



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

UTILIZAÇÃO DE BLENDAS POLIMÉRICAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) E POLI (ISOPRENO) (CELLPRENE®) PARA CORREÇÃO DE DEFEITO CRÍTICO EM ULNA DE *Coturnix japonica*

Miúriel de Aquino Goulart

PORTO ALEGRE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

UTILIZAÇÃO DE BLENDAS POLIMÉRICAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-COGLICÓLICO) E POLI (ISOPRENO) (CELLPRENE®) PARA CORREÇÃO DE DEFEITO CRÍTICO EM ULNA DE *Coturnix japonica*

Autor: Ma. Miúriel de Aquino Goulart

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

PORTO ALEGRE

2020

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

CIP - Catalogação na Publicação

Goulart, Miúriel de Aquino
Utilização de blenda polimérica de poli (Ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) (Cellprene®) para correção de defeito crítico em ulna de Coturnix japônica / Miúriel de Aquino Goulart. -- 2020.
49 f.
Orientador: Marcelo Meller Alievi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Ortopedia. 2. Silvestres. 3. Aves. 4. Biomateriais. 5. Implantes. I. Meller Alievi, Marcelo, orient. II. Título.



Ata nº

Ata de Defesa de Tese para concessão do título de Doutor em Ciências Veterinárias.
Área de Concentração: Morfologia, Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
Especialidade: Cirurgia Animal e Anestesiologia

Às 14 horas do dia 09 de abril de 2020, foi realizada através da sala virtual <https://mconf.ufrgs.br/webconf/00144905> do Portal Mconf UFRGS de forma pública em formato de videoconferência. Sob a presidência do Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi (orientador), reuniu-se a banca examinadora constituída por: Dr. Rogério Ribas Lange (UFPR), Dra. Aline Silva Gouvêa (UFRGS) e Dr. Márcio Poletto Ferreira (UFRGS). Em sessão pública, a aluna Miúriel de Aquino Goulart apresentou oralmente a tese intitulada "Utilização de Blenda Polimérica de Poli (Ácido Lático-Co-Glicólico) e Poli (Isopreno) (Cellprene®) para Correção de Defeito Crítico em Ulna de Coturnix japônica" e, na sequência, foi arguida pelos membros da banca examinadora. Após a arguição, a banca examinadora reuniu-se em sessão secreta e expressou seu julgamento, considerando a candidata,

Banca Examinadora:

Nome completo	CPF	Instituição de origem	Aprovada ou Reprovada
Dr. Rogério Ribas Lange (videoconferência)	359.459.669-91	UFPR	Aprovada
Dra. Aline Silva Gouvêa (videoconferência)	932.812.850-15	UFRGS	Aprovada
Dr. Márcio Poletto Ferreira (videoconferência)	677.528.100-53	UFRGS	Aprovada

Em face do resultado obtido, a banca examinadora considerou a candidata: **aprovada**.

Nome completo	Função	Assinaturas
Dr. Marcelo Meller Alievi	Presidente	
Dr. Rogério Ribas Lange	Membro	
Dra. Aline Silva Gouvêa	Membro	
Dr. Márcio Poletto Ferreira	Membro	
Miúriel de Aquino Goulart	Doutoranda	

A banca examinadora sugeriu a seguinte alteração no título da tese:

Prof. Cláudio Wageck Canal
Coordenador do PPGCV

Dedico este trabalho a todas as codornas que involuntariamente participaram deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus mentores espirituais, que estiveram comigo mesmo quando eu duvidava.

Ao meu marido, Vitor Hugo, por todo apoio incondicional, por aguentar minhas ausências, meus estresses, meus choros e decepções, e ainda assim ser o cara mais carinhoso, cuidadoso e amável que existe. Pelas caronas, pelas mãos-de-obra, pelas entregas de ração para as penosas, pelas traduções, enfim.... Não tem palavras que expressem minha gratidão. Te amo!

Aos meus pais, Toni e Janete, por sempre estarem ali, mesmo que no mundo virtual, torcendo pelas minhas lutas, comemorando minhas vitórias e tranquilizando as minhas perdas. Se sou quem eu sou hoje, é porque tive vocês como exemplo. Amo vocês!

À minha irmã, Mariél, que me deu suporte em incontáveis momentos, e que sempre tem alguma coisa boa para dizer quando a situação complica. Te amo!

Ao meu irmão, Marcel, que mesmo distante, mora no meu coração.

Às minhas famílias, Rodrigues de Aquino, Secchi Goulart, Costa de Souza, que sempre se fizeram presente, cada qual à sua maneira, dando suporte, aquela palavra amiga, ou simplesmente ouvindo minhas reclamações. Obrigada por existirem! Desculpem minhas ausências... Amo vocês.

Ao meu orientador, Marcelo Meller Alievi, que me acompanhou em toda trajetória acadêmica, me orientando nos estágios da graduação, na residência, banca do meu mestrado e, agora, orientando meu doutorado. Não tenho palavras para definir a importância que tens na minha vida, e o quanto admiro, respeito e agradeço por todo suporte nesses 12 anos. Muito obrigada por ter me apoiado, principalmente quando eu mais precisei. Gratidão eterna por tê-lo na minha vida.

À querida equipe que me ajudou – MUITO – no momento experimental do meu projeto, principalmente ao melhor anestesista: Manuel Trujillo, por ceder seu precioso tempo, sabedoria e aparelhos para o meu projeto. Não menos importante, Aninha Vallim, melhor estagiária EVER! Ainda, à Catharina Noé, que foi minha salvação no final do experimento! Obrigada!

Meu muito obrigada ao Anderson, grande companheiro de cirurgias, sempre ali, sempre disposto, sempre solícito! Também à Lívia, pelo apoio e às vezes simplesmente por perguntar se estava tudo bem... gratidão!

Ao Diagnose Vet, principalmente à colega e amiga Gabriela Fredo, por não ter hesitado em participar deste estudo realizando as análises histológicas. Às estagiárias, Caroline e Victória, por também ajudarem muito com as minhas amostras.

À toda equipe do LABIOMAT/ UFRGS, especialmente o prof. Dr. Luís Alberto dos Santos e à doutoranda Nathália Oderich Muniz, que produziram os implantes utilizados neste trabalho e sempre foram muito atenciosos com tudo!

Ao HCV/UFRGS, pela estrutura, pelos materiais, e por ser a minha segunda casa há mais de uma década. Em especial, ao funcionário Jaques, por sempre estar disposto a ajudar e agilizar um raio x em um momento de desespero. Não menos importante, aos funcionários do bloco de ensino e de rotina, que sempre auxiliaram em tudo que puderam.

À colega e amiga Bruna Zafalon, por ter feito o projeto que definiu o que eu poderia utilizar no meu trabalho de forma racional, científica e apropriada. Sem o teu trabalho, o meu não existiria. Obrigada!

Às amigas Alessandra, Priscila, Anelise, Natália, Victória e Mariana, por serem um ombro amigo nesse mundo louco da vet.

Aos amigos e amigas da vida, que não são muitos, mas são ótimos!

À amiga e advogada Shaiala Marques, por me apoiar em tudo, e por lutar contra uma enorme injustiça em especial.

Ao amigo Eduardo de Freitas Costa, por todo auxílio estatístico sempre!

À Faculdade Murialdo, que abriu as portas por acreditar no meu trabalho, principalmente à coordenadora do curso de Medicina Veterinária, Fernanda Flores, à colega Mayra Vissotto Ribeiro e ao colega Kléber Tochetto Gomes, amigos queridos que tenho prazer em manter por perto.

Às equipes do SOTVET e do PRESERVAS/UFRGS, antigos e novos, pelas risadas, cafés, zueiras, churrascos e amigos secretos!

Ao professor Dr. Emerson Contesini, por cordialmente emprestar o bisturi ultrassônico utilizado neste projeto.

Aos meus dois gatos, Batman e Katana, por limparem minhas nuvens negras com carinho, pãozinho e ronrom.

Sinto muito

Me perdoe

Te amo

Sou grata

RESUMO

Em vida livre ou cativeiro, a casuística de fraturas em aves é alta. O tratamento de fraturas nessa classe animal é desafiador, principalmente pelas características anatômicas, metabólicas e fisiológicas que diferem as aves dos mamíferos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) (Cellprene®) para correção de defeito crítico em ulna de *Coturnix japonica*. Foram utilizadas 20 codornas-domésticas (*Coturnix japonica*), fêmeas e com 60 dias de idade. As aves foram avaliadas previamente ao desenvolvimento do projeto quanto à sanidade por meio do exame clínico, hematológico e radiológico da asa esquerda. Sob anestesia dissociativa realizada com cetamina, xilazina e tramadol associado a remifentanil trans-operatório, a ulna foi submetida a ostectomia de duas vezes o seu diâmetro. Na sequência foi realizada a inserção intramedular do implante de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) (Cellprene®) enrolado em um pino liso de Kirschner com 0,8mm de diâmetro e aproximadamente 2,8 cm de comprimento, por via retrógrada. A dermorrafia foi feita com mononáilon 4-0 no padrão isolado simples. As aves foram mantidas com bandagem em 8 por 10 dias pós-operatórios e submetidas à exame radiográfico aos sete, 15, 30, 60 e 90 dias após o procedimento cirúrgico. Aos sete, 15, 30 e 60 dias, foi feita eutanásia de duas aves e aos 90 dias das 12 restantes e as ulnas foram enviadas à análise histológica. Em cada avaliação radiográfica e histológica foi atribuído escore que variaram de 0 a 5 pontos, de um total de 8 (radiográfico). Os escores histológicos finais apresentaram variação de 1 a 8 pontos, de um total de 13. Não foi observado união óssea radiográfica ou histológica e 55% (11/20) apresentaram proliferação de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso no foco da ostectomia, caracterizando não união. Além disso, ficou evidenciado na maioria dos animais a presença de alterações histológicas compatíveis com reação tipo corpo estranho, como inflamação mononuclear e presença de cáseo. Conclui-se que a utilização de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) (Cellprene®) não promove união óssea radiográfica ou histológica para correção de defeito crítico em ulna de *Coturnix japonica*.

Palavras-chave: ortopedia, fratura, aves, silvestres, biomateriais, implantes, enxertos.

ABSTRACT

During the veterinary attendance routine, the frequency of avian fracture is elevated, in both wild and captive environments. The treatment of fractures in these animals is challenging, especially as a result of the anatomical, metabolic and physiological features that differentiate birds from mammals. This goal of this study was to evaluate the use of a polymeric blend of poly(lactic-co-glycolic acid) and polyisoprene (Cellprene®) to recover a critical-sized bone defect in the ulna of quail (Coturnix japonica). The study used 20 female C. japonica of 60 days of age. Each bird had been evaluated, prior to the study, by a clinical examination of their health, hematology, and radiology of their left wing. Using dissociative anesthesia with ketamine, xylazine and tramadol associated with trans-operative remifentanyl, the bird's ulna was subjected to an ostectomy of twice its diameter. Then, a plain Kirschner pin of 0.8mm diameter and about 2.8cm length, wrapped in a polymeric blend of poly(lactic-co-glycolic acid) and polyisoprene was inserted retrograde. The skin was sutured with 4-0 nylon in a simple interrupted pattern. The birds were kept with a figure-of-eight bandage for 10 days after the procedure. Radiological examinations were made on the 7th, 15th, 30th, 60th and 90th days after the procedure. Two birds were euthanized on the 7th, 15th, 30th and 60th days after the procedure and their ulnas sent for histological analysis. Ninety days after procedure, 12 birds were euthanized and their ulnas also sent for histological analysis. A score based on tables from the literature was designed for each radiological and histological evaluation. The final radiological scores varied from 0 to 5 points out of 8. The final histological score presented a variation of 1 to 8 points out of 13. No single animal presented radiographical bone union and 55% (11/20) presented fibrosed tissue or fibrocartilaginous proliferation on the ostectomy focus, characterizing a non-union. Besides that, in most animals the presence of histological alterations compatible with foreign-body reaction was evident, such as mononuclear inflammation and the presence of caseous material. Hence, the use of the polymeric blend of poly(lactic-co-glycolic acid) and polyisoprene did not promote radiological or histological bone union when correcting a critical-sized bone defect in the ulna of C. japonica.

Key words: orthopedics, fracture, birds, wild, biomaterials, implants, grafts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Implante de blenda polimérica de poli (Ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli (isopreno) (IR) (Cellprene®) moldado ao redor de pino intramedular de 0,8mm de diâmetro. 21
- Figura 2 - Procedimento cirúrgico em ulna de *Coturnix japonica*. **A.** Incisão de pele na região diafisária ulnar esquerda. **B.** Divulsão e afastamento dos tecidos adjacentes à ulna esquerda. **C.** Defeito crítico em ulna após ostectomia de 2x diâmetro do osso. **D.** Inserção retrógrada da blenda polimérica em um pino intramedular de 0,8 mm. **E.** Aspecto da lesão após a colocação do implante e limpeza com solução fisiológica. **F.** Sutura de pele no padrão isolado simples com mononáilon 4-0. 23
- Figura 3 – Avaliação radiográfica mediolateral de ulna esquerda das codornas-domésticas (*Coturnix japonica*) de número 01, 03, 06, 07, 16 e 19 submetidas à ostectomia e implantação de blenda polimérica de PLGA/IR em 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Observação de migração parcial do pino (seta) e de formação de calo ósseo, mas sem união aos 30 e 60 dias da n° 07 e 60 e 90 dias da n° 19. 31
- Figura 4 - Corte histológico. *Coturnix japonica*. **A.** Ulna com enxerto realizado, 7 dias. Proliferação de tecido fibroso (asterisco). H&E. Obj. 100X. **B.** Ulna com enxerto realizado há 15 dias. Proliferação de tecido fibrovascular (setas), além de presença central de material refringente entremeado por fibrose e inflamação, compatível com lesão reacional à enxerto (asterisco). H&E. Obj. 100X. **C.** Ulna com enxerto realizado há 30 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular entremeado por inflamação mononuclear exibindo em periferia halo necrótico (asterisco). Em bordos há matriz osteoide imatura (osso hospedeiro) (setas) H&E. Obj. 100X. **D.** Ulna com enxerto realizado há 60 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular (asterisco) e matriz osteoide com formação incompleta (seta). H&E. Obj. 100X. **E.** Ulna com enxerto realizado há 90 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular entremeado a inflamação mononuclear e com área central de necrose indicando presença de cáseo (asterisco). H&E. Obj. 100X. **F.** Ulna com enxerto realizado há 90 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular e em área central, presença de material refringente amorfo indicando a presença do enxerto (seta). H&E. Obj. 100X. 34
- Gráfico 1 - Resultados finais dos escores radiológico e histológico para *Coturnix japonica* em tempos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios para colocação de implante de Cellprene® em defeito crítico de ulna. 36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Escore para avaliação radiográfica proposto por Ehrhart et al. (2005) e adaptado para avaliação da consolidação em defeitos ósseos em ulna de *Gallus gallus domesticus* por Boos (2017) e Gutierrez (2017) e por Zafalon-Silva (2019) em *Coturnix japonica*. 25
- Tabela 2 - Escore para avaliação histológica de critérios para consolidação de defeitos críticos em ulna de *Columba livia* proposto por Tunio et al. (2015) e adaptado para avaliação da consolidação em defeito crítico em ulna de *Coturnix japonica* no presente estudo. 27
- Tabela 3 - Escores radiológicos (0-8) para as codornas deste estudo de acordo com o tempo pós-operatório. Valores do escore final de avaliação radiográfica para análise da consolidação em defeitos ósseos em ulna em *Coturnix japonica* no presente estudo, considerando um total de 8 pontos. 30
- Tabela 4 - Descrição dos escores obtidos por cada codorna do estudo em relação aos critérios de avaliação histológica (Análise da consolidação – A; Desenvolvimento de córtex – B; Incorporação do enxerto ósseo – C; Presença do enxerto, grau de neovascularização, inflamação, tipo celular predominante e presença de cáseo). 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<i>BID</i>	Duas vezes ao dia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DP	Desvio-padrão
EtCO ₂	Dióxido de carbono expirado – capnografia
FAVET	Faculdade de Veterinária
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
g	Gramas
IM	Intramuscular
IR	Isopreno
IV	Intravenoso
kg	Quilograma
m ²	Metros quadrados
mm	Milímetro
MPA	Medicação pré-anestésica
n ^o	Número
NaCl	Cloreto de sódio
PIM	Pino intramedular
PLGA	Ácido láctico-co-glicólico
PO	Pós-operatório
RS	Rio Grande do Sul
<i>SID</i>	Uma vez ao dia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VO	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ORTOPEDIA EM AVES E A UTILIZAÇÃO DE IMPLANTES NA MEDICINA DE AVES	16
2.2	Ortopedia em aves.....	16
2.3	Implantes.....	17
2.3.1	Blenda polimérica de poli (Ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) como biomaterial.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1.1	Animais e manutenção	20
3.1.2	Delineamento amostral.....	20
3.1.3	Implante de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli (isopreno) (IR) (Cellprene®).....	21
3.1.4	Procedimentos anestésicos e pré-operatórios	21
3.1.5	Procedimento cirúrgico	22
3.1.6	Manejo pós-operatório	24
3.1.7	Acompanhamento de evolução clínica.....	24
3.1.8	Avaliação histológica	25
3.1.9	Análise estatística	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Características individuais e cirúrgicas	28
4.2	Características radiológicas	28
4.3	Características histológicas	32
5	DISCUSSÃO.....	37
6	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO I – DOCUMENTAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA CEUA- UFRGS	47

1 INTRODUÇÃO

Em se tratando da rotina prática da medicina de animais selvagens e *pets* não convencionais, as aves representam a classe mais comum, seja pela sua grande diversidade de espécies e população de vida livre, seja pela sua popularidade como animal de estimação. Em qualquer ambiente – vida livre ou cativo – as afecções ortopédicas são habituais (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017).

O Núcleo de Conservação e Reabilitação de Animais Silvestres (PRESERVAS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), responsável pelos atendimentos a animais silvestres no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, tem em seus registros, os seguintes dados para a contextualização do problema que motiva este estudo:

- No período de janeiro de 2008 a dezembro de 2016 foram atendidos 2008 animais silvestres, oriundos de cativo e de vida livre.
- Neste período, foram atendidas 1154 aves (57,5%), 290 répteis (14,4%), 557 mamíferos (27,7%), 6 peixes (0,3%) e 1 anfíbio (0,1%).
- Dos atendimentos a aves, 270 (23%) foram afecções musculoesqueléticas.

A partir desses dados é importante salientar que a cada 10 animais atendidos no setor, mais da metade são aves e uma em cada cinco apresenta fratura em um ou mais ossos.

Muitas aves são encaminhadas para atendimento clínico médico-veterinário com fraturas. Devido a cortical fina, característica dos ossos dessa classe animal, frequentemente essas fraturas são cominutivas e/ou representam importante perda óssea (Tully, 2002).

Existem três opções principais para o tratamento das fraturas em aves: reparo cirúrgico, coaptação externa e confinamento. Quando há deslocamento de fragmentos e/ou instabilidade no local fraturado, o reparo cirúrgico é sempre preconizado (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017).

Algumas afecções ortopédicas em aves demandam grande quantidade de regeneração óssea, situação comum em grandes defeitos ósseos que podem surgir em decorrências de traumas (Fattahian, Mansouri and Mansouri, 2017). Aves que sofrem fraturas por alta energia frequentemente apresentam fraturas cominutivas e com graves danos aos tecidos adjacentes, sendo frequentemente expostas (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2018). Na medicina, essas situações de grande perda óssea são habitualmente tratadas com enxertos ósseos ou com implantes de biomateriais (Fattahian, Mansouri and Mansouri, 2017).

O uso de materiais sintéticos como implantes para reparos de defeitos ósseos vem sendo mais estudados e aplicados na rotina médica e odontológica, sendo que uma ampla

variedade de materiais tem sido empregada e testada (Fattahian, Mansouri and Mansouri, 2017). Dentre os biomateriais utilizados, pode-se listar o titânio, os compostos cerâmicos, a hidroxiapatita, os cimentos de fosfato de cálcio, os aloplásticos, dentre outros (Pinto, 2010).

O uso de polímeros biocompatíveis sintéticos ou naturais tem sido alvo dos estudos da engenharia de tecidos. O poli (lático-co-glicólico) (PLGA) é bastante aplicado e estudado dentre polímeros biocompatíveis devido à versatilidade de sua aplicação e ao relativo baixo custo de produção em escala industrial. Já o poli (isopreno) (PI) é o principal componente polimérico da borracha natural, extraída das árvores da *Hevea brasiliensis*, ou seringueira. Embora não seja amplamente utilizado em engenharia de tecidos, o poli (isopreno) exhibe excelentes propriedades angiogênicas, que garantem o suprimento de sangue para o local do implante, acelerando o período de recuperação tecidual (Guerra *et al.*, 2018).

A utilização de codornas domésticas (*Coturnix japonica*) como modelos experimentais em cirurgias ortopédicas ainda não é comum, com poucos relatos na literatura. Como exemplo, é possível citar o estudo de Bolson *et al.* (2005) que avaliou o implante de poliuretano derivada de polímero de mamona em úmero de codornas. Devido às características biológicas e a facilidade de manejo e manutenção em cativeiro (Huss, Poynter and Lansford, 2008), acredita-se que a *C. japonica* possua grande potencial como modelo experimental em ortopedia.

Posto isto, o presente trabalho foi desenvolvido buscando avaliar a utilização de blenda polimérica de poli (ácido lático-co-glicólico) e poli (isopreno) (Cellprene®) para correção de defeito crítico em ulna de *Coturnix japonica*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORTOPEDIA EM AVES E A UTILIZAÇÃO DE IMPLANTES NA MEDICINA DE AVES

2.2 Ortopedia em aves

Afecções ortopédicas são problemas frequentes na rotina de atendimento às aves, sendo observadas fratura, luxação e degeneração articular, normalmente em decorrência de traumas ou de doenças osteometabólicas (Tully, 2002; Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017). Nas aves, os ossos apresentam duas principais funções: suporte para a musculatura e reserva de cálcio e fósforo (Tully, 2002).

A cortical óssea fina e a grande variação de tamanho, peso e conformação anatômica das aves geram diferentes resultados quando envolve a questão do tratamento das fraturas (Williams *et al.*, 1987). Assim, as aves apresentam adaptações anatômicas em relação ao esqueleto de mamíferos, sendo possível elencar essencialmente a presença de ossos pneumáticos e de corticais finas e com pouco osso esponjoso (Helmer and Redig, 2006; Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017).

Ainda assim, há aplicabilidade dos princípios ortopédicos básicos: fixação rígida, alinhamento anatômico, retorno precoce à função e baixa morbidade. Não obstante, as aves apresentam baixa cobertura de tecidos moles, o que aumenta a incidência de fraturas expostas e lesão neurovascular regional (Helmer and Redig, 2006; Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017).

Tão importante quanto classificar uma fratura é avaliar e entender a natureza dela e os parâmetros que podem contribuir para a complicação do quadro, principalmente a qualidade do osso e o estado fisiológico da ave. Algumas características como localização, tipo, natureza da fratura são essenciais para o planejamento do tratamento a ser empregado (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2018).

Fraturas com grandes perdas ósseas são os maiores desafios na clínica de aves (Tunio *et al.*, 2015). Dentre as formas de tratamento podemos citar o cirúrgico, a coaptação externa e o repouso com restrição de espaço em gaiolas (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2018). As fraturas por alta energia são comuns em aves de vida livre e com frequência são cominutivas, expostas, com grande perda óssea e grave lesão aos tecidos adjacentes. Nessas situações complexas, o tratamento cirúrgico é preconizado (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2018).

A não-união óssea, uma complicação no processo de consolidação de fraturas frequentemente causada por perda de suprimento sanguíneo periosteal devido ao trauma ou à abordagem cirúrgica, pode ser definida pela falha na união dos fragmentos ósseos por perda de atividade osteogênica no local de fratura (Schmaedecke *et al.*, 2003; Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017).

A classificação dos quadros de não-união baseia-se nos padrões de suprimento sanguíneo e no potencial osteogênico, sendo: viáveis ou não-viáveis. Na maioria dos casos, o tratamento da não-união é baseado na restauração do alinhamento ósseo, fixação estável e aplicação de enxertos ou substitutos ósseos com propriedades osteogênicas, osteocondutivas e osteoindutivas (Schmaedecke *et al.*, 2003).

2.3 Implantes

Segundo Balthazar *et al.* (2013), a utilização de implantes ou enxertos tem grande importância no tratamento de fraturas cominutivas de ossos longos, onde há necessidade de substituição ou preenchimento da falha óssea. O uso de enxertia já é amplamente estabelecido em medicina e odontologia (Oliveira, 2002), porém, apesar de já ser utilizado principalmente em mamíferos domésticos, não é aplicado com a mesma frequência em aves, pois são apresentadas algumas limitações como a dificuldade de obtenção de enxerto autógeno (Sanaei *et al.*, 2015).

Segundo Hawthorne (2010), os materiais para enxerto ósseo podem ser classificados em:

- Enxertos autógenos ou autoenxertos: quando há realocação de tecido no mesmo indivíduo. Este modelo conseqüentemente não provoca reação imune e pode ser osso cortical ou esponjoso.
- Enxertos alogênicos, homogêneos ou homoenxertos: são tecidos enxertados entre indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente distintos. Exemplos: osso fresco, congelado, liofilizado ou desmineralizado.
- Xenoenxertos, heteroenxertos ou heterólogos: enxertos realizados entre indivíduos de espécies diferentes. Neste caso é possível incluir ossos de animais de espécies diferentes do receptor e os materiais sintéticos, que podem ser de natureza metálica, cerâmica ou polimérica.

Segundo Marques (2011), a definição mais amplamente aceita de biomateriais vêm da Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas, de 1982, que explica o termo como “toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de

origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais”.

Sendo assim, o biomaterial ideal utilizado para implantes tem de ser inerte, biocompatível ou biotolerado, não alérgico, não cancerígeno, eliminado do organismo em tempo compatível com a substituição por novo osso, de fácil manipulação, esterilizável, com boa estabilidade, econômico e não atuar como substrato para proliferação de microrganismos patogênicos (Pinto, 2010; Marques, 2011; Lacerda, 2014).

Os enxertos ósseos podem promover neoformação óssea através de três principais mecanismos: osteocondução, osteoindução e osteogênese (Oliveira, 2002; Hawthorne, 2010; Lacerda, 2014). Na osteocondução o enxerto serve de suporte para o crescimento, fornecendo estrutura para depósito ósseo (Oliveira, 2002; Lacerda, 2014). Na osteoindução há estímulo à formação óssea pela promoção de recrutamento de células mesenquimais do receptor, que se diferenciarão em osteoblastos (Oliveira, 2002; Lacerda, 2014). A osteogênese é a síntese óssea por células sobreviventes do enxerto, ou neoformação óssea (Oliveira, 2002; Lacerda, 2014).

2.3.1 Blenda polimérica de poli (Ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) como biomaterial

O Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um polímero biorreabsorvível dos mais populares e um dos mais estudados na área médica (Marques, 2011). Segundo Marques (2011), “esses polímeros podem ser sintetizados a partir de fontes vegetais renováveis, fazendo-os materiais promissores em tempos cuja palavra de ordem no ramo tecnológico é sustentabilidade”. Ainda, Guerra et al. (2018) afirmaram que o PLGA é importante entre polímeros biocompatíveis devido à versatilidade de aplicação, ao relativo baixo custo de produção em escala industrial, a boa compatibilidade e não toxicidade, além de ser facilmente processado em diferentes dispositivos.

O Poli (isopreno) (IR) é um polímero extraído da árvore *Hevea brasiliensis*, também conhecida como seringueira. O cis-1,4-poliisopreno é conhecido como borracha de isopreno ou látex, encontrado na borracha da seringueira e obtido pela coagulação do látex natural, no entanto também pode ser sintetizado em laboratório (Marques, 2011). O IR apresenta excelentes propriedades angiogênicas que asseguram o fornecimento de sangue ao local do implante, acelerando o período de recuperação do tecido. A angiogênese é um processo fisiológico complexo através do qual novos capilares são formados a partir de vasos

preexistentes, envolvendo o crescimento migratório e a diferenciação de células endoteliais, e é crucial para a cicatrização de feridas e regeneração tecidual, pois esses processos são altamente dependentes da vascularização (Guerra *et al.*, 2018).

Marques (2011) ainda explica que “uma blenda polimérica é a mistura física de dois ou mais polímeros ou copolímeros que não estão ligados por ligações covalentes” e visa a obtenção de características novas combinando polímeros. No caso da blenda de PLGA e IR, o objetivo principal é associar a propriedade de biorreabsorção do PLGA com a resposta de neovascularização e adesão celular do IR em um material biocompatível (Marques, 2011).

O Cellprene®, nome registrado desta blenda polimérica, já foi utilizado *in vivo* em coelhos, testando a viabilidade deste implante no formato espiral para o tratamento de estenose traqueal (Schopf *et al.*, 2017); além disso, foi utilizado como implante absorvível para utilização em expansão cranial visando o tratamento de craniosinostose em coelhos (Faller *et al.*, 2015); e por fim, a histotoxicidade foi avaliada como implante em crânio de ratos Wistar, objetivando-se também a utilização como implante na craniosinostose, demonstrando que o material tem potencial de ser estudado para esse objetivo (Kim *et al.*, 2014).

Todavia, ainda não há registros da utilização deste material em aves, sendo este o primeiro estudo nessa classe animal e o primeiro estudo com objetivo de promover reparo de fraturas em ossos longos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob o número de protocolo 36819 (ANEXO 1).

3.1.1 Animais e manutenção

Foram utilizadas 20 codornas-domésticas (*C. japonica*) fêmeas, adultas em início de fase reprodutiva (60 dias de vida), com peso médio de 160g, obtidas de criadouro comercial. Os animais foram aclimatados durante 15 dias em gaiola coletiva (3,7m²). Durante todo o experimento os animais foram mantidos com água e ração comercial para codornas de postura (Languiru®) *ad libitum*. A higienização dos comedouros, bebedouros e dos recintos foi feita diariamente e a troca da cama de maravalha a cada 10 dias.

Após o período de aclimação os animais foram submetidos a avaliação clínica individual pré-operatória, seguida dos seguintes exames complementares hemograma, contagem de trombócitos e radiografia de membro torácico esquerdo (MTE) nas projeções mediolateral e craniocaudal.

As amostras de sangue periférico foram obtidas por punção de veia jugular direita, através do uso de seringas de 1 ml e agulhas hipodérmicas estéreis (agulha 13 x 0,45 mm ou 13 x 0,38 mm) previamente heparinizadas. O sangue colhido (no máximo 1mL) foi acondicionado em microtubos contendo heparina até o momento da avaliação laboratorial em tempo não superior a 24h da coleta. A extensão sanguínea foi realizada no momento imediatamente pós-colheita.

Os critérios de exclusão dos animais no experimento foram: alterações clínicas no exame físico (mucosas hipocoradas, dispneia, lesões, tumores), alterações na avaliação hematológica e/ou presença de lesões traumáticas ou congênicas em asa esquerda.

Os animais incluídos no estudo receberam marcação individual através da colocação de anilhas plásticas coloridas em região de tarsometatarso.

3.1.2 Delineamento amostral

Para determinação do n amostral, foi utilizado o software WinPepi (versão 11.65), baseado em estudos anteriores de Zhang et al. (2014) e Kim et al. (2014). Para um nível de significância de 5% e 80% de poder estatístico, o software estabeleceu um mínimo de 18 animais. Desta forma, foi estabelecido o total de 20 animais para este estudo.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória simples, por sorteio, em cinco subgrupos de acordo com o tempo de pós-operatório: 7, 15, 30, 60 e 90 dias, sendo dois

animais submetidos a eutanásia aos 7, aos 15, aos 30 e aos 60 dias, para envio de material para análise histológica para avaliação das propriedades atribuídas ao biomaterial implantado e 12 animais no grupo dos 90 dias, para verificação da consolidação ou não da fratura, bem como as características radiológicas e histopatológicas.

3.1.3 Implante de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli (isopreno) (IR) (Cellprene®)

O PLGA utilizado foi produzido pela PURAC (Holanda) e o IR utilizado era o látex natural centrifugado, da marca Mafer, produzido por indústria e comércio de artefatos de borracha. A blenda de PLGA/IR foi obtida na proporção de 60/40, diluídas em clorofórmio. O processo de secagem em estufa era o responsável por volatilizar esse solvente. Após a obtenção do material, este foi transformado no formato de uma lâmina de espessura finíssima e enrolada a fim de formar um corpo cilíndrico similar a um osso, observando-se a média de diâmetro ósseo da ulna de codornas. Este material foi moldado já ao redor de cada pino intramedular de 0,8 mm de diâmetro (**Figura 1**), embalado em papel grau cirúrgico e esterilizado com óxido de etileno.

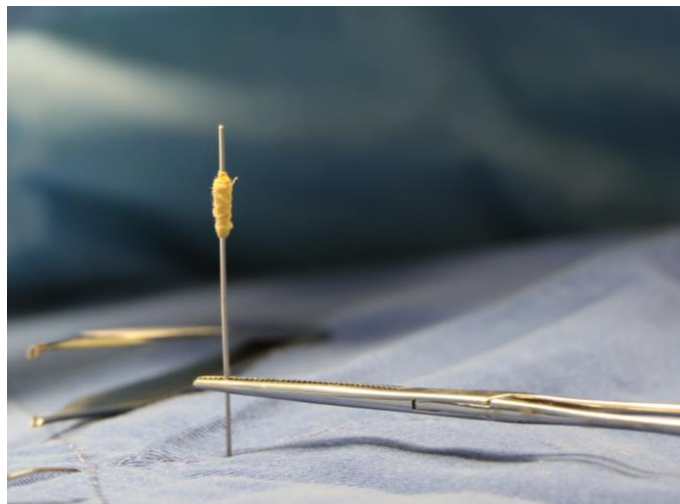


Figura 1 - Implante de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli (isopreno) (IR) (Cellprene®) moldado ao redor de pino intramedular de 0,8mm de diâmetro.

3.1.4 Procedimentos anestésicos e pré-operatórios

Para o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em jejum sólido e hídrico de 30 minutos antes da anestesia com xilazina (7 mg.kg^{-1}), quetamina (23 mg.kg^{-1}) e tramadol (30 mg.kg^{-1}) por via intramuscular e, após aproximadamente 10 minutos, foi realizada

venóclise metatarsal medial com cateter 24G e intubação orotraqueal, mediante uso de sonda uretral nº8 adaptada para ventilação com oxigênio 100%. As codornas receberam infusão contínua de remifentanil na dose de 9 µg/h, via bomba de infusão até o término do procedimento cirúrgico.

Ao longo de todo o procedimento cirúrgico, os reflexos avaliados foram: palpebral, membrana nictitante, pinçamento digital e arrancamento de pena. A total ausência desses reflexos foi considerada como plano anestésico adequado. Frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura cloacal, oximetria, ritmo cardíaco por eletrocardiograma e EtCO₂ foram avaliados continuamente e registrados a cada 5 minutos com o uso de monitor multiparamétrico.

3.1.5 Procedimento cirúrgico

Com o animal em plano anestésico-cirúrgico e em decúbito lateral direito, foi realizada delicadamente a retirada das penas de toda região radioulnar esquerda e a área foi submetida a antissepsia com álcool 70% e clorexidine a 2%. As rêmiges primárias foram envolvidas por uma atadura elástica estéril. Após a colocação dos campos plásticos e de tecido estéreis, foi realizado acesso craniodorsal a região diafisária ulnar através de incisão de pele (**Figura 2A**), divulsão do subcutâneo, afastamento do músculo flexor ulnar do carpo e das inserções dos bulbos das rêmiges secundárias aderidas ao perióstio (**Figura 2B**).

Após o acesso, foi mensurado o comprimento total da ulna com auxílio de régua metálica estéril e do diâmetro diafisário com auxílio de especímetro de Castroviejo. Para realização das ostectomias foi utilizado bisturi piezoelétrico com ponteira reta diamantada estéril, sob irrigação constante com NaCl 0,9% estéril em temperatura ambiente. Foram realizadas ostectomias de duas vezes o diâmetro da ulna de cada codorna (**Figura 2C**), tendo como referência o centro da ulna para realização dos cortes, conforme o que foi descrito por Zafalon-Silva (2019).

Os pinos com o implante foram colocados em uma cuba com solução fisiológica de forma a permanecerem submersos por pelo menos 10 minutos antes da implantação. Foi realizada a inserção do implante de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) (Cellprene®) enrolado a um pino liso de Kirschner com 0,8mm de diâmetro e aproximadamente 2,8 cm de comprimento, por via retrógrada, mediante uso de um introdutor manual de Jacobs, pelo olécrano (**Figura 2D**). O implante de Cellprene® apresentava mobilidade pelo eixo do comprimento do pino intramedular, de forma que a

inserção do pino permitia o deslocamento do implante até o encaixe adequado ao defeito crítico de cada animal.

Após, foi realizada a lavagem de região com NaCl 0,9% estéril (**Figura 2E**) e, em seguida, foi realizada a rafia da fáschia muscular e pele com mononáilon nº 4-0 em padrão isolado simples (**Figura 2F**).

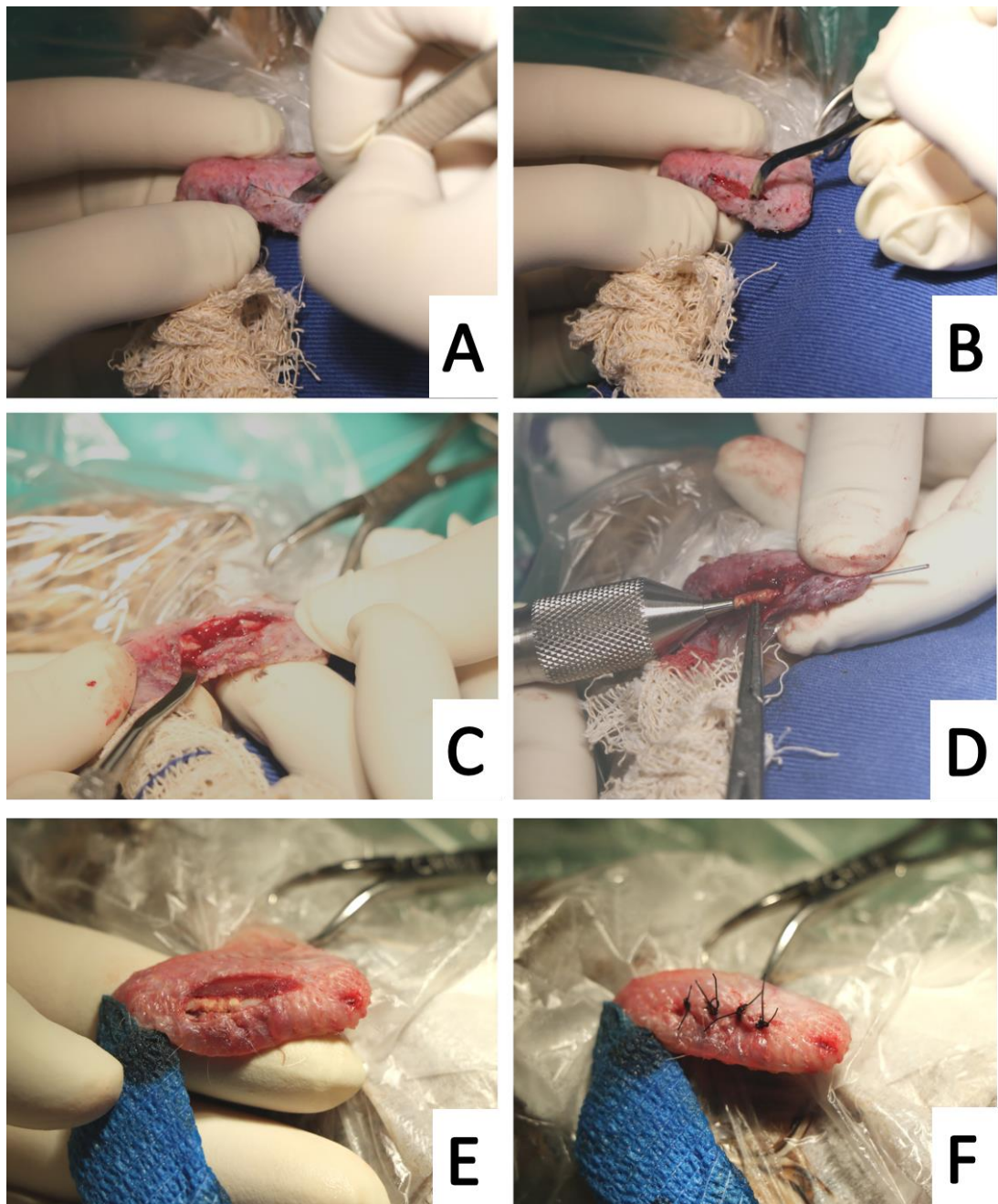


Figura 2 - Procedimento cirúrgico em ulna de *Coturnix japonica*. **A.** Incisão de pele na região diafisária ulnar esquerda. **B.** Divulsão e afastamento dos tecidos adjacentes à ulna esquerda. **C.** Defeito crítico em ulna após osteotomia de 2x diâmetro do osso. **D.** Inserção retrógrada da blenda polimérica em um pino intramedular de 0,8 mm. **E.** Aspecto da lesão após a colocação do implante e limpeza com solução fisiológica. **F.** Sutura de pele no padrão isolado simples com mononáilon 4-0.

Após a limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica e gaze, ainda sob sedação, realizava-se uma bandagem em “8” na asa operada com bandagem elástica autoadesiva. Cada ave foi envolvida em retalho de tecido para proteção quanto à agitação da recuperação anestésica e mantida em caixa de transporte com bolsa de água morna até recuperação completa.

3.1.6 Manejo pós-operatório

No pós-operatório imediato, o membro operado foi radiografado nas projeções mediolateral e craniocaudal e após a asa foi mantida com imobilização temporária mediante o uso de bandagem elástica em “8” por 10 dias.

Como protocolo terapêutico foi utilizado tramadol (30 mg.kg⁻¹, VO, BID por 5 dias), dipirona (25 mg.kg⁻¹, VO, BID por 5 dias), meloxicam (1 mg.kg⁻¹, IM, SID, por 3 dias) e enrofloxacino (15 mg.kg⁻¹, VO, SID por 5 dias).

Durante os dez primeiros dias de pós-operatório, os animais foram mantidos em gaiolas de 1,74m², sendo o número máximo de 5 animais por gaiola e após foram realocadas na gaiola coletiva supracitada.

As suturas de pele foram removidas no momento da retirada da bandagem, aos 10 dias pós-operatório.

3.1.7 Acompanhamento de evolução clínica

Foram realizados exames radiográficos, mediante contenção física, nas projeções mediolateral e craniocaudal da ulna esquerda aos sete, 15, 30, 60 e 90 dias de pós-operatório, sendo que todos os exames radiográficos foram feitos no Setor de Diagnóstico por Imagem do HCV-UFRGS e no mesmo aparelho de raio-x computadorizado com carga padrão.

Para análise das imagens radiográficas foi utilizada a tabela proposta por Ehrhart et al. (2005) e adaptada por Boos (2017) e Gutierrez (2017) para *Gallus gallus domesticus* e por Zafalon-Silva (2019) para *C. japonica*, onde três avaliadores estabeleceram escore de pontuação final, obtendo-se valor médio para fins de análise estatística nas variáveis (tabela 1): qualidade da linha de osteotomia, qualidade óssea do defeito crítico, impressão global da consolidação óssea, aspecto e fixação do pino intramedular e escore final (somatório de todos os pontos obtidos nas variáveis).

Além disso, foi contabilizada a porcentagem de animais que apresentaram união ou não-união óssea nos diferentes tempos de avaliação, sendo considerada união radiográfica a presença de continuidade cortical completa.

Tabela 1 - Escore para avaliação radiográfica proposto por Ehrhart et al. (2005) e adaptado para avaliação da consolidação em defeitos ósseos em ulna de *Gallus gallus domesticus* por Boos (2017) e Gutierrez (2017) e por Zafalon-Silva (2019) em *Coturnix japonica*.

CRITÉRIOS PARA ESCORE DE NÃO UNIÃO	PONTOS
QUALIDADE DA LINHA DA OSTEOTOMIA	
Linha de osteotomia larga	0
Linha de osteotomia ainda visível	1
Perda do detalhe da linha da osteotomia	2
QUALIDADE ÓSSEA DO DEFEITO CRÍTICO	
Sem reação óssea	0
Formação de calo ósseo, sem união	1
Preenchimento ósseo completo	2
IMPRESSÃO GLOBAL DA CONSOLIDAÇÃO	
Mínima ou nenhuma evidência radiográfica de união	0
Evidência radiográfica de calo, mas sem união	1
União radiográfica	2
ASPECTO E FIXAÇÃO DO PINO INTRAMEDULAR (PIM)	
Migração do PIM	0
Lise ao redor do PIM	1
Implantes metálicos com aparência normal	2
ESCORE FINAL	8

3.1.8 Avaliação histológica

No pós-operatório, a cada momento estabelecido (sete, 15, 30, 60 e 90 dias pós-implante) foi feita eutanásia dos animais, de acordo com as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA e do CFMV (2013), utilizando-se isoflurano em caixa anestésica, em local calmo e silencioso, individualmente, seguido de cloreto de potássio 10% por via intravenosa.

As duas asas foram retiradas e cada ulna foi delicadamente dissecada, sendo que a ulna operada teve o pino intramedular removido para, em seguida, serem colocadas e mantidas em formol tamponado até o processamento para análise histológica. Os materiais foram encaminhados ao laboratório Diagnose Vet, em Caxias do Sul – RS para análise.

A avaliação histológica foi realizada após o período de fixação em formol, descalcificação em solução de ácido nítrico a 10% e processamento pela técnica de rotina.

Foram feitos cortes histológicos no eixo longitudinal do osso, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricômio de Masson, objetivando a identificação de neoformação óssea e neovascularização no local do defeito.

O material foi examinado em microscópio óptico nas amostras de ulna com implante e de ulna contralateral como controle, levando em consideração os aspectos estabelecidos por Tunio et al. (2015) e adaptados para este trabalho conforme **tabela 2**.

A avaliação histológica dos animais aos sete, 15, 30 e 60 dias foi realizada com o objetivo de identificar histologicamente as propriedades de neovascularização, biocompatibilidade e reabsorção atribuídas ao biomaterial. A avaliação de 12 animais aos 90 dias teve como propósito avaliar, além dos fatores supracitados, a consolidação ou o estabelecimento de não-união da fratura.

Ademais, as análises histológicas incluíram as avaliações quanto aos seguintes critérios:

- Presença ou ausência do implante no tecido
- Grau de neovascularização local (de ausente a +++)
- Grau de inflamação local (de ausente a +++)
- Classificação celular predominante (quando houver inflamação)
- Presença ou ausência de cáseo.

Tabela 2 - Escore para avaliação histológica de critérios para consolidação de defeitos críticos em ulna de *Columba livia* proposto por Tunio et al. (2015) e adaptado para avaliação da consolidação em defeito crítico em ulna de *Coturnix japonica* no presente estudo.

CRITÉRIO	PONTOS
ANÁLISE DA CONSOLIDAÇÃO (A)	
Nenhuma evidência de união fibrosa ou óssea	0
Proliferação de tecido fibroso	1
Proliferação fibrocartilaginosa ou cartilaginosa	2
Cartilagem mineralizada e/ou tecido ósseo imaturo	3
União óssea	4
DESENVOLVIMENTO DE CÓRTEX (B)	
Nenhum córtex formado	0
Presença de formação óssea ao longo do córtex externo	1
Formação reconhecível do córtex externo e do espaço medular	2
Córtex formado e ponte incompleta	3
Formação completa do córtex e ponte de defeito	4
INCORPORAÇÃO DO ENXERTO ÓSSEO (C)	
Sem incorporação e sem formação de osso novo	0
Alguma incorporação com nova formação óssea: quantidade mínima de formação óssea nova	1
Alguma incorporação com nova formação óssea: quantidade moderada de formação óssea nova	2
Alguma incorporação com nova formação óssea, contínua com osso hospedeiro	3
Boa incorporação, amplo osso novo e remodelação	4
Excelente incorporação e remodelação avançada	5
ESCORE FINAL	13

3.1.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados no programa Excel (Microsoft Office) e posteriormente avaliados quanto à estatística descritiva no mesmo programa, com o suplemento do Portal Action Stat (versão 3.7). Foram descritas a média e desvio-padrão para as variáveis quantitativas e a frequência e o percentual nos diferentes tempos para as variáveis categóricas.

4 RESULTADOS

4.1 Características individuais e cirúrgicas

O peso médio dos animais foi de $160\text{g} \pm 13\text{g}$. O tempo médio de procedimento cirúrgico foi de $14,5 \pm 3,5$ minutos. Na avaliação morfométrica da ulna esquerda no momento operatório, o valor médio e desvio-padrão do diâmetro e do comprimento foram $3,0 \pm 0,2$ mm e $36,5 \pm 12$ mm, respectivamente. Com isso, o valor médio (\pm DP) do fragmento ósseo retirado para formar um defeito crítico foi de $6,0 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$.

Duas aves foram a óbito durante o experimento e foram substituídas. Uma apresentou morte súbita, e a outra apresentou perda de peso progressiva apesar de seguir se alimentando voluntariamente. O exame parasitológico de fezes resultou negativo. As causas das mortes foram inconclusivas.

Todas as aves inclusas no estudo demonstraram boa evolução clínica, alcançando pequenos voos mesmo após os procedimentos cirúrgicos. Ainda, foi surpreendente o nível de atividade, a capacidade de voo e o comportamento de autoproteção dos indivíduos, que não se habituaram ao manejo frequente, o que dificultou o controle das condições de repouso após a remoção da bandagem. Não foi necessário realizar resgate analgésico em nenhum indivíduo ao longo do projeto. Através da contagem diária de ovos, não houve evidências de alteração na postura.

4.2 Características radiológicas

Com relação à análise radiográfica, a média dos escores obtidos nos períodos do estudo estão apresentados na **tabela 3**.

Partindo do escore final de 2/8 pontos na análise radiológica do momento zero (PO - pós-operatório imediato), foi possível verificar que 85% (17/20) dos animais não demonstraram alteração dos escores em sete dias. Duas aves, representando 10% (2/20) obtiveram melhora aos sete dias, porém a nº 13 demonstrou piora nos resultados a partir do 30º dia PO. A ave 16 demonstrou o pior escore (zero pontos) já no 7º dia pós-operatório, sem melhora até o dia 90 PO.

Aos 15 dias PO, 72% (13/18) mantiveram os escores de dois pontos, enquanto 5% (1/18) teve melhora de um ponto no valor, passando para três pontos finais. Uma ave (nº12) teve piora dos resultados, decaindo o escore para um ponto.

Em 30 dias, 75% (12/16) das aves mantiveram seus escores da avaliação anterior, enquanto 12,5% (2/16) demonstraram melhora dos valores, sendo as aves nº sete e 18 que

passaram de dois para quatro pontos. Todavia, outras 12,5% (2/16) tiveram queda no escore, passando de dois para um ponto nesta avaliação.

Em 60 dias, as aves de nº sete, oito, nove, dez, 14, 15, 17 e 20 (57% - 8/14) mantiveram seus escores anteriores, enquanto destaca-se a melhora do escore da nº 18 (de quatro para cinco pontos) e da nº 19, que havia regredido para o escore 1 em 30 dias, e passou ao escore 4 aos 60 dias. A codorna nº 13 (7% - 1/14) teve piora no escore, atingindo o escore final de um ponto neste momento.

Por fim, aos 90 dias PO, 75% (9/12) das codornas mantiveram seus escores anteriores, destacando-se:

- A nº 16, que finalizou o experimento com escore igual a zero pontos desde os sete dias pós-operatórios;
- A nº 13, que teve piora desde os 30 dias PO, atingindo o escore zero aos 90 dias.
- A nº 12, que piorou os resultados radiológicos a partir do 15º dia PO, manteve o escore de um ponto até o final do experimento.
- As nº 11 e 19 apresentaram melhora do escore em relação ao obtido nos 60 dias.

As imagens radiográficas das codornas 1, 3, 6, 7, 16 e 19 estão agrupadas na **figura 3**.

Tabela 3 - Escores radiológicos (0-8) para as codornas deste estudo de acordo com o tempo pós-operatório. Valores do escore final de avaliação radiográfica para análise da consolidação em defeitos ósseos em ulna em *Coturnix japonica* no presente estudo, considerando um total de 8 pontos.

Codornas	DIAS PÓS-OPERATÓRIOS						Média ± DP
	0	7	15	30	60	90	
1	2	2					2,0±0,0
2	2	2					2,0±0,0
3	2	2	2				2,0±0,0
4	2	2	2				2,0±0,0
5	2	4	4	4			3,5±1,0
6	2	2	2	2			2,0±0,0
7	2	2	2	4	4		2,8±1,1
8	2	2	2	2	2		2,0±0,0
9	2	2	2	2	2	2	2,0±0,0
10	2	2	2	2	2	2	2,0±0,0
11	2	2	2	1	1	2	1,7±0,5
12	2	2	1	1	1	1	1,3±0,5
13	2	4	4	2	1	0	2,2±1,6
14	2	2	2	2	2	2	2,0±0,0
15	2	2	2	2	2	2	2,0±0,0
16	2	0	0	0	0	0	0,3±0,8
17	2	2	2	2	2	2	2,0±0,0
18	2	2	2	4	5	5	3,3±1,5
19	2	2	2	1	4	5	2,7±1,5
20	2	2	3	3	3	3	2,7±0,5
Média ± DP	2,0±0,0	2,1±0,8	2,1±0,9	2,1±1,1	2,2±1,4	2,2±1,6	

DP: Desvio-padrão

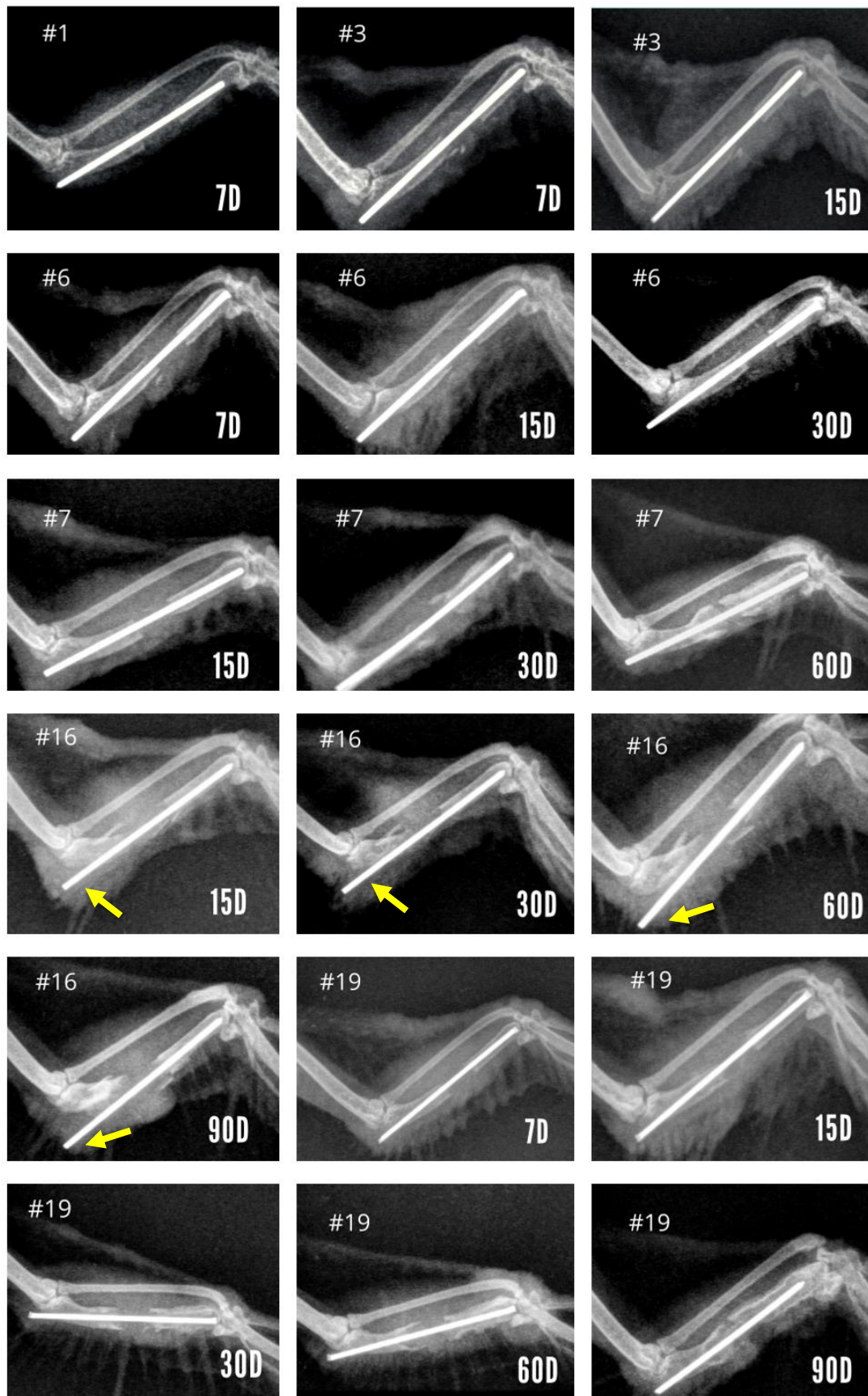


Figura 3 – Avaliação radiográfica mediolateral de ulna esquerda das codornas-domésticas (*Coturnix japonica*) de número 01, 03, 06, 07, 16 e 19 submetidas à osteotomia e implantação de blenda polimérica de PLGA/IR em 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios. Observação de migração parcial do pino (seta) e de formação de calo ósseo, mas sem união aos 30 e 60 dias da nº 07 e 60 e 90 dias da nº 19.

Ao final dos 90 dias, nenhuma ave demonstrou preenchimento ósseo completo ou união radiográfica.

4.3 Características histológicas

A descrição dos escores e critérios avaliados na histologia estão contidos na **tabela 4**.

Dos critérios histológicos, verificou-se que nenhum animal do estudo atingiu o escore de união óssea (A4, B4 e C4-5). Separando os escores em insatisfatório (0-4 pontos), razoável (5 a 8 pontos) e satisfatório (9 a 13 pontos), é possível perceber que 55% (11/20) atingiram resultados insatisfatórios na análise histológica e 45% (9/20) foram considerados razoáveis para os parâmetros avaliados, sendo que nenhum animal atingiu a faixa satisfatória.

Aos sete dias pós-operatório, 50% (1/2) das codornas apresentaram cartilagem mineralizada e tecido ósseo imaturo e córtex formando ponte incompleta com alguma incorporação do implante e quantidade moderada de nova formação óssea (A3, B3, C2). Neste mesmo período, 50% (1/2) apresentaram proliferação fibrocartilaginosa ou cartilaginosa na área do implante (**Figura 4A**) e formação reconhecível do córtex externo e do espaço medular com alguma incorporação do implante e quantidade mínima de formação óssea (A2, B2, C1).

Aos 15 dias uma das aves demonstrou resultado de escore baixo, totalizando 2/13 pontos (A1, B0, C1), enquanto a outra apresentou escore 7/13 (A3, B2, C2), com pontos que incluíam formação de tecido ósseo imaturo, de córtex externo e de boa incorporação do implante com moderada formação óssea (**Figura 4B**).

Aos 30 dias de pós-operatório houve acentuada queda nos escores, limitados a 2/13 (A2, B0, C0 – ave nº 5) e 1/13 (A1, B0, C0 – nº 6). Os únicos escores pontuados por esses indivíduos indicam que havia proliferação de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso no foco de fratura (**Figura 4C**), porém sem qualquer outro indicador benéfico para a consolidação óssea neste momento pós-operatório.

Com 60 dias de pós-operatório não foi possível verificar córtex formado em nenhuma das aves (nº 7 e 8), no entanto uma (50%) apresentava cartilagem mineralizada e tecido ósseo imaturo e incorporação de qualidade moderada do implante (A3, B0, C2 – nº 7) (**Figura 4D**).

Aos 90 dias, todas as aves demonstraram algum tipo de proliferação local - fibrosa, cartilaginosa e/ou óssea imatura. Cinquenta por cento (6/12) das codornas apresentaram cartilagem mineralizada e formação de tecido ósseo imaturo (A3), 42% (5/12) demonstraram

proliferação de tecido fibroso no foco de fratura (A1) e 8% (1/12) tiveram formação de tecido fibrocartilaginoso ou cartilaginoso (A2).

Em relação ao desenvolvimento de córtex nesse período, 25% (3/12) apresentaram córtex formado e ponte incompleta (B3), 8% (1/12) apresentaram formação reconhecível de córtex externo e espaço medular (B2), 8% (1/12) tinha alguma presença de formação óssea ao longo do córtex externo (B1), enquanto 58% (7/12) não apresentaram nenhum córtex formado (B0).

O melhor escore obtido em relação à incorporação do implante ao osso foi em 25% (3/12) das aves, que demonstraram alguma incorporação com quantidade moderada de nova formação óssea no local (C2). Trinta e três por cento (4/12) das aves aos noventa dias apresentavam alguma incorporação com nova formação óssea e quantidade mínima de formação óssea nova (C1) e as outras cinco codornas (42% - 5/12) obtiveram escore C0, equivalente a ausência de incorporação do enxerto e de evidências de formação de osso novo.

A média e desvio padrão dos escores de avaliação histológica em 7 dias de PO foram $6,5 \pm 2,1$ pontos, o melhor valor em comparação com os demais momentos: $4,5 \pm 3,5$ (15 dias), $1,5 \pm 0,7$ (30 dias), $3,5 \pm 2,1$ (60 dias) e $3,9 \pm 3,0$ (90 dias).

Todas as aves apresentaram neovascularização local, sendo 25% (5/20) com um grau moderado de neovascularização (2+) e 75% (15/20) um grau leve (1+).

Somente um animal (nº 9) não apresentou inflamação no fragmento de tecido avaliado. Os outros 95% (19/20) apresentaram graus variados, de leve a moderado (1+ a 2+), sendo que o tipo celular predominante em todos estes as células mononucleares (**Figura 4E**).

Por fim, 45% (9/20) das aves apresentaram formação caseosa (**Figura 4E**) no tecido amostrado, e a maioria (89% - 8/9) coincidia com aves que apresentaram grau moderado de inflamação e células mononucleares. Somente uma ave com cáseo demonstrava grau leve de inflamação. Três aves com inflamação moderada não apresentaram cáseo.

Já em relação à presença ou não do enxerto na amostra de tecido, houve uma divisão exata: 50% (10/20) das aves apresentaram reabsorção total do implante histologicamente, enquanto a outra metade ainda apresentava material compatível com o enxerto na amostra de tecido (**Figura 4F**).

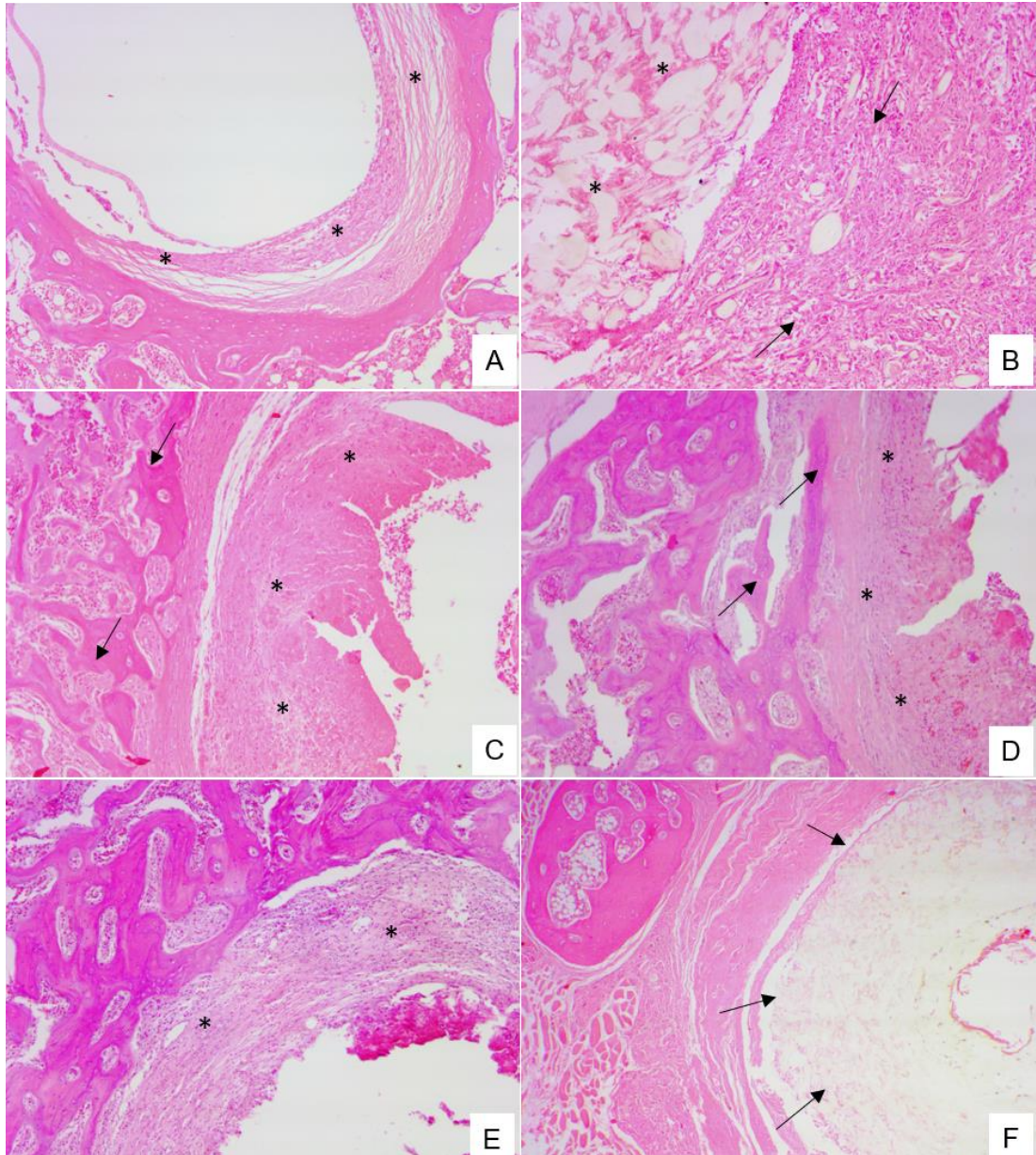


Figura 4 - Corte histológico. *Coturnix japonica*. **A.** Ulna com enxerto realizado há 7 dias. Proliferação de tecido fibroso (asterisco). H&E. Obj. 100X. **B.** Ulna com enxerto realizado há 15 dias. Proliferação de tecido fibrovascular (setas), além de presença central de material refringente entremeadado por fibrose e inflamação, compatível com lesão reacional à enxerto (asterisco). H&E. Obj. 100X. **C.** Ulna com enxerto realizado há 30 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular entremeadado por inflamação mononuclear exibindo em periferia halo necrótico (asterisco). Em bordos há matriz osteoide imatura (osso hospedeiro) (setas) H&E. Obj. 100X. **D.** Ulna com enxerto realizado há 60 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular (asterisco) e matriz osteoide com formação incompleta (seta). H&E. Obj. 100X. **E.** Ulna com enxerto realizado há 90 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular entremeadado a inflamação mononuclear e com área central de necrose indicando presença de cáseo (asterisco). H&E. Obj. 100X. **F.** Ulna com enxerto realizado há 90 dias. Intensa proliferação de tecido fibrovascular e em área central, presença de material refringente amorfo indicando a presença do enxerto (seta). H&E. Obj. 100X.

Tabela 4 - Descrição dos escores obtidos por cada codorna do estudo em relação aos critérios de avaliação histológica (Análise da consolidação – A; Desenvolvimento de córtex – B; Incorporação do enxerto ósseo – C; Presença do enxerto, grau de neovascularização, inflamação, tipo celular predominante e presença de cáseo).

N	Dias PO	A (0-4)	B (0-4)	C (0-5)	Total	Enxerto (0 ou 1)	Neovasc. (0-3)	Inflam. (0-3)	Tipo celular	Cáseo
1	7	3	3	2	8/13	-	2	1	Mono	-
2	7	2	2	1	5/13	-	2	2	Mono	-
3	15	1	0	1	2/13	+	1	2	Mono	-
4	15	3	2	2	7/13	+	2	2	Mono	-
5	30	2	0	0	2/13	-	1	1	Mono	-
6	30	1	0	0	1/13	-	1	1	Mono	-
7	60	3	0	2	5/13	+	2	2	Mono	+
8	60	2	0	0	2/13	+	1	1	Mono	-
9	90	3	3	1	7/13	-	1	0	-	-
10	90	1	0	0	1/13	+	1	1	Mono	-
11	90	2	0	1	3/13	+	1	2	Mono	+
12	90	1	0	0	1/13	+	1	2	Mono	+
13	90	3	2	2	7/13	-	1	2	Mono	+
14	90	1	0	0	1/13	+	1	2	Mono	+
15	90	1	0	0	1/13	-	1	1	Mono	-
16	90	3	3	2	8/13	-	1	2	Mono	+
17	90	3	1	1	5/13	-	1	1	Mono	+
18	90	3	0	1	4/13	-	1	2	Mono	+
19	90	3	3	2	8/13	+	1	1	Mono	-
20	90	1	0	0	1/13	+	2	2	Mono	+

N: número da codorna; PO: Pós-operatório; A: Análise da consolidação; B: Desenvolvimento de córtex; C: Incorporação do enxerto; Neovasc.: Neovascularização; Inflam: Inflamação; Mono: mononuclear; -: ausente; +: presente.

O **gráfico 1** contém as informações de escores finais da radiologia e dos achados histológicos para facilitar a comparação dos dados.

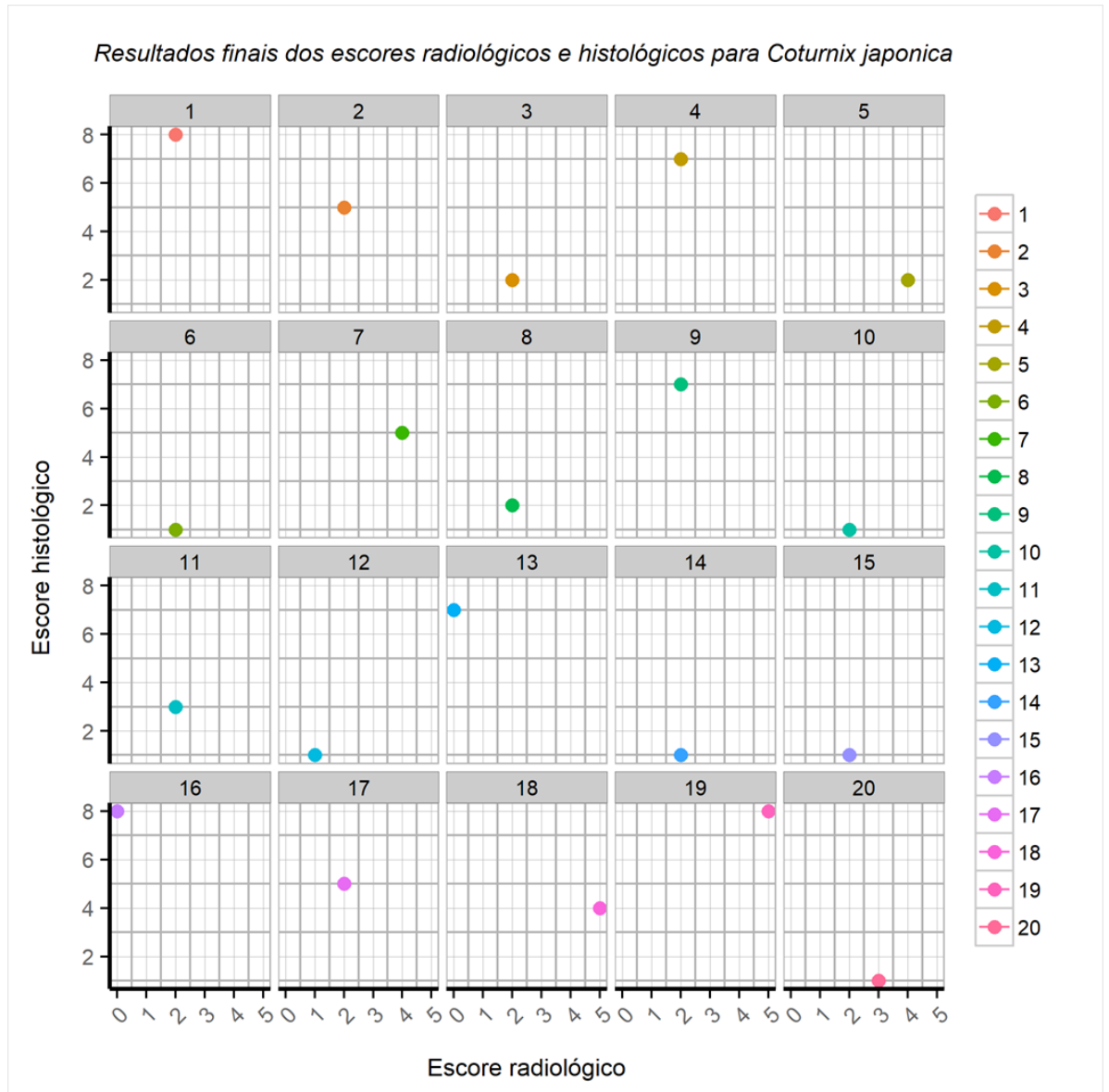


Gráfico 1 - Resultados finais dos escores radiológico e histológico para *Coturnix japonica* em tempos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios para colocação de implante de Cellprene® em defeito crítico de ulna.

5 DISCUSSÃO

O uso de codornas-domésticas em trabalhos de pesquisa em ortopedia ainda é relativamente incomum, apesar das características biológicas que favorecem sua utilização. Dentre estas, vale ressaltar a precocidade da espécie, que atinge a puberdade por volta dos 35 dias de vida e cessa o crescimento longitudinal dos ossos neste período (Huss, Poynter and Lansford, 2008; Konell, 2016). Esse quesito auxilia no desenvolvimento de estudos em menor tempo, dependendo de menor espaço para manutenção dos animais e, conseqüentemente, em menores custos.

Em relação ao presente estudo, as codornas apresentaram boa homogeneidade de peso, característica que é positiva para a padronização dos resultados em estudos científicos. Segundo Sabater González (2019) o número de trabalhos avaliando a consolidação óssea de aves ainda é limitado, porém aceita-se que os ossos das aves consolidam em menor tempo que nos mamíferos (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017; Vilaplana Grosso, 2019).

Todavia, apesar dos fatores que beneficiam a utilização deste modelo experimental, cabe salientar o que foi descrito por Zafalon-Silva (2019) e que foi percebido no presente estudo, que as codornas apresentam boa desenvoltura de voo, o que inevitavelmente às diferenciam das galinhas-domésticas no aspecto relativo à mobilidade do membro torácico. Esta movimentação do membro pode ter afetado negativamente o foco de fratura, apesar da presença do pino intramedular, levando à uma instabilidade local e tendo potencial de prejudicar a consolidação da fratura. No entanto, como foi utilizada a bandagem em oito por 10 dias pós-operatórios, tempo indicado na literatura (Bennert *et al.*, 2016; Redig and Ponder, 2016), há maior probabilidade do resultado insatisfatório na consolidação do defeito crítico neste estudo estar relacionado ao biomaterial implantado.

Dentre os fatores determinantes para a consolidação de fraturas em aves, o suprimento sanguíneo adequado no local, tanto na região do perióstio, quanto na superfície endosteal, é considerado essencial (Tully, 2002; Carrasco, Shimizu and Forbes, 2017). Além disso, a estrutura óssea das aves, que apresenta pontos de fragilidade pelas próprias características anatomofisiológicas, pode sofrer fraturas no momento da remoção dos implantes metálicos – por exemplo placa e parafuso (Redig and Ponder, 2016). A escolha pelo Cellprene® como material de implante neste caso levou em consideração os fatores supracitados, pois a capacidade de angiogênese é propriedade apresentada pelo poli (isopreno) e o poli (ácido-lático-co-glicólico) (PLGA) além de possuir características de reabsorção e biocompatibilidade (Marques, 2011; Kim *et al.*, 2014; Faller *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2017; Guerra *et al.*, 2018), apresentando resultados promissores em estudos anteriores em

espécies diversas (Kim *et al.*, 2014; Faller *et al.*, 2015). Essa característica do PLGA pode proporcionar futuramente a produção de implantes totalmente reabsorvíveis e que dispensem a necessidade de reintervenção cirúrgica para remoção do material, fato a ser levado em consideração, por exemplo, em aves com destino de retorno à vida livre.

Segundo Trejo-Iriarte *et al.* (2019), o defeito crítico ósseo é o padrão-ouro para avaliação da regeneração óssea em estudos pré-clínicos e são definidos como o ferimento intraósseo de menor tamanho em um osso em particular, que não terá cura, sem intervenções, durante a vida do animal. Boos (2017) determinou o defeito crítico de ulna de *Gallus gallus domesticus* como quatro vezes o diâmetro do osso, correspondendo a aproximadamente 43% do comprimento ósseo. Já Zafalon-Silva (2019) demonstrou que o defeito crítico de ulna de *C. japonica* é de duas vezes o diâmetro do osso, equivalendo-se a 18,75% do comprimento do osso, dados semelhantes ao que foi detectado neste estudo ($16 \pm 1,0\%$).

A tentativa de reparo de defeito crítico resulta na formação de tecido fibroso ao invés de ósseo (Trejo-Iriarte *et al.*, 2019). Um dos pilares vitais para a cura de defeitos ósseos é o acesso das células osteogênicas ao local de fratura através do recrutamento por citocinas ou pela circulação sanguínea, o que demonstra a necessidade de garantir que a porosidade da membrana do biomaterial permita a angiogênese e a formação óssea apropriada (Tarchala *et al.*, 2018). Este fator suscita a possibilidade do formato do implante do presente estudo não ter sido suficientemente poroso para promover os benefícios locais que o material propõe, uma vez que se esperava, baseado nos estudos anteriores com o biomaterial, que houvesse neovascularização intensa promovida pelo IR e total reabsorção do PLGA ao final do experimento.

Segundo Tully (2002) e Konell (2016), a cortical óssea é similar em ambos os sexos das *C. japonica*, porém nas fêmeas a cavidade medular é instável e há maior reserva de cálcio para o ovo. Este fator pode ter sido complicador neste estudo, sendo razoável considerar a utilização de machos para estudos de ortopedia. Entretanto, a manutenção de número relativamente grande de machos em no mesmo ambiente poderia ocasionar conflitos, que também poderiam produzir complicações devido ao comportamento agressivo e “territorialista” dos machos da espécie.

O tratamento ortopédico ideal deve prover estabilização efetiva das forças que atuam sobre uma fratura (arqueamento, compressão axial, tensão, cisalhamento e torção) e permitir deambulação ou movimentação precoce do membro e das articulações durante o processo de consolidação (Carrasco, Shimizu and Forbes, 2018). A inserção do pino intramedular fornece pouca resistência às forças de rotação, distração e cisalhamento (Ferrigno, Schmaedecke and

Ferraz, 2014), porém devido ao tamanho do modelo animal, e a indisponibilidade de mini placas de tamanho adequado ao osso, demonstrou benefícios em relação à facilidade de implantação, confirmados pelo curto tempo médio de procedimento. Embora algumas aves tenham demonstrado pequeno deslocamento do pino no exame radiográfico, nenhum animal teve migração total do pino a ponto de ser necessário reintervenção para remoção do implante.

É possível perceber pelo tempo médio de procedimento cirúrgico, que a técnica necessária para estabelecer ostectomia em ulna de codornas é simples, desde que o cirurgião esteja familiarizado com a manipulação de estruturas pequenas e delicadas. O acesso à ulna é facilitado pela pequena cobertura muscular da região, o que permite procedimento rápido e, conseqüentemente, com menos riscos inerentes à anestesia e à cirurgia.

Embora a união radiográfica necessite de quatro a seis semanas para a evidência do calo ósseo, clinicamente é possível perceber estabilidade no local em três semanas (Vilaplana Grosso, 2019). Esse fator concorda com o que foi encontrado neste projeto, pois aos 7 e aos 15 dias não houve alteração no escore radiográfico da maioria das aves.

Conforme citado por Carrasco; Shimizu; Forbes (2018), corroborando a escolha da imobilização externa aplicada neste estudo, a bandagem em oito circunda do carpo ao cotovelo, imobilizando a parte distal da asa. É utilizada para estabilização de fraturas distais ao cotovelo, e para minimizar danos aos tecidos moles adjacentes. É importante trocar a bandagem após 48 a 72h para evitar enrijecimento das articulações. No entanto Redig & Ponder (2016) indicaram que a movimentação passiva da asa com fraturas distais ao úmero deve iniciar somente aos 10 dias de pós-operatório, o que coincide com a retirada da bandagem e conseqüente movimentação do membro pela ave, o que ocorreu neste estudo. Apesar disso, a maioria das aves apresentaram algum nível de rigidez articular e/ou contração do patágio.

De acordo com Redig & Ponder (2016) o patágio é uma rede de fibras elásticas que se esticam com a extensão da asa para formar a borda principal, entre o ombro e o carpo e existem duas formas de prevenir a contração do patágio: promover fixação da fratura de forma que não seja necessário a aplicação de imobilização adicional por bandagem ou instituir protocolo de fisioterapia passiva e massagem patagial na primeira semana pós-operatória, mantendo por todo período de consolidação. Estas técnicas de fisioterapia são indicadas sob anestesia com isoflurano, por cinco minutos a cada dois dias (Redig and Ponder, 2016). Contudo, as codornas-domésticas parecem ter exacerbada sensibilidade ao isoflurano, motivo pelo qual optou-se pela anestesia dissociativa como protocolo anestésico-

cirúrgico, e a aplicação de sedativos injetáveis a cada dois dias por todo o período de consolidação não seria viável ou adequado para a saúde e o bem-estar dos animais.

Ficou evidente neste estudo que há pouca correlação entre os valores dos escores radiográficos e histológicos, visto que à exemplo da ave nº 16, que teve o escore radiológico zero já a partir dos primeiros 7 dias PO, obteve um dos melhores escores histológicos, somando 8 pontos do total de 13. O mesmo ocorreu na ave nº 13, que finalizou os 90 dias com escore radiológico zerado, porém obteve sete pontos na histologia no mesmo período. Contudo, consoante o estudo de Huh et al. (2005), que utilizaram a radiologia e a histologia para determinar o defeito crítico em mandíbula de cães, a histologia revela que a radiolucência observada na avaliação radiográfica representa tecido fibroso na histologia, fato verificado neste estudo.

A utilização de critérios radiológicos e histológicos para estudos que envolvem o estabelecimento de defeito crítico, tratamento de fraturas ou estudos de biomateriais são comuns (Huh et al., 2005; Kasten et al., 2008; Li et al., 2015; Boos, 2017; Oryan et al., 2017; Tarchala et al., 2018; Trejo-Iriarte et al., 2019), porém aplicáveis de diferentes formas. Enquanto o escore radiológico pode ser mais utilizado do ponto de vista clínico na tomada de decisão frente a suspeita de não união óssea, o histológico é capaz de fornecer informações microscópicas sobre as características celulares e de conformação dos tecidos estudados. Sendo assim, apesar dos valores conflitantes e frequentemente inversamente proporcionais em relação aos escores radiológicos e histopatológicos deste experimento, é justo considerar ambos necessários para a qualidade da avaliação dos resultados. Isso fundamenta-se na indispensabilidade em não só verificar se há ou não união radiológica, mas também qualificar este processo – objetivo da avaliação histológica.

Neste estudo foi necessário proceder adaptações ao escore histológico proposto por Tunio et al. (2015) devido ao critério de incorporação do enxerto ósseo, que no escore original demonstra o enxerto presente até o escore 3, valor que não foi alcançado por nenhuma ave deste estudo, embora tenha sido constatada a ausência do enxerto histologicamente. Além disso, principalmente considerando as reações locais na região, foi necessário incluir os outros critérios histológicos relatados anteriormente. Foi difícil, no entanto, encontrar algum padrão nos resultados histológicos, sendo por isso optado pela apresentação dos resultados na forma de médias, desvios-padrão e frequências.

Aos 30 dias PO é evidente o escore baixo alcançado pelas aves na avaliação histológica, que pode ser justificado pelo que foi descrito por Kim et al. (2014), onde há diminuição da histotoxicidade da blenda de PLGA/PI no período de 15 a 30 dias, aumentando

em 30 a 60 dias e diminuindo novamente dos 60 aos 90 dias pós-operatórios. Eles citaram que uma explicação possível para isso é a diminuição do processo inflamatório ao trauma cirúrgico no primeiro momento, seguido pela liberação do IR dos grânulos, com aumento da resposta inflamatória e fibrose. Eles citam ainda que o IR não é reabsorvível como o PLGA e pode produzir reação de corpo estranho com fibrose severa que pode, depois, ser substituída por tecido ósseo lamelar.

A reação de corpo estranho é relatada como complicação da implantação de enxertos em diferentes espécies, e é classificada como resposta inflamatória mononuclear, principalmente com células gigantes multinucleadas, e podendo estar associada à fibrose e formação de granuloma (Wander *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2010; Beaufrère *et al.*, 2012; Tarchala *et al.*, 2018; Merolli, 2019). As reações locais verificadas na histologia se justificam nesta reação de corpo estranho, em graus variados. Algumas aves demonstraram a formação de cáseo, cuja formação ocorre em aves a partir da ação resposta imune promovida pelos heterófilos e pelos monócitos, corroborando a ideia de reação à corpo estranho.

Apesar do máximo controle das variáveis, é impossível controlar as reações individuais. As codornas aparentam ter grande capacidade de resiliência, se mostrando clinicamente bem, ativas e inclusive alçando pequenos voos mesmo em momento pós-operatório de defeito crítico. Estes fatores devem ser considerados na escolha deste modelo animal para experimentos futuros.

Ainda que o Cellprene® apresente bons resultados *in vitro* e em estudos com animais de laboratório, não apresentou os resultados esperados nesta espécie animal. Sugere-se, no entanto, que a despeito do resultado deste estudo, outros pesquisadores sintam-se estimulados a executar mais estudos com o Cellprene® na medicina veterinária, pois ele revela propriedades importantes, que talvez aplicadas em outro modelo animal, em outro formato, ou em um osso diferente, proporcione resultados diversos.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a utilização de blenda polimérica de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) (Cellprene®) não promove união óssea radiográfica ou histológica de defeito crítico em ulna de *Coturnix japonica*.

REFERÊNCIAS

- Balthazar, D. A. et al. (2013) ‘Efeito do enxerto ósseo corticoesponjoso na osteogênese em falha cortical ulnar de galinhas domésticas (*Gallus domesticus*)’, **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, 65(1), pp. 119–126.
- Beaufrère, H. et al. (2012) ‘Successful Treatment of a Radioulnar Synostosis in a Mississippi Kite (*Ictinia mississippiensis*)’, **Journal of Avian Medicine and Surgery**, 26(2), pp. 94–100. doi: 10.1647/2011-008.1.
- Bennert, B. M. et al. (2016) ‘Evaluation of Two Miniplate Systems and Figure-of-eight Bandages for Stabilization of Experimentally Induced Ulnar and Radial Fractures in Pigeons (*Columba livia*)’, **Journal of Avian Medicine and Surgery**, 30(2), pp. 111–121. doi: 10.1647/2015-082.
- Bolson, J. et al. (2005) ‘Análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*), submetido ao implante da poliuretana derivada do polímero de mamona (*Ricinus communis*)’, **Ciência Rural**, 35(5), pp. 1123–1130.
- Boos, M. Z. (2017). **Determinação do defeito crítico em ulna de *Gallus gallus domesticus***. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. p.44.
- Carrasco, D. C., Shimizu, N. and Forbes, N. A. (2018) ‘Avian orthopaedic surgery part 2: assessment, options, conservative management’, **Companion animal**, 23(2), pp. 64–72.
- Carrasco, D. C., Shimizu, N. S. and Forbes, N. A. (2017) ‘Review and advances in avian orthopaedic surgery: part 1 — introduction’, **Companion animal**, 22(2), pp. 104–108.
- Conselho Federal de Medicina Veterinária, CFMV. (2013) **Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais**. Recuperado de <http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/Guia%20de%20Boas%20Pr%C3%A1ticas%20para%20Eutanasia.pdf.pdf>
- Ehrhart, N. P. et al. (2005) ‘The effect of host tissue irradiation on large-segment allograft incorporation’, **Clinical Orthopaedics and Related Research**, (435), pp. 43–51. doi: 10.1097/01.blo.0000165732.64757.bb.
- Faller, G. et al. (2015) ‘Development and testing of an absorbable spring for cranial expansion in rabbits’, **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**. Elsevier Ltd, 43(7), pp. 1269–1276. doi: 10.1016/j.jcms.2015.06.006.
- Fattahian, H., Mansouri, K. and Mansouri, N. (2017) ‘Biomaterials, substitutes, and tissue engineering in bone repair: current and future concepts’, **Comparative Clinical Pathology**, (5), pp. 1–13. doi: 10.1007/s00580-017-2507-2.
- Ferrigno, C. R. A., Schmaedecke, A. and Ferraz, V. C. M. (2014) ‘Ortopedia’, in Cubas, Z. S., Silva, Jean Carlos Ramos, and Catão-dias, José Luiz (eds) **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2nd editio. São Paulo: Roca.
- Guerra, N. B. et al. (2018) ‘Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical applications’, **Journal of Polymer Research**, 25(8). doi: 10.1007/s10965-018-1542-2.
- Gutierrez, L. G. de (2017) ‘**Hidroxiapatita deficiente em cálcio associada a BMP para**

tratamento de defeito crítico em ulna de *Gallus gallus domesticus*, Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil. p. 69.

Hawthorne, A. C. (2010) **Avaliação comparativa entre enxertos alógenos e autógenos “onlay”. Estudo histológico, imunohistoquímico e tomográfico em coelhos**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. p.99..

Helmer, P. and Redig, P. T. (2006) ‘Surgical resolutions of orthopedic disorders’, in Harrison, G. J. and Lightfoot, T. L. (eds) **Clinical avian medicine**. Palm Beach, Florida: Spix Publishing Inc, pp. 761–774.

Huh, J. Y. et al. (2005) ‘Critical size defect in the canine mandible’, **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, 100(3), pp. 296–301. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.12.015.

Huss, D., Poynter, G. and Lansford, R. (2008) ‘Japanese quail (*Coturnix japonica*) as a laboratory animal model.’, **Lab animal**, 37(11), pp. 513–9. doi: 10.1038/labani1108-513.

Kasten, P. et al. (2008) ‘The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects’, **Biomaterials**, 29(29), pp. 3983–3992. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.06.014.

Kim, J. H. et al. (2014) ‘Experimental Comparative Study of the Histotoxicity of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) copolymer and Poly (Lactic- co-Glycolic Acid) -Poly (Isoprene) Blend’, **Polímeros**, 24(5), pp. 529–535.

Konell, A. L. (2016) **Contribuição ao conhecimento do esqueleto da codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com especial atenção a densidade óssea por meio de densitometria óptica radiográfica**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brasil. p.68..

Lacerda, J. D. de (2014) **Uso do homoenxerto na implantodontia: revisão da literatura**. Trabalho de Conclusão de Especialização, Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, p. 28.

Li, Y. et al. (2015) ‘Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials’, **Journal of Orthopaedic Translation**. Elsevier (Singapore) Pte Ltd, pp. 95–104. doi: 10.1016/j.jot.2015.05.002.

Marques, D. R. (2011) **Obtenção e caracterização de blendas poliméricas de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) para aplicação como biomaterial**. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, p.105.

Marques, D. R. et al. (2017) ‘In vitro evaluation of poly (lactic-co-glycolic acid)/polyisoprene fibers for soft tissue engineering’, **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, 105(8), pp. 2581–2591. doi: 10.1002/jbm.b.33796.

Merolli, A. (2019) ‘**Bone repair biomaterials in orthopedic surgery**’, in Bone Repair Biomaterials. Elsevier, pp. 301–327. doi: 10.1016/b978-0-08-102451-5.00011-1.

Oliveira, A. C. P. (2002) **Comparação entre enxerto ósseo autógeno, homólogo congelado e homólogo liofilizado em modelo de cranioplastia em ratos**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do

Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, p.94.

Oryan, A. et al. (2017) 'Effectiveness of tissue engineered based platelet gel embedded chitosan scaffold on experimentally induced critical sized segmental bone defect model in rat', **Injury**. Elsevier Ltd, 48(7), pp. 1466–1474. doi: 10.1016/j.injury.2017.04.044.

Pinto, J. G. S. (2010) 'Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais—uma revisão de conceitos atuais', **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, 12(3), pp. 79–84. doi: 10.5335/RFO.V12I3.1053.

Redig, P. T. and Ponder, J. (2016) 'Orthopedic Surgery', in Samour, J. H. (ed.) **Avian Medicine**. 3rd editio. saint louis: Elsevier, pp. 312–358. doi: 10.1016/B978-0-7234-3832-8.00012-2.

Sabater González, M. (2019) 'Skeletal Bone Structure and Repair in Small Mammals, Birds, and Reptiles', **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**. Elsevier Inc, 22(2), pp. 135–147. doi: 10.1016/j.cvex.2019.01.002.

Sanaei, R. et al. (2015) 'Evaluation of Osteogenic Potentials of Avian Demineralized Bone Matrix in the Healing of Osseous Defects in Pigeons', **Veterinary Surgery**, 44(5), pp. 603–612. doi: 10.1111/vsu.12292.

Schmaedecke, A. et al. (2003) 'Tratamento cirúrgico de união retardada e não-união de fraturas em cães : revisão de literatura', **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, 6(1/3), pp. 74–82.

Schopf, L. F. et al. (2017) 'Experimental use of new absorbable tracheal stent', **Journal of Pediatric Surgery**. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.11.038.

Souza, L. A. et al. (2010) 'Redução de fraturas ósseas em aves: Revisão de literatura', **Pubvet**, 4(1), pp. 1–21.

Tarchala, M. et al. (2018) 'A pilot study: Alternative biomaterials in critical sized bone defect treatment', **Injury**. Elsevier Ltd, 49(3), pp. 523–531. doi: 10.1016/j.injury.2017.11.007.

Trejo-Iriarte, C. G. et al. (2019) 'Evaluation of bone regeneration in a critical size cortical bone defect in rat mandible using microCT and histological analysis', **Archives of Oral Biology**. Elsevier Ltd, 101, pp. 165–171. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.010.

Tully, T. N. (2002) 'Basic avian bone growth and healing', **Orthopedics**, 5(1), pp. 23–30.

Tunio, A. et al. (2015) 'Histologic Evaluation of Critical Size Defect Healing With Natural and Synthetic Bone Grafts in the Pigeon (*Columba livia*) Ulna', **Journal of Avian Medicine and Surgery**, 29(2), pp. 106–113. doi: 10.1647/2013-047.

Vilaplana Grosso, F. (2019) 'Orthopedic Diagnostic Imaging in Exotic Pets', **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**. W.B. Saunders, pp. 149–173. doi: 10.1016/j.cvex.2019.01.003.

Wander, K. W. et al. (2000) 'Fracture healing after stabilization with intramedullary xenograft cortical bone pins: a study in pigeons.', **Veterinary surgery**, 29(3), pp. 237–244. doi: 10.1053/jvet.2000.5608.

Williams, R. J. et al. (1987) 'A comparative study of treatment methods for long bone fractures', **Companion Animal Practice**, 1(4), pp. 48–55.

Zafalon-Silva, B. (2019) **Determinação do defeito crítico em ulna de codorna-doméstica (Coturnix coturnix japonica)**. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em

Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, p.49. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Zhang, M. et al. (2014) 'Repair of segmental long bone defect in a rabbit radius nonunion model: Comparison of cylindrical porous titanium and hydroxyapatite scaffolds', **Artificial Organs**, 38(6), pp. 493–502. doi: 10.1111/aor.12208.

ANEXO I – Documentação de aprovação do projeto na CEUA-UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36619

Título: Utilização de blenda polimérica de poli (Ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) (Celiprene) para correção de defeito crítico e de não-união em unha de Coturnix japonica

Vigência: 01/05/2019 à 31/07/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCELO MELLER ALIEVI - coordenador desde 01/05/2019
 LUIS ALBERTO LOUREIRO DOS SANTOS - coordenador desde 01/05/2019
 LIVIA EICHENBERG SURITA - Aluno de Mestrado desde 01/05/2019
 MIÚRIEL DE AQUINO GOULART - Aluno de Doutorado desde 01/05/2019
 Mariana Zacouleguy Boos - Aluno de Doutorado desde 01/05/2019
 Lucas Antonio Heinen Schuster - Aluno de Doutorado desde 01/05/2019
 Aires Santana Rumpf - Aluno de Doutorado desde 01/05/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 48 codornas (Coturnix japonica), fêmeas, adultas em início de fase reprodutiva (aproximadamente 60 dias de vida e 150g de massa corporal) obtidas no criadouro Avifran Avicultura® (CNPJ 02.245.089/0001-81); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 21 de Junho de 2019.

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética