlorophyllin Sodium Copper Salt Nanofibrous Mats from 2,2,2-Trifluoroethanol Solution by Electrospinning. **Iranian Polymer Journal**, v.18, p.265-274, 2009.

RAMANAUSKAITĖ, K. et al. Factors that affect healing in cases of canine antebrachium fractures. **Veterinarija ir Zootechnika**, v. 75, n. 97, 2017.

RAMÍREZ, J. M.; MACÍAS, C. Conventional bone plate fixation of distal radius and ulna fractures in toy breed dogs. **Australian veterinary journal**, v. 94, n. 3, p. 76-80, 2016.

REE, J. J.; BALTZER, W. I.; NEMANIC, S. Randomized, controlled, prospective clinical trial of autologous greater omentum free graft versus autogenous cancellous bone graft in radial and ulnar fractures in miniature breed dogs. **Veterinary Surgery**, v. 47, n. 3, p. 392-405, 2018.

REIS, E. C. C. et al. Periodontal regeneration using a bilayered PLGA/calcium phosphate construct. **Biomaterials**, v. 32, n. 35, p. 9244-9253, 2011.

REIS, E.C.C et al. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**. v.22, n.1, p.73- 79, 2012.

REIS, E. C. C. et al. Biocompatibility, osteointegration, osteoconduction, and biodegradation of a hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 817-826, 2010.

REZAEI, A.; MOHAMMADI, M. R. In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process. *Materials Science and Engineering: C*, 33.1: 390-396, 2013.

RODELLA, L. F. et al. Fresh frozen bone in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Dental Sciences**, 10.2:115-122, 2015.

ROOS, M.V.; CAMISA JÚNIOR, A.; MICHELIN, A.F. Procedimentos de um banco de ossos e a aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. **Acta Ortopédica Brasileira**, 8.3:122-127, 2000.

ROZILA, Ismail et al. Polycaprolactone-Based Scaffolds Facilitates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in a Co-Culture System. **Polymers**, v. 13, n. 4, p. 597, 2021.

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

SABREE, I.; GOUGH, J.; DERBY, B. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions. **Ceramics International**, v. 41, n. 7, p. 8425-8432, 2015.

SAFAEI, Fariba et al. Porogen Effect of Solvents on Pore Size Distribution of Solvent-Casted Polycaprolactone Thin Films. **Journal of Polymer Science and Engineering**, v. 1, n. 4, 2018.

SEOL, Young-Joon et al. Improvement of bone regeneration capability of ceramic scaffolds by accelerated release of their calcium ions. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, n. 21-22, p. 2840-2849, 2014.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European Cells and Materials**, v. 15, n. 53, p. e76, 2008.

SHISHATSKAYA, E. I. et al. Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 6, p. 719-728, 2004.

SHOKROLLAHI, P. et al. Biological and mechanical properties of novel composites based on supramolecular polycaprolactone and functionalized hydroxyapatite. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95, n. 1, p. 209-221, 2010.

SIDANE, D. et al. Biocompatibility of sol-gel hydroxyapatite-titania composite and bilayer coatings. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 650-658, 2017.

SILVA, E. C. S. V. Síntese, caracterização e estudo das propriedades biocompatíveis do poli ( $\epsilon$ -caprolactona) com topologia estrela. 2009.

SMAIDA, R. et al. Potential Implantable Nanofibrous Biomaterials Combined with Stem Cells for Subchondral Bone Regeneration. **Materials**, v. 13, n. 14, p. 3087, 2020.

SOUZA, M.M.D. et al. Orthopedic diseases of hind limbs in dogs: retrospective study. **Ciência Rural**, v.41, n.5, p.852-857, 2011.

SURMENEV, R. A. et al. Characterization of biomimetic silicate-and strontium-containing hydroxyapatite microparticles embedded in biodegradable electrospun polycaprolactone scaffolds for bone regeneration. **European Polymer Journal**, v. 113, p. 67-77, 2019.

TAMPIERI, A. et al. Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1365-1370, 2001.

THOMAS, S.; BALAKRISHNAN, P.; SREEKALA, M. S. (Ed.). **Fundamental Biomaterials: Ceramics**. Woodhead Publishing, 2018.

TORRES, E. et al. Improvement of mechanical and biological properties of polycaprolactone loaded with hydroxyapatite and halloysite nanotubes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 418-424, 2017.

TRAKOOLWANNACHAI, V.; KHEOLAMAI, P.; UMMARTYOTIN, S. Characterization of hydroxyapatite from eggshell waste and polycaprolactone (PCL) composite for scaffold material. **Composites Part B: Engineering**, v. 173, p. 106974, 2019.

TRIPATHI, Garima; BASU, Bikramjit. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. **Ceramics International**, v. 38, n. 1, p. 341-349, 2012.

VALENTE, F. L. et al. Hydroxyapatite, polycaprolactone and alendronate composites for bone regeneration in rabbits' olecranon: histological features. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 543-547, 2016.

VALLET-REGI, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in solid state chemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 1-31, 2004.

VALLET-REGÍ, M.; SALINAS, A. J. Ceramics as bone repair materials. In: *Bone repair biomaterials*. **Woodhead publishing**, 141-178. 2019.

VIDANE, A.S. et al. Incidence of fractures in the dogs and cats in Maputo (Mozambique) between 1998 and 2008. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.4, p.490-494, 2014.

VITAL, C. C. et al. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. **Revista Ceres**, v. 55, n. 1, p. 9-14, 2008.

WAN, D. C.; NACAMULI, R. P.; LONGAKER, M. T. Craniofacial bone tissue engineering. **Dental Clinics**, v. 50, n. 2, p. 175-190, 2006.

WANG, X. et al. Hybrid composites of mesenchymal stem cell sheets, hydroxyapatite, and platelet-rich fibrin granules for bone regeneration in a rabbit calvarial critical-size defect model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 5, p. 1891-1899, 2017.

WEHNER, T. et al. Influence of the fixation stability on the healing time—a numerical study of a patient-specific fracture healing process. **Clinical Biomechanics**, v. 25, n. 6, p. 606-612, 2010.

WEN, Gen et al. Functionalized polycaprolactone/hydroxyapatite composite microspheres for promoting bone consolidation in a rat distraction osteogenesis model. **Journal of Orthopaedic Research®**, v. 38, n. 5, p. 961-971, 2020.

WHANG, K. et al. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. **Tissue engineering**, v. 5, n. 1, p. 35-51, 1999.

YAO, Q. et al. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. **Biomaterials**, v. 115, p. 115-127, 2017.

YE, P. et al. Application of silk fibroin/chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffold in the repair of rabbit radial bone defect. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 14, n. 6, p. 5547-5553, 2017.

ZHOU, H; LEE, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 7, p. 2769-2781, 2011.

ZHOU, P. et al. Loading BMP-2 on nanostructured hydroxyapatite microspheres for rapid bone regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 4083, 2018.

ZHOU, Y., et al. Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts. **Biomaterials**, 28.5:814-824, 2007.