

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

**TÉCNICA DA MEMBRANA INDUZIDA USANDO
CIMENTO ÓSSEO ORTOPÉDICO OU RESINA
ACRÍLICA ODONTOLÓGICA, ACRESCIDOS OU NÃO
DE ANTIBIÓTICO, EM DEFEITO SEGMENTAR NO
RÁDIO DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*)**

LUIZ DONIZETE CAMPEIRO JUNIOR

Botucatu – SP

2022

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

**TÉCNICA DA MEMBRANA INDUZIDA USANDO
CIMENTO ÓSSEO ORTOPÉDICO OU RESINA
ACRÍLICA ODONTOLÓGICA, ACRESCIDOS OU NÃO
DE ANTIBIÓTICO, EM DEFEITO SEGMENTAR NO
RÁDIO DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*)**

LUIZ DONIZETE CAMPEIRO JUNIOR

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Titular Sheila Canevese Rahal

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Campeiro Junior, Luiz Donizete.

Técnica da membrana induzida usando cimento ósseo ortopédico ou resina acrílica odontológica, acrescidos ou não de antibiótico, em defeito segmentar no rádio de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) / Luiz Donizete Campeiro Junior. - Botucatu, 2022

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

Orientador: Sheila Canevese Rahal

Capes: 50501003

1. Histologia. 2. Polimetil metacrilato. 3. Radiografia.
4. DNA intergênico.

Palavras-chave: Espaçador; Histologia;
Polimetilmetacrilato; Radiografia.

Nome do autor: Luiz Donizete Campeiro Junior

TÍTULO: TÉCNICA DA MEMBRANA INDUZIDA USANDO CIMENTO ÓSSEO ORTOPÉDICO OU RESINA ACRÍLICA ODONTOLÓGICA, ACRESCIDOS OU NÃO DE ANTIBIÓTICO, EM DEFEITO SEGMENTAR NO RÁDIO DE GALINHAS (*Gallus gallus domesticus*)

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Sheila Canevese Rahal
Presidente da banca e orientadora
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Luciane dos Reis Mesquita
Membro interno
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^o. Dr. Marcos de Almeida Souza
Membro externo
Patologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária FAVET/UFMT – Cuiabá – MT

Prof^o. Dr. Roberto Lopes de Souza
Membro externo
Departamento de Cirurgia Veterinária/ Faculdade de Medicina Veterinária
FAVET/UFMT – Cuiabá - MT

Dr. Washington Takashi Kano
Membro externo
Médico Veterinário autônomo

Agradecimentos

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

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu) pela oportunidade.

Agradeço a Deus por ter me ajudado e me guiado na realização desse trabalho, agradeço a minha princesa linda esposa Alini, a qual sempre esteve comigo desde o início na realização e execução desse projeto, ao nosso lindo filho Luiz Gabriel que foi a melhor realização que tivemos, agradeço a minha linda filha Ana Luiza e minha família em especial meus pais, os quais mesmo de longe sempre acreditaram em meus sonhos.

Meu grande agradecimento a professora Dra. Sheila que me aceitou desde o início na orientação desse projeto, mesmo sem me conhecer pessoalmente abriu as portas da UNESP Botucatu para a realização dele, e em nenhum momento poupou esforços para a conclusão desse trabalho, meu eterno agradecimento!!! Agradeço ao grande Professor Dr. Roberto que também foi e sempre será meu orientador também nessa jornada acadêmica, se não fosse pelo senhor não estaria aqui nesse momento. Ao professor Dr. Marcos que sempre nos auxiliou para a realização da parte histológica das nossas pesquisas, e pelo aceite de estar presente nesse momento, agradeço a todos professores da UNESP Botucatu, pelos ensinamentos, agradeço pela parceria da UFMT em especial professor Roberto e Marcos, pela realização desse trabalho.

Agradeço a todos da equipe do Hospital Veterinário Duovet que também auxiliou na realização desse trabalho, Thauane, Henrique, Bruna, entre outros. Aos meus amigos de docência, Jomel, Tâmara e Paulo. Agradeço ao meu amigo de doutorado Ivaldo que me ajudou desde o início que entrei no programa de pós-graduação.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELA.....	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2	20
Artigo científico 1	21
Artigo científico 2	54
ANEXO	83

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1.** Sequência cirúrgica mostrando o afastamento muscular para identificação do rádio (a), defeito segmentar (b), aplicação do cimento ósseo ortopédico em forma de cilindro na falha segmentar (c)..... 25
- Figura 2.** Coleta da membrana induzida com 15 dias de pós-operatório (a) e armazenamento em formalina desta e das extremidades proximal e distal do rádio (b)..... 27
- Figura 3.** Exemplo de mensuração da membrana induzida em três locais distintos (linhas amarelas) em uma ave do Grupo 1 (cimento ósseo) aos 21 dias de pós-operatório, empregando o software QuPath-0.3.2. Aumento de 2,5X..... 28
- Figura 4.** Exemplo da marcação para contagem de vasos sanguíneos (pontos em amarelo) da membrana induzida em uma ave do Grupo 1 (cimento ósseo), aos 21 dias de pós-operatório, empregando o software QuPath-0.3.2. Aumento de 20X..... 29
- Figura 5.** Projeções radiográficas médio-laterais de aves dos Grupo 1 (cimento ósseo ortopédico) no pós-operatório imediato (a) e 21 dias após a cirurgia (b) e de aves do Grupo 2 (cimento ósseo ortopédico acrescido de cefazolina em pó) no pós-operatório imediato (c) e 21 dias após a cirurgia (d). Em ambos os grupos se visibiliza o cimento ósseo ocupando a falha óssea, como uma massa radiopaca bem delimitada, com densidade próxima ao tecido ósseo, com discretos sinais de proliferação óssea na extremidade proximal. No Grupo 1 nota-se o deslocamento do cimento ósseo com 21 dias de pós-operatório (b)..... 31
- Figura 6.** Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com cimento ósseo ortopédico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Proliferação de tecido fibrovascular contendo fibroblastos e histiócitos, e fibra muscular necrótica (asteriscos). HE, 20x. (b) Proliferação acentuada de tecido fibroso, desorganizado e altamente vascularizado (seta preenchida) com área de metaplasia cartilaginosa (linha pontilhada). HE, 10x. (c) Proliferação de tecido fibroso moderada, desorganizada e levemente vascularizada (asterisco), tecido conjuntivo mais frouxo (estrela) próximo ao tecido muscular esquelético. HE, 10x..... 33
- Figura 7.** Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com cimento ósseo ortopédico acrescido de antibiótico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Proliferação de tecido fibrovascular com presença de fibroblasto e histiócitos, bem como células de Langerhans (seta preta) e fibra muscular necrótica (seta branca). HE, 20x. (b) Proliferação de tecido fibroso denso (asterisco), estreita faixa de tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 5x. (a). (c) Proliferação de tecido fibroso frouxo e leve (asterisco), extensa área de metaplasia cartilaginosa (linha pontilhada) e tecido muscular esquelético (estrela). HE, 10x..... 36

Figura 8. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com cimento ósseo ortopédico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Osso compacto diafisário (asterisco preto); osso trabecular (asterisco vermelho); proliferação de tecido cartilaginoso (linha tracejada) e tecido fibroso (cruz); fibras musculares hialinizadas (seta branca). HE, 20x. (b) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado (asterisco), associado a uma extensa área de matriz óssea (seta preenchida) adjacente à diáfise (estrela). HE, 5x. (c) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado. HE, 5x..... 38

Figura 9. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com cimento ósseo ortopédico acrescido de antibiótico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Osso compacto diafisário (cruz) com discreta proliferação de tecido fibroso (asterisco) adjacente; fibras musculares (seta preta). HE, 20x. (b) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado (asterisco), adjacente à diáfise (estrela). HE, 5x. (c) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado (asterisco) associado a matriz óssea (estrela). HE, 5x..... 41

Capítulo 2

Figura 1. Projeções radiográficas médio-laterais de aves dos Grupo 1 (resina acrílica odontológica) no pós-operatório imediato (a) e 21 dias após a cirurgia (b) e de aves do Grupo 2 (resina acrílica odontológica acrescida de cefazolina em pó) no pós-operatório imediato (c) e 21 dias após a cirurgia (d). Em ambos os grupos se visibiliza a falha óssea, porém a resina acrílica não poder ser delimitada, visto a densidade da mesma se aproximar ao dos tecidos moles. Note o início da proliferação óssea nas extremidades aos 21 dias de pós-operatório..... 60

Figura 2. Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com resina acrílica aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Observe duas zonas distintas: porção externa mais delgada e formada por um tecido conjuntivo frouxo e células exibindo prolongamentos citoplasmáticos (asterisco); porção mais interna e mais espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, altamente vascularizado (seta vazada) e um leve infiltrado inflamatório mononuclear (seta preenchida). HE, 10x. (b) Verifique duas zonas distintas: porção externa mais delgada e formada por um tecido conjuntivo frouxo e células exibindo prolongamentos citoplasmáticos (asterisco); porção mais interna e mais espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, moderadamente vascularizado (seta vazada) e um moderado infiltrado inflamatório mononuclear (seta preenchida). HE, 10x. (c) Note duas zonas distintas: porção externa mais espessa e formada por um tecido conjuntivo frouxo e células exibindo prolongamentos citoplasmáticos (asterisco); porção mais interna, composta por tecido conjuntivo desorganizado, levemente vascularizado (seta vazada). HE, 10x..... 62

Figura 3. Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com resina acrílica acrescida com antibiótico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Proliferação intensa de tecido conjuntivo ósseo (asterisco) entremeando-se no tecido muscular esquelético (dois asteriscos). HE, 10x. (b) Observa-se duas zonas distintas: uma porção externa mais delgada e formada por um tecido conjuntivo frouxo (asterisco); uma porção mais interna e espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, levemente vascularizado (estrela) e tecido muscular esquelético (seta preenchida). HE, 5x. (c) Verifica-se duas zonas distintas: uma porção externa mais delgada e formada por células achatadas e discreta quantidade de tecido conjuntivo (asterisco); uma porção mais interna e espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, frouxo (estrela) e levemente vascularizado (seta preenchida). HE, 5x.....

65

Figura 4. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com resina acrílica aos sete (a) 15 (b) e 21 (b) dias de pós-operatório. (a) Matriz óssea acentuada (asterisco), matriz cartilaginosa leve (seta preenchida) e área de calcificação distrófica acentuada (seta vazada). HE, 5x. (b) Proliferação moderada de tecido fibroso (asterisco), área de fragmentos de tecido ósseo (osteólise) envolvidos por células multinucleadas (seta preenchida) adjacente ao osso da diáfise (seta vazada). HE, 5x. (c) Proliferação moderada de tecido fibroso (asterisco), matriz cartilaginosa leve (seta preenchida), matriz óssea moderada (seta vazada) e tecido muscular (estrela). HE, 5x.....

68

Figura 5. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com resina acrílica acrescida de antibiótico aos sete (a) 15 (b) e 21 (b) dias de pós-operatório. (a) Proliferação acentuada de tecido fibroso, formando um calo (asterisco), matriz cartilaginosa leve (seta vazada) e óssea moderada (seta preenchida). HE, 2,5x. (b) Proliferação moderada de tecido fibroso (asterisco), matriz cartilaginosa moderada (seta vazada) e óssea acentuada (seta preenchida). HE, 10x. (c) Proliferação acentuada de tecido fibroso (asterisco) e moderada de matriz óssea (seta preenchida). HE, 10x.

71

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com cimento ósseo ortopédico (Grupo 1), aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	34
Tabela 2. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com cimento ósseo ortopédico acrescido de antibiótico (Grupo 2), aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	37
Tabela 3. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO), matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.....	39
Tabela 4. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO), matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.....	42
Tabela 5. Espessura média das membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	43
Tabela 6. Densidade de vasos sanguíneos nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	43
Tabela 7. Proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME) e presença de células multinucleadas multifocais (PCMM) verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	44

Tabela 8. Área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	45
Tabela 9. Fibras musculares degeneradas (FMD) e metaplasia cartilaginosa (MC) verificadas nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	45
Tabela 10. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	46
Tabela 11. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz óssea (MO), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	46
Tabela 12. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	47

Capítulo 2

Tabela 1. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), formação de matriz óssea (FMO), infiltrado inflamatório granulomatoso macrófagos, linfócitos e células gigantes (IIGMLCC), proliferação de tecido ósseo (PTO) em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com resina acrílica odontológica (Grupo 1), aos 7, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	63
Tabela 2. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), formação de matriz óssea (FMO), infiltrado inflamatório granulomatoso macrófagos, linfócitos e células gigantes (IIGMLCC), proliferação de tecido ósseo (PTO), áreas de calcificação distrófica (ACD), metaplasia óssea (MO) em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com resina acrílica odontológica acrescida de antibiótico (Grupo 2), aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	66

Tabela 3. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO), matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica odontológica) aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.....	69
Tabela 4. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO), matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 2 (resina acrílica odontológica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.....	72
Tabela 5. Espessura média das membranas induzidas em galinhas do Grupo (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	73
Tabela 6. Densidade de vasos nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	73
Tabela 7. Proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME) e presença de células multinucleadas multifocais (PCMM) verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	74
Tabela 8. Área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	74
Tabela 9. Fibras musculares degeneradas (FMD) e metaplasia cartilaginosa (MC) verificadas nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	75
Tabela 10. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	75
Tabela 11. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz óssea (MO), em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	76
Tabela 12. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.....	76

CAMPEIRO JUNIOR, L.D. Técnica da membrana induzida usando cimento ósseo ortopédico ou resina acrílica odontológica, acrescidos ou não de antibiótico, em defeito segmentar no rádio de galinhas (*Gallus gallus domesticus*). Botucatu, 2020. 83p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar membranas induzidas pela técnica de Masquelet com o emprego de cimento ósseo ortopédico ou resina acrílica odontológica, acrescidos ou não de antibiótico, em modelo de falha óssea segmentar induzida no rádio esquerdo de galinhas. Foram utilizadas 60 galinhas híbridas, as quais foram distribuídas em Experimento 1 (G1 – cimento ósseo ortopédico, G2 – cimento ósseo ortopédico acrescido de cefazolina em pó) e Experimento 2 (G1 – resina acrílica odontológica, G2 - resina acrílica odontológica acrescida de cefazolina em pó). Em ambos experimentos foram realizados exames radiográficos do antebraço esquerdo no pós-operatório imediato e aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório. Para a coleta da membrana induzida, procedeu-se em cada grupo a eutanásia de cinco aves aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório. No Experimento 1, radiograficamente o cimento ósseo foi identificado com uma massa radiopaca ocupando a falha óssea. Pela análise histológica não houve diferença na espessura média entre os grupos em todos os momentos. As células multinucleadas multifocais diferiram entre os grupos aos 7 (G1>G2) e 21 (G2>G1) dias após a cirurgia. O infiltrado inflamatório mononuclear diferiu entre os grupos apenas no dia 21 (G1>G2). A proliferação de tecido fibroso não diferiu entre os grupos em todos os momentos de avaliação. A densidade dos vasos sanguíneos diferiu apenas aos 21 dias de pós-operatório (G2<G1). As áreas multifocais da cartilagem diferiram entre os grupos em todos os momentos (G1>G2). No Experimento 2, a resina acrílica tinha radiograficamente densidade próxima aos dos tecidos moles. Não ocorreram diferenças da espessura média da membrana e na densidade de vasos sanguíneos, entre G1 e G2 aos 15 e 21 dias de pós-operatório. A área focal de metaplasia mixoide e áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa não diferiram entre G1 e G2. A porcentagem de células multinucleadas multifocais foi mais evidente no G2. Conclui-se que é possível produzir membranas induzidas com produtos derivados do polimetilmetacrilato, com ou sem o uso de antibiótico; contudo, com diferenças histológicas.

Palavras-chave: Espaçador; Polimetilmetacrilato; Histologia; Radiografia.

CAMPEIRO JUNIOR, L.D. Induced membrane technique using orthopedic bone cement or dental acrylic resin, antibiotic-loaded or not, in a segmental radial defect in chickens (*Gallus gallus domesticus*). Botucatu, 2020. 83p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

SUMMARY

This study aimed to evaluate the induced membrane technique using orthopedic bone cement or dental acrylic resin, antibiotic-loaded or not, in a segmental radial defect in chickens. Sixty healthy chickens were distributed in Experiment 1 (G1 – orthopedic bone cement, G2 – orthopedic bone cement cefazolin-loaded) and Experiment 2 (G1 – dental acrylic resin, G2 - dental acrylic resin cefazolin-loaded). In both experiments, radiographic examinations of the left forearm were performed in the immediate postoperative period and at seven, 15, and 21 days after the surgery. In each group, five birds were euthanized at seven, 15, and 21 days after surgery to collect the induced membrane. In Experiment 1, the bone cement was identified as a radiopaque mass occupying the bone defect on x-rays. Histologically, there was no difference in mean thickness between groups at all time points. Multifocal multinucleated cells differed between groups at 7 (G1>G2) and 21 (G2>G1) days after surgery. Mononuclear inflammatory infiltrate differed between groups only on day 21 (G1>G2). Fibrous tissue proliferation did not differ between groups at all evaluation times. Blood vessel density differed only at 21 days postoperatively (G2<G1). Multifocal areas of cartilage differed between groups at all time points (G1>G2). In Experiment 2, the acrylic resin had a density close to that of soft tissues on x-rays. The average thickness of the membrane and blood vessel density did not differ between G1 and G2 at 15 and 21 days after surgery. The focal area of myxoid metaplasia and multifocal areas of cartilaginous metaplasia did not differ between G1 and G2. The percentage of multifocal multinucleated cells was more evident in G2. In conclusion, it was possible to produce membranes induced with products derived from polymethyl methacrylate, with or without antibiotics; however, histological differences were observed.

Key words: Spacer; Polymethylmethacrylate; Histology; Radiography.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As estratégias para o tratamento de perdas ósseas e infecções, as quais induzem falhas ósseas extensas, têm sido constantemente melhoradas em pacientes humanos (HAN et al., 2017; ALT e GIANNOUDIS, 2019), e o mesmo pode ser estendido ao paciente veterinário. Existem várias possibilidades cirúrgicas, mas deve ser levado em consideração a complexidade do método, curva de aprendizado, tempo de uso do método de estabilização, número de procedimentos necessários, custo e a espécie animal a ser tratada. Se a área a ser tratada apresenta sinais de infecção, para que haja sucesso do tratamento a área comprometida deve ser removida e a infecção local controlada (RODNER et al., 2003; ALT e GIANNOUDIS, 2019).

A técnica da membrana induzida de Masquelet tem sido introduzida em medicina humana como uma opção a tratamentos como o transporte ósseo intercalado e o enxerto fibular vascularizado autólogo (GIANNOUDIS et al., 2011; MASQUELET, 2017). Em aves, a técnica da membrana induzida de Masquelet tem sido testada em sua primeira fase em galinhas, mostrando as características da membrana em diferentes tempos de permanência do cimento ósseo (CUEVA et al., 2021).

Outro fato a se destacar é que a produção da membrana induzida pode ser afetada por aditivos, tais como o sulfato de bário (MASQUELET, 2017) e antibióticos (NAU et al., 2016). Entretanto, existem controvérsias quanto a validade do emprego ou não de antibióticos, juntamente com o cimento ósseo, na produção da membrana induzida em pacientes humanos (SCHÖTTLE et al., 2005; GIANNOUDIS et al., 2011; MASQUELET, 2017). Por sua vez, em aves estas combinações, pelo conhecimento dos autores, ainda não foram avaliadas.

Desta forma, o presente estudo se justificou uma vez que visou avaliar membranas induzidas pela técnica de Masquelet com o emprego de duas formulações de polimetilmetacrilato, com ou sem o uso de antibiótico, utilizando

a galinha (*Gallus gallus domesticus*) como modelo experimental. Para o desenvolvimento do assunto foram estabelecidos dos capítulos: Capítulo 1 - Introdução e Revisão da Literatura; Capítulo 2 - Artigos Científicos 1 e 2.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Membranas induzidas*

A técnica de Masquelet é empregada, desde 1986, para o tratamento de falhas ósseas complexas em pacientes humanos, sendo desenvolvida por meio de dois estágios: no primeiro, com o osso estabilizado faz-se o debridamento da área comprometida e aplica-se no defeito ósseo o cimento de polimetilmetacrilato, o qual atua como um espaçador e como indutor de membrana; no segundo, o espaçador é removido com seis a oito semanas e o defeito é preenchido com enxerto autólogo, de forma que a membrana induzida auxilia na revascularização, previne a reabsorção do enxerto e favorece a corticalização (MASQUELET, 2003; MASQUELET e BEGUE, 2010; VIATEAU et al., 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; MASQUELET, 2017; ALFORD et al., 2021).

Entretanto, segundo Alford et al. (2021), o tempo para a formação da membrana induzida tem ainda sido um ponto de debate em pacientes humanos, de forma que tem variado de quatro a 96 meses, visto que várias circunstâncias do paciente podem atrasar a realização do segundo estágio. Além disso, estes autores, afirmaram que aparentemente nenhum estudo demonstrou uma correlação clara entre a maturação da membrana e piores êxitos. O procedimento é considerado uma opção menos complexa, comparado aos métodos de transporte ósseo e autoenxerto de osso vascularizado (GIANNOUDIS et al., 2011; MASQUELET, 2017; ALFORD et al., 2021).

Geralmente o espaçador é moldado antes da solidificação; deve ser tão grande quanto possível, sem comprometer a aproximação dos tecidos moles e pele; devendo os tecidos moles serem irrigado e protegidos do aquecimento durante a polimerização (MASQUELET, 2017). Há sugestões que

o cimento deve ser colocado nas margens do osso para evitar a não união na área de acoplamento (HAN et al., 2017).

Tem sido recomendado a inserção de espaçador de cimento com antibiótico em casos de não-união infectada (SCHÖTTLE et al., 2005; GIANNOUDIS et al., 2011). Por outro lado, Masquelet (2017) afirmou que o antibiótico pode ser inativo para o micro-organismo; alguns antibióticos ativos podem afetar as características da membrana, mas não sabe se modifica as propriedades biológicas da membrana; a ausência de infecção recorrente com cimento sem antibióticos pode ser considerada um bom sinal; não se pode fazer um debridamento inadequado considerando a ação do antibiótico para tratar a infecção óssea. Além disso, afirmou a importância de cimento com sulfato de bário, por ser produto radiopaco irritativo.

A membrana de corpo estranho desenvolvida durante o primeiro estágio é uma resposta ao sistema imune ao cimento ósseo de polimetilmetacrilato (ALFORD et al., 2021). A membrana tem a capacidade de secretar vários fatores de crescimento (VEGF, TGF-beta 1, BMP-2, entre outros), além de ser muito vascularizada em todas as camadas, já visualizada com duas semanas, sendo a porção em contato com o cimento um epitélio como sinóvio com poucas células inflamatórias e a camada fibrosa externa composta de fibroblastos, miofibroblastos e feixes de colágeno, com fibras altamente alinhadas (MASQUELET, 2003; PELISSIER et al., 2004; MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; HAN et al., 2017; ALFORD et al., 2021). De acordo com Alford et al. (2021), pode também ser identificada uma terceira camada de fibras desorganizadas; contudo, algumas vezes é difícil de diferenciar as camadas, que podem mais facilmente serem observadas com a coloração de Picrosirius. Adicionalmente citaram que estudos têm relatado a formação de osso acima da membrana e espaçador, o qual se origina normalmente das extremidades ósseas. Desta forma, mais osteoblastos podem ser detectados se a amostra da membrana for avaliada das extremidades proximais ou distais do defeito e não do centro.

Seis pacientes humanos com não-união infectada da tíbia foram tratados, por Schöttle et al. (2005), por dois estágios. No primeiro estágio, os defeitos ósseos (5 a 8 cm) foram submetidos a cultura no debridamento e após

o resultado foram preenchidos com espaçador de cimento impregnado de gentamicina (Palacos gentamicina). Além disso, receberam antibiótico oral por três meses. Baseado no resultado de proteína C reativa se prosseguiu com antibiótico ou realizou-se o segundo estágio da técnica, com remoção do cimento e aplicação de enxerto autólogo corticoesponjoso. O antibiótico foi então mantido por mais seis semanas. A técnica foi considerada de baixo risco e resultou em alta taxa de consolidação óssea.

Henrich et al. (2013) empregaram modelo de falha óssea segmentar crítica no fêmur de ratos, para analisarem a produção da membrana induzida de Masquelet com duas, quatro e seis semanas de pós-operatório. Pela análise histológica foi observado um tecido vascularizado e rico em células, sendo que as adjacentes ao cimento de polimetilmetacrilato eram pequenas e redondas em formato e as distantes ao produto eram alongadas e paralelas ao mesmo. Foram também detectadas estruturas fibrosas orientadas paralelas ao polimetilmetacrilato. A espessura da membrana aumentou significativamente de duas para seis semanas da indução, o que foi atribuído ao aumento da proliferação celular. A atividades osteogênicas e neovasculares determinadas por imunohistoquímica e pelas mensurações dos conteúdos de BMP-2 e TGF β , entre outros, foram verificadas principalmente entre duas e quatro semanas, com diminuição após seis semanas.

As características histológicas das membranas induzidas nos ambientes ósseo (defeito em rádio), intramuscular e subcutâneo em coelhos, foram analisadas por Liu et al. (2013). Os exames histológicos (hematoxilina e eosina) foram examinados com duas, quatro e oito semanas de pós-operatório. Três medidas foram efetuadas em três campos separados, as quais incluíram espessamento da membrana, microvasos e espessamento do osso cortical, usando um sistema de análise de imagem. A maior densidade de microvasos foi verificada nas membranas dos defeitos ósseos.

Nau et al. (2016) avaliaram com duas, quatro e seis semanas o efeito de diferentes cimentos ósseos, com ou sem suplementação de antibióticos, no desenvolvimento da membrana induzida em defeito femoral crítico (10 mm) em ratos. Houve aumento significativo da membrana de duas para quatro semanas e um nível constante de quatro para seis semanas. A adição de clindamicina, carbonato de cálcio e, em menor extensão, vancomicina

resultou em alterações significativas na espessura da membrana. Foi verificado aumento significativo no Palacos R + Gentamicina de duas para seis semanas e uma significativa diminuição em Copal Gentamicina + Clindamicina de duas para seis semanas. Também ocorreram alterações na porcentagem de tecido fibroso dentro da membrana e leves alterações na vascularização, dependendo dos produtos usados.

Para avaliar a eficácia da clindamicina na redução da infecção e no desenvolvimento da membrana induzida, Shah et al. (2017) implantaram espaçadores de polimetilmetacrilato poroso, com ou sem clindamicina, em defeitos femorais de 8 mm em ratos, com ou sem inoculação de *Staphylococcus aureus*. A clindamicina foi eficaz na mitigação do desenvolvimento de infecção em defeitos ósseos inoculados e restaurou o perfil da expressão do fator de crescimento e inflamatório ao redor do espaçador de polimetilmetacrilato. Além disso, a clindamicina teve efeito independente e interativo sobre a membrana induzida. A histologia qualitativa mostrou a presença de colágeno denso em todas as membranas, porém células inflamatórias foram vistas infiltrando a membrana no grupo inoculado com bactéria e sem antibiótico, ao passo que as membranas dos outros grupos foram menos celulares

Cueva et al. (2021) avaliaram a produção da membrana induzida em defeitos segmentares do rádio de galinhas aos sete, 15, 21 e 30 dias de pós-operatório. Pela análise histológica foram detectadas três zonas distintas aos 15 dias de pós-operatório, sendo uma camada celular em contato com o cimento ósseo, uma camada de fibras colágenas e uma de tecido conjuntivo desorganizado, fibroblastos ativos e vasos sanguíneos em contato com a musculatura. Com 21 dias de pós-operatório as camadas foram menos definidas, com áreas de cartilagem e osso, ao passo que com 30 dias a membrana mostrava mineralização difusa. Segundo os autores, pelas características histológicas, o tempo de 15 dias seria o mais adequado para se proceder o segundo estágio da técnica de membrana induzida por Masquelet.

2.2 Cimento ósseo

O polimetilmetacrilato tem sido empregado tanto na odontologia como na ortopedia, sendo neste último denominado cimento ósseo acrílico (MAGNAN et al., 2013). O cimento ósseo de polimetilmetacrilato tem sido usado em pacientes humanos há anos para a fixação de próteses (WANG e DUNNE, 2008; MAGNAN et al., 2013; CAVALU, 2017), mas também para o remodelamento de áreas comprometidas por tumores, cranioplastia, vertebroplastia e cifoplastia (WEBB e SPENCER, 2007; MAGNAN et al., 2013), assim como um liberador de antibiótico (KUEHN et al., 2005; VUGT et al., 2019).

A composição geralmente inclui: pó de polímero, o qual pode ter em sua composição polimetilmetacrilato e/ou copolímeros de metacrilato, iniciador de peróxido de benzoíla, radiopacificador (sulfato de bário ou dióxido de zircônio), antibióticos (sulfato de gentamicina, hidrocloreto de clindamicina, tobramicina, eritromicina ou metansulfonato de colistina), além de aditivos; monômero líquido, que pode ter na composição metilmetacrilato ou butilmetacrilato, ativador (N,N-Dimetil-p-toluidina ou 2-[4-(dimetilamino)fenil]etanol), inibidor (hidroquinona) e aditivos (WEBB e SPENCER, 2007; WANG e DUNNE, 2008). Embora cimentos ósseos comerciais apresentem formulações similares, existem várias diferenças em composição (CAVALU, 2017).

A estrutura do monômero de metilmetacrilato permite a polimerização em temperatura de sala para produzir polimetilmetacrilato sólido (WEBB e SPENCER, 2007). Na reação de polimerização ocorre a produção de calor, o qual pode ser responsável pela osteonecrose, sendo que o tempo de endurecimento pode variar em torno de 10 a 20 minutos (MAGNAN et al., 2013). Uma camada de 4 mm do cimento entre o osso e o implante faz com que a quantidade de calor liberado permaneça abaixo do limite em que ocorre a desnaturação das proteínas (PASSUTI e GOUIN, 2003). A temperatura máxima pode ser influenciada pela composição química do cimento, pela proporção pó e líquido e o radiopacificador utilizado (KUEHN et al., 2005).

O radiopacificador é empregado para possibilitar a visibilidade do cimento ósseo nos exames radiográficos (KUEHN et al., 2005). Além disso,

vários fatores podem interferir na performance do cimento ósseo acrílico, incluindo composição química, radiopacificadores, antibióticos, forma de preparação, viscosidade, porosidade, forma de esterilização, entre outros (KUEHN et al., 2005; CAVALU, 2017). A radiação gama encurta as cadeias do polímero e provavelmente afeta as propriedades mecânica, mas isto não é observado com a esterilização com óxido de etileno (WEBB e SPENCER, 2007).

O cimento ósseo de polimetilmetacrilato é um bom carreador para a liberação de antibióticos ao local de infecção (MAGNAN et al., 2013; VUGT et al., 2019). Geralmente há uma liberação rápida após a implantação (minutos a horas) com alta concentração de antibióticos, seguida por uma liberação sustentada por vários dias, com concentração mais baixa (VUGT et al., 2019). Os potenciais efeitos negativos do emprego do cimento ósseo impregnado com antibiótico incluem o risco de toxicidade sistêmica e a geração de organismos resistentes, pela exposição prolongada às concentrações sub-terapêuticas de antibiótico (HAYES et al., 2013; VUGT et al., 2019). Os antibióticos são incluídos ao pó do polímero antes de acrescentar o monômero, sendo incorporados entre as cadeias de polimetilmetacrilato durante o processo de polimerização (VUGT et al., 2019).

Contudo, muitos produtos comerciais já incorporam o antibiótico em sua composição, sendo um dos mais frequentes a gentamicina (KUEHN et al., 2005). Isto se deve ao bom espectro de atividade bactericida dependente da concentração, estabilidade térmica e alta solubilidade em água (WEBB e SPENCER, 2007). Foi citado que doses de antibióticos de menos que 1 grama por 40 grama de pó de polímero não tem influência na força tensil ou compressiva e não muda as características térmicas ou viscosidades (WANG e DUNNE, 2008). Muitos antibióticos podem ser lábeis ao calor ou causar efeito deletério ao cimento, tais como flucloxacilina, penicilinas e cloranfenicol (CAVALU, 2017). Tem sido citado que o uso de antibiótico líquido em vez de pó não foi necessariamente associado com perda de eficácia (HAYES et al., 2013).

Quando polimetilmetacrilato é empregado como pérolas em áreas infectadas em pacientes humanos, em geral, emprega-se como antibiótico um aminoglicosídeo como a gentamicina ou vancomicina (RODNER et al., 2003). Ambos antibióticos são liberados localmente em concentrações eficazes após

três a seis meses, quando da remoção ao ser usado como espaçador (MAGNAN et al., 2013). A combinação de gentamicina e clindamicina é também conhecida por ter efeito bactericida sinérgico (KUEHN et al., 2005). De acordo com Pellegrini e Suardi (2020), o uso de espaçador de cimento em revisão séptica de próteses em pacientes humanos tem sido efetuado com altas doses de antibióticos, que muitas vezes excede 2 gramas por 40 gramas de pó de cimento. Embora seja citado como seguro, existem relatos de falência renal aguda nestes pacientes, as quais foram revertidas após a remoção do espaçador. Parece que o risco da falência renal e perda de audição estão relacionados principalmente ao uso da gentamicina no cimento e pela rota sistêmica (PASSUTI e GOUIN, 2003).

Os dados sobre a farmacocinética disponível para uso de antibiótico impregnados em cimento ósseo em pacientes veterinários é considerado limitado, de forma que é considerado prudente levar em consideração a dosagem parenteral simultânea (HAYES et al., 2013).

Frascos de 1 grama de cefazolina e gentamicina (em alta e baixa doses) esterilizados a vapor, esterilizados a gás e não esterilizados foram misturados ao polimetilmetacrilato para avaliação, por Weisman et al. (2000), da eluição dos antibióticos e teste mecânicos. Os blocos de polimetilmetacrilato contendo antibiótico inibiram o crescimento do *Staphylococcus aureus* por uma média de nove dias. A concentração de cefazolina e gentamicina diminuíram dramaticamente após as primeiras 24 horas, mas permaneceram acima da concentração inibitória mínima ao longo do experimento (até 9 dias) para todos os grupos, exceto gentamicina em baixas doses. A força compressiva foi afetada pela adição dos antibióticos.

Phillips et al. (2007) compararam a eluição *in vitro* de pérolas de polimetilmetacrilato com amicacina, cefazolina ou com os antibióticos combinados. Após liberação inicial nas primeiras 24 horas, as taxas de liberação diminuíram para ambos antibióticos isolados e também na combinação. A eluição das pérolas contendo somente amicacina ou cefazolina foram suficientemente maiores do que a concentração inibitória mínima para patógenos comuns em feridas, por no mínimo 30 dias, fato não verificado com os antibióticos combinados. Portanto, a combinação destes antibióticos não foi recomendada.

As características da eluição da cefazolina a partir de pérolas de polimetilmetacrilato de três diferentes marcas comerciais (SmartSet HV, Depuy I e Cemfix 3) e de pérolas de sulfato de cálcio foram avaliadas por Udomkusonsri et al. (2012). A proporção foi de 1 grama de cefazolina para 10 gramas do polimetilmetacrilato ou sulfato de cálcio, sendo as pérolas esterilizadas com óxido de etileno. Os dois tipos de pérolas apresentaram atividade antibacteriana. A eluição da cefazolina, analisada por 15 dias, foi considerada bifásica, com ótima eluição no período inicial e diminuição rápida depois disso. Foi detectada pouca diferença entre os três tipos de pérolas de polimetilmetacrilato, o que foi relacionado as porcentagens de polimetilmetacrilato nos produtos comerciais.

Por sua vez, em aves as pérolas de polimetilmetacrilato têm sido usadas, de acordo com Forbes (2000), no tratamento de “bumblefoot”, osteomielite e outras infecções localizadas. Existem citações de 1 a 2 gramas de pó de antibiótico incorporado com 40-60 gramas ou com 20 gramas de polimetilmetacrilato. O autor também chama a atenção para antibióticos lábeis ao calor tais como tetraciclina, cloranfenicol, polimixina B, eritromicina, bacitracina, ceftiazida. Entre os possíveis de utilização encontram-se a gentamicina, amicacina, neomicina, lincomicina e clindamicina,

2.3 Fraturas e defeitos ósseos em aves

As fraturas estão entre as condições ortopédicas mais comuns em aves (CARRASCO, 2019). Os ossos das aves têm uma série de particularidades quando comparados aos dos mamíferos, tais como ossos frágeis e com corticais mais finas, sendo alguns ossos pneumáticos, fatos que interferem nos métodos de tratamento (DONELEY, 2010; DARROW e BENNETT, 2022). O osso longo tem pouca ou nenhuma organização dentro dos sistemas Haversianos (COLES, 2007). Além disso, o êxito do tratamento da fratura está associado ao estilo de vida do pássaro e a demanda física requerida (PONDER e REDIG, 2016; CARRASCO, 2019). A estabilidade clínica de uma fratura ocorre entre duas e três semanas e geralmente precede a evidência radiográfica de consolidação em torno de três a seis semanas (DONELEY, 2010).

As fraturas expostas e contaminadas não são incomuns em aves e, quando desenvolvem osteomielite, o debridamento da área é crítico para o sucesso (SCOTT, 2016). Vários organismos têm sido isolados em casos de osteomielites, mas coliformes são comuns e algumas vezes se observa anaeróbicos (COLES, 2007). Fraturas cominutivas em que os fragmentos ósseos perderam a conexão com os tecidos moles frequentemente desenvolvem sequestro ósseo (PONDER e REDIG, 2016; GROSSO, 2019). Áreas com osso desvitalizado ou morto precisam ser removidas, porém se compreendem uma grande área ou circunferência inteira, a fratura pode não ser reparável (SCOTT, 2016). Se menos que 25% do comprimento do úmero for perdido, a ave pode se adaptar e aprender a voar (COLES, 2007).

Os sinais de osteomielite incluem drenagem sanguinolenta da incisão e achados radiográficos de áreas difusas e indistintas do periósteo, mas muitas vezes difíceis de diferenciar do processo normal de consolidação, além da presença de espículas ósseas (SCOTT, 2016). Como aves não geram muita reação periosteal durante a consolidação da fratura, o mesmo ocorre com a osteomielite, assim a osteólise junto com o edema de tecido mole são as anormalidades radiográficas predominantes (GROSSO, 2019). A ave pode também apresentar contagem elevada de leucócitos e sinais clínicos não específicos como anorexia ou queda da asa (PONDER e REDIG, 2016).

Em caso de infecção, o antibiótico deve ser baseado na cultura e antibiograma, porém em rapinantes tem sido indicada a clindamicina pela penetração no osso (SCOTT, 2016). Outros autores também indicam a clindamicina ou amoxicilina com ácido clavulânico em fraturas exposta, cominutivas e infectadas (DONELEY, 2010).

As cefalosporinas penetram o osso e seu uso profilático para cirurgia é recomendado, sendo a excreção efetuada pelos rins (TULLY, 2010). São consideradas relativamente não tóxicas e possuem capacidade de inibir a formação da parede celular bacteriana e são bactericidas no crescimento e divisão de organismos (FLAMMER, 1999). As primeiras gerações de cefalosporinas são mais efetivas contra bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, porém as gerações mais complexas (segunda e terceira) possuem atividade aumentada nas Gram-negativas, mas a atividade contra Gram-positivas é reduzida (FLAMMER, 1999). A cefazolina encontra-se na

primeira geração de cefalosporinas, cuja dosagem tem sido referida como de 25-75 mg/kg a cada 8-12 horas para a maioria das espécies aviárias e de 50-100 mg/kg para rapinantes (TULLY, 2010). As cefalosporinas são potencialmente sinérgicas com os aminoglicosídeos (FLAMMER, 1999).

De acordo com Darrow e Bennett (2022), nos casos de defeitos ósseos grandes têm sido usado enxerto autólogo, porém o volume é pequeno em aves, ou aloenxertos, os quais aparentemente possuem poucos benefícios devido às complicações. Outra opção promissora é a matriz óssea desmineralizada.

Fraturas transversais induzidas no úmero de pombos foram tratadas, por MacCoy e Haschek (1988), com xenoenxertos e aloenxertos corticais esterilizados com óxido de etileno. Nenhum dos enxertos contribuíram ou interferiram com a consolidação óssea; contudo, foi detectada aumento significativo do número de deiscência das feridas cirúrgicas e infecção local, sequestro do enxerto e reação de corpo estranho.

Por outro lado, Wander et al. (2000) investigaram o emprego de pinos ósseos corticais de xenoenxerto (avestruz ou cão), os quais foram comparados com o fio de Kirschner no reparo de fratura do úmero de pombos. Após a confecção das pontas dos pinos de xenoenxertos, estes foram esterilizados com plasma de gás de H₂O₂ e novamente conservados a -70°C. Os pinos de xenoenxertos induziram reação inflamatória mononuclear que não prejudicou a consolidação óssea, além de apresentarem mais calo periosteal e inflamação no local da fratura do que os ossos estabilizados com fio de Kirschner.

A distração osteogênica com o uso de fixador esquelético externo circular foi aplicada, por Bueno et al. (2019), para o restabelecimento do comprimento do membro pélvico em dois rapinantes (falcão peregrino e corujão-orelhudo), os quais apresentavam encurtamento ósseo decorrentes de complicações no tratamento de fratura do tibiotarso. Após a recuperação, ambas as aves foram soltas.

Por sua vez, a osteogênese com transporte ósseo foi utilizada por Johnston et al. (2008), com emprego de um fixador circular, em um papagaio-de-nuca-amarela, com perda óssea consequente à falha no tratamento de fratura

tibiotarso. Após sete semanas houve formação óssea na falha, mas a área de acoplamento não consolidou, sendo necessárias mais duas cirurgias para debridamento das extremidades ósseas e estimular a consolidação, sendo a fratura mantida com fixador esquelético tipo I.

3 REFERÊNCIAS

- ALFORD, A.I., NICOLAOU, D., HAKE, M., MCBRIDE-GAGYI, S. Masquelet's induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *J. Orthop. Res.*, v.39, n.4, p.707-718, 2021.
- ALT, V.; GIANNOUDIS, P.V. Musculoskeletal infections - A global burden and a new subsection in Injury. *Injury*, v.50, n.12, p.2152-2153, 2019.
- BUENO, I., ANDERSON, G., WILLETTE, M., REDIG, P.T., PONDER, J. Distraction osteogenesis in two wild raptors. *J. Avian Med. Surg.*, v.33, n.4, p.427-436, 2019.
- CARRASCO, D.C. Fracture management in avian species. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, v.22, n.2, p.223-238, 2019.
- CAVALU, S. Acrylic bone cements: new insight and future perspective. *Key Eng. Mater.*, v.745, p.39-49, 2017.
- COLES, B.H. Surgery. In:__. *Essentials of avian medicine and surgery*. 3rd ed. Blackwell Publishing, 2007. p.142-182.
- CUEVA, L.; RAHAL, S.C.; FONSECA-ALVES, C.E.; BONATELLI, S.P.; MAMPRIM, M.J.; FRANCA, C.; BURINI, C.; MESQUITA, L.R. Masquelet-induced membrane characteristics in chicken radii bone defects. *J. Avian Med. Surg.*, v.35, n.1, p.51-59, 2021.
- DARROW, B.; BENNETT, A. Avian orthopedics. In: BENNETT, R.A.; PYE, G.W. *Surgery of exotic animals*. Hoboken: Wiley Blackwell, 2022. p.112-153.
- DONELEY, B. Surgery. In:__. *Avian medicine and surgery in practice*. London: Manson Publishing Ltda., 2010. p.255-284.
- FLAMMER, K. Antimicrobial therapy. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth: Wingers Publishing, 1999. p.434-656.

- FORBES, N.A. antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads in the treatment of bumblefoot, osteomyelitis and other localized infections in birds. *Echuca*, p.81-87, 2000.
- 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.
- GROSSO, F.V. Orthopedic diagnostic imaging in exotic pets. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, v.22, n.2, p.149-173, 2019.
- 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.
- HAYES, G.; MOENS, N.; GIBSON, T. A review of local antibiotic implants and applications to veterinary orthopaedic surgery. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, v.26, n.4, p.251-259, 2013.
- 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.382-396, 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.
- KUEHN, K.D.; EGE, W.; GOPP, U. (2005). Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthop. Clin. North Am.*, v.36, n.1, p.17-28, 2005.
- 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.; HASCHEK, W.M. Healing of transverse humeral fractures in pigeons treated with ethylene oxide-sterilized, dry-stored, onlay cortical xenografts and allografts. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, n.1, p.106-111, 1988.

- MAGNAN, B.; BONDI, M.; MALUTA, T.; SAMAILA, E.; SCHIRRU, L.; DALL'OCA, C. Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskelet. Surg.*, v.97, n.2, p.93-10, 2013.
- MASQUELET, A.C. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch. Surg.*, v.388, p.344–6, 2003.
- MASQUELET, A.C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop. Clin. N. Am.*, v.41, p.27–37, 2010.
- MASQUELET, A.C. Induced membrane technique: pearls and pitfalls. *J. Orthop. Trauma*, v.31, n.Suppl 5, p.S36-S38, 2017.
- 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.
- PASSUTI, N.; GOUIN, F. Antibiotic-loaded bone cement in orthopedic surgery. *Joint Bone Spine*, v.70, n.3, p.169-174, 2003.
- PELLEGRINI, A.V.; SUARDI, V. Antibiotics and cement: what I need to know?. *Hip Int.*, v.30, n.1_suppl, p.48-53, 2020.
- 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.
- PHILLIPS, H.; BOOTHE, D.M.; SHOFER, F.; DAVIDSON, J.S.; BENNETT, R.A. *In vitro* elution studies of amikacin and cefazolin from polymethylmethacrylate. *Vet. Surg.*, v.36, n.3, p.272-278, 2007.
- PONDER, J.B.; REDIG, P. Orthopedics. In: SPEER, B.L. Current therapy in avian medicine and surgery. St. Louis: Elsevier, 2016. p.657-667.
- RODNER, C.M; BROWNER, B.D.; PESANTI, E. Chronic osteomyelitis. In: BROWNER, B.D.; JUPITER, J.B.; LEVINE, A.M.; TRAFTON, P.G. *Skeletal trauma: basic science, management, and reconstruction*. 3rd. Philadelphia: Saunders, 2003. p.483-506.

- SCHÖTTLE, P.B.; WERNER, C.M.; DUMONT, C.E. Two-stage reconstruction with free vascularized soft tissue transfer and conventional bone graft for infected nonunions of the tibia: 6 patients followed for 1.5 to 5 years. *Acta Orthop.*, v.76, n.6, p.878–883, 2005.
- SCOTT, D.E. Orthopedics. In: _____. *Raptor medicine, surgery, and rehabilitation*. 2nd. Oxfordshire: CABI, 2016. p.165-208.
- SHAH, S.R.; SMITH, B.T.; TATARA, A.M.; MOLINA, E.R.; LEE, E.J.; PIEPERGERDES, T.C.; UHRIG, B.A.; GULDBERG, R.E.; BENNETT, G.N.; WENKE, J.C.; MIKOS, A.G. Effects of local antibiotic delivery from porous space maintainers on infection clearance and induction of an osteogenic membrane in an infected bone defect. *Tissue Eng. Part A*, v.23, n.3-4, p.91–100, 2017.
- TULLY, T.N. Appendices. In: COLES, B.H. *Essentials of avian medicine and surgery*. 3rd ed. Blackwell Publishing, 2007. p.219-265.
- UDOMKUSONSRI, P., KAEWMOKUL, S., ARTHITVONG, S., PHAOCHOOSAK, N. Elution profiles of cefazolin from PMMA and calcium sulfate beads prepared from commercial cefazolin formulations. *J. Vet. Med. Sci.*, v.74, n.3, p.301-305, 2012.
- VUGT, T.A.G.; ARTS, J.J.; GEURTS, J.A.P. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate beads and spacers in treatment of orthopedic infections and the role of biofilm formation. *Front. Microbiol.*, v.10, n.1626, p.1-11, 2019.
- VIATEAU, V.; BENSIDHOUM, M.; GUILLEMIN, G.; PETITE, H.; HANNOUCHE, D.; ANAGNOSTOU, F.; PÉLISSIER, P. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *Orthop. Clin. North. Am.*, v.41, n.1, p.49-56, 2010.
- 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.
- WANG, J-S.; DUNNE, N. Bone cement fixation: acrylic cements. In: REVELL, P.A. *Joint replacement technology*. United Kingdom: Woodhead Publishing, 2008. p.212-251.
- WEBB, J.C.; SPENCER, R.F. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg. Br.*, v.89, n.7, p.851-857, 2007.

WEISMAN, D.L.; OLMSTEAD, M.L.; KOWALSKI, J.J. *In vitro* evaluation of antibiotic elution from polymethylmethacrylate (PMMA) and mechanical assessment of antibiotic-PMMA composites. *Vet. Surg.*, v.29, n.3, p.245-251, 2000.

CAPÍTULO 2

ARTIGO CIENTÍFICO 1

NORMAS DA REVISTA

Animals - MDPI

<https://www.mdpi.com/journal/animals/instructions>

Técnica da membrana induzida usando cimento ósseo ortopédico, acrescido ou não de antibiótico, em defeito segmentar promovido no rádio de galinhas (*Gallus gallus domesticus*)

RESUMO

O estudo avaliou, por meio de exames radiográficos e histológicos, membranas induzidas pela técnica de Masquelet com o emprego de cimento ósseo ortopédico, acrescido ou não de antibiótico, em modelo de falha óssea segmentar induzida no rádio de galinhas. Foram utilizadas 30 galinhas híbridas, com idade média de 18 meses, as quais foram divididas em dois grupos equitativos: G1 – cimento ósseo ortopédico; G2 – cimento ósseo ortopédico acrescido de cefazolina em pó. Foram efetuados exames radiográficos do antebraço esquerdo no pós-operatório imediato e aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório. Para a coleta da membrana induzida, procedeu-se em todos os grupos a eutanásia de cinco aves aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório. Radiograficamente, em ambos os grupos o cimento ósseo foi identificado como uma massa radiopaca ocupando a falha óssea. Discreto início de proliferação óssea em pelo menos uma das extremidades foi visibilizado apenas com 21 dias de pós-operatório. Pela análise histológica não houve diferença na espessura média entre os grupos em todos os momentos. As células multinucleadas multifocais diferiram entre os grupos aos 7 (G1>G2) e 21 (G2>G1) dias após a cirurgia. O infiltrado inflamatório mononuclear diferiu entre os grupos apenas no dia 21 (G1>G2). A proliferação de tecido fibroso não diferiu entre os grupos em todos os momentos de avaliação. A densidade dos vasos sanguíneos diferiu apenas aos 21 dias de pós-operatório (G2<G1). As áreas multifocais da cartilagem diferiram entre os grupos em todos os momentos (G1>G2). Em conclusão, a cefazolina misturada ao cimento ósseo não afetou a espessura da membrana induzida, mas apresentou efeito negativo em alguns aspectos histológicos.

INTRODUÇÃO

As estratégias para o tratamento de perdas ósseas e infecções, que induzem falhas ósseas extensas, têm sido constantemente melhoradas em pacientes humanos (HAN et al., 2017; ALT e GIANNOUDIS, 2019) e o mesmo pode ser estendido ao paciente veterinário, inclusive em aves, com relatos de distração osteogênica, transporte ósseo, ou o uso de matriz óssea desmineralizada (JOHNSTON et al., 2008; BUENO et al.; 2019; DARROW e BENNETT, 2022). Apesar das possibilidades cirúrgicas, deve também ser levada em consideração a complexidade do método, curva de aprendizado, tempo de uso do método de estabilização, número de procedimentos necessários, osso acometido, presença de infecção, custo e a função que a ave se destina.

A técnica da membrana induzida de Masquelet tem sido introduzida em medicina humana como uma opção menos complexa para o tratamento de falhas ósseas, comparada aos métodos de transporte ósseo e autoenxerto de osso vascularizado (GIANNOUDIS et al., 2011; MASQUELET, 2017; ALFORD et al., 2021). O procedimento é desenvolvido por meio de dois estágios: no primeiro, com o osso estabilizado faz-se o debridamento da área comprometida e aplica-se no defeito ósseo o cimento ósseo de polimetilmetacrilato, o qual atua como um espaçador e como indutor de membrana; no segundo, o espaçador é removido com seis a oito semanas e o defeito é preenchido com enxerto autólogo, de forma que a membrana induzida auxilia na revascularização, previne a reabsorção do enxerto e favorece a corticalização (MASQUELET, 2003; MASQUELET e BEGUE, 2010; VIATEAU et al., 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; MASQUELET, 2017; ALFORD et al., 2021). Em aves, a técnica da membrana induzida de Masquelet tem sido testada em sua primeira fase em galinhas, mostrando as características da membrana em diferentes tempos de permanência do cimento ósseo (CUEVA et al., 2021).

Outro fato a se destacar é que a produção da membrana induzida pode ser afetada por aditivos, tais como o sulfato de bário (MASQUELET, 2017) e antibióticos (NAU et al., 2016). Entretanto, existem controvérsias quanto a validade do emprego ou não de antibióticos, juntamente com o cimento ósseo, na produção da membrana induzida em pacientes humanos (SCHÖTTLE et al., 2005;

GIANNOUDIS et al., 2011; MASQUELET, 2017). Por sua vez, em aves estas combinações, pelo conhecimento dos autores, ainda não foram avaliadas.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de exames radiográficos e histológicos, membranas induzidas pela técnica de Masquelet com o emprego de cimento ósseo ortopédico, acrescidos ou não de antibiótico, em modelo de falha óssea segmentar induzida no rádio de galinhas.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e Ambiente de Experimentação

A metodologia adotada no presente estudo foi analisada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, 0108/2020-CEUA (Anexo I).

Foram utilizadas 30 galinhas de postura (*Gallus gallus domesticus*), híginas, com idade média de 18 meses, pesando entre 1 e 1,8 kg (Média $1,4 \pm 0,3$ kg). As aves foram mantidas livres, em espaço (4,0 m largura x 12,0 m comprimento x 3,0 m altura) com ventilação natural, nas dependências do Hospital Veterinário Duovet em Ji-Paraná – RO. Todas receberam ração comercial e água *ad libitum*. Antes do estudo, as aves passaram por período de adaptação de 20 dias, no qual foram pesadas, vermifugadas com ivermectina na dose de 0,2 mg/kg, por via subcutânea, e identificadas pelo emprego de anilha em membro pélvico.

Na sequência, foram divididas mediante sorteio em dois grupos com 15 aves cada um: Grupo 1 – cimento ósseo ortopédico, Grupo 2 – cimento ósseo ortopédico acrescido de cefazolina em pó.

2.2. Anestesia e Procedimento cirúrgico

Após jejum sólido e hídrico de seis horas, cada ave foi pré-medcada com cloridrato de tramadol (8 mg/kg), midazolam (1 mg/kg) e cloridrato de cetamina (5 mg/kg), pela via intramuscular (IM) no músculo peitoral. Decorrido 20 minutos, a anestesia geral foi induzida com isofluorano administrado por máscara, seguida da intubação com sonda endotraqueal nº 3 sem cuff. O isofluorano foi utilizado

para manutenção da anestesia geral, em circuito anestésico aberto, vaporizado a oxigênio 100%. Durante o procedimento cirúrgico, foram monitoradas a pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória, ETCO₂ e oximetria.

Na sequência, as aves foram posicionadas em decúbito dorsal, sobre colchão térmico aquecido, e procedeu-se a remoção manual das penas na região medial do antebraço esquerdo. Com a asa estendida, foi efetuada a antissepsia da pele com solução de acetato de clorexidina, seguida da aplicação dos campos operatórios. Baseado no previamente descrito (CUEVA et al., 2021), foi efetuada incisão de pele no aspecto ventral do rádio esquerdo, sendo então afastados os músculos extensor radial do metacarpo cranialmente e o músculo pronador profundo caudalmente, com auxílio de afastadores (Figura 1a). Após o isolamento do rádio dos tecidos moles circundantes, foi promovida falha segmentar centrada na porção média diafisária com excisão de 1,5 cm do rádio, com auxílio de serra oscilatória (Figura 1b). Para padronização empregou-se molde de alumínio para marcação.

No Grupo 1, a falha segmentar foi preenchida com cimento ósseo ortopédico (C-VET; CIMTECH, Rio Claro, São Paulo, Brasil), na fase pastosa em formato de cilindro (Figura 1c). Iniciada a polimerização, a área foi irrigada com solução salina 0,9%, seguida da aproximação dos tecidos moles com pontos isolados em Sultan, com fio de náilon 5-0. No tecido subcutâneo utilizou-se sutura contínua tipo Cushing com náilon 5-0 e na pele pontos isolados simples com náilon 3-0. No Grupo 2 realizou-se o mesmo procedimento cirúrgico, porém o cimento foi acrescido cefazolina sódica em pó (Cefazolina sódica; ABL, Cosmópolis, SP, Brasil). O componente líquido do cimento ortopédico continha Monometil Metacrilato, NN Dimethyl-p-toluidina e Hidroquinona, ao passo que o pó continha Polimetilmetacrilato, Sulfato de bário e Peróxido de Benzoil. A esterilização, segundo o fabricante, é por óxido de etileno. Foi empregada uma proporção de 0,54 g de cimento ósseo e 0,104 g de cefazolina.

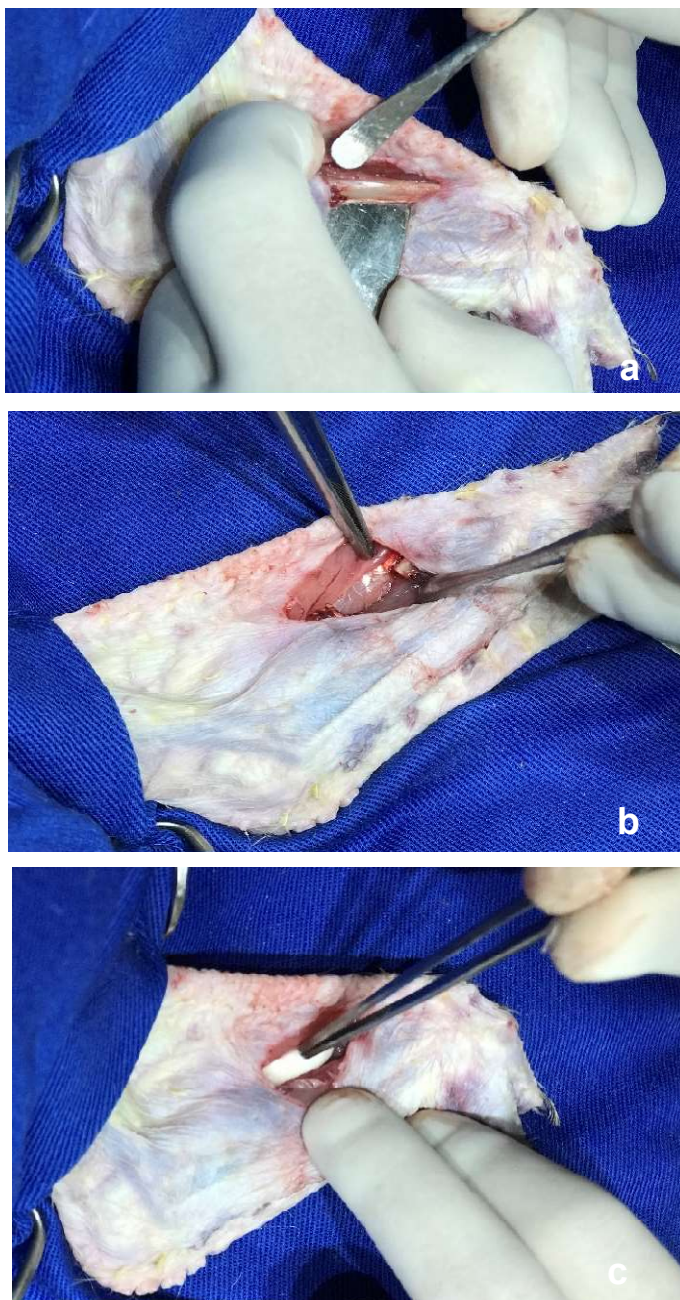


Figura 1. Sequência cirúrgica mostrando o afastamento muscular para identificação do rádio (a), defeito segmentar (b), aplicação do cimento ósseo ortopédico em forma de cilindro na falha segmentar (c).

2.3. Condutas pré e pós-operatória

Uma única dose de cefazolina (50 mg/kg, IM) foi aplicada no momento do procedimento anestésico. Foi também utilizado o meloxicam (0,5 mg/kg, IM, a cada 24 horas), no dia do procedimento cirúrgico e por mais cinco dias. A limpeza

diária da ferida cirúrgica foi efetuada com clorexidina a 2% e solução fisiológica 0,9%. Foi também aplicada bandagem, a qual foi trocada a cada 24 horas, durante sete dias.

Promoveu-se também uma restrição de espaço, durante todo o período pós-operatório. As aves foram pesadas individualmente aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

2.4. Avaliação radiográfica

No pós-operatório imediato e aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório, conforme o tempo de observação, foram efetuados exames radiográficos digitais do antebraço esquerdo, por profissional capacitado, nas projeções caudo-cranial e médio-lateral, com as aves imobilizadas mediante contenção física. Empregou-se equipamento radiográfico móvel (EPX-F1600 B 1.6KW, 90KV/20MA, Oxson®) e sistema de revelação digital Examvue DR®, com técnica de 3 mAs e 40 kV e distância foco-filme de 80 cm, pertencentes ao Hospital Veterinário Duovet. Foram avaliados o alinhamento e manutenção da falha óssea, mudanças do aspecto radiográficos dos produtos e proliferação óssea.

2.5. Análise histológica

Para a coleta da membrana induzida, procedeu-se em todos os grupos a eutanásia de cinco aves aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório. Para tanto, inicialmente foi administrada, por via IM, a combinação de cloridrato de cetamina (30 mg/kg), cloridrato de xilazina (4 mg/kg) e tramadol (8 mg/kg). Após obtido plano anestésico profundo com auxílio de máscara com isoflurano, foi administrado bolus de cloreto de potássio por via intravenosa até a obtenção de parada cardiorrespiratória.

As membranas de indução de Masquelet, assim como as extremidades proximal e distal do rádio esquerdo na falha segmentar, foram coletadas (Figura 2a) e armazenadas em formol tamponado 10% (Figura 2b). O rádio foi descalcificado em solução de EDTA a 10%. Posteriormente, tanto o rádio quanto as membranas de Masquelet foram processados de forma rotineira, cortadas em secções de 5 e 2-3 micrômetros de espessura e coradas com Hematoxilina-eosina, respectivamente. O processamento das amostras foi realizado no

laboratório de Patologia Veterinária - HOVET da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), campus de Cuiabá.



Figura 2. Coleta da membrana induzida com 15 dias de pós-operatório (a) e armazenamento em formalina desta e das extremidades proximal e distal do rádio (b).

As membranas induzidas e extremidades ósseas foram avaliadas por parâmetros histológicos qualitativos e quanto ao grau de intensidade: ausente (-), leve (+), moderado (++) e acentuado (+++).

Além disso, a membrana de Masquelet foi avaliada para dois parâmetros qualitativos: espessura e densidade de vasos sanguíneos. Para tanto, foram capturadas imagens digitais (1600 x 1200 pixels; 32bits/pixel; RGB) das lâminas histológicas utilizando o microscópio óptico (ZEISS AXIO SCOPE.A1, Germany). Para o parâmetro da espessura da membrana induzida foram capturadas três imagens digitais/animal em um aumento microscópico de 2,5x, nas quais procedeu-se a mensuração em três locais distintos, perfazendo nove medidas por membrana/animal (Figura 3). Para o parâmetro de densidade de vasos sanguíneos, as imagens digitais foram capturadas em um aumento microscópico de 20x, estas foram analisadas sobrepondo-se uma grade (50x50µm) e realizado uma contagem manual dos vasos sanguíneos, como critério de inclusão, considerou-se apenas estruturas formadas de uma a três camadas e revestidas

por endotélio vascular com ou sem hemácias (Figura 4). Todas estas mensurações foram realizadas no software QuPath-0.3.2.

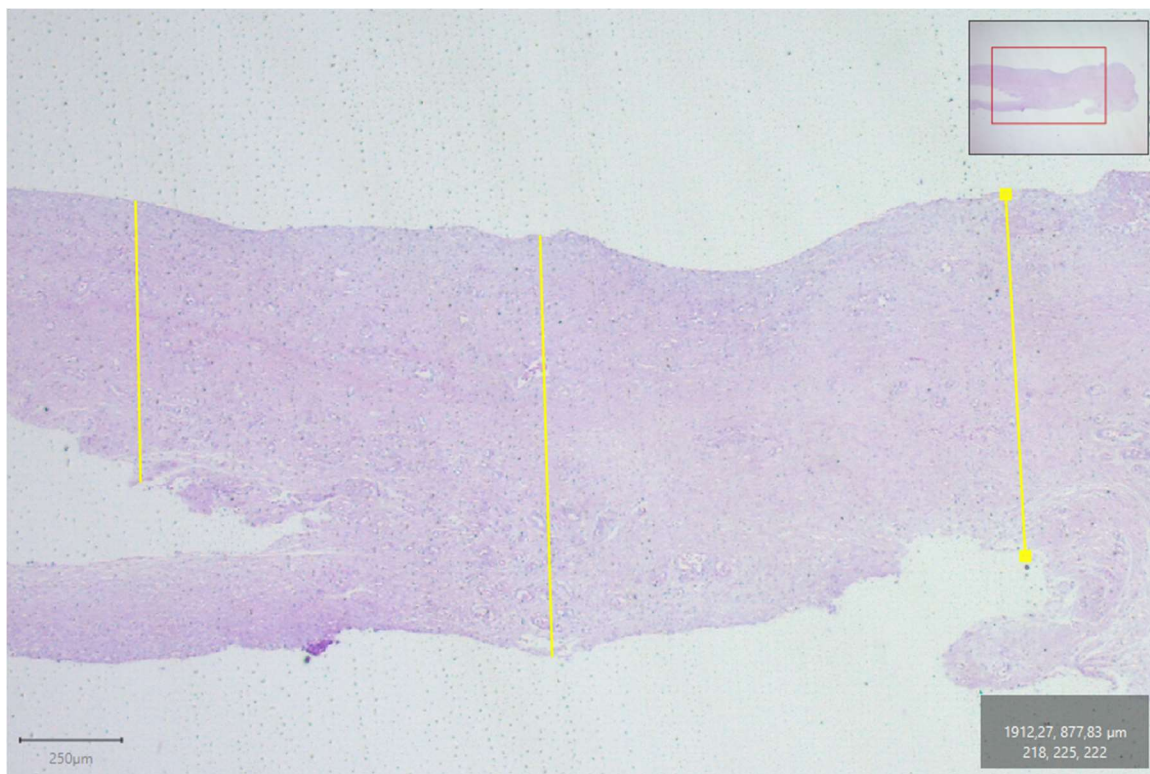


Figura 3. Exemplo de mensuração da membrana induzida em três locais distintos (linhas amarelas) em uma ave do Grupo 1 (cimento ósseo) aos 21 dias de pós-operatório, empregando o software QuPath-0.3.2. Aumento de 2,5X

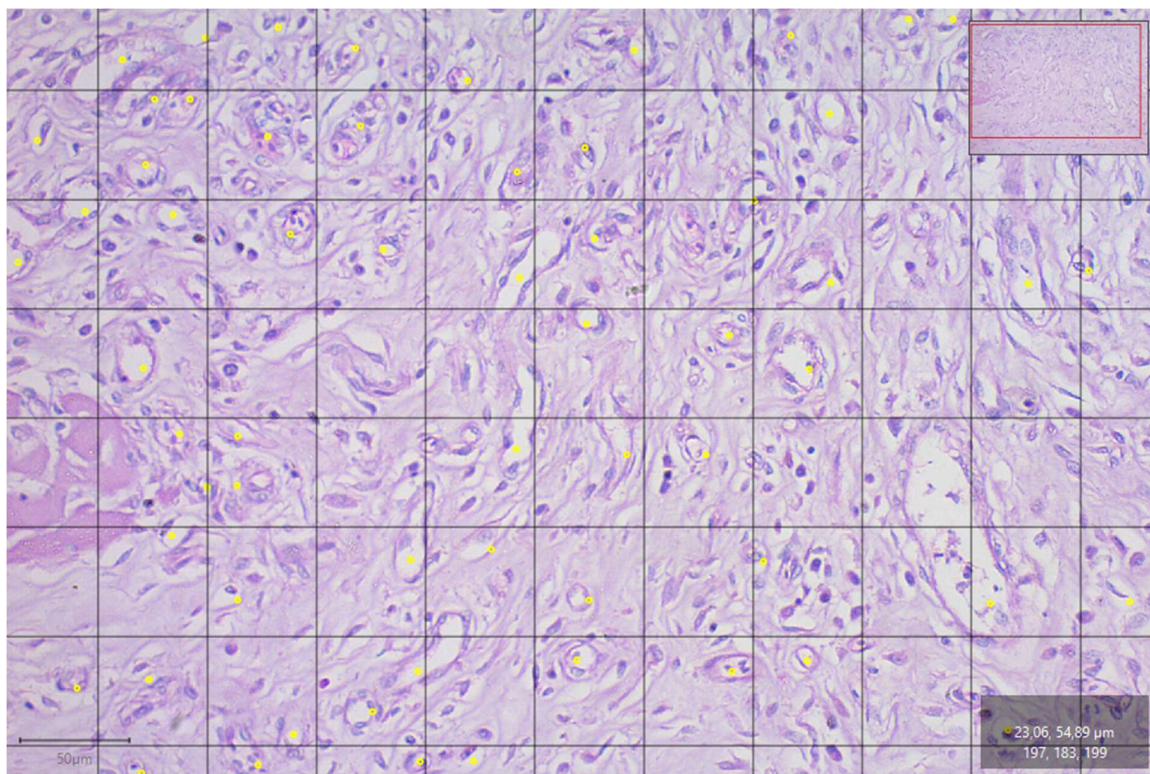


Figura 4. Exemplo da marcação para contagem de vasos sanguíneos (pontos em amarelo) da membrana induzida em uma ave do Grupo 1 (cimento ósseo), aos 21 dias de pós-operatório, empregando o software QuPath-0.3.2. Aumento de 20X

2.9. Análise estatística

Foi realizado o teste t (Student) para comparação entre os dois grupos, em cada momento. Dentro de cada grupo separadamente, foi realizada a análise de variância para verificar como cada parâmetro se comportou ao longo das semanas e, quando houve significância, foi realizado o teste de Tukey para a comparação das médias, para a avaliação da espessura média das membranas e para o número de vasos por área. Para a avaliação dos dados histológicos das membranas e das extremidades ósseas foi estabelecida a porcentagem de animais que apresentavam cada alteração, por grupo e por momento, sendo efetuado o teste de χ^2 (Qui-quadrado) para comparação das porcentagens. Em todas as análises, os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$. Para a análise dos dados foi utilizado os programas estatísticos Bio Estat 5.0 e SigmaStat 3.5.

RESULTADOS

1. Avaliações clínicas

A conduta anestésica permitiu a realização do procedimento cirúrgico sem intercorrências, além de retorno precoce e satisfatório. A alimentação foi retornada pelas aves após aproximadamente quatro horas da intervenção. Durante o período pós-operatório, não foram detectadas alteração da locomoção ou do posicionamento das asas. Além disso, todas as galinhas se alimentaram normalmente. Nenhuma ave induziu auto-traumatismo na área cirúrgica.

2. Exames radiográficos

No exame radiográfico do pós-operatório imediato das aves dos Grupos 1 e 2 visualizou-se a presença do cimento ósseo ocupando a falha óssea, como uma massa radiopaca bem delimitada, com densidade próxima ao tecido ósseo (Figura 5). Aos sete e 15 dias de pós-operatório a visualização se manteve similar. Com 21 dias de pós-operatório, havia discretos sinais de início de proliferação óssea em pelo menos uma das extremidades. Foram detectados deslocamentos de leve a moderado do cimento ósseo em 57,22% de um total de 30 aves avaliadas.

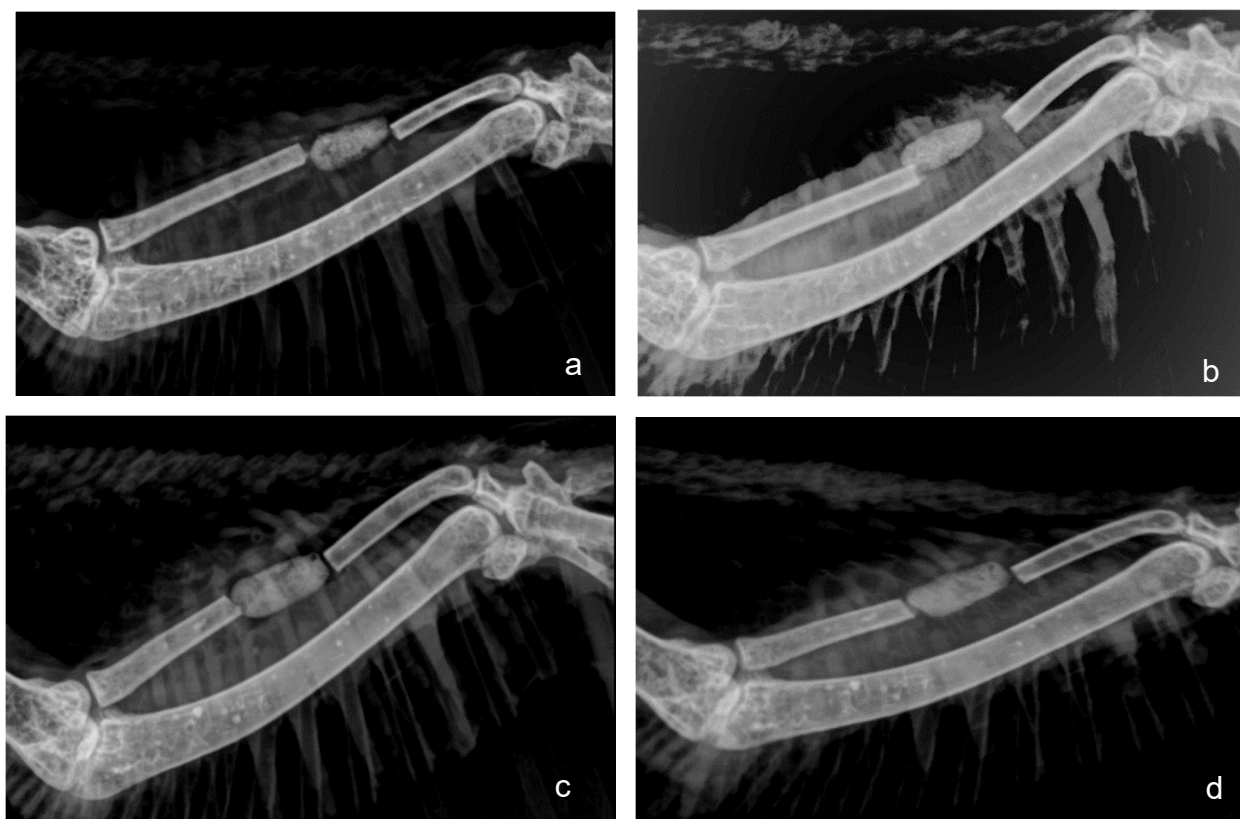


Figura 5. Projeções radiográficas médio-laterais de aves dos Grupo 1 (cimento ósseo ortopédico) no pós-operatório imediato (a) e 21 dias após a cirurgia (b) e de aves do Grupo 2 (cimento ósseo ortopédico acrescido de cefazolina em pó) no pós-operatório imediato (c) e 21 dias após a cirurgia (d). Em ambos os grupos se visualiza o cimento ósseo ocupando a falha óssea, como uma massa radiopaca bem delimitada, com densidade próxima ao tecido ósseo, com discretos sinais de proliferação óssea na extremidade proximal. No Grupo 1 nota-se o deslocamento do cimento ósseo com 21 dias de pós-operatório (b).

3. Avaliações histológicas

Membrana induzida

Nas aves do Grupo 1, aos sete dias de pós-operatório, verificou-se a proliferação de tecido fibrovascular composto de células fusiformes e de núcleo claro (fibroblasto), bem como células poligonais com citoplasma amplo e núcleo claro e levemente arredondado (histiócito), contendo múltiplas áreas de material eosinofílico fragmentado – fibra muscular necrótica (Figura 6a). Em um animal a membrana não foi identificada. Com 15 dias de pós-operatório detectou-se proliferação de tecido fibroso, composto por células poligonais a fusiformes, desorganizado, frouxo e de moderado a altamente vascularizado, além de área focal de metaplasia mixoide e áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (Figura 6b). Aos 21 dias após a cirurgia havia proliferação de tecido fibroso, composto por células poligonais a fusiformes; contudo, em apenas uma ave observou-se duas camadas bem distintas (densa e frouxa), sendo altamente vascularizadas (Figura 6c).

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 1.

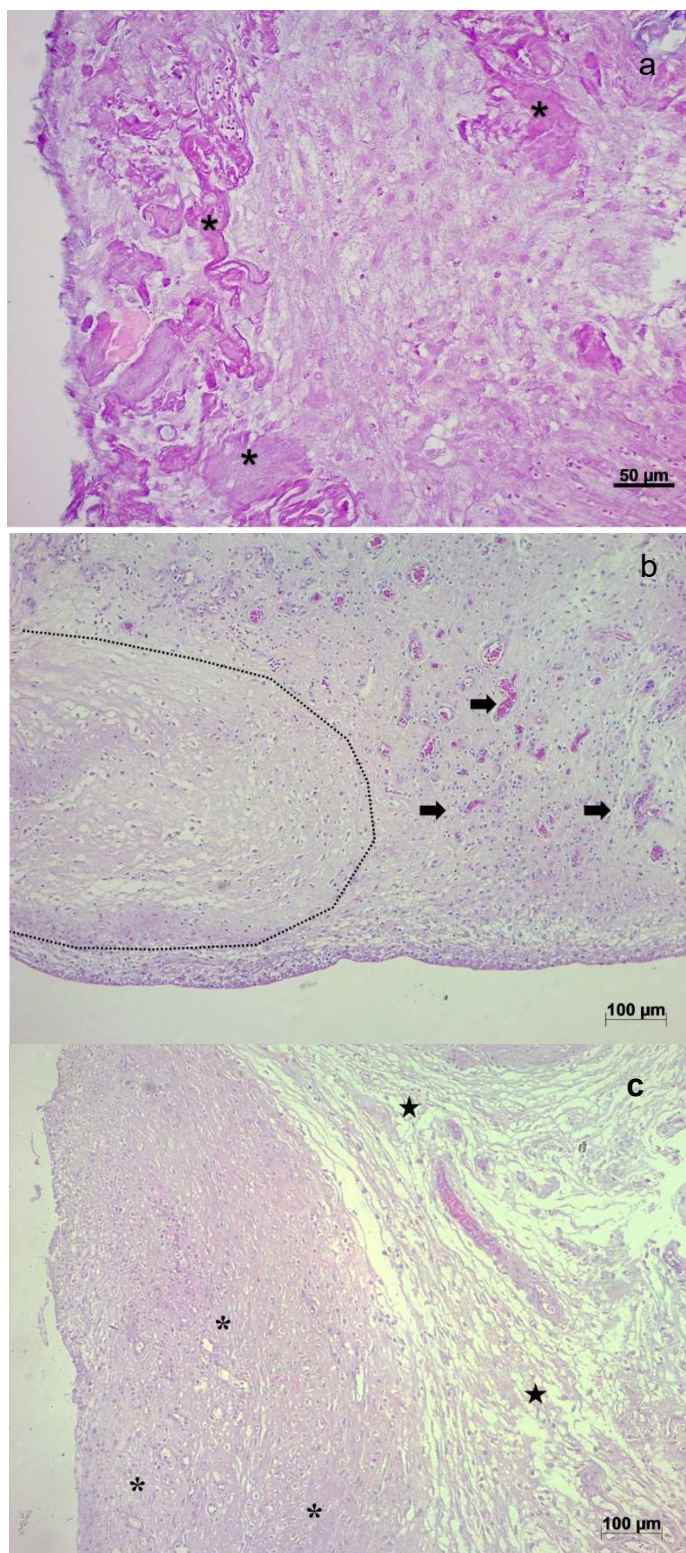


Figura 6. Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com cimento ósseo ortopédico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Proliferação de tecido fibrovascular contendo fibroblastos e histiócitos, e fibra muscular necrótica (asteriscos). HE, 20x. (b) Proliferação acentuada de tecido fibroso, desorganizado e altamente vascularizado (seta preenchida) com área de metaplasia cartilaginosa (linha pontilhada). HE, 10x. (c) Proliferação de tecido fibroso moderada, desorganizada e levemente vascularizada (asterisco), tecido conjuntivo mais frouxo (estrela) próximo ao tecido muscular esquelético. HE, 10x.

Tabela 1. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com cimento ósseo ortopédico (Grupo 1), aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

Dias	PTF	TFETME	PCMM	AFMM	AMMC	IIM	FMD	MC
7	+	++	+	+	+	+	+	+
7	++	-	++	+	+	++	-	+
7	Sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
7	+	-	-	+	+	+	-	+
7	++	-	+	+	+	++	-	+
15	+	+	-	-	-	-	-	-
15	+	++	+	-	-	-	-	-
15	++	++	-	++	+	-	-	-
15	++	++	+	-	-	++	-	-
15	+	+	-	-	-	-	-	-
21	+	+	-	-	+	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	+	+	-
21	+	-	-	-	-	+	-	+
21	+	-	-	-	-	+	+	+

ausente (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)
sm: sem membrana

Nas aves do Grupo 2, aos sete dias de pós-operatório foi detectada proliferação de tecido fibrovascular composto de células fusiformes e de núcleo claro (fibroblasto), bem como células poligonais com citoplasma amplo e núcleo claro e levemente arredondado (histiócito) e discretas áreas de material eosinofílico fragmentado (fibra muscular necrótica) (Figura 7a). Em um animal a membrana não foi identificada. Aos 15 dias de pós-operatório foram observadas proliferação de tecido fibroso, composto por células poligonais a fusiformes, desorganizado, frouxo e altamente vascularizado (Figura 7b). Havia também infiltrado inflamatório mononuclear, composto principalmente por histiócitos, além de fibras musculares degeneradas. Aos 21 dias foram detectadas proliferação de tecido fibroso, composto por células poligonais a fusiformes, desorganizado e altamente vascularizado; contudo, em apenas uma ave notou-se duas camadas bem distintas (densa e frouxa) (Figura 7c). Havia também infiltrado inflamatório mononuclear, composto principalmente por histiócitos.

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 2.

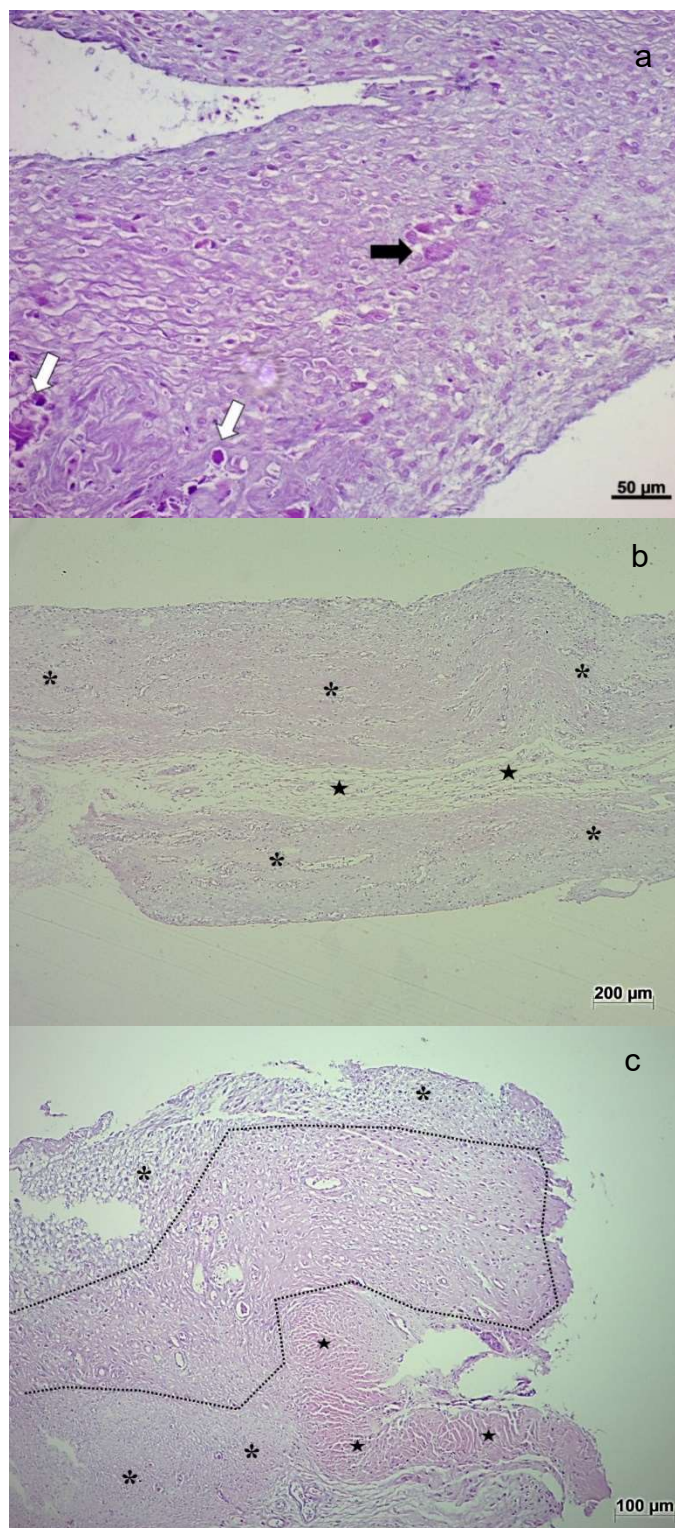


Figura 7. Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com cimento ósseo ortopédico acrescido de antibiótico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Proliferação de tecido fibrovascular com presença de fibroblasto e histiócitos, bem como células de Langerhans (seta preta) e fibra muscular necrótica (seta branca). HE, 20x. (b) Proliferação de tecido fibroso denso (asterisco), estreita faixa de tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 5x. (c) Proliferação de tecido fibroso frouxo e leve (asterisco), extensa área de metaplasia cartilaginosa (linha pontilhada) e tecido muscular esquelético (estrela). HE, 10x.

Tabela 2. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com cimento ósseo ortopédico acrescido de antibiótico (Grupo 2), aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

Dias	PTF	TFETME	PCMM	AFMM	AMMC	IIM	FMD	MC
7	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
7	++	-	-	++	-	+	-	-
7	++	-	-	++	++	+	-	+
7	++	-	+	+	-	+	-	-
7	+	-	-	+	++	+	-	++
15	+	-	+	-	-	-	+	-
15	+	-	-	-	-	+	++	-
15	+	+	-	-	-	-	-	-
15	++	-	++	+	-	-	-	-
15	+	++	-	-	-	-	-	-
21	+	+	-	-	-	+	-	-
21	+	+	+	-	-	-	-	-
21	+	-	+	-	-	+	++	-
21	+	-	+	-	-	-	+	-
21	++	+	-	+	-	-	+	-

ausente (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)
sm: sem membrana

Extremidades ósseas, proximal e distal à falha óssea

Nas aves do Grupo 1, aos sete dias de pós-operatório verificou-se adjacente ao osso uma proliferação de tecido cartilaginoso, proliferação de tecido fibroso e fibras musculares hialinizadas (Figura 8a). Aos 15 dias de pós-operatório foram detectados proliferação de tecido fibroso, com fibras sem orientação e desorganizadas, matriz óssea e cartilaginosa, tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular (Figura 8b). Aos 21 dias de pós-operatório foram notadas proliferação de tecido fibroso com fibras sem orientação e desorganizadas, matriz óssea e cartilaginosa, tecido fibroso entremeando ao tecido muscular (Figura 8c).

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 3.

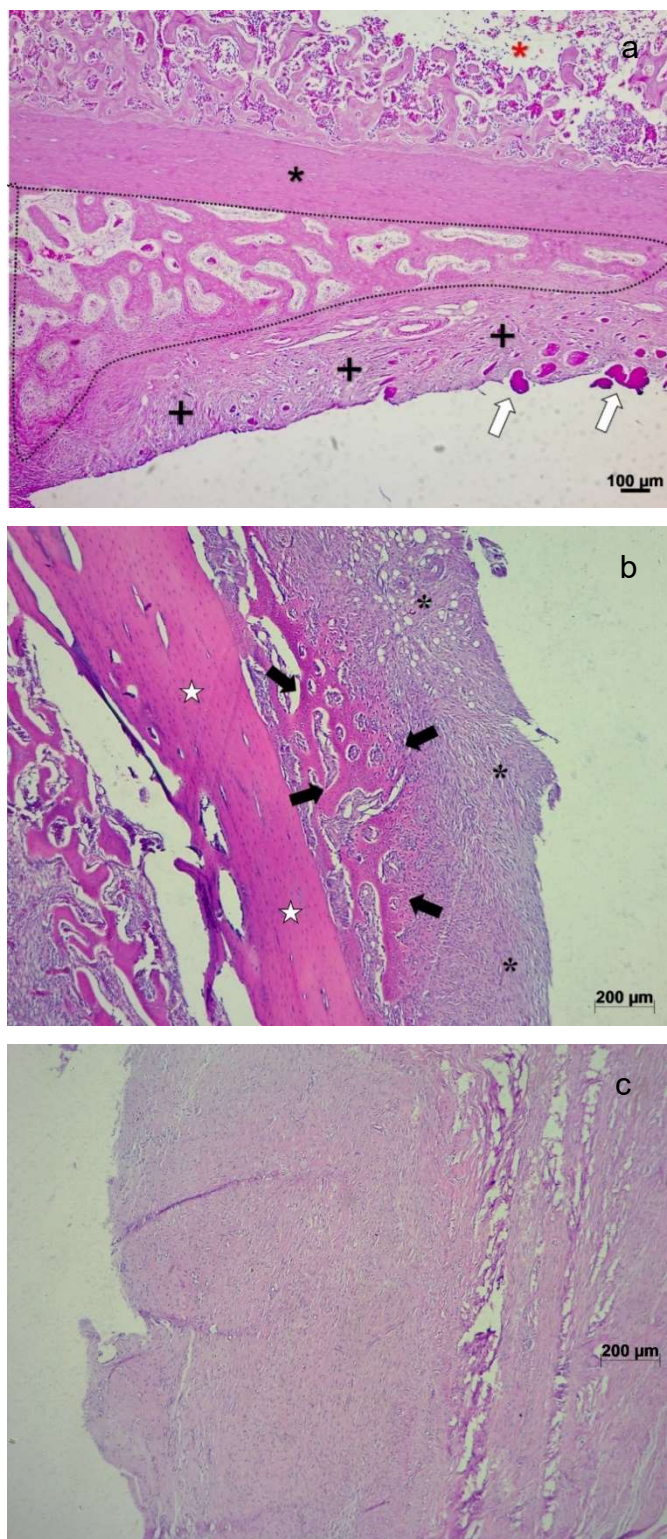


Figura 8. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com cimento ósseo ortopédico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Osso compacto diafisário (asterisco preto); osso trabecular (asterisco vermelho); proliferação de tecido cartilaginoso (linha tracejada) e tecido fibroso (cruz); fibras musculares hialinizadas (seta branca). HE, 20x. (b) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado (asterisco), associado a uma extensa área de matriz óssea (seta preenchida) adjacente à diáfise (estrela). HE, 5x. (c) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado. HE, 5x.

Tabela 3. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO), matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.

Dias	Extremidade proximal			Extremidade distal		
	PF	MO	MC	PF	MO	MC
7	-	-	+	++	-	+++
7	++	-	-	+++	+	-
7	+	-	+	++	+	-
7	++	-	+	++	-	+
7	+	-	-	+	-	-
15	-	-	++	++	-	-
15	+	-	-	+	+	-
15	-	+	-	+	+	+
15	-	-	-	++	-	+
15	-	-	-	++	+	+
21	-	+	-	++	++	+
21	-	-	-	++	-	++
21	++	-	++	++	+	+
21	++	-	-	+	+	+
21	+	+	-	+	-	++

ausente (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)

Nas galinhas do Grupo 2, aos sete dias de pós-operatório notou-se adjacente ao osso uma discreta proliferação de tecido fibroso, e fibras musculares esqueléticas (Figura 9a). Aos 15 dias de pós-operatório foram detectados proliferação de tecido fibroso, com fibras sem orientação e desorganizadas, matriz óssea e cartilaginosa, tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular (Figura 9b). Aos 21 dias de pós-operatório foram notadas proliferação de tecido fibroso com fibras sem orientação e desorganizadas, matriz óssea e cartilaginosa, tecido fibroso entremeando ao tecido muscular (Figura 9c).

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 4.

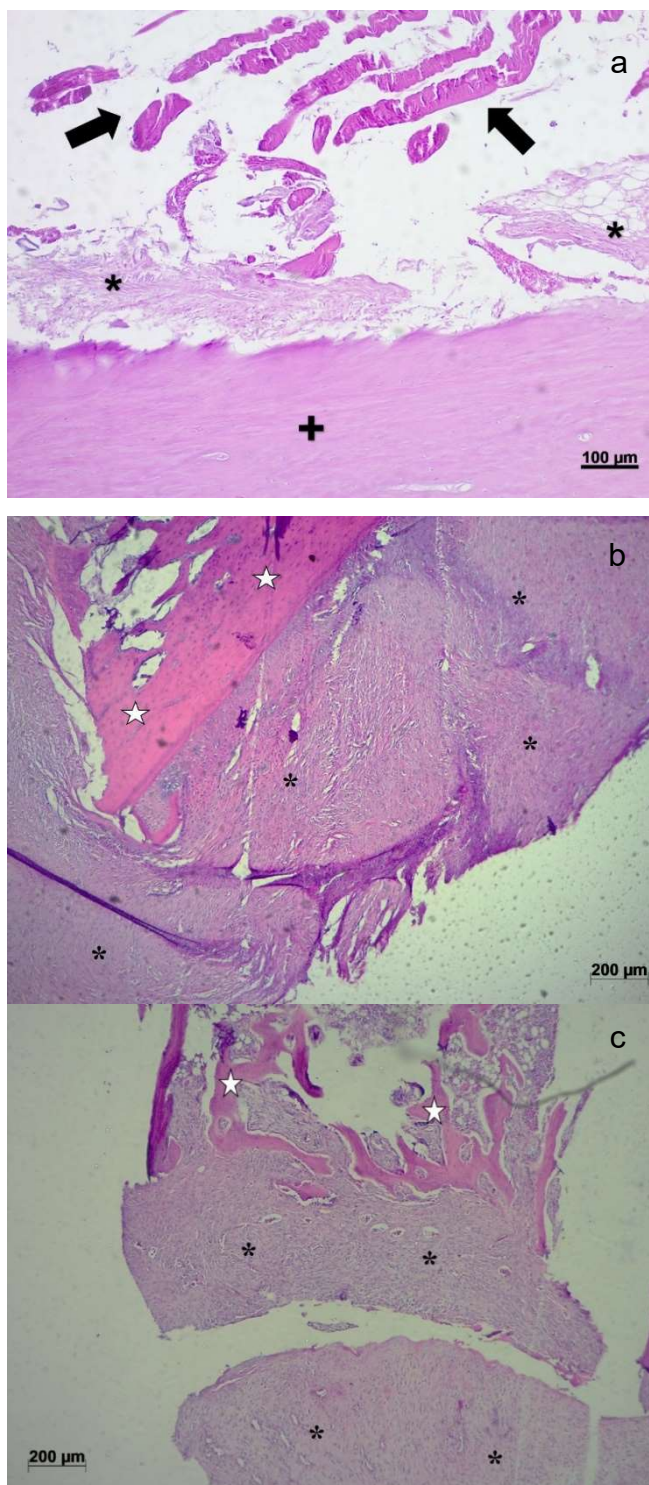


Figura 9. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com cimento ósseo ortopédico acrescido de antibiótico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Osso compacto diafisário (cruz) com discreta proliferação de tecido fibroso (asterisco) adjacente; fibras musculares (seta preta). HE, 20x. (b) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado (asterisco), adjacente à diáfise (estrela). HE, 5x. (c) Proliferação de tecido fibroso denso, desorganizado (asterisco) associado a matriz óssea (estrela). HE, 5x.

Tabela 4. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO) e matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.

Dias	Extremidade Proximal			Extremidade distal		
	PF	MO	MC	PF	MO	MC
7	-	-	++	+++	-	++
7	-	-	-	+	-	+
7	++	-	-	++	-	+++
7	-	-	+	+	-	-
7	-	-	-	+	-	-
15	+	+	-	+	+	++
15	+	-	-	++	+	+
15	-	-	-	+++	+	+
15	-	+	+	+	-	-
15	++	-	++	++	-	+
21	+	++	-	+	++	+
21	-	-	++	+++	+	+
21	-	-	+	++	++	++
21	++	-	-	++	+	+
21	-	-	-	+	+	+

ausente (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)

4. Análise estatística

Tanto no Grupo 1 como no Grupo 2 a espessura média da membrana foi menor aos sete dias de pós-operatório ($P < 0,05$), comparado aos 15 e 21 dias de pós-operatório, as quais não diferiram entre si (Tabela 5). Não houve diferença de espessura entre grupos ($P > 0,05$).

Tabela 5. Espessura média das membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	7	15	21	P
G1	450,5 ± 359,5 B	924,0 ± 255,3 A	1001,1 ± 101,6 A	0,017
G2	348,4 ± 103,0 B	992,8 ± 336,6 A	1327,9 ± 370,4 A	0,002
P	0,604	0,725	0,094	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$)

No Grupo 1 a densidade de vasos sanguíneos nas membranas induzidas foi menor aos sete dias de pós-operatório ($P = 0,016$), comparado aos 15 e 21 dias de pós-operatório, as quais não diferiram entre si (Tabela 6). No Grupo 2 não ocorreu diferença entre momentos ($P = 0,296$). Entre grupos houve menor densidade de vasos sanguíneos no Grupo 2 comparado com o Grupo 1 apenas aos 21 dias de pós-operatório.

Tabela 6. Densidade de vasos sanguíneos nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	7	15	21	P
G1	$6,49 \times 10^{-5} \pm 3,78 \times 10^{-5}$ B	$14,8 \times 10^{-5} \pm 3,57 \times 10^{-5}$ A	$19,5 \times 10^{-5} \pm 7,8 \times 10^{-5}$ A	0,016
G2	$5,78 \times 10^{-5} \pm 2,74 \times 10^{-5}$ A	$11,3 \times 10^{-5} \pm 8,36 \times 10^{-5}$ A	$10,7 \times 10^{-5} \pm 2,07 \times 10^{-5}$ A	0,296
P	0,772	0,419	0,041	

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

A porcentagem de animais com proliferação de tecido fibroso (PTF) não diferiu entre grupos e nem dentro do mesmo grupo em todos os momentos de avaliação. A porcentagem de animais que apresentaram tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME) diferiu entre grupos em todos os momentos ($P < 0,001$). Dentro de cada grupo ocorreram diferenças, sendo que a maior porcentagem de animais com TFETME no Grupo 1 foi aos 15 dias de pós-operatório e no Grupo 2 aos 21 dias de pós-operatório. A porcentagem de animais com presença de células multinucleadas multifocais (PCMM) diferiu entre grupos aos sete e 21 dias de pós-operatório. No Grupo 1 ocorreu estatisticamente uma diminuição na porcentagem entre momentos de avaliação, com o menor valor aos 21 dias de pós-operatório, ao passo que no Grupo 2 ocorreu o menor valor aos sete dias de pós-operatório. Os dados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME) e presença de células multinucleadas multifocais (PCMM) verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	PTF			P	TFETME			P	PCMM			P
	7	15	21		7	15	21		7	15	21	
G1	80,0	100,0	100,0	0,2397	20,0	100,0	20,0	<0,001	60,0	40,0	0,0	<0,001
G2	80,0	100,0	100,0	0,2397	0,0	40,0	60,0	<0,001	20,0	40,0	60,0	<0,001
	1,00	1,00	1,00		<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	1,00	<0,001	

A porcentagem de animais que apresentaram área focal de metaplasia mixoide (AFMM) diferiu entre grupos apenas aos 21 dias de pós-operatório, sendo presente apenas no Grupo 2. Contudo, dentro de cada grupo houve diferenças entre momentos, com menor porcentagem aos 21 dias de pós-operatório para o Grupo 1, ao passo que no Grupo 2 os valores se mantiveram aos 15 e 21 dias de pós-operatório. A porcentagem de animais com áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC) diferiram entre grupos em todos os momentos, sendo sempre maior no Grupo 1. Dentro do mesmo Grupo ocorreram diferenças entre momentos, sendo que no Grupo 2 os animais não apresentaram AMMC aos 15 e

21 dias de pós-operatório, ao passo que 80% dos animais do Grupo 1 aos sete dias de pós-operatório apresentavam AMMC. Relativo à percentagem de animais com infiltrado inflamatório mononuclear (IIM) ocorreu diferença entre grupos apenas aos 21 dias de pós-operatório. Dentro de cada grupo a menor percentagem foi aos 15 dias de pós-operatório. Os dados estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	AFMM			P	AMMC			P	IIM			P
	7	15	21		7	15	21		7	15	21	
G1	80,0	20,0	0,0	<0,001	80,0	20,0	20,0	<0,001	80,0	20,0	60,0	<0,001
G2	60,0	20,0	20,0	<0,001	40,0	0,0	0,0	<0,001	80,0	20,0	40,0	<0,001
	0,091	1,00	<0,001		0,0003	<0,001	<0,001		1,00	1,00	0,046	

A percentagem de animais com fibras musculares degeneradas (FMD) diferiu entre grupos, sendo que em ambos os grupos aos 21 dias de pós-operatório foi o momento no qual ocorreu a maior percentagem de animais com FMD. Dentro do mesmo grupo também foram detectadas diferenças entre momentos, sendo a maior percentagem aos 21 dias de pós-operatório. A metaplasia cartilaginosa (MC) diferiu entre grupos em todos os momentos, sendo a maior percentagem verificada aos sete dias de pós-operatório. Dentro do mesmo grupo ocorreu variação entre momentos, sendo a maior percentagem aos sete dias de pós-operatório. Os dados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Fibras musculares degeneradas (FMD) e metaplasia cartilaginosa (MC) verificadas nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	FMD			P	MC			P
	7	15	21		7	15	21	
G1	20,0	0,0	40,0	<0,001	80,0	0,0	40,0	<0,001
G2	0,0	40,0	60,0	<0,001	40,0	0,0	0,0	<0,001
	<0,001	<0,001	0,046		0,0003	---	<0,001	

Relativo porcentagem de animais que apresentaram proliferação fibrosa (PF) (Tabela 10) da extremidade óssea proximal, houve diferença entre os grupos em todos os momentos ($P < 0,05$). Dentro do mesmo grupo, houve diferença estatística significativa apenas no Grupo 1, com 80% dos animais apresentando PF aos sete dias de pós-operatório. Com respeito à extremidade óssea distal não se detectou diferenças entre grupos e dentro do mesmo grupo ($P = 1,00$).

Tabela 10. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

PF	Proximal			P	PF	Distal			P
	7	15	21			7	15	21	
G1	80	20	60	<0,001	G1	100	100	100	1,00
G2	40	60	40	0,0574	G2	100	100	100	1,00
P	0,0003	<0,0001	0,0455		P	1,00	1,00	1,00	

Quanto à porcentagem de animais com matriz óssea (MO) (Tabela 11) da extremidade óssea proximal, houve diferença estatística entre os grupos e dentro do mesmo grupo em todos os momentos ($P < 0,05$). Com respeito à extremidade óssea distal não se detectou diferenças estatísticas significativas entre grupos apenas aos 15 dias de pós-operatório ($P = 1,00$). Dentro do mesmo grupo ocorreu diferença estatística significativa apenas no Grupo 2 ($P < 0,001$), no qual a maior porcentagem de animais com MO (100%) foi observada aos 21 dias de pós-operatório.

Tabela 11. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz óssea (MO), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

MO	Proximal			P	MO	Distal			P
	7	15	21			7	15	21	
G1	0	20	40	<0,001	G1	40	60	60	0,0574
G2	0	40	20	<0,001	G2	0	60	100	<0,001
P	---	0,0098	0,0098		P	<0,0001	1,00	0,0016	

A porcentagem de animais com matriz cartilaginosa (MC) na extremidade proximal diferiu entre grupos em todos os momentos ($P < 0,05$). Dentro do mesmo grupo, somente houve diferença entre momentos no Grupo 1, com maior porcentagem de animais apresentando MC aos sete dias de pós-operatório. Na extremidade distal houve diferença estatística significativa entre grupos apenas aos sete dias de pós-operatório, com maior porcentagem de animais no Grupo 2. Dentro do mesmo grupo foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre momentos, com maior porcentagem de animais apresentando MC aos 21 dias de pós-operatório. Os dados estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 1 (cimento ósseo) e Grupo 2 (cimento ósseo acrescido de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

MC	Proximal			P	MC	Distal			P
	7	15	21			7	15	21	
G1	60	20	20	<0,001	G1	40	60	100	<0,001
G2	40	40	40	1,00	G2	60	80	100	0,0067
P	0,0455	0,0098	0,0098		P	0,0455	0,0910	1,00	

DISCUSSÃO

O presente estudo verificou que, com ou sem acréscimo de antibiótico no cimento ortopédico, foi possível detectar o desenvolvimento da membrana induzida, porém com algumas diferenças na histologia relacionadas ao tempo de permanência do cimento.

O uso de espaçador de cimento com antibiótico, como o testado no atual estudo, tem sido motivo de debate em pacientes humanos, não devendo ser um complemento de um debridamento inadequado (MASQUELET, 2017). O método já foi empregado em casos de não-união infectada com bons resultados (SCHÖTTLE et al., 2005; GIANNOUDIS et al., 2011). Contudo, Masquelet (2017) não o recomenda, baseado em premissas de que o antibiótico pode ser inativo para o micro-organismo; alguns antibióticos podem afetar as características da membrana; e a ausência de infecção recorrente com o uso do cimento sem antibióticos pode ser considerada um bom sinal.

No atual estudo foi empregado como antibiótico a cefazolina, uma cefalosporina de primeira geração (TULLY, 2010). Muitos antibióticos podem ser lábeis ao calor ou causar efeito deletério ao cimento (CAVALU, 2017), fato que deve ser levado em consideração na escolha do antibiótico a ser incorporado ao polimetilmetacrilato. Estudos da eluição da cefazolina associada ao polimetilmetacrilato, como pérolas ou blocos, tem mostrado que após a liberação inicial a concentração diminui, mas mantendo a concentração inibitória mínima (WEISMAN et al., 2000; PHILLIPS et al., 2007; UDOMKUSONSRI et al., 2012). A dose total de cefazolina no cimento foi de 100 mg. A dosagem sistêmica da cefazolina tem sido referida como de 25-75 mg/kg a cada 8-12 horas para a maioria das espécies aviárias e de 50-100 mg/kg para rapinantes (TULLY, 2010). Como os dados sobre a farmacocinética disponível para uso de antibiótico impregnados em cimento ósseo em pacientes veterinários é considerado limitado, deve-se levar em consideração a dosagem parenteral simultânea (HAYES et al., 2013).

Na avaliação clínica não foram verificadas complicações em ambos os grupos. Por sua vez, sinais de inflamação com edema e descarga serosa foram verificadas em duas galinhas, em estudo sobre a membrana induzida com o emprego de cimento ósseo ortopédico sem o acréscimo de antibiótico (CUEVA et al., 2021), porém de outra marca comercial. Radiograficamente discreto início de proliferação óssea em pelo menos uma das extremidades foi visibilizada apenas com 21 dias de pós-operatório nos Grupos 1 e 2. Isto está de acordo com a análise histológica das extremidades ósseas, em que a metaplasia cartilaginosa e óssea não mostraram um padrão uniforme entre extremidades e grupos, sendo os maiores valores na metaplasia óssea aos 15 e 21 dias de pós-operatório.

O cimento ortopédico usado no atual estudo tinha em sua composição o sulfato de bário, o qual junto com o dióxido de zircônio, estão entre os mais comuns radioopacificadores (WEBB e SPENCER, 2007; WANG e DUNNE, 2008), os quais têm por função permitir a visibilidade do cimento ósseo nos exames radiográficos (KUEHN et al., 2005), como verificado em ambos os grupos. O deslocamento do cimento foi verificado de leve a moderado em 53,03 %, incluindo todos os grupos, porém sem interferência com o desenvolvimento da membrana. O mesmo foi verificado em estudos em aves e coelhos (CUEVA et al., 2021;

CORIS et al., 2021), em que o osso pareado foi usado para a manutenção da estabilidade, sem o emprego de um método de fixação óssea.

Pela mensuração histológica não ocorreu diferenças entre grupos com respeito à espessura média das membranas, o qual foi menor aos sete dias de pós-operatório, porém sem diferenças entre 15 e 21 dias de pós-operatório, sugerindo que o uso do antibiótico não interferiu neste parâmetro. De forma inversa, em um estudo de membrana induzida em ratos, o acréscimo de gentamicina e clindamicina no cimento (Copal) promoveu diminuição na espessura da membrana comparado a outros grupos (NAU et al., 2016), mostrando a importância da escolha do antibiótico. Por sua vez, em um estudo com cimento ósseo ortopédico sem antibiótico em galinhas, macroscopicamente as membranas aos 15 dias foram consideradas menos espessas do que aos 21 e 30 dias de pós-operatório (CUEVA et al., 2021), porém não foi efetuada mensuração histológica. Contudo, deve-se levar em consideração a diferença de idade entre os estudos, visto que as galinhas usadas no atual estudo são aves de descarte.

A presença de células multinucleadas multifocais diferiu entre grupos em dois momentos, com o menor valor verificado no Grupo 1 aos 21 dias pós-operatório, o que indicou uma persistência do processo inflamatório no Grupo 2, provavelmente relacionado à inclusão do antibiótico. Por sua vez, o infiltrado inflamatório mononuclear apresentou diferença entre grupos apenas no dia 21, sendo maior em G1. Este último se justifica, visto a membrana induzida tratar-se de uma membrana de corpo estranho desenvolvida em resposta ao sistema imune ao cimento ósseo de polimetilmetacrilato (ALFORD et al., 2021). Além disso, a membrana tem sido descrita como um epitélio como sinóvio com poucas células inflamatórias, na porção em contato com o cimento, sendo a camada fibrosa externa composta de fibroblastos, miofibroblastos e feixes de colágeno, com fibras altamente alinhadas (MASQUELET, 2003; PELISSIER et al., 2004; MASQUELET e BEGUE, 2010; GIANNOUDIS et al., 2011; HAN et al., 2017; ALFORD et al., 2021). No atual estudo a proliferação de tecido fibroso não diferiu entre grupos e nem dentro do mesmo grupo em todos os momentos de avaliação, indicando que o antibiótico não modificou esta variável. Uma outra característica estrutural da membrana é ser ricamente vascularizada (HAN et al., 2017). A densidade de

vasos sanguíneos nas membranas induzidas mostrou um valor crescente em ambos os grupos aos sete e 15 dias de pós-operatório; contudo, este valor foi estatisticamente menor no Grupo 2 aos 21 pós-operatório, mostrando que houve um efeito negativo neste grupo.

A diferenciação histológica das camadas somente foi identificada aos 21 dias de pós-cirúrgico, em algumas aves de ambos os grupos, porém áreas de metaplasia cartilaginosa foram identificadas em todos os momentos no Grupo 1 e foi ausente aos 15 e 21 dias de pós-operatório no Grupo 2. Estes achados diferiram de um estudo com galinhas, em que 15 dias após a implantação do cimento ósseo as camadas foram adequadamente identificadas, sendo este momento considerado o mais adequado para o segundo estágio de reconstrução óssea, já que com 21 dias as membranas induzidas apresentavam áreas metaplásicas de cartilagem e osso (CUEVA et al., 2021). Contudo, um fator que pode ter contribuído para as diferenças foi a idade das aves, visto que as usadas no atual estudo tinham dois anos de idade e as do outro estudo tinham 1 ano de idade. Isto mostra que a idade pode influenciar nas características da membrana e deve ser levada em consideração na determinação do momento da realização do segundo estágio da técnica. Além disso, o cimento ósseo ortopédico empregado no outro estudo tinha em sua composição o óxido de zircônio como radiopacificador (CUEVA et al., 2021) e não o sulfato de bário, o qual pode ser outro fator de influência.

Entre as limitações do estudo pode ser citado a não utilização da imunoistoquímica, a qual poderia fornecer outros dados sobre a composição membrana, inclusive relativos a proliferação celular e a diferenciação entre vasos sanguíneos maduros e imaturos. Desta forma outros estudos, como o mesmo antibiótico e outras formulações serão necessários.

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo sugerem que a cefazolina misturada ao cimento ósseo não afetou a espessura da membrana induzida, mas apresentou efeito negativo em alguns aspectos histológicos, como menor número de vasos, menos áreas multifocais de cartilagem e persistência da inflamação.

REFERÊNCIAS

- ALFORD, A.I., NICOLAOU, D., HAKE, M., MCBRIDE-GAGYI, S. Masquelet's induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *J. Orthop. Res.*, v.39, n.4, p.707-718, 2021.
- ALT, V.; GIANNOUDIS, P.V. Musculoskeletal infections - A global burden and a new subsection in Injury. *Injury*, v.50, n.12, p.2152-2153, 2019.
- BUENO, I., ANDERSON, G., WILLETTE, M., REDIG, P.T., PONDER, J. Distraction osteogenesis in two wild raptors. *J. Avian Med. Surg.*, v.33, n.4, p.427-436, 2019.
- CAVALU, S. Acrylic bone cements: new insight and future perspective. *Key Eng. Mater.*, v.745, p.39-49, 2017.
- CORIS, J.G.; RAHAL, S.C.; ALVES, C.E.; MAMPRIM, M.J.; INAMASSU, L.; SAMPAIO, A.; KANO, W.T.; MESQUITA, L.R.; SILVA JÚNIOR, J.I. Effect of low-level laser therapy on the membrane induced by the Masquelet technique in an orthotopic site in rabbits. *Acta Cir. Bras.*, aceito publicação 2021. Proof
- CUEVA, L.; RAHAL, S.C.; FONSECA-ALVES, C.E.; BONATELLI, S.P.; MAMPRIM, M.J.; FRANCA, C.; BURINI, C.; MESQUITA, L.R. Masquelet-induced membrane characteristics in chicken radii bone defects. *J. Avian Med. Surg.*, v.35, n.1, p.51-59, 2021.
- DARROW, B.; BENNETT, A. Avian orthopedics. In: BENNETT, R.A.; PYE, G.W. *Surgery of exotic animals*. Hoboken: Wiley Blackwell, 2022. p.112-153.
- 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.
- HAYES, G.; MOENS, N.; GIBSON, T. A review of local antibiotic implants and applications to veterinary orthopaedic surgery. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, v.26, n.4, p.251-259, 2013.
- 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.

KUEHN, K.D.; EGE, W.; GOPP, U. (2005). Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthop. Clin. North Am.*, v.36, n.1, p.17-28, 2005.

MASQUELET, A.C. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. *Langenbecks Arch. Surg.*, v.388, p.344–6, 2003.

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

MASQUELET, A.C. Induced membrane technique: pearls and pitfalls. *J. Orthop. Trauma*, v.31, n.Suppl 5, p.S36-S38, 2017.

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.

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.

PHILLIPS, H.; BOOTHE, D.M.; SHOFER, F.; DAVIDSON, J.S.; BENNETT, R.A. *In vitro* elution studies of amikacin and cefazolin from polymethylmethacrylate. *Vet. Surg.*, v.36, n.3, p.272-278, 2007.

SCHÖTTLE, P.B.; WERNER, C.M.; DUMONT, C.E. Two-stage reconstruction with free vascularized soft tissue transfer and conventional bone graft for infected nonunions of the tibia: 6 patients followed for 1.5 to 5 years. *Acta Orthop.*, v.76, n.6, p.878–883, 2005.

TULLY, T.N. Appendices. In: COLES, B.H. *Essentials of avian medicine and surgery*. 3rd ed. Blackwell Publishing, 2007. p.219-265.

UDOMKUSONSRI, P., KAEWMOKUL, S., ARTHITVONG, S., PHAOCHOOSAK, N. Elution profiles of cefazolin from PMMA and calcium sulfate beads prepared from commercial cefazolin formulations. *J. Vet. Med. Sci.*, v.74, n.3, p.301-305, 2012.

VIATEAU, V.; BENSIDHOUM, M.; GUILLEMIN, G.; PETITE, H.; HANNOUCHE, D.; ANAGNOSTOU, F.; PÉLISSIER, P. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *Orthop. Clin. North. Am.*, v.41, n.1, p.49-56, 2010.

WANG, J-S.; DUNNE, N. Bone cement fixation: acrylic cements. In: REVELL, P.A. *Joint replacement technology*. United Kingdom: Woodhead Publishing, 2008. p.212-251.

WEBB, J.C.; SPENCER, R.F. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg. Br.*, v.89, n.7, p.851-857, 2007.

WEISMAN, D.L.; OLMSTEAD, M.L.; KOWALSKI, J.J. *In vitro* evaluation of antibiotic elution from polymethylmethacrylate (PMMA) and mechanical assessment of antibiotic-PMMA composites. *Vet. Surg.*, v.29, n.3, p.245-251, 2000.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

NORMAS DA REVISTA: Acta Cirúrgica Brasileira

<https://www.scielo.br/journal/acb/about/#instructions>

Resina acrílica odontológica, acrescida ou não de antibiótico, na produção de membranas induzidas pela técnica de Masquelet no rádio de galinhas

RESUMO

O objetivo do estudo foi determinar a capacidade da resina acrílica odontológica, acrescida ou não de antibiótico, na produção de membranas induzidas pela técnica de Masquelet em defeito segmentar promovido no rádio esquerdo de galinhas. Trinta galinhas híbridas de postura com idade média de 18 meses foram divididas, mediante sorteio, em dois grupos com 15 aves cada: G1 – resina acrílica odontológica; G2 – resina acrílica odontológica acrescida de cefazolina em pó. O defeito ósseo foi avaliado radiograficamente no pós-operatório imediato e aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório. A eutanásia de cinco aves foi efetuada aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório, para se proceder o exame histológico. Não foi possível a visibilização adequada da resina pelo exame radiográfico. Aos 15 e 21 dias foi possível verificar sinais de início de proliferação óssea em pelo menos uma das extremidades, com intensidade variando de discreta a moderada. Pela análise histológica não ocorreram diferenças da espessura média e na densidade de vasos nas membranas induzidas, entre grupos aos 15 e 21 dias de pós-operatório. A área focal de metaplasia mixoide e áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa não diferiram entre grupos. A porcentagem de células multinucleadas multifocais foi mais evidente no G2. Em ambos os grupos foram individualizadas apenas duas camadas na membrana induzida, particularmente aos 15 e 21 dias após a cirurgia. Conclui-se que foi possível produzir membranas induzidas com o uso de espaçador de resina acrílica odontológica e o acréscimo de cefazolina não interferiu no desenvolvimento ou vascularização, com crescimento organizado de tecido fibroso. Outro fato importante é que a resina acrílica odontológica não interferiu na reparação óssea nas extremidades da fratura.

INTRODUÇÃO

O polimetilmetacrilato tem sido empregado tanto na odontologia como na ortopedia, sendo neste último denominado cimento ósseo acrílico (FRAZER et al., 2005; MAGNAN et al., 2013). Na odontologia o material acrílico que polimeriza a temperatura ambiental se classifica como resina auto-polimerizável (GOIATO et al., 2015; RASZEWSKI et al., 2021). O composto consiste de uma parte sólida de polimetilmetacrilato e uma parte líquida de monômero de metil metacrilato (GOIATO et al., 2015). O polimetilmetacrilato é considerado um material seguro e compatível, porém o metil metacrilato pode permanecer como monômero residual e promover processos alérgicos, danos celulares e mudanças teciduais (GOIATO et al., 2015; RASZEWSKI et al., 2021). Além disso, quando o pó e líquidos são misturados ocorre uma reação exotérmica, em que uma quantidade considerável de calor é liberada, podendo danificar os tecidos circundantes (FRAZER et al., 2005).

Entre as utilizações do polimetilmetacrilato na ortopedia podem ser citados nas cirurgias de próteses, vertebroplastia, cifoplastia, reconstrução e estabilização do corpo vertebral após ressecção de tumor metastático, reconstrução de defeito craniano (FRAZER et al., 2005; WEBB e SPENCER, 2007; MAGNAN et al., 2013; CAVALU, 2017). Uma outra opção é o uso do cimento ósseo acrílico na promoção da membrana induzida pela técnica de Masquelet, visando a reconstrução de defeitos ósseos, por meio de dois estágios cirúrgicos (MASQUELET e BEGUE, 2010; MASQUELET, 2017). O primeiro estágio consiste na colocação de um espaçador de cimento, que após algumas semanas será removido, sendo a cavidade semi-rígida desenvolvida pela membrana induzida preenchida mais frequentemente por enxerto ósseo autólogo, caracterizando o segundo estágio (TAYLOR et al., 2012; MASQUELET, 2017; HAN et al., 2017).

O cimento ósseo acrescido de antibiótico tem sido empregado na ortopedia humana como um método de prevenção e tratamento de infecções em artroplastias articulares, ou infecções relacionadas às fraturas, entre outros (WALKER et al., 2016; VUGT et al., 2019; SCHWARZ ET AL, 2021). Contudo, quando se trata de seu emprego durante a produção da membrana induzida há uma série de questionamentos relativos à interferência no tipo de membrana induzida ou mesmo ser um procedimento para um debridamento inadequado

(SCHÖTTLE et al., 2005; GIANNOUDIS et al., 2011; NAU et al., 2016; MASQUELET, 2017).

Considerando que os estudos em aves relativos a técnica da membrana induzida de Masquelet são ainda incipientes (CUEVA et al., 2021), o objetivo do estudo foi determinar a capacidade da resina acrílica odontológica, acrescido ou não de antibiótico, na produção de membranas induzidas pela técnica de Masquelet em defeito segmentar promovido no rádio de galinhas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Ambiente de Experimentação

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, 0108/2020-CEUA (Anexo I).

Foram usadas 30 galinhas de postura (*Gallus gallus domesticus*), clinicamente sadias, com massa corpórea variando de 1 a 2,2 kg e idade média de 18 meses. Estas foram alojadas sem restrição de espaço de 4 x 12 m, sob ventilação natural, sendo alimentadas com ração comercial e água *ad libitum*.

Após sorteio, foram constituídos dois grupos, como segue: Grupo 1 (n=15) – resina acrílica odontológica; Grupo 2 (n=15) - resina acrílica odontológica acrescida de cefazolina em pó.

Antes da realização do estudo, efetuou-se a cultura bacteriana e fúngica do pó e líquido, as quais foram negativas.

Procedimento cirúrgico e demais condutas

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, as aves foram inicialmente pré-medicadas pela combinação de cloridrato de tramadol (8 mg/kg), midazolam (1 mg/kg) e cloridrato de cetamina (5 mg/kg), aplicado por via intramuscular. Após 20 minutos, foram induzidas e mantidas em anestesia geral com isoflurano, sob intubação.

Com as aves em decúbito dorsal, foram removidas as penas de forma manual na área medial do antebraço esquerdo, seguida da antisepsia com

solução de acetato de clorexidina. Após a aplicação dos campos operatórios, a área operatória foi acessada como previamente descrito (CUEVA et al., 2021) e promoveu-se uma falha segmentar (1,5 cm) centrada na porção média diafisária do rádio, com auxílio de serra oscilatória.

A falha segmentar foi preenchida nos Grupos 1 e 2 com resina acrílica odontológica (AutoCril; Imodonto, Pirassununga, São Paulo, Brasil) na fase pastosa em formato de cilindro, respectivamente, sem e com cefazolina sódica em pó. Os tecidos moles e o tecido subcutâneo foram aproximados com fio de náilon 5-0, e a pele com pontos isolados simples com náilon 3-0. O componente líquido do acrílico autopolimerizável não continha crosslink, ao passo que o pó tinha em sua composição polimetilmetacrilato, peróxido de benzoila e pigmentos biocompatíveis. Foi empregada uma proporção de 0,54 g de resina acrílica e 0,104 g de cefazolina.

Todas as aves receberam uma dose de antibiótico (cefazolina, 50 mg/kg IM) no momento da conduta anestésica. Adicionalmente, empregou-se meloxicam, na dose de 0,5 mg/kg, IM, a cada 24 horas, no dia da intervenção cirúrgica e por 5 dias de pós-operatório. A asa operada foi mantida por bandagem por 7 dias, sendo a limpeza da ferida cirúrgica realizada uma vez ao dia com clorexidina a 2% e solução fisiológica 0,9%.

Foram realizados exames radiográficos (EPX-F1600 B 1.6KW, 90KV/20MA, Oxson®) do antebraço esquerdo (projeções caudo-cranial e médio-lateral), no pós-operatório imediato e aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório, conforme período de eutanásia. A distância foco-filme foi de 80 cm, com exposição de 3 mAs e 40 kV. A avaliação incluiu alinhamento e manutenção da falha óssea, proliferação óssea e alterações do aspecto radiográficos das resinas.

Histologia

Em ambos os grupos, foi realizada a eutanásia de cinco aves aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório para a coleta da membrana induzida e extremidades proximal e distal do rádio na falha segmentar, as quais foram fixadas em formol tamponado 10%. As membranas induzidas foram incluídas em parafina, cortadas em secções de 2-3 micra de espessura e coradas com Hematoxilina-eosina. As

extremidades ósseas foram descalcificadas em solução de EDTA a 10% e após processamento foi incluída em parafina, cortadas em secções de 5 micra de espessura e coradas com Hematoxilina-eosina. O processamento das amostras foi realizado no laboratório de Patologia Veterinária - HOVET da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), campus de Cuiabá.

A avaliação das amostras foi de modo qualitativo e também foram atribuídos graus de intensidade para as alterações mais presentes em cada momento: ausente (-), leve (+), moderado (++) e acentuado (+++). Na sequência, empregando o software QuPath-0.3.2 procedeu-se em cada animal a mensuração da espessura da membrana, em três pontos distintos (aumento de 2,5x). Em seguida, foi mensurada a área de produção de membrana (20x) e computado a quantidade de vasos sanguíneos em três áreas distintas.

Análise estatística

Para comparar as variáveis (espessura média das membranas e número de vasos por área) entre os grupos em cada momento de avaliação empregou-se o teste T Student. Por sua vez, dentro de cada grupo e em cada momento utilizou-se a análise de variância. Quando ocorreu diferença significativa foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias. Para análise da histologia das membranas e extremidades ósseas, determinou-se por grupo e momento a porcentagem de animais com cada alteração e aplicou-se o teste de χ^2 (Qui-quadrado). O nível de significância adotado em todas as análises foi de $P < 0,05$. Para as análises estatísticas foram empregados os softwares Bio Estat 5.0 e SigmaStat 3.5.

RESULTADOS

Avaliações clínicas e radiográficas

Foi observada a presença de seroma na área cirúrgica em todos os períodos de avaliação, sendo este mais intenso no Grupo 1. Este não foi removido e nenhuma ave apresentou deiscência de pontos no pós-cirúrgico. Contudo, foram colhidas amostras do seroma de uma ave de cada grupo aos 15 dias de pós-operatório para cultura fúngica e bacteriana, sendo uma negativa para o Grupo 1 e outra positiva para *Enterobacter aerogenes* para o Grupo 2

Na avaliação radiográfica do pós-operatório imediato a densidade da resina acrílica se aproximou a dos tecidos moles, dificultando a visibilização (Figura 1). Aos sete dias de pós-operatório a visibilização se manteve similar. Aos 15 e 21 dias foi possível verificar sinais de início de proliferação óssea em pelo menos uma das extremidades, com intensidade variando de discreta a moderada.

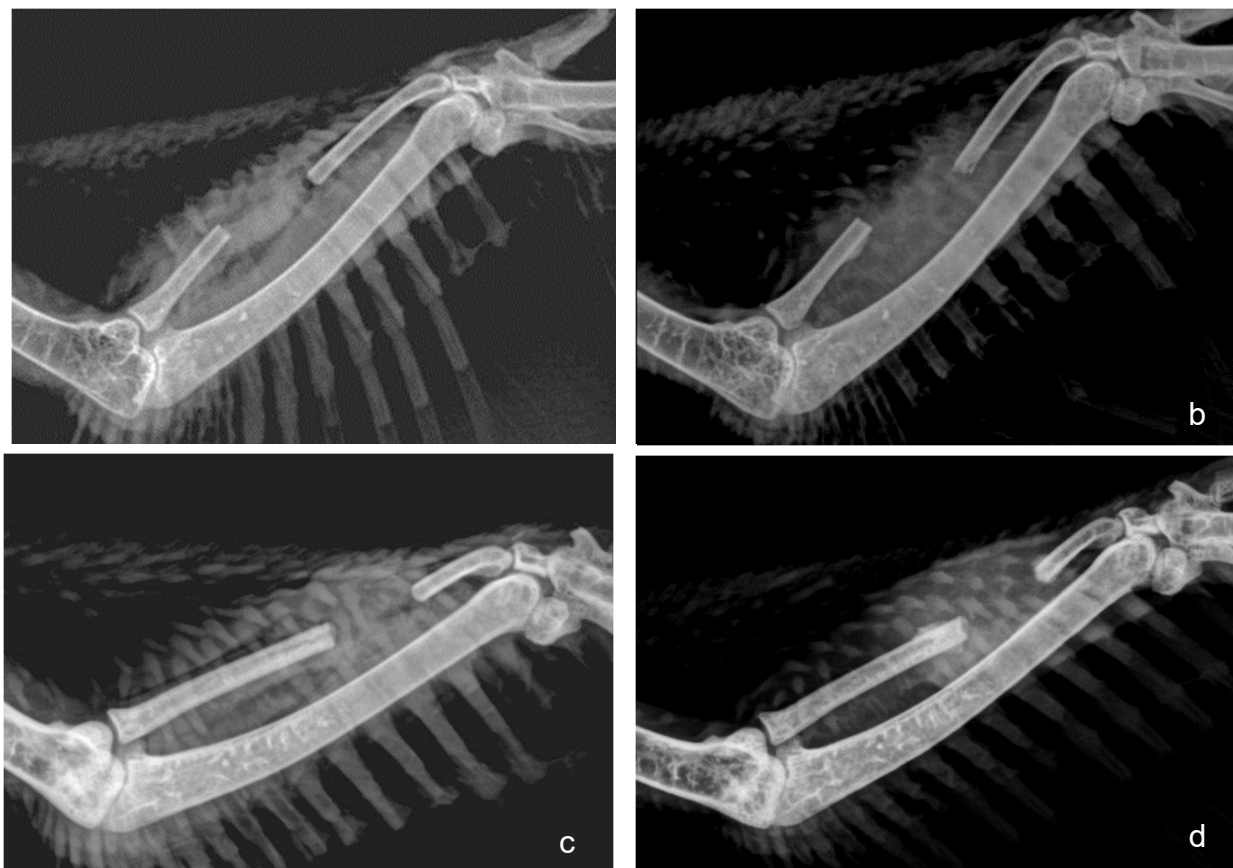


Figura 1. Projeções radiográficas médio-laterais de aves dos Grupo 1 (resina acrílica odontológica) no pós-operatório imediato (a) e 21 dias após a cirurgia (b) e de aves do Grupo 2 (resina acrílica odontológica acrescida de cefazolina em pó) no pós-operatório imediato (c) e 21 dias após a cirurgia (d). Em ambos os grupos se visualiza a falha óssea, porém a resina acrílica não poder ser delimitada, visto a densidade da mesma se aproximar ao dos tecidos moles. Note o início da proliferação óssea nas extremidades aos 21 dias de pós-operatório.

Avaliações histológicas

Membrana induzida

Nas galinhas do Grupo 1, aos sete dias de pós-operatório, na única ave que produziu a membrana detectou-se duas zonas distintas, uma mais interna, formada por uma camada simples, composta de células poliédricas a fusiformes com citoplasma amplo e basofílico, núcleo redondo a oval, conectado por prolongamentos citoplasmáticos, associada a uma rede frouxa de tecido

conjuntivo (Figura 2a). Na porção profunda, havia uma proliferação de tecido fibrocartilaginoso leve, calcificação distrófica multifocal e leve. Havia vascularização intensa e formação de matriz óssea. Aos 15 dias de pós-operatório (n=1) foram verificadas duas zonas distintas, uma mais interna, formada por uma camada simples, composta de células poliédricas a fusiformes com citoplasma amplo e basofílico, núcleo redondo a oval, conectado por prolongamentos citoplasmáticos, associada a uma rede frouxa de tecido conjuntivo (Figura 2b). Na porção profunda, havia uma proliferação de tecido mixoide desorganizada, composta de células fusiformes com núcleos alongados e citoplasma escasso. Havia também vascularização intensa, formação de matriz óssea, bem como áreas de calcificação distrófica leve e multifocal. Aos 21 dias de pós-operatório (n=4) foram detectadas duas zonas distintas, uma mais interna, formada por uma camada simples, composta de células poliédricas a fusiformes com citoplasma amplo e basofílico, núcleo redondo a oval, conectado por prolongamentos citoplasmáticos, associada a uma rede frouxa de tecido conjuntivo (Figura 2c). Na porção profunda, notou-se uma proliferação de tecido mixoide desorganizada, composta de células fusiformes com núcleos alongados e citoplasma escasso. A vascularização foi intensa, com infiltrado inflamatório linfocitário focal e moderado, e fibras musculares esqueléticas entremeadas por tecido fibroso.

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 1.

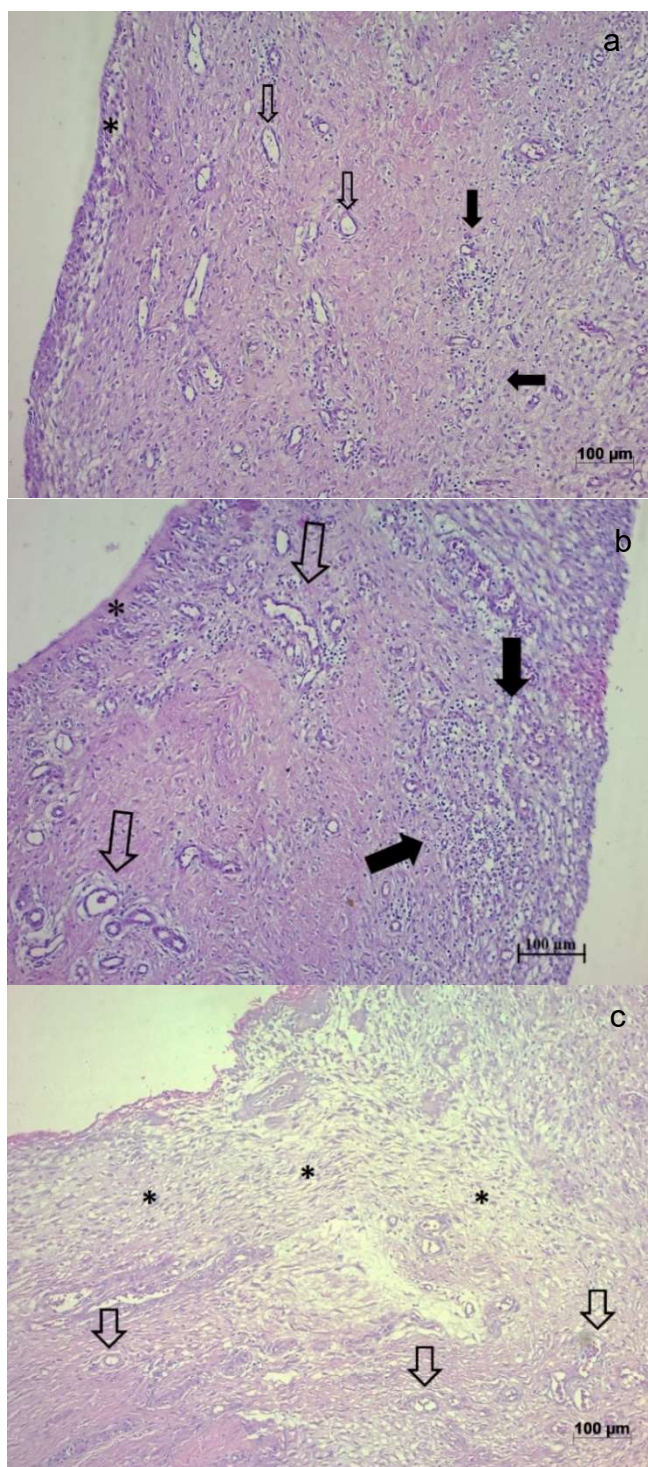


Figura 2. Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com resina acrílica aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Observe duas zonas distintas: porção externa mais delgada e formada por um tecido conjuntivo frouxo e células exibindo prolongamentos citoplasmáticos (asterisco); porção mais interna e mais espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, altamente vascularizado (seta vazada) e um leve infiltrado inflamatório mononuclear (seta preenchida). HE, 10x. (b) Verifique duas zonas distintas: porção externa mais delgada e formada por um tecido conjuntivo frouxo e células exibindo prolongamentos citoplasmáticos (asterisco); porção mais interna e mais espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, moderadamente vascularizado (seta vazada) e um moderado infiltrado inflamatório mononuclear (seta preenchida). HE, 10x. (c) Note duas zonas distintas: porção externa mais espessa e formada por um tecido conjuntivo frouxo e células exibindo prolongamentos citoplasmáticos (asterisco); porção mais interna, composta por tecido conjuntivo desorganizado, levemente vascularizado (seta vazada). HE, 10x.

Tabela 1. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), formação de matriz óssea (FMO), infiltrado inflamatório granulomatoso macrófagos, linfócitos e células gigantes (IIGMLCC), proliferação de tecido ósseo (PTO) em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com resina acrílica odontológica (Grupo 2), aos 7, 15 e 21 dias de pós-operatório.

Dias	PTF	TFETME	PCMM	AFMM	AMMC	IIM	FMD	MC	FMO	IIGMLCG	PTO
7	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-
7	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
7	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
7	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
7	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm
15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
15	+	-	-	+	+	++	-	+	-	++	-
15	++	-	-	++	+	++	-	-	-	+	-
15	++	++	-	+	++	+	+	++	+	+	+
15	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
21	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
21	+++	-	+	+	+	++	-	-	-	+	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

não observado (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)
sm: sem membrana

Nas aves do Grupo 2, aos sete dias de pós-operatório foram observadas duas zonas distintas, uma mais interna, formada por uma camada simples, composta de células poliédricas a fusiformes com citoplasma amplo e basofílico, núcleo redondo a oval, conectado por prolongamentos citoplasmáticos, associada a uma rede frouxa de tecido conjuntivo (Figura 3a). Na porção profunda, há uma proliferação de tecido mixoide desorganizada, composta de células fusiformes com núcleos alongados e citoplasma escasso. Notou-se intensa vascularização infiltrado inflamatório linfocitário multifocal e acentuado, e fibras musculares esqueléticas entremeadas por tecido fibroso.

Com 15 dias de pós-operatório verificou-se em uma ave duas zonas distintas, uma mais interna, formada por uma camada simples, composta de células poliédricas a fusiformes com citoplasma amplo e basofílico, núcleo redondo a oval, conectado por prolongamentos citoplasmáticos, associada a uma rede frouxa de tecido conjuntivo (Figura 3b). Na porção profunda, há uma proliferação de tecido mixoide desorganizada, composta de células fusiformes com núcleos alongados e citoplasma escasso. Verificou-se intensa vascularização, infiltrado inflamatório linfohistiocítico multifocal e acentuado, além da metaplasia óssea.

Com 21 dias de pós-operatório (n=2) notou-se duas zonas distintas, uma mais interna, formada por uma camada simples, composta de células poliédricas a fusiformes com citoplasma amplo e basofílico, núcleo redondo a oval, conectado por prolongamentos citoplasmáticos, associada a uma rede frouxa de tecido conjuntivo (Figura 3c). Na porção profunda, havia uma proliferação de tecido mixoide desorganizado, composto de células fusiformes com núcleos alongados e citoplasma escasso. Verificou-se intensa vascularização, infiltrado inflamatório granulomatoso e macrófagos, linfócitos e células gigantes (acentuado), multifocal.

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 2.

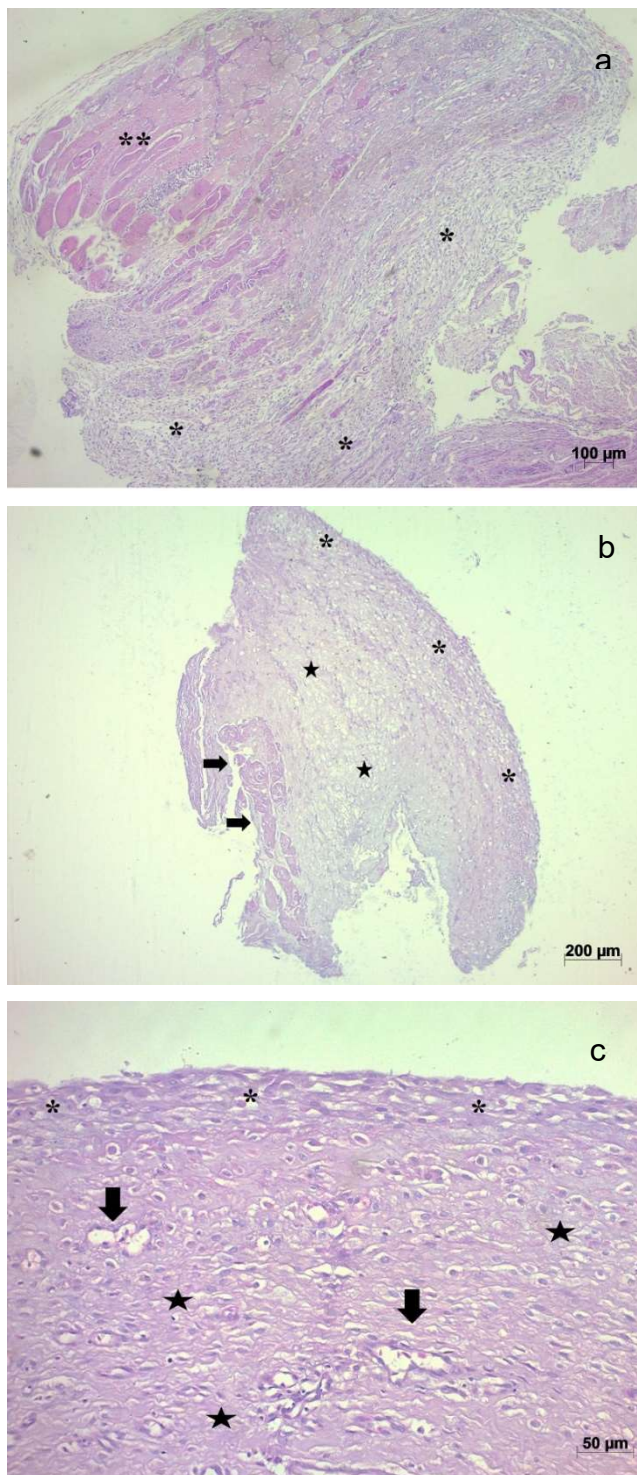


Figura 3. Aspecto microscópico da membrana induzida em galinhas com resina acrílica acrescida com antibiótico aos sete (a), 15 (b) e 21 (c) dias de pós-operatório. (a) Proliferação intensa de tecido conjuntivo ósseo (asterisco) entremeando-se no tecido muscular esquelético (dois asteriscos). HE, 10x. (b) Observa-se duas zonas distintas: uma porção externa mais delgada e formada por um tecido conjuntivo frouxo (asterisco); uma porção mais interna e espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, levemente vascularizado (estrela) e tecido muscular esquelético (seta preenchida). HE, 5x. (c) Verifica-se duas zonas distintas: uma porção externa mais delgada e formada por células achatadas e discreta quantidade de tecido conjuntivo (asterisco); uma porção mais interna e espessa, composta por tecido conjuntivo desorganizado, frouxo (estrela) e levemente vascularizado (seta preenchida). HE, 5x.

Tabela 2. Avaliação histológica quantitativa das membranas induzidas, com respeito à proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME), presença de células multinucleadas multifocais (PCMM), área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), fibras musculares degeneradas (FMD), metaplasia cartilaginosa (MC), formação de matriz óssea (FMO), infiltrado inflamatório granulomatoso macrófagos, linfócitos e células gigantes (IIGMLCC), proliferação de tecido ósseo (PTO), áreas de calcificação distrófica (ACD), metaplasia óssea (MO) em defeitos ósseos do rádio de galinhas, preenchidos com resina acrílica odontológica acrescida de antibiótico (Grupo 2), aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

Dias	PTF	TFETME	PCMM	AFM M	AMM C	IIM	FMD	MC	FMO	IIGMLC G	PTO	ACD	M O
7	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
7	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	Sm	sm	sm	sm	sm
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
15	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	+
15	++	-	-	+	++	+	-	+	-	+	-	-	-
15	+++	+	+	++	+	+++	+	+	-	++	-	-	-
15	+++	-	-	++	++	+	-	++	+	+	+	-	-
15	+++	++	-	++	++	+	+	++	+	+	+	+	-
21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++	+	-
21	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
21	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	Sm	sm	sm	sm	sm
21	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	sm	Sm	sm	sm	sm	sm

não observado (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)

sm: sem membrana

Extremidades ósseas, proximal e distal à falha óssea

Nas aves do Grupo 1, aos sete dias de pós-operatório foram verificadas, de forma geral e mais evidente na extremidade distal, proliferação de tecido fibroso adjacente ao perióstio, com fibras sem orientação e desorganizadas; matriz óssea, tecido fibroso se entremeando ao tecido muscular esquelético (Figura 4a). Aos 15 dias de pós-operatório foram detectados proliferação de tecido fibroso, com fibras sem orientação e desorganizadas; matriz óssea; tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular (Figura 4b). Aos 21 dias de pós-operatório foram notadas proliferação de tecido fibroso com fibras sem orientação e desorganizadas, matriz óssea e cartilaginosa, tecido fibroso entremeando ao tecido muscular (Figura 4c).

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 3.

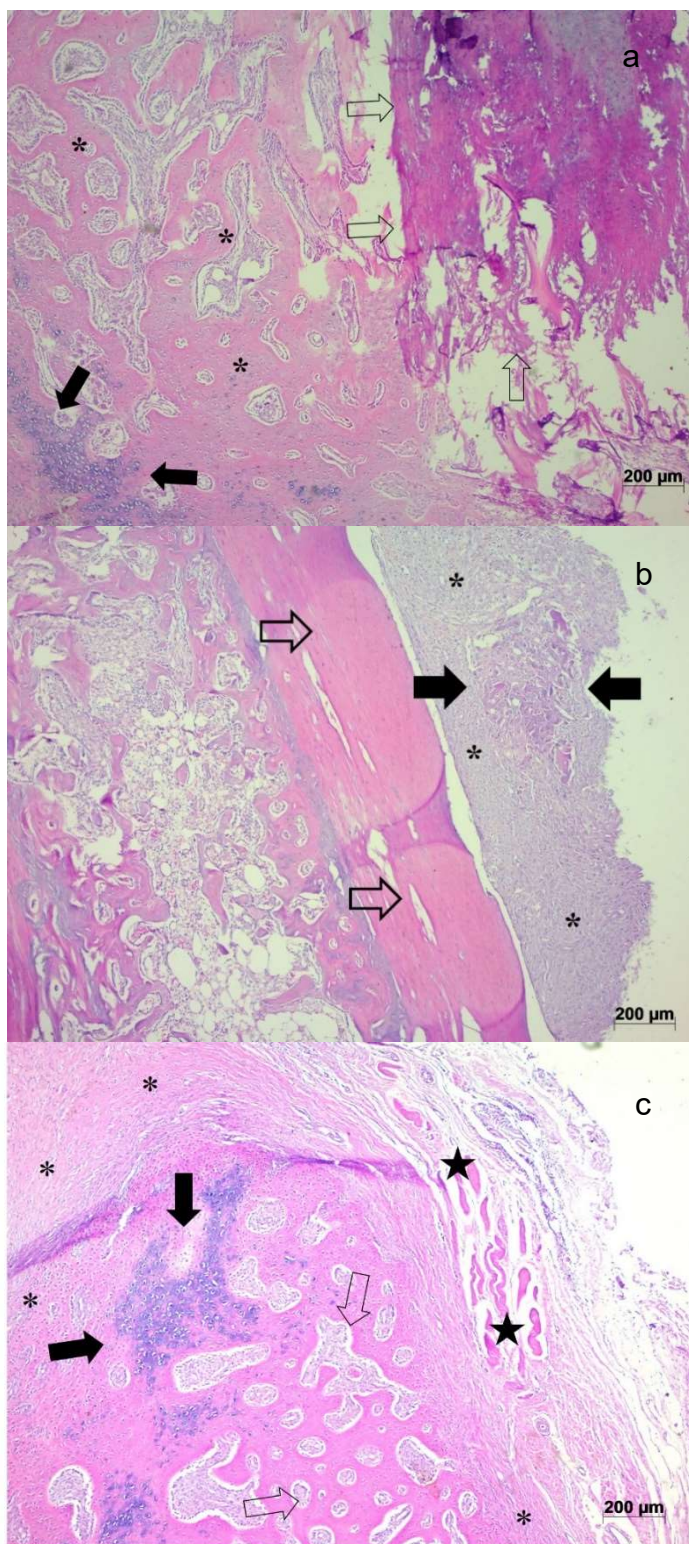


Figura 4. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com resina acrílica aos sete (a) 15 (b) e 21 (b) dias de pós-operatório. (a) Matriz óssea acentuada (asterisco), matriz cartilaginosa leve (seta preenchida) e área de calcificação distrófica acentuada (seta vazada). HE, 5x. (b) Proliferação moderada de tecido fibroso (asterisco), área de fragmentos de tecido ósseo (osteólise) envolvidos por células multinucleadas (seta preenchida) adjacente ao osso da diáfise (seta vazada). HE, 5x. (c) Proliferação moderada de tecido fibroso (asterisco), matriz cartilaginosa leve (seta preenchida), matriz óssea moderada (seta vazada) e tecido muscular (estrela). HE, 5x.

Tabela 3. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO) e matriz cartilaginosa (MC), aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.

Dias	Extremidade proximal			Extremidade distal		
	PF	MO	MC	PF	MO	MC
7	+	+	-	++	-	-
7	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	+	+	-
7	-	-	-	++	+	-
7	-	-	-	+++	+	-
15	-	-	-	+	-	-
15	-	-	-	+	+++	+
15	++	-	+	++	-	-
15	+	+	+	+++	-	-
15	-	-	-	+++	+	-
21	-	-	-	+++	++	+
21	+	+	-	++	++	+
21	-	-	-	-	-	-
21	++	+	-	+++	+++	+
21	+	-	-	+	+	-

ausente (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)

Nas galinhas do Grupo 2, aos sete dias de pós-operatório foram verificadas, de forma geral, proliferação de tecido fibroso adjacente ao periósteo, com fibras em sua maioria sem orientação e desorganizadas, matriz óssea e estrutura trabecular bem-organizada, sendo o calo recoberto por tecido fibroso, proliferação de tecido fibroso se entremeando ao tecido muscular esquelético (Figura 5a). Aos 15 dias de pós-operatório havia proliferação de tecido fibroso, com fibras orientadas ao eixo da diáfise formando um calo, matriz óssea trabecular e cartilaginosa, tecido fibroso entremeando ao tecido muscular esquelético com proliferação vascular de pequeno calibre (Figura 5b). Aos 21 dias de pós-operatório foram detectadas proliferação de tecido fibroso; matriz cartilaginosa e óssea trabecular bem-organizada, sendo o calo recoberto por tecido fibroso, tecido fibroso entremeando ao tecido muscular esquelético com proliferação vascular de pequeno calibre (Figura 5c).

Os dados quantitativos estão apresentados na Tabela 4.

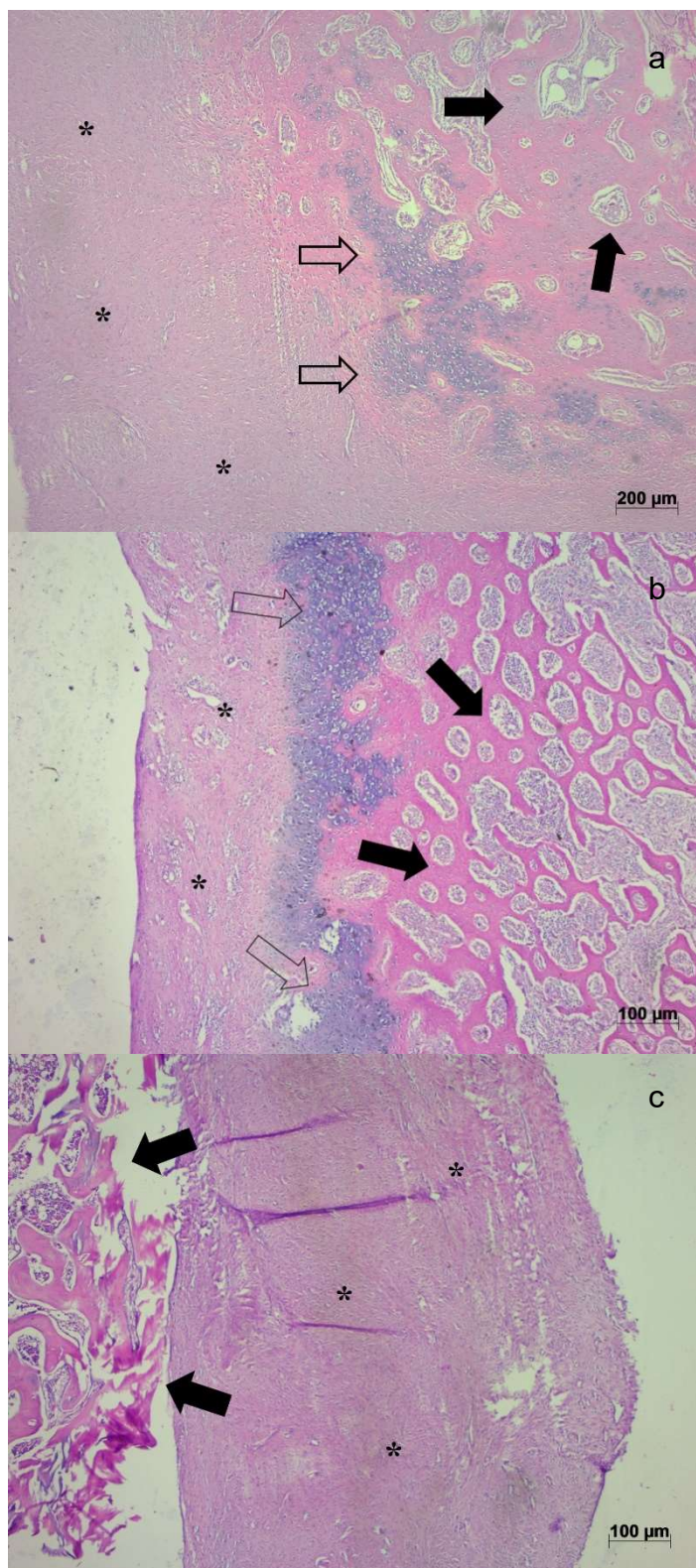


Figura 5. Aspecto microscópico das extremidades ósseas em galinhas com resina acrílica acrescida de antibiótico aos sete (a) 15 (b) e 21 (b) dias de pós-operatório. (a) Proliferação acentuada de tecido fibroso, formando um calo (asterisco), matriz cartilaginosa leve (seta vazada) e óssea moderada (seta preenchida). HE, 2,5x. (b) Proliferação moderada de tecido fibroso (asterisco), matriz cartilaginosa moderada (seta vazada) e óssea acentuada (seta preenchida). HE, 10x. (c) Proliferação acentuada de tecido fibroso (asterisco) e moderada de matriz óssea (seta preenchida). HE, 10x.

Tabela 4. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), matriz óssea (MO), matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 2 (resina acrílica odontológica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias da fase 1 da técnica da membrana induzida.

Dias	Extremidade proximal			Extremidade distal		
	PF	MO	MC	PF	MO	MC
7	++	++	-	+	++	-
7	+	+	-	+	+++	+
7	-	-	-	+	+++	+
7	-	-	-	+++	++	-
7	+	+++	-	+	+++	-
15	-	-	-	++	+++	++
15	-	-	+	++	-	-
15	++	-	-	+	++	+++
15	-	-	-	+++	+	-
15	-	-	++	+++	++	++
21	+	++	-	+	++	-
21	++	+	+	++	+	+
21	++	++	-	++	++	-
21	+++	++	+++	+++	++	+++
21	+	-	-	++	-	-

ausente (-); leve (+), moderado (++) e acentuado (+++)

4. Análise estatística

Não houve diferença de espessura média da membrana entre grupos ou dentro do mesmo grupo entre momentos ($P>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Espessura média das membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	7	15	21	Valo de P
G1	1447,6 ± 0,0	602,7 ± 453,6	1197,2 ± 544,7	0,098
G2	1209,2 ± 415,7	958,3 ± 516,8	1174,8 ± 337,0	0,676
	---	0,281	0,952	

Não houve diferença na densidade de vasos entre grupos ou dentro do mesmo grupo entre momentos ($P>0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Densidade de vasos nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	7	15	21	P
G1	$9,50 \times 10^{-5} \pm 0,00 \times 10^{-5}$	$15,7 \times 10^{-5} \pm 9,37 \times 10^{-5}$	$10,3 \times 10^{-5} \pm 2,44 \times 10^{-5}$	0,250
G2	$7,55 \times 10^{-5} \pm 4,55 \times 10^{-5}$	$10,2 \times 10^{-5} \pm 3,41 \times 10^{-5}$	$11,4 \times 10^{-5} \pm 8,60 \times 10^{-5}$	0,363
P	---	0,254	0,502	

A porcentagem de animais com proliferação de tecido fibroso (PTF) diferiu entre grupos apenas aos sete dias de pós-operatório ($P<0,001$), sendo menor no Grupo 2. Dentro do mesmo grupo ocorreram diferenças nas porcentagens, com o maior valor aos 15 dias de pós-operatório. A porcentagem de animais que apresentaram o tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME) diferiu entre grupos aos 15 ($P=0,014$) e 21 dias de pós-operatório ($P<0,001$), sendo maior a porcentagem no Grupo 2. Dentro do mesmo grupo ocorreram diferenças, com maior porcentagem aos 15 dias de pós-operatório. A porcentagem de presença de células multinucleadas multifocais (PCMM) diferiu entre grupos apenas aos 21 dias de pós-operatório ($P=0,014$) e foi maior no Grupo

2. Dentro do mesmo grupo ocorreram diferença, com maior porcentagem de células aos 21 dias de pós-operatório. Os dados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Proliferação de tecido fibroso (PTF), tecido fibroso entremeando-se no tecido muscular esquelético (TFETME) e presença de células multinucleadas multifocais (PCMM) verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	PTF			P	TFETME			P	PCMM			P
	7	15	21		7	15	21		7	15	21	
G1	20,0	80,0	40,0	<0,001	0,0	20,0	0,0	<0,001	0,0	0,0	20,0	<0,001
G2	0,0	80,0	40,0	<0,001	0,0	40,0	20,0	<0,001	0,0	20,0	40,0	<0,001
P	<0,001	1,00	1,00		---	0,014	<0,001		---		0,014	

A porcentagem de animais que apresentaram área focal de metaplasia mixoide (AFMM) não diferiu entre grupos ($P>0,05$). Contudo, dentro de cada grupo houve diferenças nas porcentagens entre momentos, com maior valor aos 15 dias de pós-operatório (80%). A porcentagem de animais que apresentaram áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC) não diferiu entre os grupos ($P>0,05$). Dentro do mesmo grupo ocorreram diferenças nas porcentagens entre momentos, sendo a menor porcentagem aos sete dias de pós-operatório. A porcentagem de infiltrado inflamatório mononuclear (IIM) diferiu entre grupos apenas aos sete dias de pós-operatório ($P<0,05$), sendo maior no Grupo 2. Dentro do mesmo grupo ocorreram diferenças entre momentos, sendo a maior porcentagem aos 15 dias de pós-operatório. Os dados estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Área focal de metaplasia mixoide (AFMM), áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa (AMMC), infiltrado inflamatório mononuclear (IIM), verificados nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	AFMM			P	AMMC			P	IIM			P
	7	15	21		7	15	21		7	15	21	
G1	0,0	80,0	40,0	<0,001	0,0	80,0	40,0	<0,001	0,0	80,0	40,0	<0,001
G2	0,0	80,0	40,0	<0,001	0,0	80,0	40,0	<0,001	40,0	100,0	40,0	<0,001
P	---	1,00	1,00		---	1,00	1,00		<0,001	0,136	1,00	

A porcentagem de animais com fibras musculares degeneradas (FMD) diferiram entre grupos aos 15 e 21 dias de pós-operatório, sendo a maior

porcentagem no Grupo 2. Entre grupos ocorreram diferenças entre momentos ($P < 0.05$), com maior porcentagem aos 15 dias de pós-operatório. A metaplasia cartilaginosa (MC) diferiu entre grupos aos 15 e 21 dias de pós-operatório ($P < 0.05$), sendo maior no Grupo 2. Dentro do mesmo grupo ocorreu variação entre momentos, sendo a maior porcentagem aos 15 dias de pós-operatório. Os dados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Fibras musculares degeneradas (FMD) e metaplasia cartilaginosa (MC) verificadas nas membranas induzidas em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

	FMD			P	MC			P
	7	15	21		7	15	21	
G1	0,0	20,0	0,0	<0,001	0,0	40,0	0,0	<0,001
G2	0,0	40,0	20,0	<0,001	0,0	80,0	20,0	<0,001
P	---	0,014	<0,001		---	0,0003	<0,001	

A porcentagem da proliferação de tecido fibroso (PF) na extremidade óssea proximal diferiu entre os grupos em todos os momentos ($P < 0.05$), sendo maior no Grupo 2 aos 7 e 21 dias de pós-operatório. Dentro do mesmo grupo, somente ocorreu diferenças nas porcentagens entre momentos no Grupo 2. Com respeito à extremidade óssea distal não se detectou diferenças dentro do mesmo grupo e entre grupos ($P > 0.05$). Os dados estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à proliferação fibrosa (PF), em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

PF	Proximal			P	PF	Distal			P
	7	15	21			7	15	21	
G1	40	40	60	0,0574	G1	80	100	80	0,2147
G2	60	20	100	<0,001	G2	100	100	100	1,00
P	0,0455	0,0098	0,0016		P	0,1360	1,00	0,1360	

Relativo à porcentagem da matriz óssea (MO) (Tabela 11) da extremidade óssea proximal, houve diferença entre os grupos e dentro do mesmo grupo em todos os momentos ($P < 0.05$). Com respeito à porcentagem da extremidade óssea distal houve diferenças entre grupos aos sete e 15 dias de pós-operatório ($P < 0.05$). Dentro do mesmo grupo ocorreu diferença na porcentagem apenas no Grupo 1, sendo o maior valor aos 21 dias de pós-operatório.

Tabela 11. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz óssea (MO), em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

MO	Proximal			P	MO	Distal			P
	7	15	21			7	15	21	
G1	40	20	40	0,0183	G1	60	40	100	<0,001
G2	60	0	80	<0,001	G2	100	80	80	0,2147
P	0,0455	<0,0001	0,0003		P	0,0016	0,0003	0,1360	

A porcentagem da matriz cartilaginosa (MC) (Tabela 12) na extremidade proximal diferiu entre grupos apenas aos 21 dias de pós-operatório ($P < 0.0001$). Dentro do mesmo grupo houve diferença entre momentos em ambos os grupos. Na extremidade distal houve diferenças entre grupos em todos os momentos ($P < 0.05$). Dentro do mesmo grupo foram verificadas diferenças entre momentos, somente no Grupo 1.

Tabela 12. Avaliação histológica quantitativa das extremidades ósseas proximal e distal à falha óssea, relativo à matriz cartilaginosa (MC), em galinhas do Grupo 1 (resina acrílica) e Grupo 2 (resina acrílica acrescida de antibiótico) aos sete, 15 e 21 dias de pós-operatório.

MC	Proximal			P	MC	Distal			P
	7	15	21			7	15	21	
G1	0	40	0	<0,001	G1	0	20	60	<0,001
G2	0	40	40	<0,001	G2	40	60	40	0,0574
P	---	1,00	<0,0001		P	<0,0001	<0,0001	0,0455	

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou um produto baseado no polimetilmetacrilato (PMMA), utilizado na odontologia, com ou sem antibiótico, mostrando que com ambas as formulações foi possível promover a indução da membrana.

Em relação à avaliação radiográfica a resina acrílica odontológica empregada no presente estudo não tinha o radiopacificador em sua composição, fato que interferiu na sua visibilização do preenchimento da falha segmentar, já que a radiopacidade foi similar à dos tecidos moles. Vale ainda citar que a resina acrílica odontológica não possuía “crosslink”. Este geralmente é incorporado para promover melhora da resistência ao solvente do polímero curado (PRICE, 1986); entretanto, o impacto de carga não se torna importante no tipo de falha segmentar empregado.

Na avaliação clínica, ambos os grupos apresentaram presença de seroma na área cirúrgica, sendo este mais intenso no Grupo 1. O processo pode estar relacionado à irritação local aos produtos, o qual pode também ter favorecido ao desenvolvimento de um processo infeccioso, visto ter sido identificado *Enterobacter aerogenes* na cultura do seroma de uma das aves, mesmo com o uso de antibiótico. A resina acrílica odontológica não é esterilizada, diferente do cimento ósseo utilizado na ortopedia, no qual a esterilização é realizada com óxido de etileno (WEBB e SPENCER, 2007). Contudo, a cultura do pó e líquido foram negativas, indicando que a contaminação foi secundária e não relacionada aos produtos. Ademais sinais de inflamação com edema e descarga serosa foram também notadas em duas galinhas, em estudo sobre a membrana induzida com o emprego de cimento ósseo ortopédico, que foram tratadas com penicilina benzatina (CUEVA et al., 2021).

Radiograficamente o início de proliferação óssea foi detectada com 15 e 21 dias após a cirurgia, com intensidade variando de discreta a moderada. Por sua vez, na análise histológica da extremidade óssea proximal as porcentagens de tecido fibroso, metaplasia óssea e metaplasia cartilaginosa diferiram entre grupos, sendo maior no Grupo 2. Na extremidade distal ocorreram variações entre os períodos, mas em sua maioria referia-se também ao Grupo 2. Desta forma, a presença do antibiótico aparentemente promoveu maior reação das extremidades ósseas.

Histologicamente a espessura média da membrana não mostrou diferença estatística entre grupos ou dentro do mesmo grupo entre momentos 15 e 21 de pós-operatórios. Contudo, deve-se considerar que apenas uma membrana foi identificada no Grupo 1 aos sete dias de pós-operatório. Um estudo em ratos mostrou diferenças de espessura das membranas induzidas de acordo com o tipo de cimento ósseo ortopédico e antibiótico empregados (NAU et al., 2016). Sendo assim, outros antibióticos e cimentos podem promover resultados diversos aos observados no atual estudo.

A densidade de vasos nas membranas não diferiu entre grupos ou dentro do mesmo grupo entre momentos, salientando-se a presença dos mesmos já na primeira avaliação aos sete dias de pós-operatório. Um estudo em coelhos revelou que as membranas induzidas se tornam altamente vascularizadas, sendo ainda capazes de secretar diversos fatores de crescimento, tais como VEGF e TGF β 1 (PELISSIER et al., 2004). Na avaliação de membranas induzidas em pacientes humanos foi verificado uma diminuição da taxa de vascularização com o tempo de implantação (AHO et al., 2013), o que deve ser considerado quando da realização do segundo estágio da técnica.

A porcentagem de infiltrado inflamatório mononuclear e a porcentagem de células multinucleadas multifocais diferiram entre grupos, respectivamente aos sete e 21 dias de pós-operatório, sendo sempre maior no Grupo 2, o que indica uma maior irritação inflamatória tecidual pela presença do antibiótico. As membranas induzidas geralmente promovem reação de corpo estranho com presença de macrófagos e células gigantes, porém no início do processo pode haver reação inflamatória aguda (PELISSIER et al., 2004; AHO et al., 2013). Em ambos os grupos foram também identificadas células linfocitárias, o que pode estar associada à reação imune mais intensa promovida pelo tipo de resina empregada, desde que os linfócitos são células envolvidas na imunidade humoral e mediada por células (LIEBICH, 2019).

Tanto no Grupo 1 como no Grupo 2 foram individualizadas apenas duas camadas na membrana induzida, particularmente aos 15 e 21 dias após a cirurgia. A membrana induzida geralmente é composta por pelo menos uma camada celular em contato com o cimento e outra mais externa fibrosa, sendo a terceira camada de fibras desorganizadas nem sempre observada, o que requer colorações especiais como o picosirius red (ALFORD et al., 2021). Contudo, em

estudo com galinhas jovens três camadas foram histologicamente identificadas com a coloração de hematoxilina-eosina aos 15 dias após implantação do cimento ósseo, porém estas foram menos distintas com 21 dias após a cirurgia (CUEVA et al., 2021). Além disso, um estudo com ratos Sprague–Dawley de um ano de idade, foram também identificadas as três camadas com a coloração de hematoxilina eosina, tanto com três como quatro semanas da indução da membrana (GOURON et al., 2014). A idade mais avançada das aves no atual estudo pode ter colaborado para as diferenças.

No presente estudo, a proliferação de tecido fibroso na membrana induzida diferiu entre grupos apenas aos sete dias de pós-operatório, sendo menor no Grupo 2. Além disso, não foram detectadas diferenças em áreas focais de metaplasia mixoide e áreas multifocais de metaplasia cartilaginosa. A presença de áreas de metaplasia cartilaginosa pode ser um indicativo de um maior amadurecimento da membrana (CUEVA et al., 2021). Em um modelo com ratos foram identificados vários pontos de mineralização e células ósseas nas membranas induzidas, quando analisadas por colorações especiais (GOURON et al., 2014). Em pacientes humanos, foi também relatado a ossificação endocondral, assim como a presença de osteogênese em membranas induzidas (AHO et al., 2013; NIIKURA et al., 2021).

O uso de antibiótico juntamente como a resina odontológica não influenciou negativamente as características da membrana induzida no atual estudo. Foi verificado em ratos que a membrana induzida não apresenta propriedades antimicrobianas e, segundo os autores, o uso de antibiótico local incorporado ao cimento junto ao extenso debridamento seria desejável durante o primeiro estágio do procedimento de Masquelet (ROUKOZ et al., 2019). No entanto, a possibilidade de resistência bacteriana, maior controle cirúrgico após o debridamento e a incorreta seleção de antibiótico estão entre os fatores para o não emprego do antibiótico (MASQUELET, 2017). Sendo assim, estudos futuros são necessários para determinar a validade clínica do emprego do antibiótico.

CONCLUSÃO

Foi possível produzir membranas induzidas com o uso de espaçador de resina acrílica odontológica e o acréscimo de antibiótico (cefazolina) não interferiu no desenvolvimento ou vascularização, com crescimento organizado de tecido fibroso. Outro fato importante é que a resina acrílica odontológica não interferiu na reparação óssea nas extremidades da fratura.

REFERÊNCIAS

- 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
- ALFORD, A.I., NICOLAOU, D., HAKE, M., MCBRIDE-GAGYI, S. Masquelet's induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *J. Orthop. Res.*, v.39, n.4, p.707-718, 2021.
- CAVALU, S. Acrylic bone cements: new insight and future perspective. *Key Eng. Mater.*, v.745, p.39-49, 2017.
- CUEVA, L.; RAHAL, S.C.; FONSECA-ALVES, C.E.; BONATELLI, S.P.; MAMPRIM, M.J.; FRANCIA, C.; BURINI, C.; MESQUITA, L.R. Masquelet-induced membrane characteristics in chicken radii bone defects. *J. Avian Med. Surg.*, v.35, n.1, p.51-59, 2021.
- Frazer RQ, Byron RT, Osborne PB, West KP. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15(6):629-639.
- 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.
- GOIATO, M.C.; FREITAS, E.; SANTOS, D.; MEDEIROS, R.; SONEGO, M. Acrylic resin cytotoxicity for denture base - Literature review. *Adv. Clin. Exp, Med.*, v. 24, n.4, p.679-686, 2015.
- 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.

- 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.
- LIEBICH, H-G. *Veterinary histology of domestic mammals and birds*. 5th ed. Sheffield: 5M Publishing, 2019. 397p.
- MAGNAN, B.; BONDI, M.; MALUTA, T.; SAMAILA, E.; SCHIRRU, L.; DALL'OCA, C. Acrylic bone cement: current concept review. *Musculoskelet. Surg.*, v.97, n.2, p.93-10, 2013.
- MASQUELET, A.C.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop. Clin. N. Am.*, v.41, p.27–37, 2010.
- MASQUELET, A.C. Induced membrane technique: pearls and pitfalls. *J. Orthop. Trauma*, v.31, n.Suppl 5, p.S36-S38, 2017.
- 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.
- NIKURA, T.; JIMBO, N.; KOMATSU, M.; OE, K.; FUKUI, T.; MATSUMOTO, T.; HAYASHI, S.; MATSUSHITA, T.; SAKAI, Y.; ITOH, T.; KURODA, R. Histological analysis of induced membranes in patients whose bone defects were treated with the Masquelet technique to identify factors affecting the vascularity of induced membranes. *J. Orthop. Surg. Res.*, v.16, n.1, p.248, 2021.
- PELLISSIER, P.; MASQUELET, A.C.; BAREILLE, R.; PELLISSIER, S.M.; AMEED, 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.
- PRICE, C.A. The effect of cross-linking agents on the impact resistance of a linear poly(methyl methacrylate) denture-base polymer. *J. Dent. Res.*, v.65, n.7, p.987-992, 1986.
- RASZEWSKI, Z.; NOWAKOWSKA-TOPOROWSKA, A.; NOWAKOWSKA, D.; WIĘCKIEWICZ, W. Update on acrylic resins used in dentistry. *Mini Rev. Med. Chem.*, v.21, n.15, p.2130-2137, 2021.
- ROUKOZ, S.; EL KHOURY, G.; SAGHBINI, E.; SALIBA, I.; KHAZZAKA, A.; RIZKALLAH, M. Does the induced membrane have antibacterial properties? An

experimental rat model of a chronic infected nonunion. *Int. Orthop.*, v.44, n.2, p. 391–398, 2020.

SCHWARZ, E.M.; MCLAREN, A.C.; SCULCO, T.P.; BRAUSE, B.; BOSTROM, M.; KATES, S.L.; PARVIZI, J.; ALT, V.; ARNOLD, W.V.; CARLI, A.; CHEN, A.F.; CHOE, H.; CORAÇA-HUBER, D.C.; CROSS, M.; GHERT, M.; HICKOK, N.; JENNINGS, J.A.; JOSHI, M.; METSEMAKERS, W.J.; NINOMIYA, M.; NISHITANI, K.; OH, I.; PADGETT, D.; RICCIARDI, B.; SAEED, K.; SENDI, P.; SPRINGER, B.; STOODLEY, P.; WENKE, J.C.; Hospital for Special Surgery 2019 Biofilm Symposium Workgroup (2021). Adjuvant antibiotic-loaded bone cement: Concerns with current use and research to make it work. *J. Orthop. Res.*, v.39, n.2, p.227–239, 2021.

SCHÖTTLE, P.B.; WERNER, C.M.; DUMONT, C.E. Two-stage reconstruction with free vascularized soft tissue transfer and conventional bone graft for infected nonunions of the tibia: 6 patients followed for 1.5 to 5 years. *Acta Orthop.*, v.76, n.6, p.878–883, 2005.

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

VUGT, T.A.G.; ARTS, J.J.; GEURTS, J.A.P. Antibiotic-Loaded Polymethylmethacrylate beads and spacers in treatment of orthopedic infections and the role of biofilm formation. *Front. Microbiol.*, v.10, n.1626, p.1-11, 2019.

WALKER, L.C.; BAKER, P.; HOLLEYMAN, R.; DEEHAN, D. Microbial resistance related to antibiotic-loaded bone cement: a historical review. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.*, v.25, n.12, p.3808–3817, 2017.

WEBB, J.C.; SPENCER, R.F. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg. Br.*, v.89, n.7, p.851-857, 2007.

ANEXO

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Técnica da membrana induzida usando cimento ósseo ortopédico ou resina acrílica odontológica, acrescidos ou não de antibiótico, em defeito segmentar no rádio de galinhas" **Protocolo CEUA 0237/2021**, a ser conduzido por Luiz Donizete Campeiro Junior, 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	20/12/2021 a 20/12/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	AVE / GALLUS GALLUS DOMESTICUS /
Raça	variadas
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	60
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	1,600
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	2 ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Oriundos de casa agropecuárias

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 15/12/2021



JULIANY GOMES QUITZAN
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu