

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CARACTERÍSTICAS DA MEMBRANA INDUZIDA PELA
TÉCNICA DE MASQUELET EM DEFEITO ÓSSEO DO
RÁDIO EM GALINHAS**

LUIS ORLANDO BASELLY CUEVA

Botucatu – SP

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**CARACTERÍSTICAS DA MEMBRANA INDUZIDA PELA
TÉCNICA DE MASQUELET EM DEFEITO ÓSSEO DO
RÁDIO EM GALINHAS**

LUIS ORLANDO BASELLY CUEVA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Animais
Selvagens para a obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Titular Sheila Canevese Rahal

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Cueva, Luis Orlando Baselly.

Características da membrana induzida pela Técnica de Masquelet em defeito ósseo do rádio em galinhas / Luis Orlando Baselly Cueva. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sheila Canevese Rahal

Capes: 50501003

1. Galináceo. 2. Regeneração óssea. 3. Consolidação da fratura.

Palavras-chave: Ave; Defeito ósseo; Fratura; Tratamento.

Nome do autor: Luis Orlando Baselly Cueva

**TÍTULO: CARACTERÍSTICAS DA MEMBRANA INDUZIDA PELA TÉCNICA
DE MASQUELET EM DEFEITO ÓSSEO DO RÁDIO EM GALINHAS**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal
Presidente e orientadora
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ- UNESP –BOTUCATU

Profa. Dra. Luciane dos Reis Mesquita
Membro
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
FMVZ- UNESP –BOTUCATU

Dra. Isabela Cristina de Souza Marques
Membro
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, ao qual agradeço.

Agradeço a minha família, especialmente à minha mãe Maria Petronila Cueva de Baselly, pelo seu amor incondicional, sempre presente em todas as etapas de minha vida, sendo um exemplo de perseverança não deixando que eu desistisse em nenhuma dificuldade que a vida me deu.

Aos meus irmãos José, Victor, Fernando Baselly, que com seus conselhos e apoios morais me ajudaram a lutar e não desistir apesar das dificuldades.

À professora Sheila Canevese Rahal por ter me aceitado para a realização do Mestrado, pela orientação e conselhos dados ao longo deste projeto e pelo apoio ao enfrentar os desafios deste grande passo de minha vida. Você é uma pessoa que inspira e dá muita admiração.

À professora Associada Ibiara Correia de Lima Almeida Paz, responsável pela área de Ensino, Pesquisa e Extensão em Avicultura, pela gentileza e fornecimento das galinhas para o experimento.

À Professora Associada Maria Jaqueline Mamprim e a pós-graduanda Shayra Peruch Bonatelli pela realização dos exames radiográficos e de ultrassom, os quais foram muito importantes para melhorar a qualidade da pesquisa.

À Professora Dra. Camila Contin Diniz de Almeida Francia e Dr. Caio Henrique Paganini Burini, que muito nos ajudaram no processamento das lâminas, sem o qual a pesquisa não poderia ser concluída a bom termo.

Ao Professor Carlos Eduardo Fonseca Alves e Dra. Isabela Cristina de Souza Marques pelo auxílio na interpretação dos exames histológicos, o qual foi essencial para a interpretação dos resultados da pesquisa.

Ao amigo Tulio Genari Filho que me acolheu neste país, me ajudou nas dificuldades e ainda auxiliou na realização do experimento.

Aos pós-graduandos, Luciane dos Reis Mesquita e Washington Takashi Kano, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos e outras etapas do projeto, sempre com companheirismo e delicadeza.

À Dra. Lídia Mitsuko Matsubara pela realização das anestésias, que foi essencial para a boa realização do projeto.

Aos colegas, Jeniffer Gabriela Figueroa Coris, Raquel Naomi Tanaka Scaduto, Daniel Angelo Felippi e Paolla Nicole Franco, pelo auxílio em todas dificuldades que encontrei durante a realização da pós-graduação e no experimento.

Ao estagiário colombiano Camilo Ernesto Santander Rodriguez e à estudante Estirle Xiomara Santos Gonzalez, pela assistência na realização do projeto e nos cuidados com as galinhas.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Perda óssea segmentar e modalidades de tratamento.....	5
2.2 Fraturas em aves.....	12
2.3 Métodos de imobilização das fraturas.....	15
2.4 Complicações.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Animais e ambiente de experimentação.....	24
4.2 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos.....	24
4.3 Medicamentos pré e pós-operatórios.....	26
4.4 Exames de imagem.....	26
4.5 Coleta, Preparação e Análise histológica.....	27
5 RESULTADOS.....	29
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	46
8 BIBLIOGRAFIA.....	48
9 Trabalho científico 1.....	55
10 Trabalho científico 2.....	66
Anexos.....	78

Lista de Figuras

- Figura 1.** Etapas cirúrgicas para o desenvolvimento da membrana induzida de Masquelet em galinhas. Osso do rádio isolado e início da secção óssea com auxílio de serra oscilatória (a). Falha óssea segmentar (b). Osso do rádio excisado com 1,5 cm de comprimento. Aplicação do cimento ósseo na região da falha segmentar na fase pastosa (d)..... 25
- Figura 2.** Imagens ultrassonográficas com a ferramenta Doppler colorido demonstrando a escala da vascularização de acordo com o Doppler colorido..... 27
- Figura 3.** Imagens radiográficas em projeção médio-lateral do antebraço de galinha imediatamente (a) e com 15 dias de pós-operatório (b). Note a falha segmentar preenchida com cimento ósseo com massa radiopaca em ambos os momentos, cuja visibilização foi dificultada pelo crescimento das penas aos 15 dias de pós-operatório..... 31
- Figura 4.** Imagens radiográficas em projeção médio-lateral do antebraço de galinha imediatamente (a) e com 21 dias de pós-operatório (B). Note a falha segmentar preenchida com cimento ósseo com massa radiopaca em ambos os momentos, com extremidades ósseas sem sinais de reação aos 21 dias de pós-operatório..... 31
- Figura 5.** Imagens radiográficas em projeção médio-lateral do antebraço de galinha imediatamente (a) e com 30 dias de pós-operatório (B). Note a falha segmentar preenchida com cimento ósseo com massa radiopaca em ambos os momentos, com formação óssea partindo das extremidades ósseas fraturadas em direção ao cimento ósseo aos 30 dias de pós-operatório..... 32
- Figura 6.** Imagem ultrassonográfica ao Modo-B do pós-operatório imediato demonstrando as extremidades da falha óssea (setas) e o cimento ósseo (cabeça de seta)..... 33
- Figura 7.** Imagem ultrassonográfica ao Modo-B, aos 30 dias de pós-operatório, demonstrando a mensuração da membrana (calipers)..... 33
- Figura 8.** Aspecto macroscópico da membrana induzida de Masquelet em galinha aos 30 dias de pós-operatório. Note a membrana induzida na região da falha segmentar (a) e após a remoção (b). Observe a presença do cimento ósseo, após a incisão da membrana (c). Verifique a espessura da membrana com sinais de formação óssea..... 35

Figura 9. Aspecto microscópico da membrana induzida de Masquelet em galinhas aos sete (a), 15 dias (b), 21 dias (c) e 30 dias (d) de pós-operatório. Três zonas distintas foram observadas especialmente nos dias 7 e 15 (zona 1 – camada celular, zona 2 - fibras colágenas, zona 3 – tecido conjuntivo desorganizado). No 21º dia nota-se perda da evidenciação das diferentes zonas, as quais no 30º dia constitui-se de tecido conjuntivo (2) e osso (1) (HE – Hematoxilina-eosina).....	37
Figura 10. Aspecto microscópico da membrana induzida de Masquelet em galinhas. Observar a angiogênese aos 15 dias de pós-operatório (a) com presença de pequenos vasos (setas) e aos 30 dias após a cirurgia (b) com vasos calibrosos (setas). Aos 21 dias de pós-operatório verifica-se a formação de matriz de cartilagem (c), matriz óssea (d), cartilagem madura (e) e a formação óssea mineralizada (f).....	38
Figura 11. Representação gráfica da intensidade da angiogênese nas análises histológicas das extremidades das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.....	39
Figura 12. Representação gráfica do escore de inflamação nas análises histológicas das extremidades das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.....	39
Figura 13. Representação gráfica da intensidade da angiogênese nas análises histológicas na porção central das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.....	40
Figura 14. Representação gráfica do escore de inflamação nas análises histológicas na porção central das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.....	40

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Espessura da membrana induzida pela técnica de Masquelet em galinhas, mensurada pelo exame ultrassonográfico ao Modo-B aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório..... 34

Tabela 2 - Escores da vascularização da membrana induzida em galinhas pela técnica de Masquelet à ferramenta Doppler aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório..... 34

CUEVA, L.O.B. **Características da membrana induzida pela técnica de Masquelet em defeito ósseo do rádio em galinhas**. Botucatu, 2019. 89 p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo visou avaliar temporalmente a formação e a qualidade da membrana induzida de Masquelet, tendo por modelo uma falha óssea segmentar induzida no rádio de galinhas. Foram utilizadas 16 galinhas saudáveis, com um ano de idade e massa corpórea média de 1,45 kg. Sob anestesia geral inalatória, foi induzido defeito segmentar de 1,5 cm no rádio esquerdo, o qual foi preenchido com cimento ósseo na fase pastosa. Os defeitos foram avaliados por meio de exames radiográficos e ultrassonográficos, imediatamente após o procedimento cirúrgico e aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. Para a avaliação histológica das membranas induzidas, uma ave foi submetida à eutanásia aos sete dias (estudo piloto) de pós-operatório e cinco aves aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. No exame radiográfico do pós-operatório imediato foi possível verificar a presença do cimento ocupando a falha óssea segmentar, como uma massa radiopaca, com variações de intensidade. Com 30 dias de pós-operatório já foi evidente a presença de nova formação óssea partindo de ambas as extremidades fraturadas. Pelo exame ultrassonográfico, as membranas mostraram a maior formação de vascularização aos 30 dias de pós-operatório. Pela avaliação histológica a membrana aos sete e 15 dias de pós-operatório tinha três zonas distintas, porém aos 15 dias havia presença de neovascularização, fibras colágenas organizadas e diminuição de células inflamatórias. Aos 21 dias após a cirurgia houve uma perda de delimitação das camadas, com formação de metaplasia cartilaginosa e óssea, e aos 30 dias de pós-operatório havia completa mineralização da membrana. Foi possível concluir que entre os momentos avaliados, todos mostraram a formação da membrana induzida de Masquelet em galinhas, porém com 15 dias de pós-operatório se detectou a melhor qualidade da membrana, visando o segundo estágio cirúrgico para reconstrução óssea.

Palavras-chave: Ave; Defeito ósseo; Fratura; Tratamento.

CUEVA, L.O.B. **Characteristics of Masquelet induced-membrane technique in a chicken radius bone defect.** Botucatu, 2017. 89 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the formation and quality of the induced membrane in Masquelet's technique, using a segmental bone defect induced in the chicken's radius. Sixteen healthy domestic chickens, 1 year old and weighing 1.45 kg were used. Under general anesthesia, a 1.5-cm segmental bone defect was induced in the left radius, which was filled with bone cement during its pasty polymerization phase. The bone defects were evaluated by plain X-rays and ultrasounds, immediately after surgery and at seven, 15, 21 and 30 days postoperatively. One bird was euthanized at 7 days after surgery (pilot study), and five birds were euthanized at 15, 21 and 30 days postoperatively for histological evaluation of the induced membranes. Immediate postoperative radiographic examination showed the presence of cement that occupied the segmental bone defect, as a radiopaque mass, with intensity variations. Thirty days after surgery the presence of new bone formation at the fractured extremities was evident. Ultrasound evaluation showed that the induced-membrane had the highest rate of vascularization at 30 days post-surgery. Histologically, the induced-membrane had three distinct zones at 7 and at 15 days postoperatively, but day 15 had neovascularization, organized collagen fibers and reduced of inflammatory cells. At 21 days after surgery, the zones were less defined and there was cartilage and bone metaplastic areas. At 30 days postoperative diffuse mineralization of the membrane was observed. In conclusion, all time periods of evaluation showed the formation of the induced membrane, but the highest quality of the membrane was detected at 15 days postoperatively, aiming second-stage surgery for bone reconstruction.

Key words: Bird; Bone defect; Fracture; Treatment.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas constituem uma grande parcela dos procedimentos cirúrgicos em aves e incluem desde lacerações até fraturas graves (BUSCH, 1986; PONDER e REDIG, 2016). Diversos fatores precisam ser considerados antes do reparo da fratura, tais como o estilo de vida e o tipo de função esperado para a ave, ou seja, retorno a natureza ou em cativeiro (FORBES, 1998; McFADDEN, 2016; PONDER e REDIG, 2016).

Entre os principais fatores que podem atrasar ou impedir a consolidação da fratura são instabilidade, infecção e presença de implantes metálicos dentro ou arredor do foco fraturado (BUSCH, 1986; WILLIAMS, 2002; PONDER e REDIG, 2016). Todos os tipos de não-união ocorrem em aves (BENNETT e KUZMAN, 1992). Desta forma, o método de imobilização escolhido pode contribuir para a minimização desses fatores (BUSCH, 1986; OROSZ et al., 1992; PONDER e REDIG, 2016).

A reconstrução de defeitos ósseos da diáfise óssea é um desafio, tanto em pequenos animais como em aves, sendo o objetivo regenerar não apenas a perda óssea, mas também a restauração da função do membro (RAHAL et al., 2001; RAHAL et al., 2003; CAPPELLARI et al., 2014; JOHNSTON et al., 2008; SANAEI et al., 2015; TUNIO et al., 2015). Existem várias opções de tratamento, cada uma com desafios inerentes da técnica e do tipo de afecção óssea, e com muitas controvérsias sobre o melhor método de reconstrução óssea.

As técnicas de transporte ósseo ou de encurtamento agudo e subsequente alongamento, baseada no método de Ilizarov, têm sido empregadas em perdas ósseas de pequenos animais, mais comumente decorrentes de processos traumáticos e/ou infecciosos, com relativo sucesso (RAHAL et al., 2001; RAHAL et al., 2003; RAHAL et al., 2005; CAPPELLARI et al., 2014). Em aves há um relato do emprego do transporte ósseo, com uso de fixador circular, o qual foi empregado no tratamento de uma complicação de fratura em um papagaio (JOHNSTON et al., 2008).

Uma outra opção para a perda segmentar é o emprego da técnica da membrana induzida de Masquelet, que tem sido aplicada particularmente em pacientes humanos (MASQUELET e BEGUE, 2010; KARGER et al., 2012; AHO et al., 2013; TAYLOR et al., 2012). Esta consiste na reconstrução óssea em dois estágios (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012). No primeiro realiza-se o debridamento dos tecidos ósseo e mole desvitalizados, implantação de um espaçador de cimento ósseo e estabilização do membro (GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; HAN et al., 2017). O cimento é mantido por aproximadamente 4-8 semanas para que ocorra a formação de uma membrana (MASQUELET e BEGUE, 2010; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012). No segundo estágio, a membrana é incisada para a remoção do espaçador de cimento, sendo o defeito preenchido com enxerto e/ou biomateriais (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012).

Embora ainda não testado, a membrana induzida de Masquelet poderia ser uma opção mais adequada para aves, comparada aos outros métodos de reconstrução por histogênese de distração. Contudo, para o uso clínico seria necessário determinar o tempo de formação da membrana induzida nesta espécie, levando em consideração as diferenças em relação aos mamíferos, com por exemplo, a maior rapidez de consolidação das fraturas (FORBES, 1998).

Sendo assim, o presente estudo se justificou, uma vez que avaliou o tempo de formação da membrana induzida de Masquelet, tendo por modelo uma falha segmentar no rádio de galinhas. A hipótese foi que a formação da membrana de Masquelet ocorra em período mais curto do que o estabelecido em humanos e coelhos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Perda óssea segmentar e modalidades de tratamento

A reconstrução de defeitos ósseos da diáfise óssea é um desafio, tanto em pacientes humanos como em aves, sendo o objetivo regenerar não apenas a perda óssea, mas também a restauração da função do membro (GIANNOUDIS et al., 2011; TAYLOR et al., 2012; JOHNSTON et al., 2008; TUNIO et al., 2015). Existem várias opções de tratamento, cada uma com desafios inerentes da técnica e do tipo de afecção óssea, e com muitas controvérsias sobre o melhor método de reconstrução óssea.

As técnicas de transporte ósseo ou de encurtamento agudo e subsequente alongamento, baseada no método de Ilizarov, têm sido empregadas em perdas ósseas de pequenos animais, mais comumente decorrentes de processos traumáticos e/ou infecciosos, com relativo sucesso (RAHAL et al., 2001; RAHAL et al., 2003; RAHAL et al., 2005; CAPPELLARI et al., 2014). Em aves há relato do emprego do transporte ósseo, por Johnston et al. (2008), com o uso de fixador circular em um papagaio. O método foi usado para reconstrução de um defeito segmentar no osso tibiotarso, decorrente de uma complicação de fratura. A distração óssea foi iniciada a 0,7 mm por dia, com um ritmo de quatro vezes; porém após nove dias foi aumentada a 1,05 mm com um ritmo de três vezes. Após sete semanas ocorreu a formação da regeneração óssea, mas o local de acoplamento dos ossos não consolidou. Foram necessárias mais duas cirurgias de debridamento das extremidades ósseas e aplicação de enxerto para estimular a consolidação óssea, juntamente com a aplicação de fixador externo.

Em galinhas, há um estudo efetuado por Mizuta et al. (2003), de distração osteogênica da tíbia por um período de 10 dias com fixador monolateral, na magnitude de 0,75 mm por dia, sendo um grupo na frequência de 0,375 mm a cada 12 horas e o outro na frequência de 0,00625 mm a cada 12 minutos efetuada por um auto-distrator.

Uma outra opção para a perda segmentar é o emprego de biomateriais. Um estudo efetuado por Sanaei et al. (2015) avaliou a matriz óssea desmineralizada alogênica (tubular *versus* lasca) em defeitos ósseos induzidos no eixo médio da ulna de pombas, os quais foram estabilizados com fixador híbrido. Baseado nas avaliações radiográficas e histológicas a matriz desmineralizada tubular mostrou-se comparável ao enxerto ósseo autólogo, sendo viável para tratar grandes defeitos ósseos. A matriz desmineralizada em lasca, embora inferior, pode ser viável para reparo de fraturas mais simples ou como um complemento a outros materiais. Por sua vez, Tunio et al. (2015) avaliaram histologicamente a regeneração de defeitos críticos (1 cm de comprimento) induzidos na ulna de pombos, tratados com hidroxiapatita (n=12) ou matriz óssea desmineralizada e hidroxiapatita (n=12). As fraturas foram estabilizadas com fixador externo de metal. A combinação matriz óssea desmineralizada e hidroxiapatita resultou em um enxerto ósseo de melhor qualidade comparada a hidroxiapatita, porém sem diferenças significativas no desenvolvimento do córtex ou na incorporação de enxerto em três, seis ou 12 semanas.

Em pacientes humanos tem também sido empregada a técnica da membrana induzida, a qual foi acidentalmente descoberta por Masquelet em 1986, o qual em 2010 desenvolveu o seu conceito e possibilitou assim novas perspectivas de tratamento (HAN et al., 2017).

A técnica de Masquelet consiste na reconstrução óssea em dois estágios (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012). O primeiro estágio consiste: - no debridamento dos tecidos ósseos e do tecido mole, seguido da implantação de um espaçador de cimento ósseo de polimetilmetacrilato, para evitar o colapso do tecido mole dentro do defeito; - a estabilização do membro com um fixador esquelético externo temporário, ou outro método de fixação (KARGER et al., 2012; GIANNOUDIS et al., 2011; HAN et al., 2017). Haverá a formação de uma membrana pseudosinovial ao redor do espaçador de cimento, como uma reação de corpo estranho, visto que histologicamente foram identificadas células gigantes e macrófagos (GIANNOUDIS et al., 2011; TAYLOR et al., 2012).

No segundo estágio com aproximadamente 4-8 semanas, o espaçador de cimento é removido e o defeito preenchido com enxerto e/ou biomateriais, sendo o fixador removido e o osso estabilizado com placa metálica e parafusos, ou outro tipo de fixação (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012). A membrana deve ser suturada sobre o enxerto para criar um ambiente fechado (TAYLOR et al., 2012).

Na dependência do tamanho do defeito, o enxerto esponjoso autólogo pode ser suficiente, porém para defeitos maiores o enxerto esponjoso pode ser incluído juntamente com o aloenxerto, os substitutos de enxerto ósseo, tais como matriz óssea desmineralizada, sulfato de cálcio, e outros (GIANNOUDIS et al., 2011; HAN et al., 2017). A percentagem de expansores de volume entre 25% e 40% tem sido efetuada sem aumento da taxa de complicações (HAN et al., 2017). Contudo, baseado em estudo clínico com 84 pacientes humanos com defeitos ósseos pós-traumáticos em que se utilizou a técnica de Masquelet, Karger et al. (2012) concluíram que o auto-enxerto esponjoso, aplicado em tamanhos não superiores a 1-2 mm, como o melhor material de preenchimento. Além disso, os autores afirmaram que a cavidade medular deve ser desbridada e mantida permeável e as extremidades ósseas devem ser decorticadas antes da aplicação do enxerto.

O cimento é colocado dentro do defeito durante os estágios mais tardios da polimerização e, se os tecidos moles permitirem, o espaçador deve ser maior que o defeito original, para permitir suficiente colocação do enxerto no momento da reconstrução (TAYLOR et al., 2012). Alguns autores recomendam a colocação do cimento dentro do canal e sobre as margens do osso para propiciar uma melhor estabilidade (GIANNOUDIS et al., 2011). Segundo Karger et al. (2012), com o espaçador de cimento circundando as extremidades do defeito ósseo, isso permite preparar um enxerto que “envolve” estas extremidades. A câmara biológica formada após remoção do cimento tem por funções: a manutenção do volume do enxerto ósseo, a diminuição da reabsorção do enxerto ósseo e a prevenção do crescimento do tecido mole na falha segmentar (HAN et al., 2017).

O espaçador de cimento pode ser aplicado com antibiótico em casos de área infectada (GIANNOUDIS et al., 2011). Deve-se considerar que a qualidade do cimento e o tipo de antibiótico empregado tem efeito significativo na qualidade da membrana (HAN et al., 2017). A seleção dos antibióticos que podem ser usados com espaçadores é mais limitada, porque precisam ser termoestáveis devido a significativa reação exotérmica associada com a polimerização do cimento, e precisam ser hidrofílicos para difundir dentro dos tecidos circundantes (TAYLOR et al., 2012). Entre os antibióticos indicados estão tobramicina, gentamicina, vancomicina e várias cefalosporinas (TAYLOR et al., 2012; HAN et al., 2017). A quantidade de oito gramas de antibiótico por 40 gramas de pó não deve ser excedida, visto que pode alterar as propriedades mecânicas do cimento (TAYLOR et al., 2012).

Alguns estudos têm mostrado que a membrana induzida se torna altamente vascularizada e secreta uma combinação de importantes fatores de crescimento, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) e proteína morfogenética óssea (BMP-2) (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; HAN et al., 2017). Além disso, a análise bioquímica mostrou que o extrato de proteína da membrana estimula a proliferação de células da medula óssea, assim como a diferenciação das células mesenquimais em células da linhagem osteoblástica (TAYLOR et al., 2012).

Por ser espessa e vascularizada, a membrana lembra o periósteo em relação a composição e perfil molecular (HAN et al., 2017). A porção mais interna da membrana possui células como epitélio e a parte mais externa é composta de fibroblastos, miofibroblastos e feixes de colágeno (MASQUELET e BEGUE, 2010; HAN et al., 2017). Estudos mostraram que as membranas produzidas após a remoção do espaçador com seis semanas de implantação, apresentavam espessura de 1 a 2 mm, eram bem vascularizadas e não aderiam ao espaçador (TAYLOR et al., 2012). Além disso, em modelos animais em que o defeito ósseo não foi preenchido com enxerto ósseo, após a remoção do espaçador, formação óssea adicional foi notada na superfície mais interna da membrana (HAN et al., 2017).

Em estudo clínico com 14 pacientes humanos, Aho et al. (2013) realizou biopsias de membranas induzidas em diferentes tempos durante os procedimentos cirúrgicos. Histologicamente, as membranas se caracterizaram por tecido fibroso vascularizado maduro, sendo que a maior vascularização ocorreu nas amostras com um mês e diminuiu para menos que 60% nas amostras de três meses. Com relação a expressão de VEGF, IL-6 e Col-1, a maior expressão foi com um mês, sendo que com dois meses ocorreu diminuição inferior a 40%. Desta forma, os autores sugeriram que a capacidade da membrana para melhorar a osteogênese diminuiu com o tempo, e que um mês seria o melhor período para a segunda intervenção.

Pelissier et al. (2004) avaliaram por estudos histológicos e imunohistoquímicos membranas induzidas por espaçadores cilíndricos de polimetilmetacrilato aplicados no subcutâneo das costas de coelhos. Os exames histológicos foram efetuados com duas, quatro, seis e oito semanas após a implantação e revelaram uma rica vascularização. A imunohistoquímica mostrou produção de fatores de crescimento (VEGF, TGFPI) e osteoindutivos (BMP-2). A máxima produção de BMP-2 foi obtida com quatro semanas, mesmo período em que ocorreu nas membranas a diferenciação das células do estroma da medula óssea para a linhagem osteoblástica. Neste sentido, os autores sugeriram que a reconstrução óssea possa ser conduzida mais cedo, para otimizar o papel *in situ* dos fatores de crescimento e osteoindutivos.

Utilizando um modelo de defeito femoral crítico (8 mm) em ratos, a membrana de Masquelet foi avaliada, por Gouron et al. (2014), aos três, quatros, cinco e seis semanas após a inserção do polimetilmetacrilato. Pelo exame microscópico com hematoxilina e eosina, três zonas distintas foram identificadas. Uma camada fina, ricamente celular em contato com a resina, uma outra zona consistindo de uma rede de fibras orientadas paralela ao cimento, a qual tinha densidade celular mais baixa e aumento em tamanho com o tempo, sugerindo maturação progressiva. Por fim, uma camada em contato com músculo, mais espessa que as outras duas camadas, consistindo de rede vascular grande com tecido desorganizado. Desta forma, a membrana consistia de uma rede densa de colágeno orientada paralela a resina.

Além disso, a membrana continha ilhas de calcificação na terceira semana pós-implantação, porém não pareciam ser contínuas dentro da membrana. Fosfato de cálcio e manchas de carbonato de cálcio, visíveis após coloração de Alizarina vermelha ou Von Kossa, foram demonstradas na área da membrana em contato com a resina. A membrana não aderiu ao cimento e foi suficientemente forte para ser suturada.

Christou et al. (2014) investigaram as propriedades e características da membrana induzida de Masquelet em defeito ósseo de tamanho crítico na tíbia em ovelhas. Nos grupos determinados para receber enxerto, o defeito foi preenchido com polimetilmetacrilato com tobramicina e a estabilização foi com haste bloqueada. Após quatro semanas, os animais foram submetidos a nova cirurgia para implantação do enxerto e no momento que o espaçador de cimento foi removido, amostras do tecido capsular fibroso foram removidas para avaliação histológica e imunohistoquímica. Histologicamente observou-se que a membrana consistia de três a quatro camadas celulares densamente compactadas, cuboides na aparência, células do tipo fibroblástico adjacentes e alinhadas paralelamente ao espaçador de cimento. As camadas mais profundas exibiam fibroblastos alongados. Inicialmente alinhados paralelos ao espaçador de cimento, os fibroblastos tornaram-se mais aleatórios na orientação enquanto se distanciavam do espaçador, os fibroblastos então se combinavam com os tecidos mais profundos tornando a mensuração da espessura mais difícil. Nenhuma membrana basal foi evidente entre as células da superfície e as células mais profundas. O tecido continha muitos vasos sanguíneos e ocasionais células polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos. A imunohistoquímica revelou membrana ativa com vários fatores teciduais, com potencial para auxiliar a consolidação óssea.

As características histológicas de membranas induzidas no tecido subcutâneo (área lombar), intramuscular (músculos paravertebrais) e defeito ósseo (15 mm rádio distal) foram avaliadas em coelhos, por Liu et al. (2013). Foram empregados cilindros de polimetilmetacrilato que foram moldados *ex vivo*. Cinco animais foram submetidos a eutanásia e 10 espécimes de cada local foram avaliadas histologicamente com duas, quatro e oito semanas de pós-operatório.

As membranas induzidas no tecido subcutâneo se desenvolveram mais rapidamente e tiveram densidade de microvasos mais baixa, ao passo que nos defeitos ósseos foram mais finas e apresentaram maior densidade de microvasos.

Liu et al. (2012) avaliaram a aspereza da superfície do cimento ósseo nas características histológicas da membrana induzida. Cimentos com superfície lisa e áspera foram implantados em defeito ósseo do rádio, intramuscular e subcutâneo. As membranas foram avaliadas pela hematoxilina-eosina com seis semanas de implantação. Nos parâmetros avaliados (espessura, área, densidade celular, densidade de microvasos) não houveram diferenças com o tipo de superfície nos três locais aplicados.

Henrich et al. (2016) analisaram, em ratos, as membranas de Masquelet induzidas ao redor de defeitos ósseos do fêmur e em bolsas subcutâneas aos dois, quatro e seis semanas após indução, e compararam ao perióstio. Na análise histológica, as células localizadas nas camadas mais distantes do polimetilmetacrilato mostravam-se alongadas e orientadas paralelas ao cimento, ao passo que células na camada adjacente ao cimento foram pequenas e redondas em formato. Com o passar do tempo as membranas espessavam e a fibrosidade aumentava significativamente. As membranas induzidas no defeito ósseo foram geralmente mais densas do que no tecido subcutâneo. Ambas diferiram daquela sobre o perióstio. A vascularização foi presente predominante nas partes médias das membranas e áreas mais distantes do cimento. Com duas semanas as células estavam igualmente distribuídas pelas membranas, e a partir daí o número de células diminuiu em suas áreas fibrosas centrais e permaneceu constante na camada de membrana externa mais distante do cimento.

Diferentes cimentos ósseos, com ou sem suplementação de antibióticos, foram comparados por Nau et al. (2016) em modelo de defeito de tamanho crítico induzido no fêmur de ratos. Em todos os grupos, a análise histológica revelou tecido vascularizado, rico em células com alta proporção de proteínas estruturais e com estruturas fibrosas orientadas paralelas ao cimento de polimetilmetacrilato.

Células localizadas nas camadas da membrana longe do cimento foram alongadas e orientadas paralelas ao cimento, ao passo que células na camada adjacente ao cimento foram pequenas e redondas em formato. A formação da espessura da membrana variou significativamente na dependência do tipo de cimento ósseo. As cápsulas fibrosas tornavam-se menos celulares com o tempo. Antibióticos que exercem efeitos citotóxicos como a clindamicina têm um maior impacto nos aspectos estruturais da membrana.

Entre as complicações da técnica de Masquelet são citadas a refratura, a qual foi associada a inadequada corticalização do osso e uso de fixador externo, e também a reabsorção maciça do enxerto relacionada ao osteoclastos (HAN et al., 2017). Pode também ocorrer infecção, geralmente decorrente de um debridamento inadequado (TAYLOR et al., 2012).

2.2 Fraturas em aves

Se a ave é apresentada com uma fratura, certamente se deve a um trauma maior, o que requer um completo exame físico para identificar outras possíveis injúrias (MARTIN e RITCHIE, 1999). Além disso, em aves de vida livre, é preciso considerar a possibilidade de doenças intercorrentes como fator contribuinte da lesão (HARCOURT-BROWN, 2002). Neste sentido, a fixação definitiva de uma fratura é raramente uma emergência, sendo como primeira prioridade a estabilização do paciente (HELMER e REDIG, 2006). Importante ainda considerar que a maioria das aves estarão sob grave estresse após a fratura, tanto pelo trauma, como pelo estresse adicional da contenção e manuseio (BENNETT e KUZMAN, 1992).

Um fato também a ser considerado é que a consolidação de fraturas em aves difere de mamíferos (NUNAMAKER, 1998). O perióstio e o endóstio contêm poucas células e falta uma significativa atividade biológica (McFADDEN, 2016). Uma vez que as aves apresentam células nucleadas, a participação e diferenciação das células sanguíneas no processo de consolidação parece alterar o processo biológico (NUNAMAKER, 1998).

Ademais, embora as aves possuam osso cortical e esponjoso, o osso cortical é organizado em padrões misto de sistema lamelar e haversiano incompleto, sendo que este último varia consideravelmente entre as espécies (McFADDEN, 2016). Por sua vez, o calo endosteal é um componente importante na consolidação de fraturas em aves, desde que proporciona um suporte rápido e rígido em osso bem alinhado, ao passo que o calo periosteal proporciona um suporte secundário (BENNETT e KUZMAN, 1992; McFADDEN, 2016).

Embora os princípios de reparo da fratura em aves seja similar aos de pequenos animais, existem diferenças que precisam ser consideradas, tais como: corticais finas e frágeis, as quais não seguram adequadamente os implantes; menor cobertura óssea pelos tecidos moles; há pouco enxerto esponjoso para ser coletado; largo canal medular, o qual dificulta o preenchimento sem acrescentar excessivo peso no osso afetado; a carga precisa ser rapidamente restaurada nas pernas já que a locomoção é bipedal (BENNETT e KUZMAN, 1992; HELMER e REDIG, 2006). Além disso, há presença de ossos pneumáticos, tais como o úmero e o fêmur de algumas aves, os quais dificultam o uso de implantes intramedulares (BUSCH, 1986; OROSZ et al., 1992; WILLIAMS, 2002).

Algumas vezes o grau e o tipo de dano ao tecido mole podem ser mais críticos em determinar o retorno pós-operatório à função do que a lesão óssea específica (MARTIN e RITCHIE, 1999). Adesões entre os tecidos danificados podem limitar a função muscular e o movimento articular (MACCOY, 1992). O tênue suprimento sanguíneo das fraturas distais ao carpo e tarso aumenta o potencial para complicações, aliado ao pouco suporte de tecido mole, composto apenas por tendão e pele (BENNETT e KUZMAN, 1992).

A gravidade da fratura interfere na taxa e curso da consolidação; contudo, a estabilidade clínica (2-3 semanas) pode preceder a evidência radiográfica (três a seis semanas), sugerindo que o implante pode ser removido antes da consolidação estar visível radiograficamente (BENNETT e KUZMAN, 1992; DONELEY, 2010). Fraturas adequadamente alinhadas consolidam mais rapidamente do que em mamíferos, estando estável com três a quatro semanas (FORBES, 1998).

Vale ainda citar que o tempo necessário para a consolidação de uma fratura aviária depende da quantidade de deslocamento, a integridade do suprimento sanguíneo, a presença de infecção e o grau de mobilidade da fratura (BENNETT e KUZMAN, 1992). Se a fratura estiver corretamente alinhada e as extremidades em posição a consolidação óssea ocorre com calo endosteal, porém se ossos não estiverem alinhados ou houver movimento no foco de fratura ocorrerá formação de calo periosteal (FORBES, 1998; DONELEY, 2010). O suprimento sanguíneo para o osso se deve aos vasos sanguíneos do periósteo, medular e os da metáfise e epífise (DONELEY, 2010). A maioria do calo durante a consolidação é derivado da superfície periosteal, sendo o suprimento de sanguíneo para o periósteo muito importante (HELMER e REDIG, 2006; DONELEY, 2010). Por sua vez, a circulação intramedular parece ser de menor importância na consolidação óssea aviária do que nos mamíferos (HELMER e REDIG, 2006). O reparo de uma fratura da asa, em especial perto da articulação, precisa ser manipulado de forma a evitar a anquilose e proteger o tecido mole, para assim assegurar o retorno a capacidade de voar, em especial em aves de vida livre (MARTIN e RITCHIE, 1999). Estas precisam de total restauração da função musculoesquelética antes de retornar ao habitat (PONDER e REDIG, 2016). Por outro lado, aves que são mantidas em cativeiro são capazes de tolerar a perda funcional da asa (MARTIN e RITCHIE, 1999), porém a meta é o retorno a uma vida confortável e livre de dor (PONDER e REDIG, 2016).

Em muitas aves, porções do canal medular do úmero são conectados aos sacos aéreos, os quais são importantes para reduzir o peso do osso e contribuir para o ciclo respiratório durante o voo (MARTIN e RITCHIE, 1999).

O rádio e a ulna em geral deslizam entre si longitudinalmente, de forma que se ocorrer uma fusão entre eles, o pássaro será incapaz de supinar ou pronar o carpo, impossibilitando a adequada capacidade de voo (MACCOY, 1992; MARTIN e RITCHIE, 1999). A ulna é o principal osso de suporte do conjunto, de forma que fraturas ulnares podem contribuir para fratura de estresse do rádio, a menos que suporte adicional seja efetuado (MACCOY, 1992).

Os membros pélvicos em aves podem ser usados, de acordo com a espécie, para empoleirar, escalar, capturar e manipular itens de comida, sendo assim muito importantes em termos funcionais (McFADDEN, 2016). As lesões da perna que alteram o suporte de peso em um ou ambos os pés podem predispor ao desenvolvimento do “*bumblefoot*” ou artrite (MARTIN e RITCHIE, 1999). Adicionalmente, a fratura de um membro pélvico favorece a distribuição de peso para o membro contralateral e, se não resolvida rapidamente, pode acarretar complicações no membro saudável (McFADDEN, 2016). Uma diminuição de 20% a 30% da função pode ser aceitável, desde que a disfunção não afete drasticamente a flexão ou a extensão do pé ou a apreensão de comida (MARTIN e RITCHIE, 1999).

Nos membros pélvicos, a fratura do tibiotarso é considerada uma das mais comuns e sempre requerem estabilização (BENNETT e KUZMAN, 1992). Por sua vez, as fraturas do tarso-metatarso são geralmente expostas (REDIG, 1986) e também requerem adequada estabilização (BENNETT e KUZMAN, 1992).

2.3 Métodos de imobilização das fraturas

As fraturas em aves podem ser imobilizadas por meio da coaptação externa (talas e bandagens), fixação interna (pinos, fios de cerclagem, placas ósseas) e fixação externa, cada qual com suas vantagens e desvantagens (MACCOY, 1992; MARTIN e RITCHIE, 1999; HARCOURT-BROWN, 2002; PONDER e REDIG, 2016). Na escolha do método de fixação vários fatores precisam ser considerados, incluindo o tipo e a gravidade da injúria; o comportamento, nível de atividade esperada e necessidades da espécie aviária (MARTIN e RITCHIE, 1999). O retorno a função das extremidades, particularmente das pernas e asas, é uma consideração importante ao se determinar o método de fixação a ser usado (TULLY, 2002). Além disso, fatores externos como o consentimento do proprietário e considerações financeiras precisam ser avaliados (PONDER e REDIG, 2016). O ideal é que a fratura esteja suportada rigidamente, mas que as articulações possam ser movidas livremente (HARCOURT-BROWN, 2002).

Embora a coaptação externa seja menos dispendiosa, o retorno à função é tipicamente prolongado e pode não ser tão completo quanto à fixação interna (HELMER e REDIG, 2006). São consideradas vantagens da técnica a menor chance de infecção, o menor dano a vascularização regional e o fato de ser uma possibilidade de tratamento em aves pequenas demais para a realização de procedimentos cirúrgico (DONELEY, 2010). A localização da fratura é crítica ao se escolher este tipo de imobilização, sendo mais adequada para as fraturas do eixo médio, porque fornecem superfície de suporte para as ataduras e algum benefício pode ser obtido a partir do alinhamento dos músculos e penas (MACCOY, 1992).

Os pinos intramedulares são relativamente pouco dispendiosos, proporcionam alinhamento axial, resistem ao dobramento e requerem pouca exposição (BENNETT e KUZMAN, 1992). Os pinos confeccionados de titânio comparado aos de aço inoxidável têm por vantagem a memória e retorno a posição normal após certo grau de dobramento (HELMER e REDIG, 2006). Uma das formas de evitar a rotação e forças de cisalhamento é a inclusão da coaptação externa juntamente com o pino intramedular (PONDER e REDIG, 2016), porém o mais apropriado é o emprego de fixador externo e fios de cerclagem (BENNETT e KUZMAN, 1992). Pinos excessivamente grandes devem ser evitado, porque interferem com o suprimento sanguíneo endosteal, o que pode favorecer a necrose avascular ou fraturas iatrogênicas (DONELEY, 2010).

Um estudo avaliou a efetividade de xenoenxerto de pino de osso cortical, proveniente de avestruz ou cão, em relação ao fio de Kirschner no reparo de fratura do úmero induzida em pombos, não tendo sido observada diferenças estatísticas nos testes biomecânicos, porém os pinos de xenoenxerto promoveram maior calo periosteal e inflamação no local da fratura (WANDER et al., 2000).

Hastes de polímero intramedular são uma outra opção que pode ser aplicada sozinha, com fixador esquelético externo ou com polimetilmetacrilato, porém são menos rígidas do que o aço (BENNETT e KUZMAN, 1992).

A fixação esquelética externa com fixadores simples tem sido usada em aves por promover a formação de calo endosteal e minimizar a formação de calo periosteal, já que este último pode afetar as atividades dos músculos e tendões e enfraquecer o voo (KOCK, 1983; BUSCH, 1986). Há uma variedade de sistemas, com diferenças em conectores e barras, sendo que estas últimas podem ser de fibra de carbono, alumínio, titânio, polimetilmetacrilato e resina de epóxi, entre outros (BENNETT e KUZMAN, 1992; McFADDEN, 2016; PONDER e REDIG, 2016). As montagens tipo I e tipo II são geralmente as usadas em aves, embora o tipo III possa ser requerida em aves de maior porte (MACCOY, 1992; DONELEY, 2010; PONDER e REDIG, 2016).

Em estudo que comparou o confinamento em gaiola, a coaptação externa, e o fixador externo simples em ossos longos de pombos, foi observado que o fixador permitiu ótima consolidação e bom alinhamento anatômico comparado aos demais, além do uso precoce do membro e manutenção da mobilidade articular (WILLIAMS et al., 1987). O uso de resina de acrílico como substituto da barra do fixador mostrou-se efetivo em 12 membros fraturados de 11 pássaros, tendo como principal complicação a fratura óssea ao redor do pino, que foi atribuída a incorreta manipulação (KOCK, 1983). Por sua vez, o uso de fixadores híbridos, ou fixadores “tie-in”, em que o pino intramedular é unido ao fixador externo, tem por vantagens a diminuição na migração do pino intramedular, a leveza e o fato de permitir a dinamização, entre outras (HELMER e REDIG, 2006; PONDER e REDIG, 2016). A técnica permite a manutenção do alinhamento do osso e previne a rotação (HARCOURT-BROWN, 2002), podendo ser empregado no reparo de fraturas diafisais e periarticulares de todos os ossos longos das aves, com exceção do tarsometatarso (DONELEY, 2010).

Na aplicação de placas e parafusos é importante tomar muito cuidado, em virtude das corticais finas e delicadas das aves, que proporcionam pobre capacidade de retenção dos parafusos (BENNETT e KUZMAN, 1992; DONELEY, 2010). As placas podem ser usadas sozinhas ou com polimetilmetacrilato intramedular (BENNETT e KUZMAN, 1992).

Bennert et al. (2016) avaliaram a consolidação da fratura de rádio e ulna induzida em 27 pombos, que foram imobilizadas por dois tipos de miniplacas de aço aplicadas apenas na ulna. Quatro grupos foram compostos: placa adaptada de 1,3 mm com ou sem bandagem de figura em oito, placa de compressão de 1 mm com ou sem bandagem de figura em oito. Os exames radiográficos foram conduzidos com três, 14 e 28 dias após a cirurgia. Em todas as aves as fraturas consolidaram sem dobramento ou distorção das placas, não ocorrendo diferenças entre tratamentos. Um total de 85,2% dos pombos apresentou habilidade de voo boa ou muito boa. De acordo com os resultados, ambos sistemas podem ser recomendados para pássaros com massa corpórea menor que 500 g e a aplicação da bandagem de figura em oito foi considerada benéfica por até 10 dias de pós-operatório, visto reduzir o risco de infecção pós-operatória. Se a placa for removida, isto precisa ser efetuado antes de 28 dias após a cirurgia, já que no dia 28 de pós-operatório em 15 pássaros esta foi apenas parcialmente visível e em três estava completamente coberta por calo ósseo.

Se possível, a placa deve ser removida, especialmente em casos de sensibilidade ao frio, o que pode resultar em dor e automutilação (BENNETT e KUZMAN, 1992). Darrow et al. (2019) realizaram estudo biomecânico para comparar a força de dobramento de uma placa bloqueada, uma placa não bloqueada e um fixador “*tie-in*” em modelo de fratura do úmero (ostectomia transversa de 1 mm), realizado em pombos. As construções foram testadas ciclicamente por teste não destrutivo por 1000 ciclos. A configuração do fixador “*tie-in*” foi mais rígida e mais forte que as placas fixadas na posição dorsal, mas tinha menor energia de tensão. Segundo os autores, a importância na consolidação da fratura ainda precisa ser esclarecida.

2.4 Complicações

A má-união ou não-união se devem a instabilidade no local da fratura, seja pela aplicação de método de fixação externa ou interna (HARCOURT-BROWN, 2002; HELMER e REDIG, 2006). Também o dano maciço ao tecido mole e a isquemia associada são fatores que favorecem a estas complicações da fratura (MACCOY, 1992). O manejo da não-união da fratura inclui adequada imobilização da fratura, preferivelmente com algum grau de compressão, a qual pode ser realizada com um aparato adicional, coaptação adicional, ou diminuição do nível da atividade da ave (HARCOURT-BROWN, 2002; HELMER e REDIG, 2006). Em casos iniciais de má-união em que há um calo ativo, este pode ser removido e usado como um enxerto (HARCOURT-BROWN, 2002). Em casos de mais longa permanência, o enxerto ósseo pode ser coletado da carina do esterno (HELMER e REDIG, 2006).

Segundo Bennett e Kuzman (1992), o auto-enxerto mais comumente usado em aves é o córtico-esponjoso, colhido da carina. Os ossos longos maiores (fêmur e tíbia) são pneumáticos e não possuem significativa quantidade de enxerto esponjoso, e os ossos mais distais são estreitos e não são uma boa fonte de enxerto esponjoso. Contudo, em aves maiores e terrestres o tibiotarso proximal pode proporcionar adequada quantidade de enxerto esponjoso.

As fraturas em aves tendem a ser expostas e cominutivas, em virtude da insuficiente cobertura de tecidos moles (BENNETT e KUZMAN, 1992; HELMER e REDIG, 2006; DONELEY, 2010). Quando expostas, as fraturas apresentam alto risco de osteomielite e, conseqüentemente, união atrasada ou não-união da fratura (WILLIAMS, 2002; PONDER e REDIG, 2016). Por sua vez, as fraturas cominutivas são mais prováveis de se tornarem infectadas, resultando em osteomielite secundária (MARTIN e RITCHIE, 1999).

Os casos de osteomielite pós-operatória podem ser manejados com debridamento cirúrgico e terapia antibiótica baseada na cultura e sensibilidade (HELMER e REDIG, 2006). Se possível, o osso afetado deve ser removido no momento da cirurgia; porém, se a infecção atingiu a cavidade medular é difícil prever se ocorrerá a formação de material purulento, que ocorre como massa caseosa (HARCOURT-BROWN, 2002).

Isso ocorre porque os heterófilos não possuem proteinase para liquefazer o tecido necrótico, sendo a osteomielite caracterizada por lesões caseosas, secas e sem drenagem (MARTIN e RITCHIE, 1999). A implantação de pérolas de polimetilmetacrilato pode ser benéfica, desde alta concentrações de antibiótico são alcançadas na área circundante (HELMER e REDIG, 2006). Importante citar que a osteomielite granulomatosa serve como um nidus de infecção, a qual pode promover septicemia no caso de o pássaro tornar-se imunossuprimido (MARTIN e RITCHIE, 1999).

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar temporalmente, por meio de estudos radiológico, ultrassonográficos e histológicos, a formação e a qualidade da membrana induzida de Masquelet, tendo por modelo uma falha óssea segmentar induzida no rádio de galinhas.

Específicos

Avaliar os aspectos radiográficos da falha segmentar e do espaçador de cimento.

Analisar ultrassonograficamente as características evolutivas da membrana induzida, com relação à vascularização e à espessura.

Estudar os aspectos histológicos da membrana, conforme a evolução temporal, e quantificar a angiogênese e a inflamação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) – Botucatu (nº. 0225/2018 - CEUA - anexo I).

Foram utilizadas 16 galinhas de postura (*Gallus gallus domesticus*), clinicamente saudáveis, com um ano de idade, doadas por granja da fazenda universitária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp Botucatu, com massa corpórea variando entre 1,2 e 1,6 kg (Média = 1,45 kg, Desvio Padrão = 0,11). Estas foram mantidas livres, em espaço fechado (3,3 m largura x 3,3 m comprimento x 3 m altura) com ventilação, no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (Cempas), com água e ração comercial para aves *ad libitum*.

4.2 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

As galinhas foram pré-medicadas com midazolam (2 mg/kg) e morfina (2 mg/kg) na mesma seringa, por via intramuscular (IM). Decorridos 10 minutos, estas foram induzidas com isoflurano na máscara facial, seguida de intubação com sonda endotraqueal sem cuff (no. 3) para a manutenção da anestesia geral inalatória.

Após as penas da asa esquerda terem sido removidas por arrancamento, a galinha foi posicionada em decúbito dorsal e a asa esquerda foi mantida estendida, para realização de acesso ventral. Efetuou-se a antisepsia com clorhexidina e aplicou-se os panos de campo operatório. A pele foi incisada sobre o aspecto ventral do rádio, incluindo toda a diáfise medial. Foram afastados os músculos extensor radial do metacarpo cranialmente e o pronador profundo caudalmente. O osso do rádio foi isolado, com o cuidado de não lesar as artérias e veias maiores, nervos, músculos e tendões presentes na região (Figura 1a).

Removeu-se um 1,5 cm da porção medial do rádio, com o auxílio de serra oscilatória (Figuras 1a, 1b e 1c). Na sequência, foi aplicado cimento ósseo (Baumer OSTEO-CLASS) na região da falha segmentar na fase pastosa (Figura 1d). Este se compunha de dois componentes - 20 ml de monômero (metil metacrilato) e 40 gramas de polímero (polimetil metacrilato) –, além da presença de três gramas de óxido de zircônio junto ao polímero.

Os tecidos moles foram aproximados com uma sutura contínua simples e o tecido subcutâneo com sutura tipo Cushing. A síntese da pele foi com pontos isolados simples. O fio utilizado foi o náilon 3-0 agulhado.



Figura 1. Etapas cirúrgicas para o desenvolvimento da membrana induzida de Masquelet em galinhas. Osso do rádio isolado e início da secção óssea com auxílio de serra oscilatória (a). Falha óssea segmentar (b). Osso do rádio excisado com 1,5 cm de comprimento. Aplicação do cimento ósseo na região da falha segmentar na fase pastosa (d).

4.3 Medicamentos pré e pós-operatório

As aves receberam enrofloxacina na dose de 15 mg/kg pela via IM (músculo peitoral) no momento da tranquilização e por mais sete dias, a cada 24 horas. O anti-inflamatório utilizado foi o meloxicam na dose de 0,2 mg/kg, IM, a cada 24 horas por cinco dias. No período pós-operatório imediato foi usado o cloridrato de tramadol na dose 10mg/kg, IM.

4.4 Exames de imagem

Foram realizados exames radiográficos, sob contenção física, no pós-operatório imediato e aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. Foram efetuadas projeções radiográficas caudo-cranial e médio-lateral do antebraço esquerdo. A técnica foi 40KV, 8 mAs e 200 mA, com distância foco-filme de um metro, com o uso de equipamento digital (GE Health, DR-F®).

Nestes mesmos períodos também foram efetuados exames ultrassonográficos ao Modo-B e com Doppler colorido na região do defeito ósseo. Foi utilizado um equipamento modelo MyLab Alpha da marca Esaote® equipado com transdutor linear na frequência de 3 a 13 MHz. Ao Modo-B foi observado o tempo de formação da membrana e medida sua espessura em cada momento de avaliação. Para a avaliação da formação de vascularização utilizou-se o Doppler colorido e cada momento foi graduado na seguinte escala, estabelecida pelo ultrassonografista do presente estudo (Figura 2):

- Escore 0: sem sinal de vascularização.
- Escore 1: um a dois pontos de vascularização.
- Escore 2: um a dois trajetos de vascularização.
- Escore 3: três ou mais trajetos de vascularização.

Os dados da imagem foram avaliados por análise estatística descritiva, tendo sido determinado média e desvio padrão.

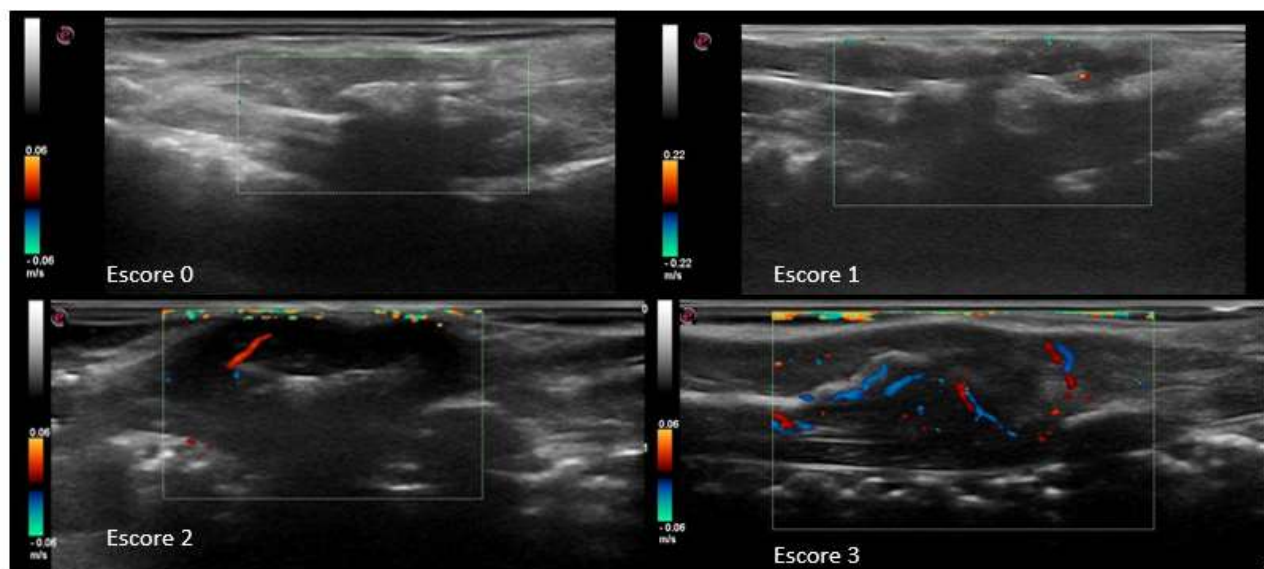


Figura 2. Imagens ultrassonográficas com a ferramenta Doppler colorido demonstrando a escala da vascularização de acordo com o Doppler colorido.

4.5 Coleta, Preparação e Análise histológica

Para a coleta da membrana de indução uma ave foi sacrificada aos sete dias após a cirurgia (estudo piloto) e cinco aves foram sacrificadas aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. Para tanto, as aves foram sedadas com cloridrato de cetamina (30 mg/kg), cloridrato de xilazina (4 mg/kg), midazolam (2 mg/kg) e morfina (2 mg/kg), por via IM. Depois recebeu mistura de cloridrato de cetamina (30 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg), por via intravenosa. Após obtido plano anestésico profundo, aplicou-se o cloreto de potássio por via intravenosa até a parada cardiorespiratória.

As membranas de indução de Masquelet foram coletadas e fixadas em formalina tamponada 10% por 24-48 horas e, logo em seguida, foram mantidas em álcool 70%. Posteriormente foram embebidas em parafina, cortada em seções de 2-3 micra de espessura, e coradas com hematoxilina-eosina.

Os espécimes foram avaliados com respeito a angiogênese e características celulares. A membrana foi avaliada em sua porção central e nas extremidades, junto às porções proximal e distal do rádio. Para a quantificação da angiogênese foram contados os números de vasos sanguíneos presentes com auxílio de uma ocular com retícula de 1cm² (10 x10 mm) em objetiva de 40X. A presença de células inflamatórias foi classificada com um escore semi-quantitativo de acordo a intensidade: ausente (grau 0), leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3).

Para a análise estatística da angiogênese foram empregados o teste não paramétrico de Mann Whitney e análise de variância (ANOVA) para amostras repetidas. Os testes qui-quadrado e Fischer foram utilizados para a análise dos escores de inflamação, respectivamente, de acordo com a comparação entre três ou dois momentos. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

5 *RESULTADOS*

5 RESULTADOS

Todas as aves se alimentaram e se locomoveram de forma normal, durante todo o período de observação. Duas galinhas mostraram sinais de reação inflamatória no local cirúrgico com 10 dias de pós-operatório. Foi aplicado duas doses de pentabiótico (200 mg/kg de penicilina), a cada três dias, e curativos locais, havendo reversão do processo.

No exame radiográfico do pós-operatório imediato foi possível verificar a presença do cimento ocupando a falha óssea segmentar, como uma massa radiopaca, com variações de intensidade. Embora na posição médio-lateral denotou-se adequado posicionamento das extremidades das fraturas, em torno de 75% (12 de um total de 16) das galinhas havia algum grau de deslocamento das extremidades ósseas na posição caudo-cranial. Na avaliação com 15 dias de pós-operatório notou-se a manutenção do produto na falha segmentar, com aumento da radiopacidade do cimento ósseo, quando comparado ao momento pós-operatório imediato (Figura 3). Aos 21 dias de pós-operatório, uma galinha apresentou sinais reabsorção óssea em uma das extremidades da fratura e outra em ambas as extremidades (Figura 4). Com 30 dias de pós-cirúrgico já foi evidente a presença de formação óssea partindo de ambas extremidades fraturadas (Figura 5).



Figura 3. Imagens radiográficas em projeção médio-lateral do antebraço de galinha imediatamente (a) e com 15 dias de pós-operatório (b). Note a falha segmentar preenchida com cimento ósseo com massa radiopaca em ambos os momentos, cuja visibilização foi dificultada pelo crescimento das penas aos 15 dias de pós-operatório.



Figura 4. Imagens radiográficas em projeção médio-lateral do antebraço de galinha imediatamente (a) e com 21 dias de pós-operatório (B). Note a falha segmentar preenchida com cimento ósseo com massa radiopaca em ambos os momentos, com extremidades ósseas sem sinais de reação aos 21 dias de pós-operatório.



Figura 5. Imagens radiográficas em projeção médio-lateral do antebraço de galinha imediatamente (a) e com 30 dias de pós-operatório (B). Note a falha segmentar preenchida com cimento ósseo com massa radiopaca em ambos os momentos, com formação óssea partindo das extremidades ósseas fraturadas em direção ao cimento ósseo aos 30 dias de pós-operatório.

Nas imagens ultrassonográficas ao Modo-B do pós-operatório imediato foram evidenciadas as extremidades da falha óssea, o cimento ósseo e a reação inflamatória em tecidos moles adjacentes (Figura 6). No momento de sete dias de pós-operatório e nos momentos seguintes foi possível visibilizar e mensurar a membrana (Figura 7 e Tabela 1). Com a utilização da ferramenta Doppler colorido foi possível encaixar cada ave nos escores de vascularização como demonstrado na Tabela 2. No exame ultrassonográfico aos 30 dias de pós-operatório uma galinha apresentou formação de coleção líquida adjacente à falha óssea.

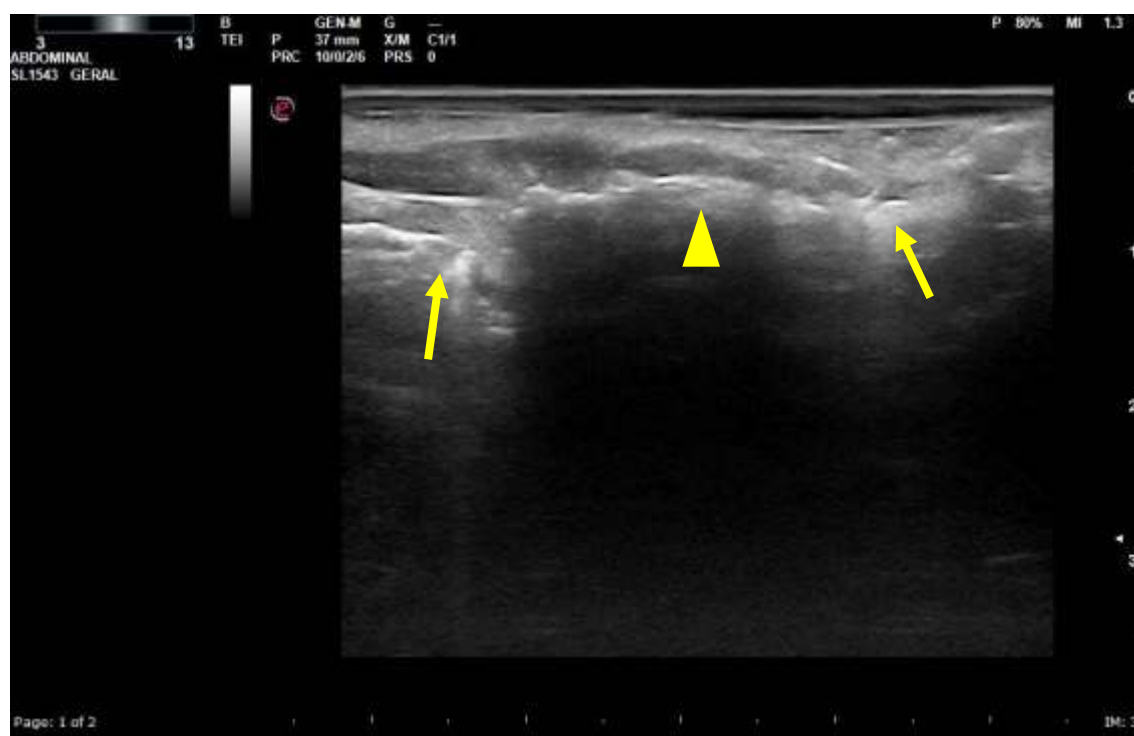


Figura 6. Imagem ultrassonográfica ao Modo-B do pós-operatório imediato demonstrando as extremidades da falha óssea (setas) e o cimento ósseo (cabeça de seta).

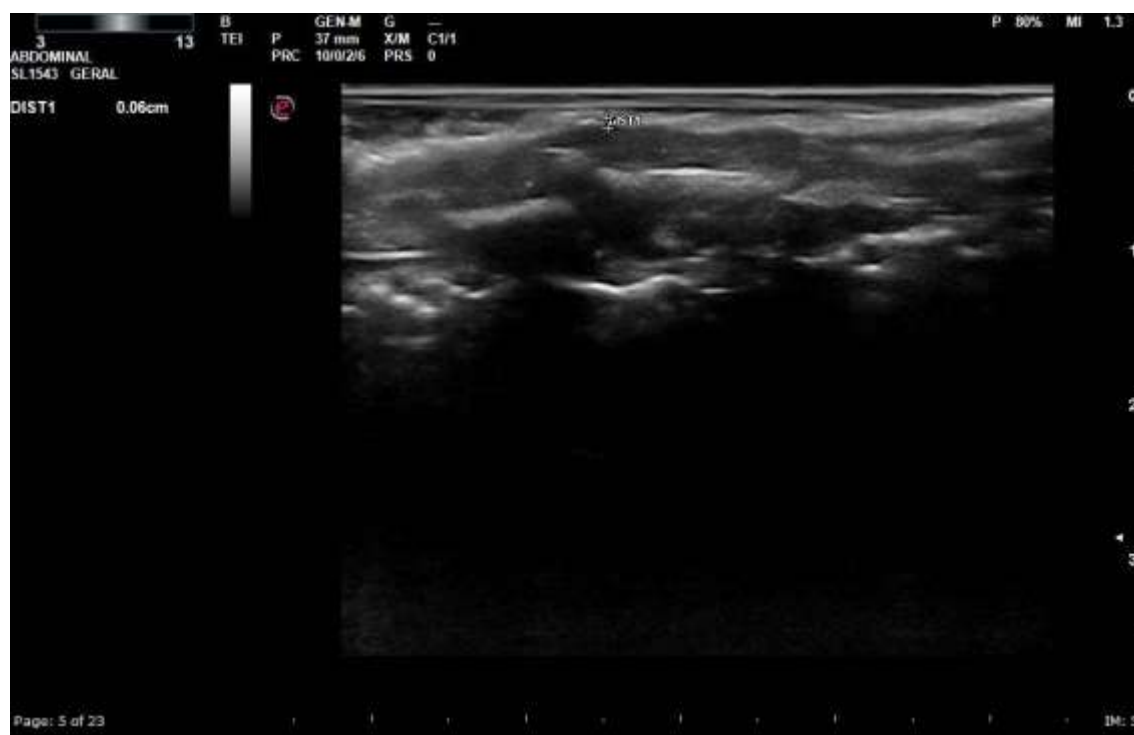


Figura 7. Imagem ultrassonográfica ao Modo-B, aos 30 dias de pós-operatório, demonstrando a mensuração da membrana (calipers).

Tabela 1 - Espessura da membrana induzida pela técnica de Masquelet em galinhas, mensurada pelo exame ultrassonográfico ao Modo-B aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório

	7 dias	15 dias	21 dias	30 dias
	0,04 cm	0,07 cm	0,06 cm	0,07 cm
	0,05 cm	0,05 cm	0,03 cm	0,09 cm
	0,06 cm	0,07 cm	0,05 cm	0,06 cm
	0,07 cm	0,07 cm	0,07 cm	0,11 cm
	0,04 cm	0,08 cm	0,07 cm	0,06 cm
Média	0,052 cm	0,068 cm	0,056 cm	0,078 cm
Desvio Padrão	0,013 cm	0,010 cm	0,016 cm	0,021 cm

Tabela 2 - Escores da vascularização da membrana induzida em galinhas pela técnica de Masquelet à ferramenta Doppler aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório

7 dias	15 dias	21 dias	30 dias
Escore 2	Escore 1	Escore 3	Escore 3
Escore 1	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Escore 3	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Escore 3	Escore 3	Escore 3	Escore 3
Escore 3	Escore 2	Escore 3	Escore 3

Macroscopicamente foi verificada a formação de membranas ao redor do cimento ósseo, as quais foram mais espessas nos períodos mais tardios, ou seja, 21 e 30 dias de pós-operatórios (Figura 8). Aos 30 dias após a cirurgia foi detectada presença de formação óssea junto à membrana. A membrana acompanhou o formato da massa de cimento, sendo que a porção interna se adentrou nas áreas de maior irregularidade.

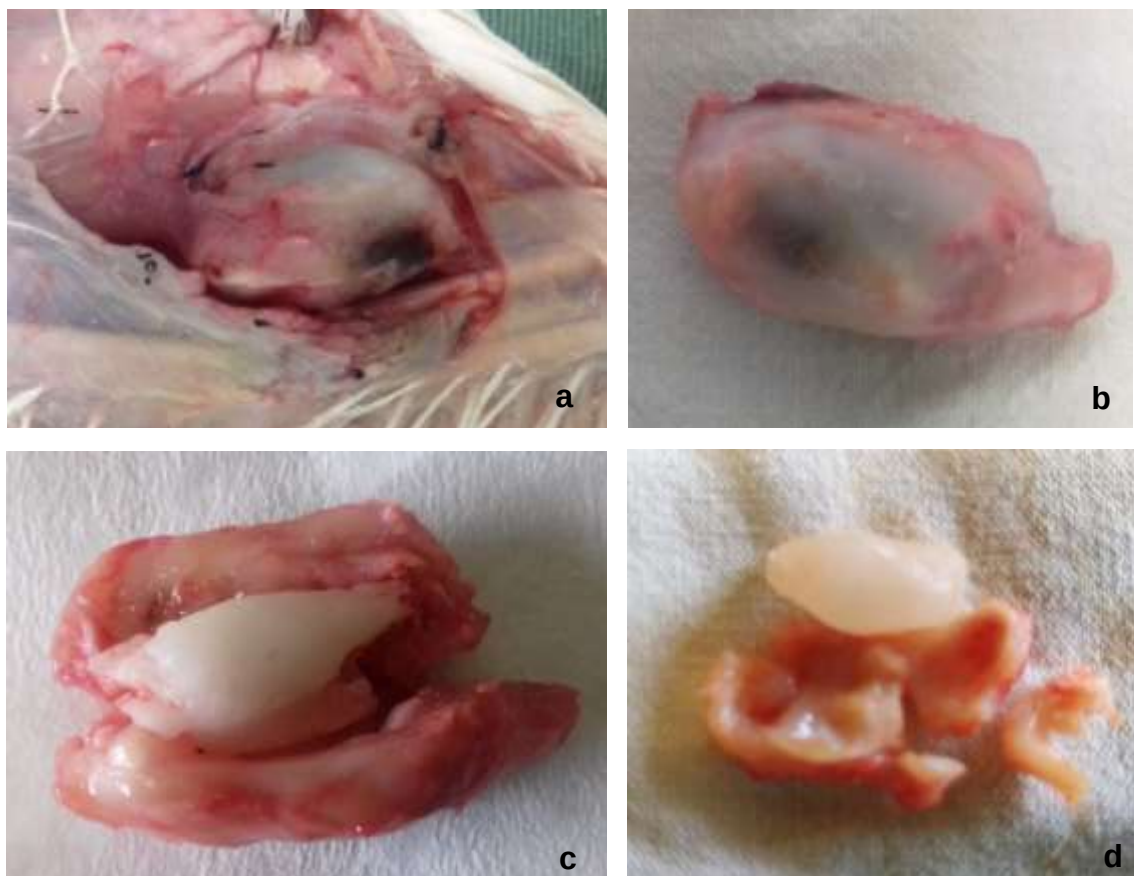


Figura 8. Aspecto macroscópico da membrana induzida de Masquelet em galinha aos 30 dias de pós-operatório. Note a membrana induzida na região da falha segmentar (a) e após a remoção (b). Observe a presença do cimento ósseo, após a incisão da membrana (c). Verifique a espessura da membrana com sinais de formação óssea.

Na avaliação histológica na porção central da membrana, aos sete dias de pós-operatório foi possível observar uma delimitação em três zonas distintas (Figura 9a). A primeira zona (zona 1), estava em contato com a resina acrílica e foi composta por uma fina camada com alta concentração celular. Foram identificadas células inflamatórias mononucleares e células estromais, com citoplasma escasso, e núcleo variados de ovalada a fusiforme. Na segunda zona (zona 2), foi possível verificar abundante quantidade de fibras colágenas, dispostas em feixes orientados, paralela à resina. Notou-se grande quantidade de vasos sanguíneos. A terceira camada (zona 3), estava em contato com a musculatura adjacente, consistindo em tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos.

Após 15 dias, observou-se uma diferença na proporção entre as camadas (Figura 9b) das zonas 1, 2 e 3. Notou-se diminuição da quantidade de células inflamatórias nas três zonas e morfologicamente foi possível verificar nas três camadas fibras colágenas organizadas, orientadas em feixes paralelos a resina. Detectou-se também uma grande quantidade de vasos sanguíneos. Após 21 dias (Figura 9c), houve uma perda de delimitação das camadas, com difícil evidenciação das diferentes zonas. Notou-se ainda, formação de metaplasia cartilaginosa e óssea, indicando a mineralização da membrana. Foram observadas extensas áreas com formação de cartilagem e regiões com formação de trabéculas ósseas (Figura 10). Após 30 dias (Figura 9d), havia completa mineralização da membrana, com formação de trabéculas ósseas perdendo a delimitação das zonas. Foi possível identificar uma zona completamente mineralizada e uma zona fibromuscular entre as trabéculas ósseas e a musculatura. Os vasos sanguíneos mostravam-se calibrosos.

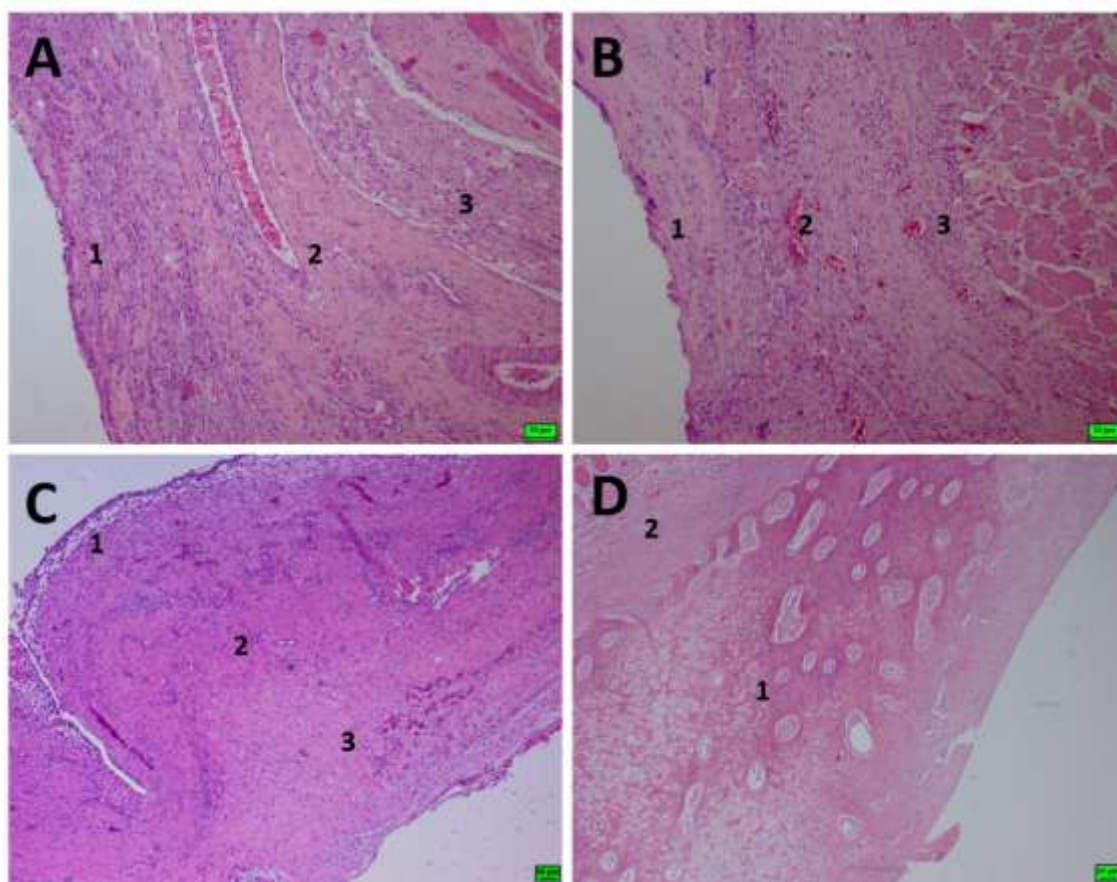


Figura 9. Aspecto microscópico da membrana induzida de Masquelet em galinhas aos sete (a), 15 dias (b), 21 dias (c) e 30 dias (d) de pós-operatório. Três zonas distintas foram observadas especialmente nos dias 7 e 15 (zona 1 – camada celular, zona 2 - fibras colágenas, zona 3 – tecido conjuntivo desorganizado). No 21º dia nota-se perda da evidenciação das diferentes zonas, as quais no 30º dia constitui-se de tecido conjuntivo (2) e osso (1) (HE – Hematoxilina-eosina).

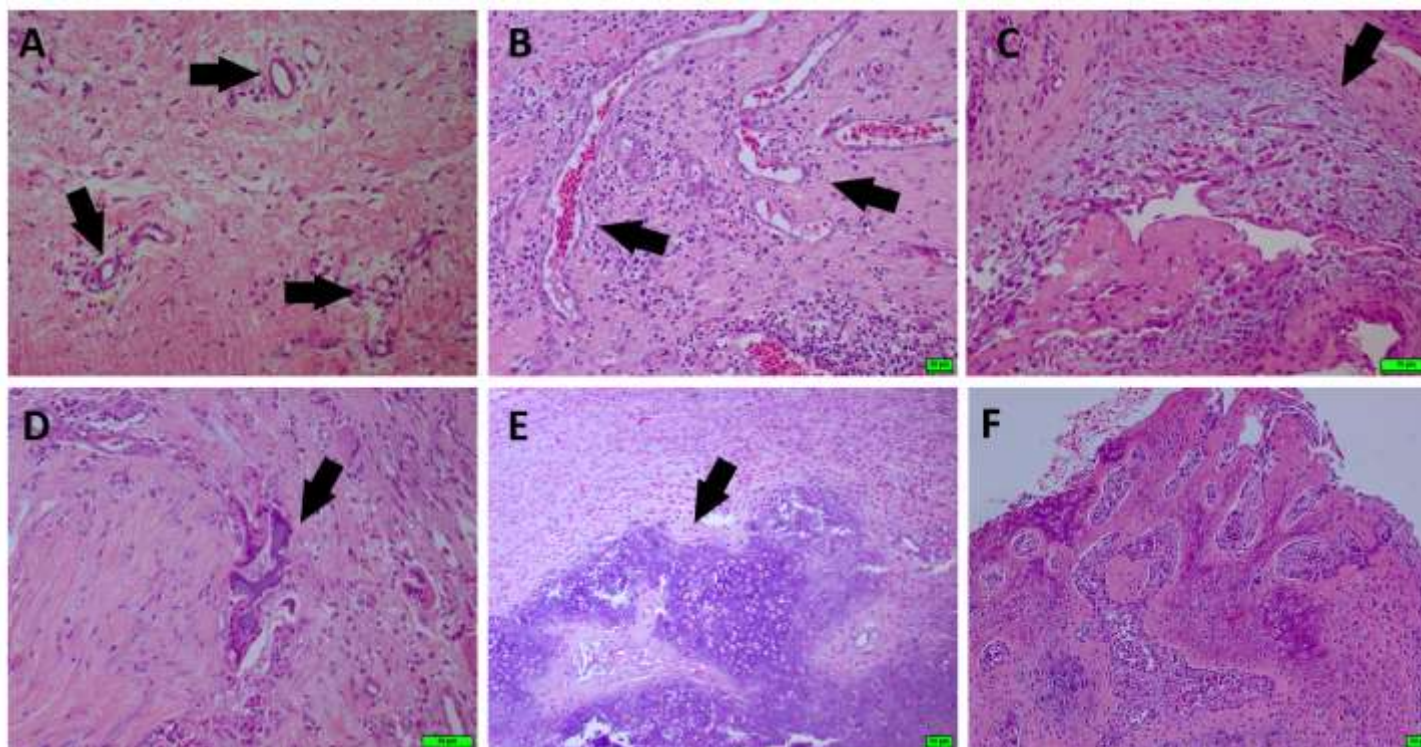


Figura 10. Aspecto microscópico da membrana induzida de Masquelet em galinhas. Observar a angiogênese aos 15 dias de pós-operatório (a) com presença de pequenos vasos (setas) e aos 30 dias após a cirurgia (b) com vasos calibrosos (setas). Aos 21 dias de pós-operatório verifica-se a formação de matriz de cartilagem (c), matriz óssea (d), cartilagem madura (e) e a formação óssea mineralizada (f).

Pela análise estatística da angiogênese das extremidades das membranas de Masquelet foram detectadas diferenças entre 15 e 30 dias de pós-operatório ($P=0,0397$), e entre 21 e 30 dias de pós-operatório ($P=0,0238$) (Figura 11). Contudo, nestas áreas não foram detectadas diferenças no escore de inflamação (Figura 12). Por sua vez, na análise da porção central das membranas foi verificada diferença da angiogênese entre os dias 15 e 21 de pós-operatório ($P=0,0238$) (Figura 13). Não ocorreram diferenças entre os escores de inflamação (Figura 14).

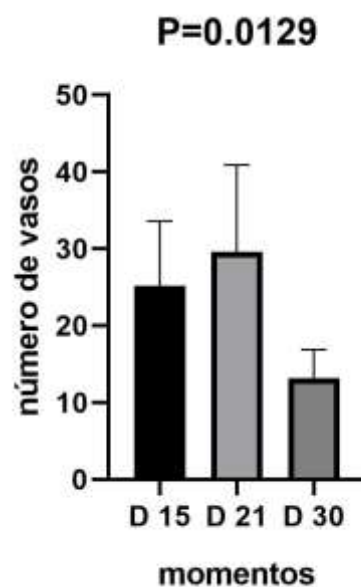


Figura 11. Representação gráfica da intensidade da angiogênese nas análises histológicas das extremidades das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.

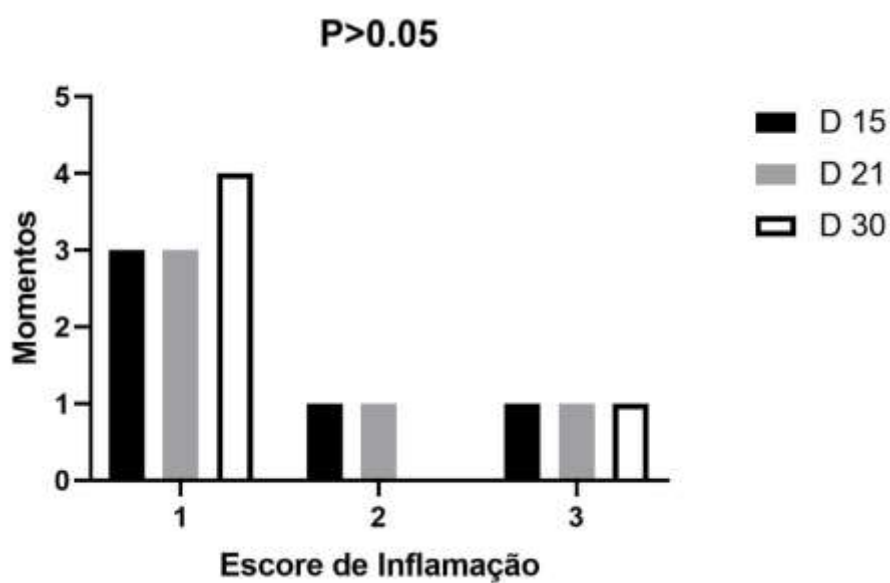


Figura 12. Representação gráfica do escore de inflamação nas análises histológicas das extremidades das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.

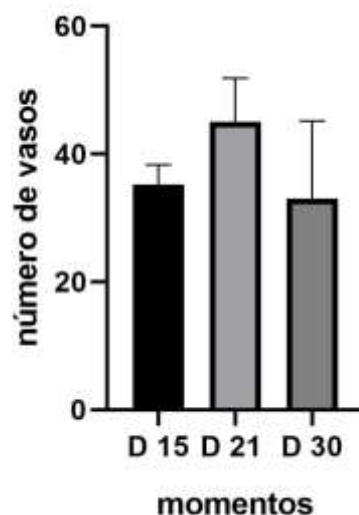


Figura 13. Representação gráfica da intensidade da angiogênese nas análises histológicas na porção central das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.

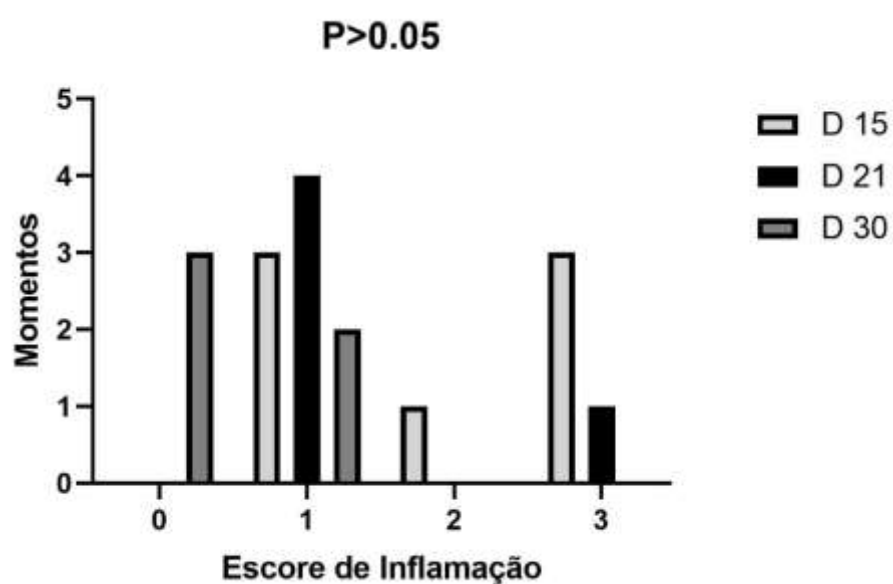


Figura 14. Representação gráfica do escore de inflamação nas análises histológicas na porção central das membranas de Masquelet aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.

6 *DISCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

O cimento empregado no atual estudo tinha o óxido de zircônio como agente radiopaco, o que permitiu uma melhor avaliação radiográfica do preenchimento da falha segmentar. Contudo, foram visibilizadas variações de intensidade, sugerindo que a distribuição do agente radiopaco pode não ser uniforme. Em casos de infecção o espaçador de cimento pode ser aplicado com antibiótico (GIANNOUDIS et al., 2011). Este não foi empregado no presente estudo, já que não se tratava de área infectada. Entretanto, deve-se considerar que a qualidade do cimento e o tipo de antibiótico empregado tem efeito significativo na qualidade da membrana (NAU et al., 2016; HAN et al., 2017), o que necessitaria de outros estudos em galinhas.

Por se tratar de um sistema de dois ossos que deslizam entre si longitudinalmente (MACCOY, 1992; MARTIN e RITCHIE, 1999), optou-se por não estabilizar o rádio, já que a ulna é o principal osso de suporte em aves (MACCOY, 1992). Embora não tenha se detectado fratura decorrente da não estabilização, foi notado desalinhamento das extremidades ósseas na posição radiográfica caudo-cranial, sugerindo que em caso clínico este osso necessita de estabilização. Em pacientes humanos, o osso afetado geralmente é estabilizado por um método temporário no primeiro estágio da técnica de Masquelet (GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; HAN et al., 2017).

Pelo escore de vascularização obtido com auxílio da ferramenta Doppler, os maiores valores foram verificados aos 21 dias de pós-operatório, com 60% de escore 3 e 40% de escore 2, e aos 30 dias de pós-operatório, com 100% de escore 3. Como referido por outros estudos, a membrana induzida se torna altamente vascularizada e secreta uma combinação de importantes fatores de crescimento, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) e proteína morfogenética óssea

(BMP-2) (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; HAN et al., 2017). Pelo exame ultrassonográfico foi possível observar a presença da membrana induzida aos sete dias de pós-operatório, sendo que a maior média de espessura (0,078 cm) foi observada aos 30 dias de pós-operatório. Em ovinos, as membranas produzidas após a remoção do espaçador com seis semanas de implantação, apresentavam espessura de aproximadamente 1 mm (VIATEAU et al., 2006).

Tanto pelo exame radiográfico, como pela avaliação macroscópica, foi notada a presença de formação óssea partindo de ambas extremidades fraturadas aos 30 dias de pós-operatório. Isto está de acordo com a velocidade da consolidação das fraturas em aves, já que fraturas adequadamente alinhadas consolidam mais rapidamente do que em mamíferos, estando estável com três a quatro semanas (BENNETT e KUZMAN, 1992; FORBES, 1998).

Como verificado em outros estudos as membranas não aderiram ao espaçador (TAYLOR et al., 2012). Entretanto, pela avaliação macroscópica foi notado que a membrana se adentrava nas áreas de irregularidade do cimento, indicando que a aplicação do cimento de forma mais uniforme seria mais adequada. As características histológicas da membrana induzida não foram afetadas em estudo que comparou cimento ósseo de superfície lisa ou áspera (LIU et al., 2012).

Pela avaliação histológica foi possível observar uma evolução mais avançada da membrana comparada aos exames de imagem. Apenas uma ave foi usada para exame histológico aos sete dias, porque macroscopicamente a membrana mostrava-se muito fina para um segundo estágio do método de Masquelet. Contudo, tanto ao sete como aos 15 dias foi possível identificar três zonas distintas na membrana, uma celular mais próxima à resina, uma de fibras colágenas e outra mais externa de tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos. Achados similares foram descritos em modelo de defeito femoral em ratos (GOURON et al., 2014) e defeito tibial em ovelhas (CHRISTOU et al., 2014).

Aos 15 dias de pós-operatório havia histologicamente a presença de neovascularização, fibras colágenas organizadas e diminuição de células inflamatórias, sugerindo que a reconstrução óssea em casos clínicos de perda óssea em aves poderia ser conduzida já neste período. O tempo para a segunda intervenção tem sido citado em pacientes humanos entre quatro até oito semanas (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012; AHO et al., 2013). Em estudos experimentais com diversos animais o período tem variado, sendo ovelhas de quatro semanas (CHRISTOU et al., 2014), em coelhos de quatro semanas (PELISSIER et al., 2004; LIU et al., 2013) e em ratos de quatro a seis semanas (GOURON et al., 2014; HENRICH et al., 2016). Contudo, no período de 21 dias pós-operatório no presente estudo havia formação de metaplasia cartilaginosa e óssea e aos 30 dias de pós-operatório uma completa mineralização da membrana, compatível com a velocidade da consolidação óssea em aves, porém muito avançado para o segundo estágio da técnica da membrana de Maquelet. Tem sido referido que a capacidade da membrana para melhorar a osteogênese diminui com o tempo (AHO et al., 2013). Desta forma, a reconstrução óssea deve ser realizada em período que otimize o papel *in situ* dos fatores de crescimento e osteoindutivos (PELISSIER et al., 2004).

Vale ainda citar que em alguns modelos animais em que o defeito ósseo não foi preenchido com enxerto ósseo, após a remoção do espaçador, formação óssea adicional foi também notada na superfície mais interna da membrana (HAN et al., 2017). Além disso, em defeito crítico no fêmur de ratos, foi verificado que a membrana continha ilhas de calcificação na terceira semana pós-implantação, porém não pareciam ser contínuas dentro da membrana (GOURON et al., 2014).

Histologicamente, a angiogênese foi maior estatisticamente aos 21 dias, tanto para as extremidades como para a porção central da membrana. Embora os achados ultrassonográficos tenham também mostrado um aumento da vascularização aos 21 dias, a maior porcentagem de escore 3 ocorreu com 30 dias de pós-operatório.

Contudo, deve-se considerar que os vasos, especialmente na porção central da membrana mostravam-se mais calibrosos aos 30 dias de pós-operatório pela na análise histológica, o que pode ter influenciado no escore ultrassonográfico.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos foi possível concluir que entre os momentos avaliados, todos mostraram a formação da membrana induzida de Masquelet em galinhas, porém com 15 dias de pós-operatório se detectou a melhor qualidade da membrana, visando o segundo estágio cirúrgico para a reconstrução óssea.

8 BIBLIOGRAFIA

8 BIBLIOGRAFIA

AHO, O.M.; LEHENKARI, P.; RISTINIEMI, J.; LEHTONEN, S.; RISTELI, J.; LESKELÄ, H.V. The mechanism of action of induced membranes in bone repair, *J. Bone Jt. Surg. Am.*, v.95, n.7, p.597-604, 2013.

BENNERT, B.M.; KIRCHER, P.R.; GUTBROD, A.; RIECHERT, J.; HATT, J.M. Evaluation of two miniplate systems and figure-of-eight bandages for stabilization of experimentally induced ulnar and radial fractures in pigeons (*Columba livia*). *J. Avian Med. Surg.*, v.30, n.2, p.111-121, 2016.

BENNETT, R.; KUZMAN, A. Fracture management in birds. *J Zoo Wildl Med.*, v.23, n.1, p.5-38, 1992.

BUSH, M. Laparoscopy and surgery. In: FOWLER, M.E. *Zoo and wild animal medicine*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.254-261.

CAPPELLARI, F.; PIRAS, L.; PANICHI, E.; FERRETTI, A.; PEIRONE, B. Treatment of antebrachial and crural septic nonunion fractures in dogs using circular external skeletal fixation: a retrospective study. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, v.27, p.297–305, 2014.

CHRISTOU, C.; OLIVER, R.A.; YU, Y.; WALSH, W.R. The Masquelet technique for membrane induction and the healing of ovine critical sized segmental defects. *PLoS One*, v.9, n.12:e114122, p.1-19, 2014.

DARROW, B.G.; WEIGEL, J.P.; GREENACRE, C.B.; XIE, X.; LIAW, P.K.; BISKUP, J.J. *Ex vivo* biomechanical comparison of titanium locking plate, stainless steel nonlocking plate, and tie-in external fixator applied by a dorsal approach on osteotomized humeri of pigeons (*Columba livia*). *J. Avian Med. Surg.*, v.33, n.1, p.29-37, 2019.

DONELEY, B. Surgery. In: __. *Avian medicine and surgery in practice*. London: Manson Publishing Ltda., 2010. p.255-284.

FORBES, N.A. Avian orthopedics. *Vet. Quarterly*, v.20, p. S69-S70, 1998.

GOURON, R.; PETIT, L.; BOUDOT, C.; SIX, I.; BRAZIER, M.; KAMEL, S.; MENTAVERRI, R. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.11, n.2, p.382-389, 2017.

GIANNOUDIS, P.V.; FAOUR, O.; GOFF, T.; KANAKARIS, N.; DIMITRIOU, R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: Tips-tricks and future directions. *Injury*, v.42, n.6, p.591-598, 2011.

HAN, W.; SHEN, J.; WU, H.; YU, S.; FU, J.; XIE, Z. Induced membrane technique: advances in the management of bone defects. *Int. J. Surg.*, v.42, p.110-116, 2017.

HARCOURT-BROWN, N.H. Orthopedic conditions that affect the avian pelvic limb. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, v.5, n.1, p.49-81, 2002.

HELMER, P.; REDIG, P.T. Surgical resolution of orthopedic disorders. In: HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, T.L. *Clinical avian medicine*. v.2, Palm Beach: Spix Publishing Inc. Publishing, 2006. p.761-774.

HENRICH, D.; SEEBACH, C.; NAU, C.; BASAN, S.; RELJA, B.; WILHELM, K.; SCHAIBLE, A.; FRANK, J.; BARKER, J.; MARZI, I. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.10, n.10, p.E382-E396, 2016.

JOHNSTON, M.S.; THODE, H.O.; EHRHART, N.P. Bone transport osteogenesis for reconstruction of a bone defect in the tibiotarsus of a yellow-naped Amazon parrot (*Amazona ochrocephala auropalliata*). *J. Avian Med. Surg.*, v.22, n.1, p.47–56, 2008.

KARGER, C.; KISHI, T.; SCHNEIDER, L.; FITOUSSI, F.; MASQUELET, A.C. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, v.98, n.1, p.97-102, 2012.

KOCK, M.D. The use of modified Kirschner-Ehmer apparatus in avian fracture repair. *J. Small Anim. Pract.*, v.24, p.383-390, 1983.

LIU, H.X.; XU, H.Z.; ZHANG, Y.; HU, G.; SHEN, Y.; CHENG, X.J.; PENG, L. Effects of surface roughness of bone cements on histological characteristics of induced membranes. *Zhongguo Gu Shang*, v.25, n.8, p.662-666, 2012.

LIU, H.; HU, G.; SHANG, P.; SHEN, Y.; NIE, P.; PENG, L.; XU, H. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, v.99, n.8, p.959-964, 2013.

MACCOY, D.M. Treatment of fractures in avian species. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.22, n.1, p.225-238, 1992.

MARTIN, H.; RITCHIE, B.W. Orthopedic surgical techniques. In: RITCHIE B.W., HARRISON G.J.; HARRISON L.R. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth: Wingers Publishing, 1999. p.1137-1169.

MASQUELET, A.C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop. Clin. North Am.*, v.41, n.1, p.27-37, 2010.

MIZUTA, H.; NAKAMURA, E.; MIZUMOTO, Y.; KUDO, S.; TAKAGI, K. Effect of distraction frequency on bone formation during bone lengthening. A study in chickens. *Acta Orthop. Scand.*, v.74, n.6, p.709–713, 2003.

McFADDEN, M.S. Musculoskeletal System. In: MITCHELL, M.A.; TULLY, T.N. *Current therapy in exotic pet practice*. St. Louis: Elsevier, 2016. p.352-391.

NAU, C.; SEEBACH, C.; TRUMM, A.; SCHAIBLE, A.; KONTRADOWITZ, K.; MEIER, S.; BUECHNER, H.; MARZI, I.; HENRICH, D. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*, v.47, n.2, p.325-334, 2016.

NUNAMAKER, D.M. Experimental models of fracture repair. *Clin. Orthop. Related Res.*, n.355, p.S56-S65, 1998.

OROSZ, S.E.; ENSLEY, P.K.; HAYNES, C.J. *Avian surgical anatomy thoracic and pelvic limbs*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. 139p.

PELISSIER, P.; MASQUELET, A.C.; BAREILLE, R.; PELISSIER, S.M.; AMEDEE, J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J. Orthop. Res.*, v.22, n.1, p.73-79, 2004.

PONDER, J.B.; REDIG, P. Orthopedics. In: SPEER, B.L. *Current therapy in avian medicine and surgery*. St. Louis: Elsevier, 2016. p.657-667.

RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; VULCANO, L.C.; BÜTTNER, R.C. Acute shortening and subsequent lengthening of the radius and ulna for the treatment of an infected nonunion in a dog. *Can. Vet. J.*, v.42, p.724-726, 2001.

RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; VULCANO, L.C.; CIANI, R.B.; MANNARINO, R. Large segmental radius and ulna defect treated by bone transportation with the Ilizarov technique. *Aust. Vet. J.*, v.81, n.11, p.677-680, 2003.

RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; HETTE, K.; VULCANO, L.C.; BÜTTNER, R.C. Use of circular external fixator in the treatment of fracture complications of radius and ulna in small breed dogs. *Ciênc. Rural*, v35, n.5, p.1116-1122, 2005.

REDIG, P.T. Evaluation and nonsurgical management of fractures. In: HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Clinical avian medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.380-395.

SANAEI, R.; ABU, J.; NAZARI, M.; ZUKI, M.A.; ALLAUDIN, Z.N. Evaluation of osteogenic potentials of avian demineralized bone matrix in the healing of osseous defects in pigeons. *Vet. Surg.*, v.44, n.5, p.603-612, 2015.

TAYLOR, B.C.; FRENCH, B.G.; FOWLER, T.T.; RUSSELL, J.; POKA, A. Induced membrane technique for reconstruction to manage bone loss. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, v.20, n.3, p.142-150, 2012.

TULLY, T.N. Basic avian bone growth and healing. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, v.5, n.1, p.23-30, 2002.

TUNIO, A.; JALILA, A.; GOH, Y.M.; SHAMEHA-INTAN; SHANTHI, G. Histologic evaluation of critical size defect healing with natural and synthetic bone grafts in the pigeon (*Columba livia*) ulna. *J. Avian Med. Surg.*, v.29, n.2, p.106-113, 2015.

VIATEAU, V.; GUILLEMIN, G.; CALANDO, Y.; LOGEART, D.; OUDINA, K.; SEDEL, L.; HANNOUCHE, D.; BOUSSON, V.; PETITE, H. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet. Surg.*, v. 35, n.5, p.445-452, 2006.

WANDER, K.W.; SCHWARZ, P.D.; JAMES, S.P.; POWERS, B.E.; TAYLOR, B.; WIMSATT, J.H. Fracture healing after stabilization with intramedullary xenograft cortical bone pins: a study in pigeons. *Vet. Surg.*, v.29, n.3, p.237-244, 2000.

WILLIAMS, R.J.; HOLLAND, M.; MILTON, J.L.; HOOVER, J.P. A comparative study of treatment methods for long bone fractures. *Comp. An. Pract.*, v.1, n.4, p.48-55, 1987.

WILLIAMS, J. Orthopedic radiography in exotic animal practice. *Vet. Clin. North Am., Exotic An. Pract.*, v.5, n.1, p.1-22, 2002.

TRABALHO CIENTÍFICO 1

Revista a ser enviada: Veterinária e Zootecnia
(<https://rvz.emnuvens.com.br/rvz>)

CONSIDERAÇÕES SOBRE FRATURAS EM AVES

RESUMO

A presente revisão teve por objetivos descrever aspectos das fraturas em aves, alguns métodos de imobilização e as complicações das fraturas. Embora os princípios de reparo da fratura em aves seja similar aos de pequenos animais, existem diferenças que precisam ser consideradas no momento da aplicação do método de imobilização. As fraturas em aves podem ser imobilizadas por meio da coaptação externa (talas e bandagens), fixação interna (pinos, fios de cerclagem, placas ósseas) e fixação externa, entre outros, cada qual com suas vantagens e desvantagens. A severidade da fratura interfere na taxa e curso da consolidação; contudo, a estabilidade clínica pode preceder a evidência radiográfica, que é visibilizada entre 3 e 6 semanas. As fraturas em aves tendem a ser expostas e cominutivas, em virtude da insuficiente cobertura de tecidos moles. Quando expostas, as fraturas apresentam alto risco de osteomielite e, conseqüentemente, podem desenvolver união atrasada ou não-união.

Palavras-chave: tratamento, consolidação, osso, imobilização, complicação.

CONSIDERATIONS ON AVIAN FRACTURES

ABSTRACT

This review aimed to describe aspects of bird fractures, some immobilization techniques and the complications of fractures. Although the principles of fracture repair in birds are similar to those of small animals, there are differences that should be considered during the application of the immobilization method. Fractures in birds can be immobilized by external coaptation (splints and bandages), internal fixation (pins, cerclage wires, bone plates) and external fixation, among others, each one with its own advantages and disadvantages. The severity of the fracture interferes in the rate and course of bone healing; however, clinical stability may precede radiographic evidence, which is visible in 3-6 weeks. Avian fractures tend to be open and comminuted, because of the scarce cover of soft tissues. Open fractures have high risk of developing osteomyelitis and, consequently, may develop delayed union or non-union.

Keywords: treatment, healing, bone, immobilization, complication.

CONSIDERACIONES SOBRE FRACTURAS EN AVES

RESUMEN

La presente revisión tuvo por objetivos describir aspectos relacionados a las fracturas en aves, algunos métodos de inmovilización y las complicaciones de las fracturas. Aunque los principios de reparación de las fracturas en las aves son similares a los de los pequeños animales, existen diferencias que deben considerarse en el momento de la aplicación del método de inmovilización. Las fracturas en aves pueden ser inmovilizadas por medio de la coaptación externa (tallos y vendajes), fijación interna (Clavos, hilos de cerclaje, placas óseas) y fijación externa, entre otros, cada uno con sus ventajas y desventajas. La severidad de la fractura interfiere en la tasa y el curso de la consolidación; sin embargo, la estabilidad clínica puede preceder a la evidencia radiográfica, que es visibilizada entre tercera y sexta semana. Las fracturas en aves tienden a ser expuestas y conminutas, debido a la insuficiente cobertura de tejidos blandos.

Cuando están expuestas, las fracturas presentan un alto riesgo de osteomielitis y, consecuentemente, pueden desarrollar unión atrasada o no-unión.

Palabras clave: tratamiento, consolidación, hueso, inmovilización, complicación.

INTRODUÇÃO

Se a ave é apresentada com uma fratura, certamente se deve a um trauma maior, o que requer um completo exame físico para identificar outras possíveis injúrias (1). Além disso, em aves de vida livre, é preciso considerar a possibilidade de doenças intercorrentes como fator contribuinte da lesão (2). Neste sentido, a fixação definitiva de uma fratura é raramente uma emergência, sendo como primeira prioridade a estabilização do paciente (3). Importante ainda considerar que a maiorias das aves estarão sob severo estresse após a fratura, tanto pelo trauma, como pelo estresse adicional da contenção e manuseio (4).

Embora os princípios de reparo da fratura em aves seja similar aos de pequenos animais, existem diferenças que precisam ser consideradas, tais como: corticais finas e frágeis, que não seguram adequadamente os implantes; menor cobertura óssea pelos tecidos moles; há pouco enxerto esponjoso para ser coletado; largo canal medular, que dificulta o preenchimento sem acrescentar excessivo peso no osso afetado; a carga precisa ser rapidamente restaurada nas pernas já que a locomoção é bipedal (3,4). Além disso, há presença de ossos pneumáticos, tais como o úmero e fêmur de algumas aves, que dificultam o uso de implantes intramedulares (5-7).

Sendo assim, a presente revisão teve por objetivos descrever aspectos das fraturas em aves, alguns métodos de imobilização e as complicações das fraturas.

DESENVOLVIMENTO DO ASSUNTO

Aspectos das fraturas em aves

Um fato também a ser considerado é que a consolidação de fraturas em aves difere de mamíferos (8). O perióstio e o endóstio contêm poucas células e falta uma significativa atividade biológica (9). Uma vez que as aves apresentam células nucleadas, a participação e diferenciação das células sanguíneas no processo de consolidação parece alterar o processo biológico (8).

Ademais, embora as aves possuam osso cortical e esponjoso, o osso cortical é organizado em padrões misto de sistema lamelar e haversiano incompleto, sendo que este último varia consideravelmente entre as espécies (9). Por sua vez, o calo endosteal é um componente importante na consolidação de fraturas em aves, desde que proporciona um suporte rápido e rígido em osso bem alinhado, ao passo que o calo periosteal proporciona um suporte secundário (4,9).

Algumas vezes o grau e o tipo de dano ao tecido mole podem ser mais críticos em determinar o retorno pós-cirúrgico à função do que a injúria óssea específica (1). Adesões entre os tecidos danificados podem limitar a função muscular e o movimento articular (10). O tênue suprimento sanguíneo das fraturas distais ao carpo e tarso aumenta o potencial para complicações, aliado ao pouco suporte de tecido mole, composto apenas por tendão e pele (4).

A severidade da fratura interfere na taxa e curso da consolidação; contudo, a estabilidade clínica (2-3 semanas) pode preceder a evidência radiográfica (3 a 6 semanas), sugerindo que o implante pode ser removido antes da consolidação estar visível radiograficamente (4,11). Fraturas adequadamente alinhadas consolidam mais rapidamente do que em mamíferos, estando estável com 3 a 4 semanas (12).

Vale ainda citar que o tempo necessário para a consolidação de uma fratura aviária depende da quantidade de deslocamento, a integridade do suprimento sanguíneo, a presença de infecção e o grau de mobilidade da fratura (4). Se a fratura estiver corretamente alinhada e as extremidades em posição a consolidação óssea ocorre com calo endosteal, porém se ossos não estiverem alinhados ou houver movimento no foco de fratura ocorrerá formação de calo periosteal (11,12). O suprimento sanguíneo para o osso se deve aos vasos sanguíneos do perióstio, medular e os da metáfise e epífise (11). A maioria do calo durante a consolidação é derivado da superfície periosteal, sendo o suprimento de sanguíneo para o perióstio muito importante (3,11). Por sua vez, a circulação intramedular parece ser de menor importância na consolidação óssea aviária do que nos mamíferos (3).

O reparo de uma fratura da asa, em especial perto da articulação, precisa ser manipulado de forma a evitar a anquilose e proteger o tecido mole, para assim assegurar o retorno a capacidade de voar, em especial em aves de vida livre (1). Estas precisam de total restauração da função musculoesquelética antes de retornar ao habitat (13).

Por outro lado, aves que são mantidas em cativeiro são capazes de tolerar a perda funcional da asa (1), porém a meta é o retorno a uma vida confortável e livre de dor (13).

Em muitas aves porções do canal medular do úmero são conectados aos sacos aéreos, que são importantes para reduzir o peso do osso e contribuir para o ciclo respiratório durante o voo (1).

O rádio e ulna em geral deslizam entre si longitudinalmente, de forma que se ocorrer uma fusão entre eles o pássaro será incapaz de supinar ou pronar o carpo, impossibilitando a adequada capacidade de voo (1,10). A ulna é o principal osso de suporte do conjunto, de forma que fraturas ulnares podem contribuir para fratura de estresse do rádio, a menos que suporte adicional seja efetuado (10).

Os membros pélvicos em aves podem ser usados, de acordo com a espécie, para empoleirar, escalar, capturar e manipular itens de comida, sendo assim muito importantes em termos funcionais (9). Injúrias da perna que alteram o suporte de peso em um ou ambos os pés podem predispor ao desenvolvimento do “bumblefoot” ou artrite (1). Adicionalmente, a fratura de um membro pélvico favorece a distribuição de peso para o membro contralateral e, se não resolvida rapidamente, pode acarretar complicações no membro saudável (9). Uma diminuição de 20 a 30% da função pode ser aceitável, desde que a disfunção não afete dramaticamente a flexão ou extensão do pé ou a preensão de comida (1).

Nos membros pélvicos, a fratura do tibiotarso é considerada uma das mais comuns e sempre requerem estabilização (4). Por sua vez, as fraturas do tarso-metatarso são geralmente expostas (14) e também requerem adequada estabilização (4).

Métodos de imobilização das fraturas

As fraturas em aves podem ser imobilizadas por meio da coaptação externa (talas e bandagens), fixação interna (pinos, fios de cerclagem, placas ósseas) e fixação externa, cada qual com suas vantagens e desvantagens (1,2,10,13). Na escolha do método de fixação vários fatores precisam ser considerados, incluindo o tipo e a gravidade da injúria; o comportamento, nível de atividade esperada e necessidades da espécie aviária (1). O retorno a função das extremidades, particularmente das pernas e asas, é uma consideração importante ao se determinar o método de fixação a ser usado (15).

Além disso, fatores externos como o consentimento do proprietário e considerações financeiras precisam ser avaliados (13). O ideal é que a fratura esteja suportada rigidamente, mas que as articulações possam ser movidas livremente (2). Embora a coaptação externa seja menos dispendiosa, o retorno à função é tipicamente prolongado e pode não ser tão completo quanto à fixação interna (3). São consideradas vantagens da técnica a menor chance de infecção, o menor dano a vascularização regional e o fato de ser uma possibilidade de tratamento em aves pequenas demais para realização de procedimentos cirúrgico (11). A localização da fratura é crítica ao se escolher este tipo de imobilização, sendo mais adequada para fraturas do eixo médio, porque fornecem superfície de suporte para as ataduras e algum benefício pode ser obtido a partir do alinhamento dos músculos e penas (10).

Os pinos intramedulares são relativamente pouco dispendiosos, proporcionam alinhamento axial, resistem ao dobramento e requerem pouca exposição (4). Os pinos confeccionados de titânio comparado aos de aço inoxidável têm por vantagem a memória e retorno a posição normal após certo grau de dobramento (3). Uma das formas de evitar a rotação e forças de cisalhamento é a inclusão da coaptação externa juntamente com o pino intramedular (13), porém o mais apropriado é o emprego de fixador externo e fios de cerclagem (4). Pinos excessivamente grandes devem ser evitados, porque interferem com o suprimento sanguíneo endosteal, o que pode favorecer a necrose avascular ou fraturas iatrogênicas (11).

Um estudo avaliou a efetividade de xenoenxerto de pino de osso cortical, proveniente de avestruz ou cão, em relação ao fio de Kirschner no reparo de fratura do úmero induzida em pombos, não tendo sido observada diferenças estatísticas nos testes biomecânicos, porém os pinos de xenoenxerto promoveram maior calo periosteal e inflamação no local da fratura (16).

Hastes de polímero intramedular são uma outra opção que pode ser aplicada sozinha, com fixador esquelético externo ou com polimetilmetacrilato, porém são menos rígidas do que o aço (4).

A fixação esquelética externa com fixadores simples tem sido usada em aves por promover a formação de calo endosteal e minimizar a formação de calo periosteal, já que este último pode afetar as atividades dos músculos e tendões e enfraquecer o voo (5,18).

Há uma variedade de sistemas, com diferenças em conectores e barras, sendo que estas últimas podem ser de fibra de carbono, alumínio, titânio, polimetilmetacrilato e resina de epóxi, entre outros (4,9,13). As montagens tipo I e tipo II são geralmente as usadas em aves, embora o tipo III possa ser requerida em aves de maior porte (10,11,13).

Em estudo que comparou o confinamento em gaiola, a coaptação externa, e o fixador externo simples em ossos longos de pombos, foi observado que o fixador permitiu ótima consolidação e bom alinhamento anatômico comparado aos demais, além do uso precoce do membro e manutenção da mobilidade articular (17). O uso de resina de acrílico como substituto da barra do fixador mostrou-se efetivo em 12 membros fraturados de 11 pássaros, tendo como principal complicação a fratura óssea ao redor do pino, que foi atribuída a incorreta manipulação (18).

Por sua vez, o uso de fixadores híbridos, ou fixadores “tie-in”, em que o pino intramedular é unido ao fixador externo, tem por vantagens a diminuição na migração do pino intramedular, a leveza e o fato de permitir a dinamização, entre outras (3,13). A técnica permite a manutenção do alinhamento do osso e previne a rotação (2), podendo ser empregado no reparo de fraturas diafisais e periarticulares de todos os ossos longos das aves, com exceção do tarsometatarso (11).

Na aplicação de placas e parafuso é importante tomar muito cuidado, em virtude das corticais finas e delicadas das aves, que proporcionam pobre capacidade de retenção dos parafusos (4,11). As placas podem ser usadas sozinhas ou com polimetilmetacrilato intramedular (4).

Bennert et al. (19) avaliaram a consolidação da fratura de rádio e ulna induzida em 27 pombos, que foram imobilizadas por dois tipos de miniplacas de aço aplicadas apenas na ulna. Quatro grupos foram compostos: placa adaptada de 1,3 mm com ou sem bandagem de figura em oito, placa de compressão de 1 mm com ou sem bandagem de figura em oito. Os exames radiográficos foram conduzidos com 3, 14 e 28 dias após a cirurgia. Em todas as aves as fraturas consolidaram sem dobramento ou distorção das placas, não correndo diferenças entre tratamentos. Um total de 85,2% dos pombos apresentou habilidade de voo boa ou muito boa. De acordo com os resultados, ambos sistemas podem ser recomendados para pássaros pesando menos de 500 g e a aplicação da bandagem de figura em oito foi considerada benéfica por até 10 dias de pós-operatório, visto reduzir o risco de infecção pós-operatória.

Se a placa for removida, isto precisa ser efetuado antes de 28 dias após a cirurgia, já que no dia 28 de pós-operatório em 15 pássaros esta foi apenas parcialmente visível e em três estava completamente coberta por calo ósseo.

Se possível, a placa deve ser removida, especialmente em casos de sensibilidade ao frio, o que pode resultar em dor e automutilação (4). Darrow et al. (20) realizaram estudo biomecânico para comparar a força de dobramento de uma placa bloqueada, placa não bloqueada e fixador “tie-in” em modelo de fratura do úmero (ostectomia transversa de 1 mm), realizado em pombos. As construções foram testadas ciclicamente por teste não destrutivo por 1000 ciclos. A configuração do fixador “tie-in” foi mais rígida e mais forte que as placas fixadas na posição dorsal, mas tinha menor energia de tensão. Segundo os autores, a importância na consolidação da fratura ainda precisa ser esclarecida.

Complicações

A má-união ou não-união se devem a instabilidade no local da fratura, seja pela aplicação de método de fixação externa ou interna (2,3). Também o dano maciço ao tecido mole e a isquemia associada são fatores que favorecem a estas complicações da fratura (10).

O manejo da não-união da fratura inclui adequada imobilização da fratura, preferivelmente com algum grau de compressão, que pode ser realizada com um aparato adicional, coaptação adicional, ou diminuição do nível da atividade da ave (2,3). Em casos iniciais de má-união em que há um calo ativo, este pode ser removido e usado como um enxerto (2). Em casos de mais longa permanência, o enxerto ósseo pode ser coletado da carina do esterno (3).

Segundo Bennett e Kuzman (4), o auto-enxerto mais comumente usado em aves é o córtico-esponjoso, colhido da carina. Os ossos longos maiores (fêmur e tíbia) são pneumáticos e não possuem significativa quantidade de enxerto esponjoso, e o osso mais distais são estreitos e não são uma boa fonte de enxerto esponjoso. Contudo, em aves maiores e terrestres o tibiotarso proximal pode proporcionar adequada quantidade de enxerto esponjoso.

As fraturas em aves tendem a ser expostas e cominutivas, em virtude da insuficiente cobertura de tecidos moles (3,4,11).

Quando expostas, as fraturas apresentam alto risco de osteomielite e, consequentemente, união atrasada ou não-união da fratura (13,17). Por sua vez, as fraturas cominutivas são mais prováveis de se tornarem infectadas, resultando em osteomielite secundária (1).

Os casos de osteomielite pós-operatória podem ser manejados com debridamento cirúrgico e terapia antibiótica baseada na cultura e sensibilidade (3). Se possível, o osso afetado deve ser removido no momento da cirurgia; porém, se a infecção atingiu a cavidade medular é difícil prever se ocorrerá a formação de material purulento, que ocorre como massa caseosa (2). Isso ocorre porque os heterófilos não possuem proteinase para liquefazer o tecido necrótico, sendo a osteomielite caracterizada por lesões caseosas, secas e sem drenagem (1). A implantação de pérolas de polimetilmetacrilato pode ser benéfica, desde altas concentrações de antibiótico são alcançadas na área circundante (3). Importante citar que a osteomielite granulomatosa serve como um foco de infecção, que pode promover septicemia no caso de o pássaro tornar-se imunossuprimido (1).

CONCLUSÃO

A despeito da variedade dos métodos de imobilização de fraturas, a escolha deve levar em consideração o retorno a função das extremidades, particularmente das pernas e asas. Complicações como má-união ou não-união podem ser evitadas ao se evitar a instabilidade no local da fratura.

REFERÊNCIAS

1. Martin H, Ritchie BW. Orthopedic surgical techniques. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. Avian medicine: principles and application. Lake Worth: Wingers Publishing, 1999. p.1137-1169.
2. Harcourt-Brown NH. Orthopedic conditions that affect the avian pelvic limb. Vet. Clin North Am Exot Anim Pract. 2002;5:49-81.
3. Helmer P, Redig PT. Surgical resolution of orthopedic disorders. In: Harrison GJ, Lightfoot TL. Clinical avian medicine. Palm Beach: Spix Publishing Inc. Publishing, 2006. p.761-774.

4. Bennett R, Kuzman A. Fracture management in birds. *J Zoo Wildl Med.* 1992;23:5-38.
5. Bush M. Laparoscopy and surgery. In: Fowler ME. *Zoo and wild animal medicine*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.254-261.
6. Orosz SE, Ensley PK, Haynes CJ. *Avian surgical anatomy thoracic and pelvic limbs*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992.
7. Williams J. Orthopedic radiography in exotic animal practice. *Vet Clin North Am, Exotic An Pract.* 2002;5:1-22.
8. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Related Res.* 1998;355:S56-S65.
9. McFadden MS. Musculoskeletal System. In: Mitchell MA, Tully TN. *Current therapy in exotic pet practice*. St. Louis: Elsevier, 2016. p.352-391.
10. Maccoy DM. Treatment of fractures in avian species. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992;22:225-238.
11. Doneley B. Surgery. In: __. *Avian medicine and surgery in practice*. London: Manson Publishing Ltda., 2010. p.255-284.
12. Forbes NA. Avian orthopedics. *Vet Quarterly.* 1998;20: S69-S70.
13. Ponder JB, Redig P. Orthopedics. In: Speer BL. *Current therapy in avian medicine and surgery*. St. Louis: Elsevier, 2016. p.657-667.
14. Redig PT. Evaluation and nonsurgical management of fractures. In: Harrison GJ, Harrison LR. *Clinical avian medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.380-395.
15. Tully TN. Basic avian bone growth and healing. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2002;5:23-30.
16. Wander KW, Schwarz PD, James SP, Powers BE, Taylor B, Wimsatt JH. Fracture healing after stabilization with intramedullary xenograft cortical bone pins: a study in pigeons. *Vet Surg.* 2000;29:237-244.
17. Williams RJ, Holland M, Milton JL, Hoover JP. A comparative study of treatment methods for long bone fractures. *Comp An Pract.* 1987;1:48-55.
18. Kock MD. The use of modified Kirschner-Ehmer apparatus in avian fracture repair. *J Small Anim Pract.* 1983;24:383-390.

19. Bennert BM, Kircher PR, Gutbrod A, Riechert J, Hatt JM. Evaluation of two miniplate systems and figure-of-eight bandages for stabilization of experimentally induced ulnar and radial fractures in pigeons (*Columba livia*). *J. Avian Med. Surg.* 2016;30:111-121.
20. Darrow BG, Weigel JP, Greenacre CB, Xie X, Liaw PK, Biskup JJ. Ex vivo biomechanical comparison of titanium locking plate, stainless steel nonlocking plate, and tie-in external fixator applied by a dorsal approach on osteotomized humeri of pigeons (*Columba livia*). *J Avian Med Surg.* 2019;33:29-37.

TRABALHO CIENTÍFICO 2

Revista a ser enviada: Research in Veterinary Science
<https://www.journals.elsevier.com/research-in-veterinary-science>

Características da membrana induzida pela técnica de Masquelet em defeito ósseo do rádio em galinhas

Introdução

As lesões traumáticas constituem uma grande parcela dos procedimentos cirúrgicos em aves e incluem desde lacerações até fraturas severas (BUSCH, 1986; PONDER e REDIG, 2016). Diversos fatores precisam ser considerados antes do reparo da fratura, tais como estilo de vida e o tipo de função esperado para a ave, ou seja, retorno a natureza ou em cativeiro (FORBES, 1998; McFADDEN, 2016; PONDER e REDIG, 2016).

Entre os principais fatores que podem atrasar ou impedir a consolidação da fratura são instabilidade, infecção e presença de implantes metálicos dentro ou arredor do foco fraturado (BUSCH, 1986; WILLIAMS, 2002; PONDER e REDIG, 2016). Todos os tipos de não-união ocorrem em aves (BENNETT e KUZMAN, 1992). Desta forma, o método de imobilização escolhido pode contribuir para a minimização desses fatores (BUSCH, 1986; OROSZ et al., 1992; PONDER e REDIG, 2016).

A reconstrução de defeitos ósseos da diáfise óssea é um desafio, tanto em pequenos animais como em aves, sendo o objetivo regenerar não apenas a perda óssea, mas também a restauração da função do membro (RAHAL et al., 2001; RAHAL et al., 2003; CAPPELLARI et al., 2014; JOHNSTON et al., 2008; SANAEI et al., 2015; TUNIO et al., 2015). Existem várias opções de tratamento, cada uma com desafios inerentes da técnica e do tipo de afecção óssea, e com muitas controvérsias sobre o melhor método de reconstrução óssea.

As técnicas de transporte ósseo ou de encurtamento agudo e subsequente alongamento, baseada no método de Ilizarov, têm sido empregadas em perdas ósseas de pequenos animais, mais comumente decorrentes de processos traumáticos e/ou infecciosos, com relativo sucesso (RAHAL et al., 2001; RAHAL et al., 2003; RAHAL et al., 2005; CAPPELLARI et al., 2014).

Em aves há um relato do emprego do transporte ósseo, com uso de fixador circular, que foi empregado no tratamento de uma complicação de fratura em um papagaio (JOHNSTON et al., 2008).

Uma outra opção para a perda segmentar é o emprego da técnica da membrana induzida de Masquelet, que tem sido aplicada particularmente em pacientes humanos (MASQUELET e BEGUE, 2010; KARGER et al., 2012; AHO et al., 2013; TAYLOR et al., 2012). Esta consiste na reconstrução óssea em dois estágios (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012). No primeiro realiza-se o debridamento dos tecidos ósseo e mole desvitalizados, implantação de um espaçador de cimento ósseo e estabilização do membro (GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; HAN et al., 2017). O cimento é mantido por aproximadamente 4-8 semanas para que o ocorra a formação de uma membrana. No segundo estágio, a membrana é incisada para remoção do espaçador de cimento, sendo o defeito preenchido com enxerto e/ou biomateriais (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012).

Embora ainda não testado, a membrana induzida de Masquelet poderia ser uma opção mais adequada para aves, comparada aos outros métodos de reconstrução por histogênese de distração. Contudo, para o uso clínico seria necessário determinar o tempo de formação da membrana induzida nesta espécie, levando em consideração as diferenças em relação aos mamíferos, com por exemplo, a maior rapidez de consolidação das fraturas (FORBES, 1998).

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar temporalmente, por meio de estudos radiológico, ultrassonográficos e histológicos, a formação e a qualidade da membrana induzida de Masquelet, tendo por modelo uma falha óssea segmentar induzida no rádio de galinhas. A hipótese foi que a formação da membrana de Masquelet ocorre em período mais curto do que o estabelecido em humanos e coelhos.

Material e Métodos

A metodologia adotada no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp) – Botucatu (nº. 0225/2018 - CEUA - anexo I). Foram utilizadas 15 galinhas de postura (*Gallus gallus domesticus*), clinicamente saudáveis, com 1 ano de idade, doadas por granja da fazenda universitária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp Botucatu, com peso variando entre 1,2 e 1,6 kg (Média = 1,45 kg, Desvio Padrão = 0,11). Estas foram mantidas livres, em espaço fechado (3,3 m largura x 3,3 m comprimento x 3 m altura) com ventilação, no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (Cempas), com água e ração comercial para aves *ad libitum*.

Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

As galinhas foram pré-medicadas com midazolam (2 mg/kg) e morfina (2 mg/kg) na mesma seringa, por via intramuscular. Decorridos 10 minutos, estas foram induzidas com isoflurano na máscara facial, seguida de intubação com sonda endotraqueal sem cuff (no. 3) para manutenção da anestesia geral inalatória.

Após as penas da asa esquerda terem sido removidas por arrancamento, a galinha foi posicionada em decúbito dorsal e a asa esquerda foi mantida estendida, para realização de acesso ventral. Efetuou-se a antisepsia com clorhexidina e aplicou-se os panos de campo operatório. A pele foi incisada sobre o aspecto ventral do rádio, incluindo toda a diáfise medial. Foram afastados os músculos rádio extensor radial do metacarpo anteriormente e o extensor digital comunicante sobre o espaço interósseo. O osso do rádio foi isolado, com o cuidado de não lesar as artérias e veias maiores, nervos, músculos e tendões presentes na região. Removeu-se um 1,5 cm da porção medial do rádio, com o auxílio de serra oscilatória. Na sequência, foi aplicado cimento ósseo (Baumer OSTEO-CLASS) na região da falha segmentar na fase pastosa. Este se compunha de dois componentes - 20 ml de monômero (metil metacrilato) e 40 gramas de polímero (polimetil metacrilato) –, além da presença de 3 gramas de óxido de zircônio junto ao polímero.

Os tecidos moles foram aproximados sobre com uma sutura contínua simples e o tecido subcutâneo com sutura tipo Cushing. A síntese da pele foi com pontos isolados simples. O fio utilizado foi o náilon 3-0 agulhado.

Medicamentos pré e pós-operatório

As aves receberam enrofloxacina na dose de 15 mg/kg pela via IM (músculo peitoral) no momento da tranquilização e por mais sete dias, a cada 24 horas. O anti-inflamatório utilizado foi o meloxicam na dose de 0,2 mg/kg, IM, cada 24 horas por cinco dias. No período pós-operatório imediato foi usado o cloridrato de tramadol na dose 10mg/kg, IM.

Exames de imagem

Foram realizados exames radiográficos, sob contenção física, no pós-operatório imediato e aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. Foram efetuadas projeções radiográficas caudo-cranial e médio-lateral do antebraço esquerdo. A técnica foi 40KV, 8 mAs e 200 mA, com distância foco-filme de um metro, com o uso de equipamento digital (GE Health, DR-F®).

Nestes mesmos períodos também foram efetuados exames ultrassonográficos ao Modo-B e com Doppler colorido na região do defeito ósseo. Foi utilizado um equipamento modelo MyLab Alpha da marca Esaote® equipado com transdutor linear na frequência de 3 a 13 MHz. Ao Modo-B foi observado o tempo de formação da membrana e medida sua espessura em cada momento de avaliação. Para a avaliação da formação de vascularização utilizou-se o Doppler colorido e cada momento foi graduado na seguinte escala (Figura 1):

- Escore 0: sem sinal de vascularização.
- Escore 1: um a dois pontos de vascularização.
- Escore 2: um a dois trajetos de vascularização.
- Escore 3: 3 ou mais trajetos de vascularização.

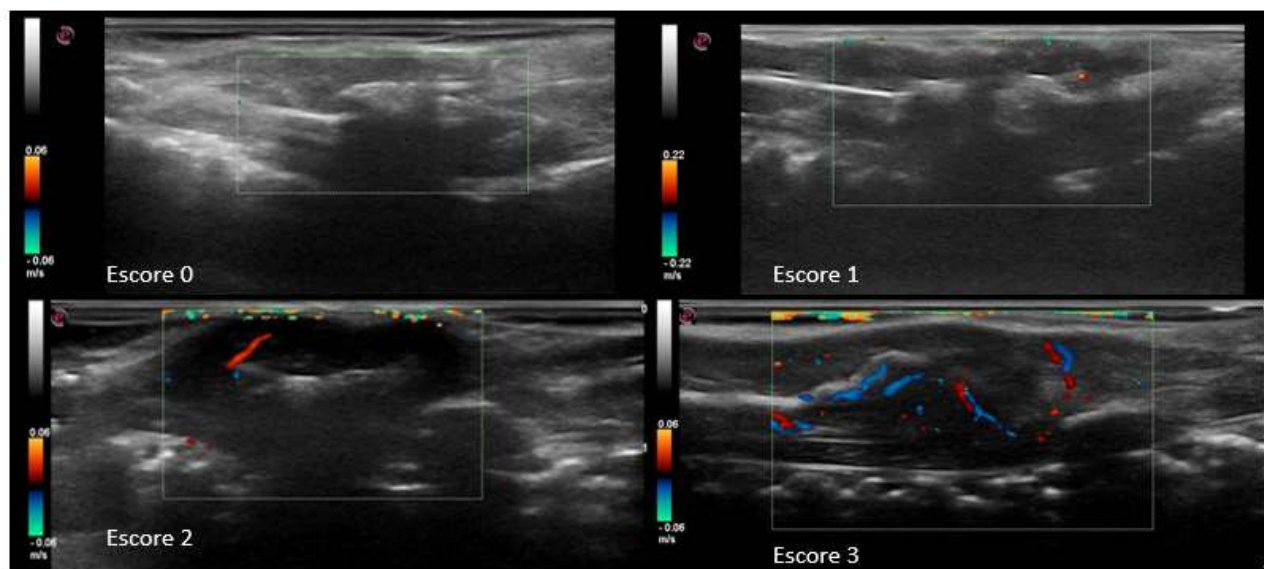


Figura 1. Imagens ultrassonográficas com a ferramenta Doppler colorido demonstrando a escala da vascularização de acordo com o Doppler colorido.

Coleta, Preparação e Análise histológica

Para a coleta da membrana de indução cinco aves foram sacrificadas aos 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. Para tanto, as aves foram sedadas com cloridrato de cetamina (30 mg/kg), cloridrato de xilazina (4 mg/kg), midazolam (2 mg/kg) e morfina (2 mg/kg), por via IM. Depois recebeu mistura de cloridrato de cetamina (30 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg), por via intravenosa. Após obtido plano anestésico profundo, aplicou-se o cloreto de potássio por via intravenosa até a parada cardiorespiratória.

As membranas de indução de Masquelet foram coletadas e fixadas em formalina tamponada 10% por 24-48 horas e, logo em seguida, foram mantidas em álcool 70%. Posteriormente foram embebidas em parafina, cortada em seções de 2-3 micra de espessura, e coradas com hematoxilina-eosina. Os espécimes foram avaliados com respeito a angiogênese e características celulares.

Resultados

Todas as aves se alimentaram e se locomoveram de forma aparentemente normal, durante todo o período de observação. Duas galinhas mostraram sinais de reação inflamatória no local cirúrgico com 10 dias de pós-operatório. Foi aplicado duas doses de pentabiótico (200 mg/kg de penicilina), a cada três dias, e curativos locais, havendo reversão do processo.

No exame radiográfico do pós-operatório imediato foi possível verificar a presença do cimento ocupando a falha óssea segmentar, como uma massa radiopaca, com variações de intensidade. Embora na posição médio-lateral denotou-se adequado posicionamento das extremidades das fraturas, em torno de 73% das galinhas havia algum grau de deslocamento das extremidades ósseas na posição caudo-cranial. Na avaliação com 15 dias de pós-operatório notou-se a manutenção do produto na falha segmentar, com aumento da radiopacidade do cimento ósseo, quando comparado ao momento pós-operatório imediato. Aos 21 dias de pós-operatório, uma galinha apresentou sinais reabsorção óssea em uma das extremidades da fratura e outra em ambas as extremidades. Com 30 dias de pós-cirúrgico já foi evidente a presença de formação óssea partindo de ambas extremidades fraturadas. Nas imagens ultrassonográficas ao Modo-B do pós-operatório imediato foram evidenciadas as extremidades da falha óssea, o cimento ósseo e a reação inflamatória em tecidos moles adjacentes. No momento de sete dias de pós-operatório e nos momentos seguintes foi possível visibilizar e mensurar a membrana (Tabela 1). Com a utilização da ferramenta Doppler colorido foi possível encaixar cada ave nos escores de vascularização como demonstrado na Tabela 2. No exame ultrassonográfico aos 30 dias de pós-operatório uma galinha apresentou formação de coleção líquida adjacente à falha óssea.

Tabela 1 - Espessura da membrana induzida pela técnica de Masquelet, mensurada pelo exame ultrassonográfico ao Modo-B aos 7, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.

	7 dias	15 dias	21 dias	30 dias
	0,04 cm	0,07 cm	0,06 cm	0,07 cm
	0,05 cm	0,05 cm	0,03 cm	0,09 cm
	0,06 cm	0,07 cm	0,05 cm	0,06 cm
	0,07 cm	0,07 cm	0,07 cm	0,11 cm
	0,04 cm	0,08 cm	0,07 cm	0,06 cm
Média	0,052 cm	0,068 cm	0,056 cm	0,078 cm
Desvio Padrão	0,013 cm	0,010 cm	0,016 cm	0,021 cm

Tabela 2 - Escores da vascularização da membrana induzida pela técnica de Masquelet à ferramenta Doppler aos 7, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório.

7 dias	16 dias	21 dias	30 dias
Escore 2	Escore 1	Escore 3	Escore 3
Escore 1	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Escore 3	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Escore 3	Escore 3	Escore 3	Escore 3
Escore 3	Escore 2	Escore 3	Escore 3

Macroscopicamente foi verificada a formação de membranas ao redor do cimento ósseo, que foram mais espessas nos períodos mais tardios, ou seja, 21 e 30 dias de pós-operatórios. Aos 30 dias após a cirurgia foi detectada presença de formação óssea junto à membrana. A membrana acompanhou o formato da massa de cimento, sendo que a porção interna se adentrou nas áreas de maior irregularidade. Na avaliação histológica na porção central da membrana, aos 15 dias de pós-operatório observou-se zonas 1, 2 e 3. A primeira zona estava em contato com a resina acrílica e foi composta por uma fina camada com alta concentração celular. Na segunda zona foi possível verificar abundante quantidade de fibras colágenas, dispostas em feixes orientados, paralela à resina. A terceira camada estava em contato com a musculatura adjacente, consistindo em tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos. Morfologicamente foi possível verificar nas três camadas fibras colágenas organizadas, orientadas em feixes paralelos a resina. Detectou-se também uma grande quantidade de vasos sanguíneos. Após 21 dias, houve uma perda de delimitação das camadas, com difícil evidênciação das diferentes zonas.

Notou-se ainda, formação de metaplasia cartilaginosa e óssea, indicando a mineralização da membrana. Foram observadas extensas áreas com formação de cartilagem e regiões com formação de trabéculas ósseas. Após 30 dias, havia completa mineralização da membrana, com formação de trabéculas ósseas perdendo a delimitação das zonas. Foi possível identificar uma zona completamente mineralizada e uma zona fibromuscular entre as trabéculas ósseas e a musculatura. Os vasos sanguíneos mostravam-se calibrosos.

Discussão

O cimento empregado no atual estudo tinha o óxido de zircônio como agente radiopaco, o que permitiu uma melhor avaliação radiográfica do preenchimento da falha segmentar. Contudo, foram visibilizadas variações de intensidade, sugerindo que a distribuição do agente radiopaco pode não ser uniforme. Em casos de infecção o espaçador de cimento pode ser aplicado com antibiótico (GIANNOUDIS et al., 2011). Este não foi empregado no presente estudo, já que não se tratava de área infectada. Entretanto, deve-se considerar que a qualidade do cimento e o tipo de antibiótico empregado tem efeito significativo na qualidade da membrana (NAU et al., 2016; HAN et al., 2017), o que necessitaria de outros estudos em galinhas

Por se tratar de um sistema de dois ossos que deslizam entre si longitudinalmente (MACCOY, 1992; MARTIN e RITCHIE, 1999), optou-se por não estabilizar o rádio, já que a ulna é o principal osso de suporte em aves (MACCOY, 1992). Embora não tenha se detectada fratura decorrente da não estabilização, foi notado desalinhamento das extremidades ósseas na posição radiográfica caudo-cranial, sugerindo que em caso clínico este osso necessita estabilização. Em pacientes humanos, o osso afetado geralmente é estabilizado por um método temporário no primeiro estágio da técnica de Masquelet (GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012;; HAN et al., 2017). Pelo escore de vascularização obtido com auxílio da ferramenta Doppler, os maiores valores foram verificados aos 21 dias de pós-operatório, com 60% de escore 3 e 40% de escore 2, e aos 30 dias de pós-operatório, com 100% de escore 3.

Como referido por outros estudos, a membrana induzida se torna altamente vascularizada e secreta uma combinação de importantes fatores de crescimento, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) e proteína morfogenética óssea (BMP-2) (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; HAN et al., 2017). Pelo exame ultrassonográfico foi possível observar a presença da membrana induzida aos sete dias de pós-operatório, sendo que a maior média de espessura (0,078 cm) foi observada aos 30 dias de pós-operatório. Em ovinos, as membranas produzidas após a remoção do espaçador com 6 semanas de implantação, apresentavam espessura de aproximadamente 1 mm (VIATEAU et al., 2006).

Pelo exame radiográfico, como pela avaliação macroscópica, foi notada a presença de formação óssea partindo de ambas extremidades fraturadas aos 30 dias de pós-operatório. Isto está de acordo com a velocidade da consolidação das fraturas em aves, já que fraturas adequadamente alinhadas consolidam mais rapidamente do que em mamíferos, estando estável com 3 a 4 semanas (BENNETT e KUZMAN, 1992; FORBES, 1998).

Como verificado em outros estudos as membranas não aderiram ao espaçador (TAYLOR et al., 2012). Entretanto, pela avaliação macroscópica foi notado que a membrana se adentrava nas áreas de irregularidade do cimento, indicando que a aplicação mais do cimento de forma mais uniforme seria mais adequado. As características histológicas da membrana induzida não foram afetadas em estudo que comparou cimento ósseo de superfície lisa ou áspera (LIU et al., 2012). Pela avaliação histológica foi possível observar uma evolução mais avançada da membrana comparada aos exames de imagem. Aos 15 dias foi possível identificar três zonas distintas na membrana, uma celular mais próxima à resina, uma de fibras colágenas e outra mais externa de tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos. Achados similares foram descritos em modelo de defeito femoral em ratos (GOURON et al., 2014) e defeito tibial em ovelhas (CHRISTOU et al., 2014). Aos 15 dias de pós-operatório havia histologicamente a presença de neovascularização, fibras colágenas organizadas e diminuição de células inflamatórias, sugerindo que a reconstrução óssea em casos clínicos de perda óssea em aves poderia ser conduzida já neste período.

O tempo para a segunda intervenção tem sido citado em pacientes humanos entre quatro até oito semanas (MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; KARGER et al., 2012; TAYLOR et al., 2012; AHO et al., 2013). Em estudos experimentais com diversos animais o período tem variado, sendo ovelhas de quatro semanas (CHRISTOU et al., 2014), em coelhos de quatro semanas (PELISSIER et al., 2004; LIU et al., 2013) e em ratos de quatro a seis semanas (GOURON et al., 2014; HENRICH et al., 2016). Contudo, no período de 21 dias pós-operatório no presente estudo havia formação de metaplasia cartilaginosa e óssea e aos 30 dias de pós-operatório uma completa mineralização da membrana, compatível com a velocidade da consolidação óssea em aves, porém muito avançado para o segundo estágio da técnica da membrana de Maquet. Tem sido referido que a capacidade da membrana para melhorar a osteogênese diminui com o tempo (AHO et al., 2013). Desta forma, a reconstrução óssea deve ser realizada em período que otimize o papel *in situ* dos fatores de crescimento e osteoindutivos (PELISSIER et al., 2004).

Vale ainda citar que em alguns modelos animais em que o defeito ósseo não foi preenchido com enxerto ósseo, após a remoção do espaçador, formação óssea adicional foi também notada na superfície mais interna da membrana (HAN et al., 2017). Além disso, em defeito crítico no fêmur de ratos, foi verificado que a membrana continha ilhas de calcificação na terceira semana pós-implantação, porém não pareciam ser contínuas dentro da membrana (GOURON et al., 2014).

Histologicamente, a angiogênese foi maior estatisticamente aos 21 dias, tanto para as extremidades como para a porção central da membrana. Embora os achados ultrassonográficos tenham também mostrado um aumento da vascularização aos 21 dias, a maior porcentagem de escore 3 ocorreu com 30 dias de pós-operatório. Baseado nos resultados obtidos foi possível concluir que entre os momentos avaliados, todos mostraram a formação da membrana induzida de Masquelet em galinhas, porém com 15 dias de pós-operatório se detectou a melhor qualidade da membrana.

Referência bibliográficas

- AHO, O.M.; LEHENKARI, P.; RISTINIEMI, J.; LEHTONEN, S.; RISTELI, J.; LESKELÄ, H.V. The mechanism of action of induced membranes in bone repair, *J. Bone Jt. Surg. Am.*, v.95, n.7, p.597-604, 2013.
- BENNETT, R.; KUZMAN, A. Fracture management in birds. *J Zoo Wildl Med.*, v.23, n.1, p.5-38, 1992.
- BUSH, M. Laparoscopy and surgery. In: FOWLER, M.E. *Zoo and wild animal medicine*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p.254-261.
- CAPPELLARI, F.; PIRAS, L.; PANICHI, E.; FERRETTI, A.; PEIRONE, B. Treatment of antebrachial and crural septic nonunion fractures in dogs using circular external skeletal fixation: a retrospective study. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, v.27, p.297-305, 2014.
- CHRISTOU, C.; OLIVER, R.A.; YU, Y.; WALSH, W.R. The Masquelet technique for membrane induction and the healing of ovine critical sized segmental defects. *PLoS One*, v.9, n.12:e114122, p.1-19, 2014.
- FORBES, N.A. Avian orthopedics. *Vet. Quarterly*, v.20, p. S69-S70, 1998.
- GOURON, R.; PETIT, L.; BOUDOT, C.; SIX, I.; BRAZIER, M.; KAMEL, S.; MENTAVERRI, R. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.11, n.2, p.382-389, 2017.
- GIANNOUDIS, P.V.; FAOUR, O.; GOFF, T.; KANAKARIS, N.; DIMITRIOU, R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: Tips-tricks and future directions. *Injury*, v.42, n.6, p.591-598, 2011.
- HAN, W.; SHEN, J.; WU, H.; YU, S.; FU, J.; XIE, Z. Induced membrane technique: advances in the management of bone defects. *Int. J. Surg.*, v.42, p.110-116, 2017.
- HENRICH, D.; SEEBACH, C.; NAU, C.; BASAN, S.; RELJA, B.; WILHELM, K.; SCHAIBLE, A.; FRANK, J.; BARKER, J.; MARZI, I. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.10, n.10, p.E382-E396, 2016.

- JOHNSTON, M.S.; THODE, H.O.; EHRHART, N.P. Bone transport osteogenesis for reconstruction of a bone defect in the tibiotarsus of a yellow-naped Amazon parrot (*Amazona ochrocephala auropalliata*). *J. Avian Med. Surg.*, v.22, n.1, p.47–56, 2008.
- KARGER, C.; KISHI, T.; SCHNEIDER, L.; FITOUSSI, F.; MASQUELET, A.C. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, v.98, n.1, p.97-102, 2012.
- LIU, H.X.; XU, H.Z.; ZHANG, Y.; HU, G.; SHEN, Y.; CHENG, X.J.; PENG, L. Effects of surface roughness of bone cements on histological characteristics of induced membranes. *Zhongguo Gu Shang*, v.25, n.8, p.662-666, 2012.
- LIU, H.; HU, G.; SHANG, P.; SHEN, Y.; NIE, P.; PENG, L.; XU, H. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, v.99, n.8, p.959-964, 2013.
- MACCOY, D.M. Treatment of fractures in avian species. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.22, n.1, p.225-238, 1992.
- McFADDEN, M.S. Musculoskeletal System. In: MITCHELL, M.A.; TULLY, T.N. *Current therapy in exotic pet practice*. St. Louis: Elsevier, 2016. p.352-391.
- MARTIN, H.; RITCHIE, B.W. Orthopedic surgical techniques. In: RITCHIE B.W., HARRISON G.J.; HARRISON L.R. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth: Wingers Publishing, 1999. p.1137-1169.
- MASQUELET, A.C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop. Clin. North Am.*, v.41, n.1, p.27-37, 2010.
- NAU, C.; SEEBACH, C.; TRUMM, A.; SCHAIBLE, A.; KONTRADOWITZ, K.; MEIER, S.; BUECHNER, H.; MARZI, I.; HENRICH, D. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*, v.47, n.2, p.325-334, 2016.
- OROSZ, S.E.; ENSLEY, P.K.; HAYNES, C.J. *Avian surgical anatomy thoracic and pelvic limbs*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. 139p.
- PELISSIER, P.; MASQUELET, A.C.; BAREILLE, R.; PELISSIER, S.M.; AMEDEE, J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J. Orthop. Res.*, v.22, n.1, p.73-79, 2004.

- PONDER, J.B.; REDIG, P. Orthopedics. In: SPEER, B.L. *Current therapy in avian medicine and surgery*. St. Louis: Elsevier, 2016. p.657-667.
- RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; VULCANO, L.C.; BÜTTNER, R.C. Acute shortening and subsequent lengthening of the radius and ulna for the treatment of an infected nonunion in a dog. *Can. Vet. J.*, v.42, p.724-726, 2001.
- RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; VULCANO, L.C.; CIANI, R.B.; MANNARINO, R. Large segmental radius and ulna defect treated by bone transportation with the Ilizarov technique. *Aust. Vet. J.*, v.81, n.11, p.677-680, 2003.
- RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; HETTE, K.; VULCANO, L.C.; BÜTTNER, R.C. Use of circular external fixator in the treatment of fracture complications of radius and ulna in small breed dogs. *Ciênc. Rural*, v.35, n.5, p.1116-1122, 2005.
- SANAEI, R.; ABU, J.; NAZARI, M.; ZUKI, M.A.; ALLAUDIN, Z.N. Evaluation of osteogenic potentials of avian demineralized bone matrix in the healing of osseous defects in pigeons. *Vet. Surg.*, v.44, n.5, p.603-612, 2015.
- TAYLOR, B.C.; FRENCH, B.G.; FOWLER, T.T.; RUSSELL, J.; POKA, A. Induced membrane technique for reconstruction to manage bone loss. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, v.20, n.3, p.142-150, 2012.
- TUNIO, A.; JALILA, A.; GOH, Y.M.; SHAMEHA-INTAN; SHANTHI, G. Histologic evaluation of critical size defect healing with natural and synthetic bone grafts in the pigeon (*Columba livia*) ulna. *J. Avian Med. Surg.*, v.29, n.2, p.106-113, 2015.
- VIATEAU, V.; GUILLEMIN, G.; CALANDO, Y.; LOGEART, D.; OUDINA, K.; SEDEL, L.; HANNOUCHE, D.; BOUSSON, V.; PETITE, H. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet. Surg.*, v. 35, n.5, p.445-452, 2006.
- WILLIAMS, J. Orthopedic radiography in exotic animal practice. *Vet. Clin. North Am., Exotic An. Pract.*, v.5, n.1, p.1-22, 2002.

ANEXOS

ANEXOS



ATESTADO

Atesto que o Projeto "TÉCNICA DE MASQUELET EM DEFEITOS ÓSSEOS EM GALINHAS" **Protocolo CEUA 0225/2018**, a ser conduzido por LUIS ORLANDO BASELLO CUEVA, responsável/orientador Sheila Canevese Rahal, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/11/2018 a 01/09/2019
Nome Comum / Espécie / Linhagem	AVE / GALLUS GALLUS DOMESTICUS /
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	30
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	3 Kg
Idade	1 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Granja comercial

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 14/11/2018

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Cordeiro, s/nº
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 13618-681
(14) 3880-2176 - patricia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br