

Ministério da Saúde
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE MEMBRANA INDUZIDA DE MASQUELET
EM MODELO MURINO DE FALHA SEGMENTAR ÓSSEA

Breno Jorge Braga Scorza

Rio de Janeiro
2019

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE MEMBRANA INDUZIDA DE MASQUELET
EM MODELO MURINO DE FALHA SEGMENTAR ÓSSEA DE TAMANHO CRÍTICO

Breno Jorge Braga Scorza

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. João Antonio Matheus Guimarães
Prof^ª. Dr^ª. Rafaela Sartore da Costa Gomes

Rio de Janeiro
Fevereiro
2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

S423e Scorza, Breno Borge Braga.

Estabelecimento da técnica de membrana induzida de Masquelet em modelo murino de falha segmentar óssea. / Breno Jorge Braga Scorza. — 2019.

50f.

Orientadores: João Antônio Matheus Guimarães e Rafaela Sartore da Costa Gomes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético). — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2019.

1. Perda Óssea. 2. Técnica de Masquelet. 3. Membrana induzida. 4. Ortopedia. I. Guimarães, João Antônio Matheus; Gomes, Rafaela Sartore da Costa, orient. II. Título.

NLM WE 250

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ESTABELECIMENTO DA TÉCNICA DE MEMBRANA INDUZIDA DE MASQUELET
EM MODELO MURINO DE FALHA SEGMENTAR ÓSSEA DE TAMANHO CRÍTICO

Breno Jorge Braga Scorza

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Sérgio Franco (UFRJ)

Prof. Dr. Pedro José Labronici (UFF)

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Leal de Oliveira (INTO)

Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Leite Duarte (INTO, revisora)

Prof^a. Dr^a. Anneliese Fortuna de Azevedo Freire da Costa (INTO, suplente)

Prof^a. Dr^a. Verônica Aran Ponte (INTO, suplente)

Rio de Janeiro
Fevereiro
2019

RESUMO

SCORZA, Breno J B. Estabelecimento da técnica de membrana induzida de Masquelet em modelo murino de falha segmentar óssea de tamanho crítico. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2019.

A técnica de Masquelet é utilizada para a reconstrução de grandes falhas na região diafisária de ossos longos. Na segunda etapa da técnica, é observada a formação de uma membrana de tecido conjuntivo ao redor do espaçador inserido na falha óssea, gerada por uma reação do organismo do tipo corpo estranho. Atualmente, sabe-se que a membrana induzida exerce intensa atividade biológica e pode auxiliar na consolidação óssea após a enxertia. O objetivo desse projeto foi estabelecer um modelo murino de membrana induzida através da criação de falha óssea segmentar médio-diafisária no fêmur, estabilizada por haste intramedular retrógrada (fio de kirschner rosqueado) e inserção do espaçador de PMMA. Um defeito ósseo de cerca de 7 milímetros de extensão foi obtido, com adequada estabilização da perda óssea pelo uso do fio de Kirschner. A análise histológica das membranas formadas após 2, 4 e 6 semanas da inserção do espaçador de PMMA mostrou a evolução da membrana de um tecido conjuntivo frouxo para um tecido conjuntivo denso, além de redução do número de vasos sanguíneos ao longo do tempo. Além disso, as membranas dos extraídas nos três tempos mostraram focos de ossificação endocondral. Como conclusão, o estudo demonstrou resultado satisfatório do uso do fio de Kirschner como haste intramedular em modelo de falha óssea de tamanho crítico em ratos e o potencial do modelo para o estudo da membrana induzida de Masquelet.

Palavras-chave: Perdas ósseas, Técnica de Masquelet, Membrana induzida.

ABSTRACT

SCORZA, Breno J B. Establishment of the Masquelet induced membrane technique in a murine model of critical-sized segmental bone defect. Rio de Janeiro, 2019. Master Thesis. (Master's Degree in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2019.

The Masquelet technique is used to reconstruct major faults in the diaphyseal region of long bones. In the second step of the procedure, a membrane of connective tissue is observed around the cement spacer, generated by a reaction of the organism against the foreign body. Nowadays it is known that such membrane holds intense biological potential, and it must be preserved in order to promote osteogenesis upon autologous bone engraftment. The objective of this project was to establish a murine model of mean diaphyseal bone failure in the femur treated with retrograde intramedullary nailing (threaded Kirschner's wire), followed by the insertion of a spacer in the bone defect site. A bone defect measuring 7 millimeters of length was obtained, upon adequate stabilization with the threaded Kirschner's wire. The histological evaluation of the membranes formed after 2, 4 and 6 weeks of insertion of the PMMA spacer demonstrated the evolution of the membrane from a loose connective tissue to a dense connective tissue, in addition to a reduction in vascularity along the time frame. Besides, the membranes of all three groups showed endochondral ossification foci. In conclusion, our study demonstrated the success of Kirschner's wire for obtaining intramedullary nail fixation in the model of critical size bone defects in rats, besides the potential of the model for the study of the induced membrane of Masquelet.

Key words: Bone loss, Masquelet technique, Induced membrane.

SUMÁRIO

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE QUADROS E TABELAS	IX
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Perdas ósseas de tamanho crítico	1
1.2 Tratamento de perdas ósseas de tamanho crítico	3
1.2.1 Osteogênese distracional - Técnica de Ilizarov	3
1.2.2 Transferência de osso vascularizado	5
1.2.3 Enxerto ósseo não vascularizado	7
1.2.4 Técnica de Masquelet.....	8
1.3 Biomembrana de Masquelet	10
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Principal.....	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4 METODOLOGIA	16
4.1 Planejamento estatístico	16
4.2 Animais.....	16
4.3 Desenho experimental do biomodelo de membrana induzida de Masquelet.....	16
4.4 Procedimentos cirúrgicos	17
4.4.1 Criação do defeito, anestesia e analgesia	17
4.4.2 Osteossíntese e preenchimento do defeito ósseo.....	18
4.4.3 Acompanhamento pós-operatório.....	20
4.5 Análise radiográfica.....	20

4.6	Análise histológica	20
4.7	Análise estatística	22
5	RESULTADOS.....	23
5.1	Estabelecimento do modelo cirúrgico	23
5.2	Achados histológicos da membrana induzida	27
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	42
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
	ANEXO A. LICENÇA DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS (CEUA/INTO).....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética Óssea)
PMMA	Polimetilmetacrilato
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
VEGF	<i>Vascular endotelial growth fator</i>
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem ilustrativa de defeito crítico médio-diafisário em tíbia direita.	02
Figura 2- Fixador externo circular, proposto por Ilizarov para o tratamento de grandes defeitos segmentares	04
Figura 3- Ilustração do fixador externo de Debastiani, utilizado para a estabilização óssea no primeiro tempo da técnica da biomembrana induzida, proposta por Masquelet	09
Figura 4- Material cirúrgico utilizado para realização da técnica de Masquelet	17
Figura 5- Material cirúrgico utilizado para realização da técnica de Masquelet	18
Figura 6- Etapas do procedimento cirúrgico para a indução de formação da biomembrana de Masquelet	19
Figura 7- Aspecto macroscópico da membrana induzida de Masquelet	21
Figura 8- Imagens radiográficas pós-operatórias demonstrativas de falha no ancoramento trocantérico pelo fio de Kirschner	24
Figura 9- Imagens radiográficas pós-operatórias demonstrativas de ancoramento trocantérico pelo fio de Kirschner	25
Figura 10- Histologia da membrana induzida de Masquelet após duas semanas de formação	26
Figura 11- Histologia da membrana induzida de Masquelet após quatro e seis semanas de formação	28
Figura 12- Membrana induzida de Masquelet após seis semanas de formação	30
Figura 13- Focos de ossificação na membrana induzida de Masquelet	32
Figura 14- Avaliação do ancoramento da membrana no tecido muscular	34
Figura 15- Avaliação da densidade do tecido conjuntivo das membranas	36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Avaliação histológica da membrana induzida.	21
Quadro 1. Análise histológica semi-quantitativa do nível de vascularização e de fibrose das membranas de Masquelet	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Perdas ósseas de tamanho crítico

O defeito ósseo segmentar pode ser resultado de diversas condições clínicas, tais como ressecção de tumores ósseos ou de tecido de pseudoartroses, desbridamento cirúrgico de tecido com osteomielite e, principalmente, de trauma direto.

O trauma de alta energia pode gerar lesões como fraturas expostas, esmagamentos e perdas tegumentares extensas. As internações hospitalares ocasionadas por traumas de alta energia compreendem majoritariamente adultos jovens, gerando uma média de 250.000 atendimentos por ano nos EUA (BOSSE; MACKENZIE; KELLAM, 2006). No Brasil, os acidentes automobilísticos ultrapassam 400.000 eventos anuais (2008) e estão diretamente relacionados a esse tipo de lesão (ANJOS, 2012). Em um estudo retrospectivo realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, acidentes motociclísticos foram relatados como uma das principais causas de lesões ósseas em adultos jovens (90% dos casos, idade de 18 a 38 anos), afetando em sua maioria o sexo masculino (62%) (ANJOS, 2012). Além dos acidentes de trânsito, as quedas de grande altura e lesões por arma de fogo também estão entre os grandes causadores de lesões traumáticas.

A reconstrução de defeitos ósseos extensos representa um desafio não somente ao ortopedista, mas principalmente ao paciente. O prolongado tempo de internação, as diversas abordagens cirúrgicas com risco de complicações per operatórias, além do risco de graves sequelas decorrentes das múltiplas formas de tratamento, levam à reclusão social prolongada e a impactos financeiros ao paciente. Segundo estudo, o impacto social se estende não somente ao indivíduo, mas também aos seus familiares diretos, através do afastamento de atividades laborais e gastos com o tratamento (ANJOS, 2012).

Dentre as definições propostas para a classificação de um defeito ósseo como sendo de tamanho crítico destacam-se a perda óssea de extensão pelo menos duas vezes e meia superior ao diâmetro do osso acometido (TARCHALA et al, 2017) e o defeito segmentar com extensão superior a 50% da área de secção transversa do osso, mantendo-se contato entre os fragmentos ósseos principais (Figura 1). Simplificadamente, um defeito ósseo de tamanho crítico tem como principal característica a incapacidade de regeneração mesmo após estabilização mecânica da fratura, sendo necessários tratamentos adjuvantes em seu manejo. Segundo Keating e colaboradores (2005), defeitos segmentares maiores que 2 cm de extensão necessitam de tratamento auxiliar associado a fixação óssea para a consolidação, dentre esses, encontram-se a enxertia autóloga, a técnica de osteogênese distracional de Ilizarov, os transplantes vascularizados ou mais recentemente a técnica da membrana induzida de Masquelet. Além disso, a manutenção da vascularização local, associada ao tratamento adequado de partes moles, ajudam no desfecho final (SCHEMITSCH et al, 2017; TOOGOOD et al, 2017; TOSOUNIDIS et al, 2017).



Figura 1: Perda óssea de tamanho crítico. Fotografia ilustrativa de um paciente com perda óssea crítica segmentar no fêmur direito (Fonte: INTO/Arquivo pessoal).

1.2 Tratamento de perdas ósseas de tamanho crítico

Os defeitos ósseos segmentares, especialmente aqueles associados a graves lesões de tecidos moles, tinham como única alternativa de tratamento a amputação do segmento acometido (BOSSE; MACKENZIE; KELLAM, 2006), levando à impotência funcional permanente e estigma social. Com os avanços tecnológicos, a cirurgia de salvamento do membro passou a ser uma alternativa viável, apesar de associada a elevados custos hospitalares (VIATEAU et al, 2006; KEATING et al, 2005).

Atualmente, dentre as opções terapêuticas para o tratamento da falha óssea segmentar estão o enxerto ósseo esponjoso autólogo, o transplante ósseo vascularizado, a osteogênese por distração estabelecida por Ilizarov e a técnica da membrana induzida de Masquelet. Todas essas técnicas têm como meta a mobilidade precoce, o retorno à carga total no membro lesionado e, principalmente, a manutenção deste. O controle de comorbidades, estado nutricional e imunológico, além de suporte mental e social do paciente estão intrinsecamente associados aos bons resultados do tratamento, que se baseia em pouca agressão ao suprimento vascular nos fragmentos ósseos íntegros e estabilização dos mesmos (OBREMSKEY, 2014). Até o momento, não há um algoritmo validado que oriente o ortopedista na escolha do tratamento das lesões ósseas com defeitos críticos (GIANNOUDIS et al, 2007; MCCLURE et al, 2017).

1.2.1 Osteogênese distracional - Técnica de Ilizarov

Os estudos sobre a osteogênese distracional, iniciados por Graviil Ilizarov em 1951, foram pioneiros no tratamento de grandes defeitos ósseos, assim como em pseudoartroses, alongamentos e deformidades ósseas. Essa técnica se baseia nos pilares de estabilização óssea e manutenção do estado biológico e é realizada através da colocação de fios metálicos

percutâneos, associados a anéis metálicos que transferem tensão aos fios e suporte estrutural ao osso saudável. O método é associado a uma osteotomia desse segmento ósseo, seguido de distração do fragmento, na direção da falha segmentar (Figura 2) (ILIZAROV, 1992).

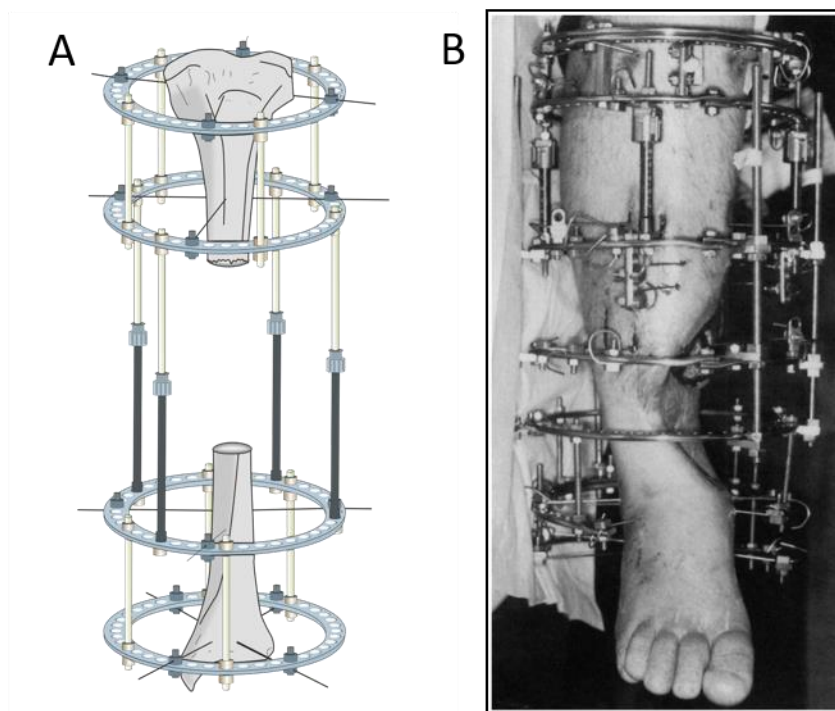


Figura 2: Transporte ósseo com fixador externo circular. (A) Imagem ilustrativa de fixador externo circular de Ilizarov para transporte ósseo. (B) Fotografia ilustrativa de fixador externo circular de Ilizarov, em paciente com perda óssea crítica em tíbia direita (Adaptado de ILIZAROV e LEDYAEV, 1992).

Após um período aproximado de 10 dias, necessário para a formação inicial de calo ósseo na região da osteotomia, a distração é iniciada pelo paciente, sob orientação médica na velocidade de 1 mm/dia, divididos em 4 momentos do dia (0,25 mm cada) em intervalos regulares. Essa velocidade não só permite o alongamento ósseo, como também protege as estruturas neurovasculares de tensões inadequadas e impede a consolidação óssea precoce do osso regenerado. Este apresenta aspectos morfológicos e biológicos iguais ao osso saudável. Outro aspecto positivo da técnica é a possibilidade de correção de deformidades ósseas, no decorrer do tratamento (MCNALLY, et al, 2017; QUINNAN et al, 2017).

Em contrapartida, o procedimento exige um longo período de utilização do fixador externo para que as três fases do processo sejam completadas, sendo elas: distração, corticalização e consolidação do osso regenerado. Sendo a última fase, composta por um período que é em média 3 vezes maior que o tempo necessário para o ganho de comprimento do osso (distração). Além disso, o tamanho do aparelho dificulta a sociabilidade do paciente. Como variante da técnica, DeBastiani propôs a estabilização através de fixador externo do tipo plataforma monolateral, porém, o período de utilização do aparelho não varia em proporção significativa (DEBASTIANI et al, 1987). Outro ponto negativo inerente à técnica é o índice de infecção no trajeto dos fios de Kirchner e Pinos de Schanz no contato com a pele, que em alguns casos pode evoluir para infecção de maior gravidade. Somado a esses fatores estão o alto custo do tratamento e a dificuldade técnica do procedimento que, associados à adesão e comprometimento do paciente, interferem diretamente no sucesso final do tratamento. Também é importante ressaltar que muitos pacientes referem dor durante todo o tratamento. Em último ponto, há também a necessidade de uma nova abordagem cirúrgica para enxertia com osso esponjoso autólogo e revitalização da região distal do osso transportado para que a consolidação entre os fragmentos ósseos seja promovida (EL-GAMMAL, et al. 2018; MOLINA et al, 2014).

1.2.2 Transferência de osso vascularizado

Os primeiros relatos de transplante de osso vascularizado foram descritos em 1975 por Taylor e colaboradores, com a técnica de enxerto vascular microcirúrgico da fíbula. Esse transplante é realizado através da ressecção da fíbula contralateral associada ao pedículo arteriovenoso, com posterior anastomose no membro receptor. Com o passar do tempo, outras áreas doadoras como crista ilíaca, escápula, rádio e costelas passaram a ser empregadas. Contudo, o transplante de fíbula continua sendo o mais utilizado por apresentar menores

índices de agressão ao sítio doador, maior comprimento ósseo quando comparado aos demais ossos e formato anatômico que permite a substituição de áreas específicas como rádio e ulna ou fêmur, tíbia e úmero, de forma intramedular (MALIZOS et al, 2004; NUSBICKEL et al, 1989).

A técnica apresenta como vantagem o aporte sanguíneo endosteal, promovido pela artéria fibular e, sequencialmente, pela artéria nutrícia que se bifurca em um ramo proximal e um distal. O retorno venoso é realizado através de duas veias fibulares com suficiente calibre que garantem a homeostasia local. A divisão da artéria nutrícia, também permite que o enxerto seja dividido em dois fragmentos menores, permitindo uma maior abrangência na cobertura do defeito em tamanho circunferencial. Soma-se também à irrigação periosteal, uma média oito arteríolas, que confere potencial de consolidação adicional ao enxerto. Além disso, por permitir o recobrimento de lesões de tecidos moles com transplante muscular e cutâneo em tempo único, é reduzido o total de abordagens a qual o paciente é submetido (PELLISSIER et al, 2000). O enxerto se incorpora ao sítio receptor como uma fratura segmentar e, graças ao aporte vascular, sua reabsorção é prevenida. A estrutura anatômica do sítio da falha óssea é mantida e, em associação à progressão de cargas a qual o membro é submetido, a hipertrofia é estimulada, permitindo assim um membro mais próximo da normalidade (STORM et al, 1996).

Em contrapartida, o alto grau de complexidade da cirurgia exige longo tempo de especialização do cirurgião e suporte tecnológico hospitalar, além da presença do microscópio óptico, que não representa a realidade da maior parte dos hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro, inviabilizando a realização da cirurgia em diversas unidades. A elevada complexidade do procedimento demanda prolongado tempo cirúrgico e, frequentemente, duas equipes capacitadas para sua realização, além de perda sanguínea acentuada, com impactos em estadia hospitalar e em unidades de terapia intensiva decorrente

da instabilidade hemodinâmica. Além disso, o índice de morbidade da área doadora é bastante elevado, podendo ser observado desde intercorrências como hematoma pós-operatório e dor até tromboembolismo venoso e necrose do membro, podendo necessitar de amputação do membro. Observa-se, em alguns casos, o valgismo progressivo e acentuado no tornozelo, com necessidade de correção cirúrgica tardia. O membro receptor está sujeito às mesmas intercorrências, somados a um número acentuado de fraturas por estresse, em torno de 25%, devido à sobrecarga estrutural em algumas áreas transplantadas. Outra complicação observada é o *déficit* de arco de movimento tanto no tornozelo quanto no joelho, nos casos de transplante para coberturas de defeitos tibiais (TANG et al, 1992).

1.2.3 Enxerto ósseo não vascularizado

O padrão ouro no tratamento da enxertia óssea em defeitos menores de 6 cm segue sendo o osso esponjoso de crista ilíaca. Tais defeitos não demandam tratamento adjuvante obrigatório, além da enxertia. Observam-se propriedades osteoindutivas, osteocondutivas e osteogênicas neste. Também possui diversos imunomoduladores com interleucinas, fatores de crescimento e proteína morfogenética do osso. A área doadora tida como preferencial, ocorre devido ao maior volume de enxerto disponível, além de relativa facilidade de acesso para coleta, sem levar à deficiência funcional. Porém, a enxertia de osso esponjoso, acaba sendo rapidamente reabsorvida, em tempo menor que o necessário para formação óssea, principalmente em grandes defeitos, o que impossibilita seu uso de forma isolada com finalidade curativa, em casos extremos. Além disso, o enxerto esponjoso, apesar de possuir células viáveis e preservar o formato trabecular, não possui estabilidade mecânica. Apresenta também como desvantagem a dor residual na área doadora do paciente (MYEROFF et al, 2011; FINKEMEIER et al, 2002; SEN et al, 2007).

1.2.4 Técnica de Masquelet

No início da década de 90, Alain Masquelet e colaboradores iniciaram uma série de casos para o tratamento de grandes defeitos ósseos, que se desenvolveu em um estudo com 35 pacientes com lesões de tamanho críticos de até 25 cm, tratados através de dupla abordagem (MASQUELET; BEGUE, 2010).

Inicialmente, os pacientes, em sua maioria vítimas de trauma ou sequelas de osteomielite, foram tratados com desbridamento agressivo dos tecidos desvitalizados associado à colocação de um espaçador de cimento ósseo (Figura 3). Esse tinha como função prioritária a manutenção de comprimento ósseo e impedir a invasão da falha por tecidos moles circunjacentes permitindo, assim, a permanência de um arcabouço anatômico mais fidedigno para a subsequente reconstrução óssea. Além disso, com o intuito de debelar a infecção em fraturas expostas e osteomielite, a base de polimetilmetacrilato do cimento ósseo era acrescida de antibiótico (vancomicina, tobramicina, gentamicina), possibilitando a liberação de doses contínuas de antibiótico por uma média duas semanas. Nessa primeira abordagem, a cobertura de lesões de tecidos moles era estimulada com a rotação de retalhos de cutâneos ou miocutâneos e a estabilização do eixo mecânico era obtida através da fixação com fixador externo (Figura 3) (MASQUELET, 2017; GIANNOUDIS, 2016).

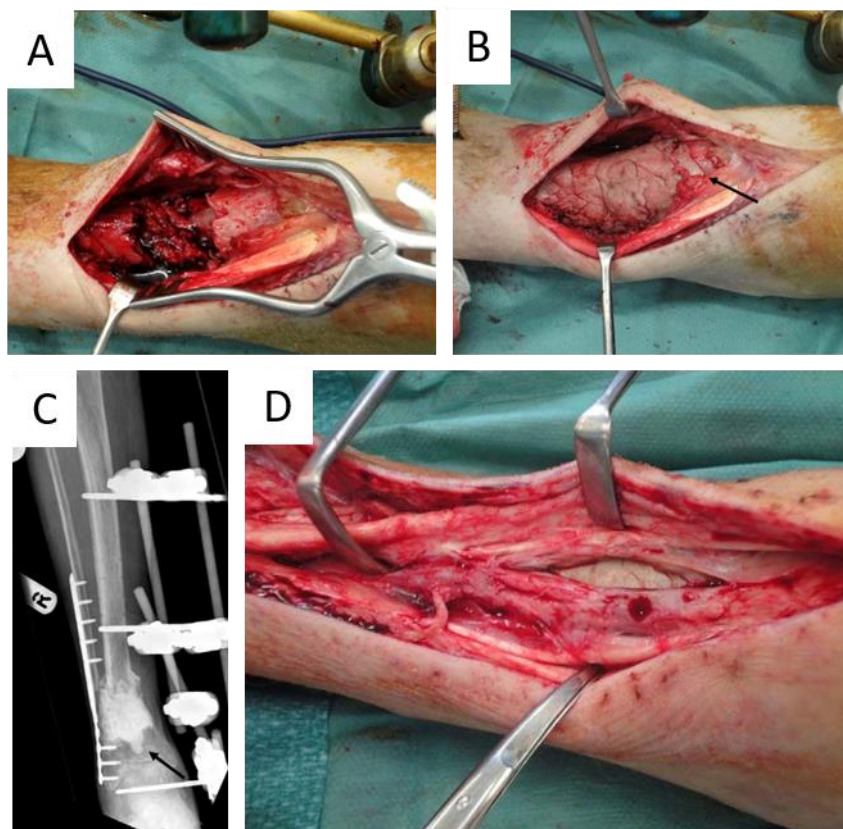


Figure 3: Técnica da membrana induzida. (A) Fotografia ilustrativa de perda óssea crítica segmentar na tibia em um paciente, após desbridamento de infecção óssea. (B) Fotografia ilustrativa de perda óssea crítica segmentar na tibia preenchida por espaçador de cimento ósseo de PMMA. (C) Fotografia ilustrativa de radiografia em antero-posterior dos ossos da perna de um paciente em pós operatório com perda óssea preenchida com cimento ósseo de PMMA, associada a um fixador externo. (D) Fotografia ilustrativa da segunda etapa cirúrgica, após 6 semanas, evidenciando a formação da membrna induzida entre o cimento ósseo e as partes moles (Adaptado de GIANNLOUDIS et al., 2011).

A reação exotérmica provocada pela polimerização do cimento ósseo e a presença do próprio espaçador levam a uma reação do tipo corpo estranho pelo organismo do paciente. Como resultado, uma membrana de tecido fibroso é formada ao redor do espaçador. No segundo estágio da técnica proposta por Masquelet, realizada após 4 a 8 semanas da interposição do espaçador, essa membrana era inicialmente preservada a fim de se evitar maior sangramento e espoliação do paciente. Após estudos iniciais, sabe-se que a preservação dessa apresenta diversos outros benefícios a consolidação óssea (CHADAYAMMURI et al, 2015;

AHO et al, 2013). A membrana é cuidadosamente incisada, o cimento ósseo é removido e a cavidade é preenchida com osso esponjoso. É de extrema importância a reavaliação e remoção dos possíveis tecidos desvitalizados. Caso o quadro infeccioso não tenha sido debelado, novo desbridamento é realizado, com nova colocação de cimento com antibiótico no local da falha (GIANNOUDIS et al, 2016).

Segundo Masquelet e colaboradores, o enxerto proveniente das cristas ilíacas do próprio paciente é suficiente para o recobrimento de defeitos tibiais de até 20 centímetros. Estudos mais recentes utilizam também enxerto ósseo esponjoso retirado do canal medular femoral através do sistema de *reamer irrigator aspirator* (RIA), associado a outros compostos como matriz óssea bovina (MASQUELET, 2003; MORELLI et al., 2016).

A técnica oferece como vantagem menor tempo de tratamento, com consolidação óssea ocorrendo em torno de quatro meses e retorno à carga total do membro em oito meses. Em comparação às outras técnicas, há menor desgaste do paciente por não necessitar de uso de fixador externo por tempo prolongado ou de abordagem do membro contralateral para a realização do transplante ósseo vascularizado autólogo, sendo o índice de complicações substancialmente menor desta em comparação às demais (GIANNOUDIS et al, 2011).

O uso dessa técnica tem se expandido ao longo dos anos e hoje se sabe da grande importância em manter a viabilidade da biomembrana, e também do fechamento dessa, que funciona mimetizando um neoperiosteio, assim como um receptáculo, mantendo o enxerto em posição favorável à consolidação (FLAMANS et al., 2010).

1.3 Biomembrana de Masquelet

A formação da membrana é induzida pela presença do espaçador no defeito ósseo crítico, seguida de um processo inflamatório iniciado pela reação de corpo estranho gerada pelo organismo, levando à formação de um tecido de granulação. O material utilizado como

espaçador, estabelecido pela literatura, é o cimento ósseo, que a partir da reação exotérmica provocada pela polimerização do PMMA, inicia o processo inflamatório (PELISSIER et al, 2004).

Masquelet e colaboradores (2000), em série de casos em pacientes com osteomielite, bem como Viateau e colaboradores (2004), em modelo caprino, descreveram que a membrana apresenta propriedades similares a um tecido sinovial, podendo prover um ambiente favorável a consolidação óssea, auxiliando assim o enxerto ósseo. A análise histológica em modelo murino, revela um tecido ricamente vascularizado, com grande volume de células e uma matriz fibrosa organizada em paralelo ao espaçador de cimento ósseo colocado no local da perda óssea. Tanto a espessura da membrana, quanto as características histológicas sofrem alteração com o tempo (BOSEMARK et al, 2015).

A celularidade da membrana, em modelo murino, inicialmente se apresenta distribuída homogeneamente por todo o tecido e de acordo com o tempo, passa a se concentrar na região mais próxima ao envelope muscular. O mesmo ocorre com o padrão vascular, que inicialmente é rico em capilares de baixa espessura de parede e lúmen, evoluindo com decréscimo do número total, associado ao aumento de calibre e espessura da parede dos vasos que passam a se concentrar mais na zona periférica da membrana (HENRICH et al, 2013).

De acordo com características histológicas, como observado por Pelissier em 2004, a membrana, no modelo murino, com duas semanas apresenta duas camadas formadas. A porção mais próxima ao cimento é formada predominantemente por vasos sanguíneos, células com aparência cuboidal e fibroblastos organizados em sentido paralelo ao cimento, além de algumas células gigantes, apresentando similaridade com um tecido sinovial. A região mais próxima à face muscular, apresenta maior desorganização dos fibroblastos além de alta presença de fibras de colágeno e miofibroblastos (WANG et al, 2017). A grande diferença

desta membrana para a membrana com 4 semanas é a presença de vasos mais calibrosos e uma diminuição do processo inflamatório (MONES et al, 2015).

Conforme o passar das semanas, a membrana vai adquirindo um aspecto mais fibroso, com maior deposição de fibras de colágeno, perdendo seu potencial secretor, levando a uma redução de seu potencial adjuvante na consolidação óssea. Independentemente, segue sendo importante seu papel como barreira de proteção à reabsorção do enxerto ósseo pelos tecidos moles adjacentes (YEE et al, 2017), impedindo também que esses mesmos tecidos invadam a área da perda óssea segmentar, antes da consolidação óssea (MARAIS, FERREIRA, 2015).

A membrana também é fonte de diversas moléculas sinalizadoras, tais como a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de von Willebrand, interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8), entre outros. (WANG et al., 2015). Esses fatores, também apresentam alterações quantitativas relacionadas ao tempo (CHRISTOU et al, 2014).

Nas membranas mais jovens, tanto em modelo murino quanto em humanos, observam-se altos índices de BMP-2, TGF- β e principalmente VEGF, que evolui com um decréscimo expressivo. Esses mediadores estão diretamente ligados a diferenciação óssea, síntese de colágeno e aumento do número de vasos, respectivamente (NAU et al, 2016, GRUBER et al, 2016, AHO et al, 2013). O TGF- β é uma citocina com grande importância na modulação da homeostase celular, atuando tanto na sua proliferação quanto na sua diferenciação, além de modular a produção e deposição de matriz extracelular, angiogenese e inflamação (ROSSI et al, 2019). Outro fator importante na angiogenese também encontrado é o fator de Von Willebrand, presente principalmente no endotélio dos vasos, varia em quantidade de forma similar ao VEGF (PELLISSIER et al, 2004). Já a inflamação, presente nas fases iniciais da membrana induzida, está diretamente relacionada a produção das Interleucinas 6 e 8 que encontram-se difusas na membrana (HILDEBRAN et al, 2005)

Esse tecido caracterizado por macrófagos, fibroblastos e matriz de colágeno que apresenta intensa vascularização na fase inicial, associados às propriedades osteoindutoras, osteocondutoras e osteoprogenitoras do enxerto ósseo esponjoso é de extrema importância para a consolidação óssea ao final do processo (AHO et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

A técnica de Masquelet tem sido empregada na prática ortopédica como uma opção de tratamento de perdas ósseas de tamanho crítico causadas por trauma, infecção ou tumor. Devido às suas funções biológicas tais como aporte vascular, celular e secreção de fatores de sinalização, essa membrana tem sido utilizada como ferramenta adjuvante a fim de promover a consolidação óssea de enxertos autólogos e desvitalizados. Contudo, ainda não está bem esclarecido qual o melhor mecanismo de indução da formação da membrana, a fim de se aproveitar seu melhor potencial biológico. O emprego do modelo animal permite a manipulação de parâmetros cruciais para elucidar essa questão.

O modelo da técnica da membrana induzida em ratos é reprodutível uma vez que o fêmur deste é um osso tubular com comprimento interno e diâmetro exterior relativamente consistentes que, associado ao seu longo eixo longitudinal, pode nos levar a uma estabilização da fratura de forma padronizada. Além disso, a cobertura muscular do fêmur é um elemento importante na investigação do papel dos tecidos moles na formação da membrana de Masquelet. Assim, o modelo de rato pode ser considerado como a espécie adequada para o desenvolvimento da técnica.

Os elevados custos de aquisição de implantes específicos para modelo de perdas ósseas em animais de pequeno porte são elevados, impondo o desenvolvimento de um novo método de fixação para o estudo da técnica da membrana induzida. Nesse contexto propomos nesse estudo a utilização do fio de Kirschner de ponta rosqueda, intramedular, associado ao uso do cimento ósseo de PMMA para a preenchimento e estabilização da perda óssea, como um método reprodutível e de baixo custo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Estabelecer um modelo murino para o estudo da membrana de Masquelet.

3.2 Objetivos Específicos

1. Estabelecer a técnica cirúrgica de osteotomia e osteossíntese com fio de Kirschner em modelo de ratos estabilizado com o fio de Kirschner;
2. Avaliar a fixação e estabilização dos seguimentos ósseos após fixação interna;
3. Avaliar a histologia das membranas induzidas após 2, 4 e 6 semanas da colocação do espaçador de cimento ósseo no sítio da perda óssea.

4 METODOLOGIA

4.1 Planejamento estatístico

Para estimar o número de animais utilizados no biomodelo proposto neste estudo, empregamos o método de equação de recursos baseado na análise de variância ANOVA, onde o valor de “E”, equivalente ao número total de animais subtraído do número de grupos experimentais, deve variar de 10 a 20. De acordo o método, para valores de $E < 10$, ao aumentar o número de animais a chance de obter resultados mais significativos também aumentaria; para valores de $E > 20$, o aumento do número de animais não elevaria o poder estatístico (CHARAN; KANTHARIA, 2013). Considerando número de sete animais em cada grupo experimental, para três grupos seriam necessários 21 animais ($E=18$).

4.2 Animais

Foram utilizados no presente estudo vinte e dois animais machos, com maturidade óssea adequada (Roach et al 2003), da espécie *Rattus rattus* da linhagem Sprague Dawley de 12 a 14 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Unicamp (SP). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia no Rio de Janeiro (INTO/MS) sob o registro no 006/2017 (Anexo A).

4.3 Desenho experimental do biomodelo de membrana induzida de Masquelet

Para o modelo de membrana induzida, simulando a técnica de Masquelet para tratamento de perdas ósseas foram utilizados 22 animais. As etapas do desenho experimental do estudo estão descritas em sequência temporal na Figura 4.

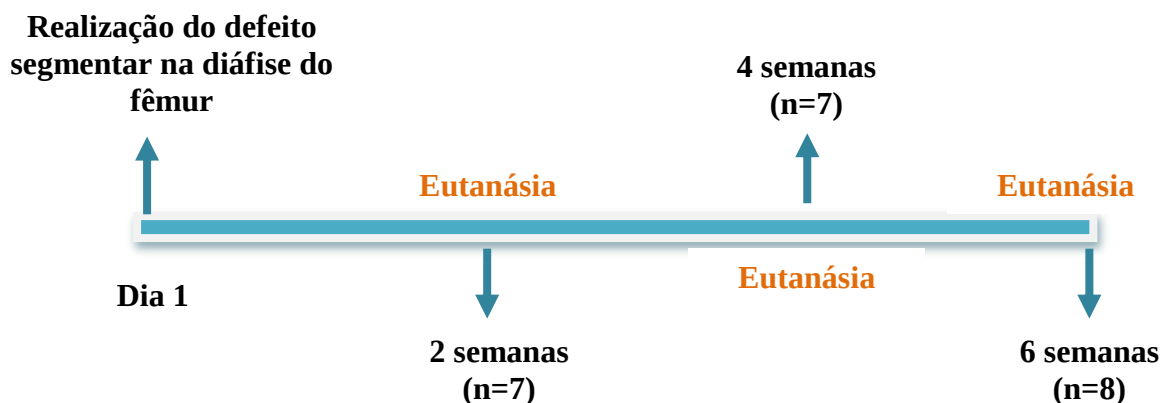


Figura 4. Linha temporal do desenho experimental.

4.4 Procedimentos cirúrgicos

4.4.1 Criação do defeito, anestesia e analgesia

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com o animal sob efeito de anestesia geral administrada por via inalatória induzida com isoflurano a 5% e a mantida com isoflurano a 2,5%. A analgesia foi realizada com 5 mg/kg de cloridrato de tramadol (Hipolabor, Sabara, MG) associado a cetoprofenona (Ketoprofeno 1%, Vencofarma) ambos administrados por via subcutânea no pré-operatório e mantidos uma vez ao dia por três dias consecutivos no pós-operatório. A antibioticoterapia profilática foi realizada com 50 mg/kg de cefazolina sódica (Fazolon[®], Blau Farmacêutica – São Paulo, SP) por via intraperitoneal uma vez ao dia, por três dias consecutivos no pós-operatório.

Para a cirurgia, foram utilizados os seguintes materiais: gancho ósseo duplo, fio de Kirschner, motor manual e serra de Gigli (Figura 5).

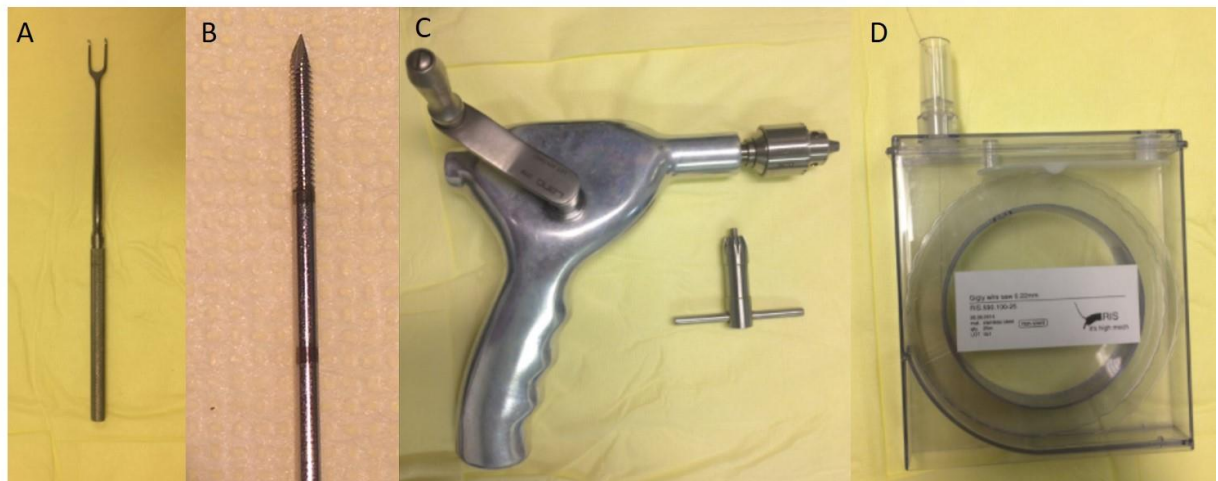


Figura 5: Material cirúrgico utilizado para realização da técnica de Masquelet. (A) Gancho ósseo duplo, utilizado para demarcar a osteotomia de 1 cm; (B) Fio de Kirschner de 1,5 mm, rosqueado na ponta, utilizado para estabilizar os fragmentos ósseos; (C) Perfurador manual, utilizado para a introdução do fio de Kirschner no canal medular ósseo; (D) Serra de Gigli, utilizada para a confecção da osteotomia.

As cirurgias para a criação do defeito segmentar foram realizadas em ambiente estéril, com o animal posicionado em decúbito lateral esquerdo. Após a tricotomia e antissepsia do membro posterior direito com álcool 70%, foi realizada incisão cutânea longitudinal na face lateral da coxa, do grande trocânter até o côndilo lateral do fêmur. Após a incisão da fáscia lata, o músculo vasto lateral foi divulsionado para exposição do fêmur em toda a sua extensão (Figura 6A). A seguir, foi realizada osteotomia com o auxílio de serra de Gigli (0,22 mm; RISystem AG) (Figura 6B), utilizando-se um gancho ósseo duplo (Figura 6A) como referência para a criação de defeito padronizado com 10 mm na porção central da diáfise femoral.

4.4.2 *Osteossíntese e preenchimento do defeito ósseo*

Com auxílio de perfurador manual, foi inserido um fio de Kirschner ponta prego rosqueada de espessura de 1,5 mm pelo canal medular do segmento ósseo distal, em direção ao joelho (Figura 6C). Após visualização da extremidade do fio na fossa intercondílea, o motor manual foi posicionado nessa extremidade e o fio foi progredido retrogradamente

através da falha óssea pelo canal medular, obtendo-se a estabilização dos segmentos ósseos e ancorando a ponta rosqueada do fio na região trocantérica. A seguir o tamanho da falha óssea foi reconfirmando com o gancho ósseo duplo (Figura 6E).

Em capela de exaustão, foi misturado 1 g de polimetilmetacrilato a 487 μ L de líquido ativador (Smartset GMV Endurance, Gentamicin in Bone Cement, 3105040, DePuy International) em uma placa de petri de vidro, com ajuda de uma espátula. Após início da polimerização do cimento, o mesmo foi moldado sobre a falha óssea e foi aguardado seu enrijecimento (Figura 6E). A seguir foi feito o fechamento da fáscia e do subcutâneo com pontos simples interrompidos com fio absorvível de poliglactina (Vicryl 4-0, Ethicon, Vila Olímpia, São Paulo) e, na sequência, o fechamento da pele foi feito com pontos simples interrompidos com fio de nylon 4-0 (NylPoint, Fortaleza, Ceara).

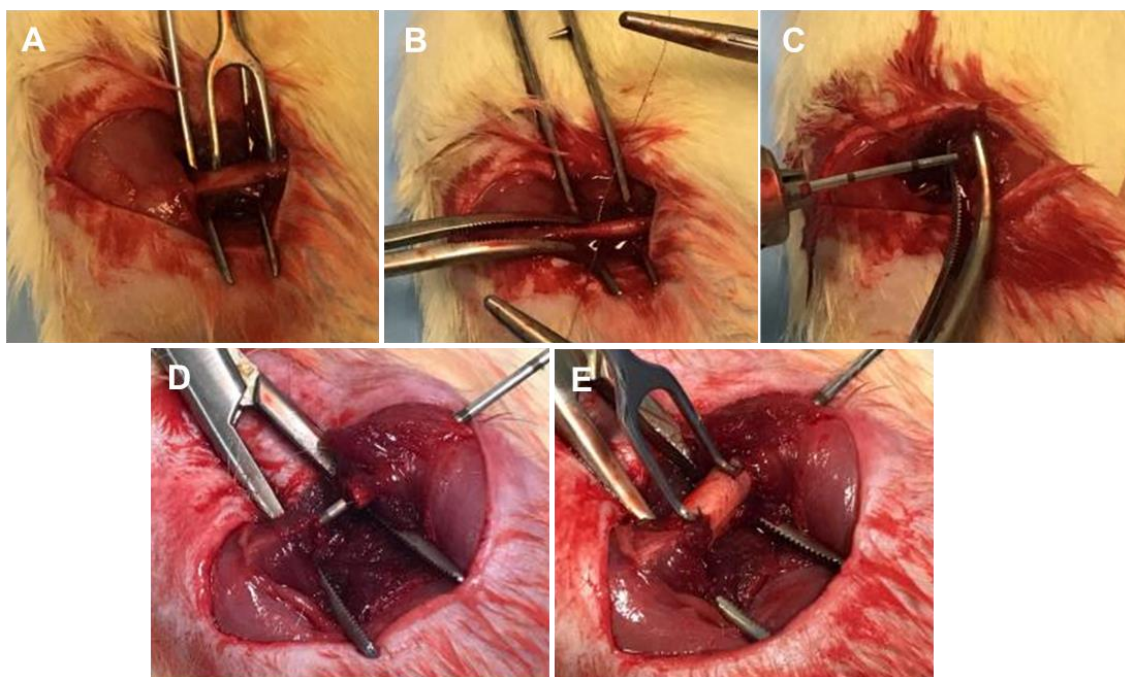


Figura 6: Etapas do procedimento cirúrgico para a indução de formação da biomembrana de Masquelet. (A) Exposição do fêmur após acesso anterolateral e divulsão de tecido moles e uso do gancho duplo para demarcação da porção médio-diafisária femoral a ser excisada; (B) Osteotomia com serra de Gigli; (C) Inserção do fio de Kirschner de forma através da falha em direção ao joelho; (D) União dos fragmentos ósseos obtida com o fio de Kirschner após ancoragem trocantérica; (E) Cimento ósseo já polimerizado após o preenchimento do defeito ósseo segmentar.

4.4.3 Acompanhamento pós-operatório

Após a cirurgia os animais foram mantidos em micro isoladores individuais com livre acesso à água e ração comercial (Nuvilab CR1-Nuvital). Os animais foram observados diariamente para avaliação da ferida operatória quanto à presença de secreções, deiscência de sutura, edema e evolução do processo de cicatrização da pele. Também foram avaliadas alterações comportamentais, qualidade da deambulação, aspecto geral, vocalização, perda de apetite, sinais de dor (arrepimento dos pelos, postura arqueada, vermelhidão ao redor de olhos e narinas, orelhas baixas e alterações no comportamento exploratório do animal). Quaisquer alterações e/ou intercorrências foram comunicadas imediatamente ao médico veterinário responsável pelo biotério que opinava e decidia sobre a realização de eutanásia humanitária. A eutanásia foi realizada em todos os animais sob efeito de anestesia inalatória profunda e injeção intravenosa de solução saturada de KCl.

4.5 Análise radiográfica

Imediatamente após a eutanásia foi feito o controle radiográfico da osteossíntese em radiografias convencionais do membro posterior direito nas incidências em perfil e anteroposterior. Posteriormente o tamanho dos defeitos ósseos foi medido utilizando programa de processamento de imagem radiográfica (mDicomViewer, Microdata versão 3.0).

4.6 Análise histológica

Após a eutanásia 2, 4 ou 6 semanas após a cirurgia, o membro inferior direito foi desarticulado no quadril e o fêmur foi cuidadosamente exposto após a remoção dos tecidos moles. Uma vez evidenciada a face anterior do osso, o tecido de recobrimento do cimento foi identificado (membrana induzida) e retirado delicadamente com auxílio de pinça e bisturi. A seguir, a membrana com parte do músculo adjacente aderido foi esticada sobre papel de filtro, fixada por 48 horas em formaldeído tamponado a 10% (pH 7,4), clivada em fragmentos transversais com 2-3 mm de espessura e totalmente incluída em parafina (Figura 7). Foram

obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura, que foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas histológicas contendo as amostras foram escaneadas no sistema ApoTome 2 em câmera de alta resolução AxioCam HRm (Zeiss Axiozoom v.16, Carl Zeiss). As imagens foram digitalizadas no programa de análise Zen 2 core (Carl Zeiss).

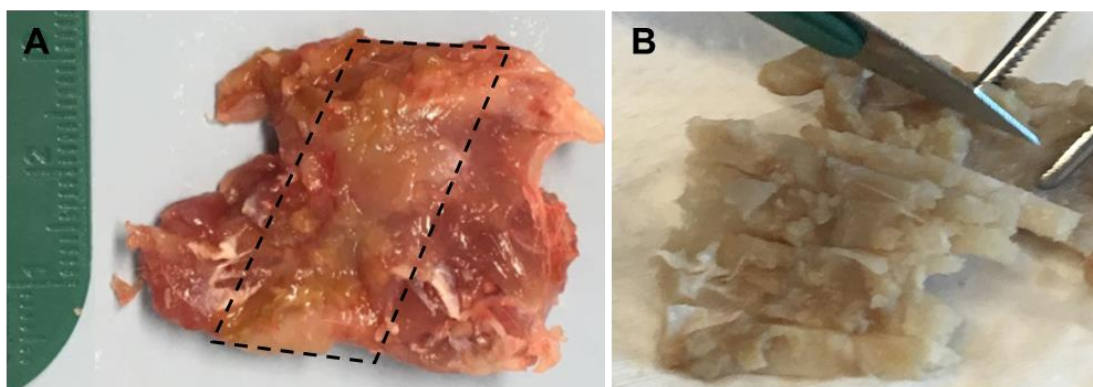


Figura 7: Aspecto macroscópico da membrana induzida de Masquelet. (A) Membrana acastanhada com superfície brilhante aderida à musculatura subjacente. (B) Membrana após fixação em formol tamponado, clivada em fragmentos transversais com 2-3 mm de espessura.

A avaliação da membrana induzida foi padronizada visando identificar os achados histológicos que caracterizavam ou que predominavam em cada fase do estudo (2, 4 e 6 semanas respectivamente). Na tabela abaixo está denotada a avaliação semi-quantitativa usada para avaliação de densidade do tecido conjuntivo e densidade decapilares (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação histológica da membrana induzida.

Densidade do tecido conjuntivo	Frouxo (escore 1) Denso (escore 2) Muito denso (escore 3)
Densidade de capilares	Baixa (escore 1) Intermediária (escore 2) Alta (escore 3)

4.7 Análise estatística

Para avaliação das análises semi-quantitativas histológicas, os escores de intensidade 1 e 2 foram agrupados e comparados à frequência de escore 3 nos tempos de duas, quatro e seis semanas de formação da membrana. Foi empregado teste de qui-quadrado para tendência. Foi considerada significância de 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento do modelo cirúrgico

Com o intuito de estabelecer um modelo de falha segmentar de tamanho crítico no osso femoral do rato, utilizamos um gancho ósseo duplo, de cerca de 1 cm de largura, para demarcar a região médio-diafisária a ser excisada. A ostectomia e a osteossíntese foram realizadas com a ajuda de um cirurgião assistente, sendo este necessário principalmente para os passos de estabilização do fêmur na ostectomia e imobilização dos fragmentos ósseos para inserção do fio de Kirschner no canal medular. O tempo médio de cirurgia foi de 32 ± 7 minutos. Não houve complicações intraoperatórias, exceto por um óbito de causa desconhecida.

Em análise das vinte e uma radiografias em perfil, observamos que em dezoito casos foi alcançada adequada estabilização da perda óssea de tamanho crítico com o uso do fio intramedular associado ao cimento ósseo. Na figura 8, é possível observar a fixação da parte rosqueada do fio intramedular na região proximal do fêmur do animal e o preenchimento da falha óssea com o cimento de PMMA, que foi moldado de forma a envolver as extremidades dos segmentos ósseos distal e proximal.



Figura 8: Radiografia em perfil do fêmur operado em quatro semanas. Evidência da adequada fixação intramedular com presença de um *gap* preenchido pelo espaçador de cimento o qual abraça as extremidades dos segmentos ósseos distal e proximal. A extremidade rosqueada do fio está ancorada no segmento proximal e a parte distal está posicionada no sulco intercondíleo do fêmur, com perfeito alinhamento de todo o segmento ósseo.

Em todos os três grupos houve a recuperação funcional do membro operado, sendo observada boa mobilidade e ausência de claudicação quando o fio intramedular foi posicionado adequadamente, ancorando-se no segmento de osso proximal do fêmur (Figura 9). Análises realizadas no fim do experimento demonstraram que o tamanho do defeito ósseo produzido foi de $7 \pm 1,5$ mm.

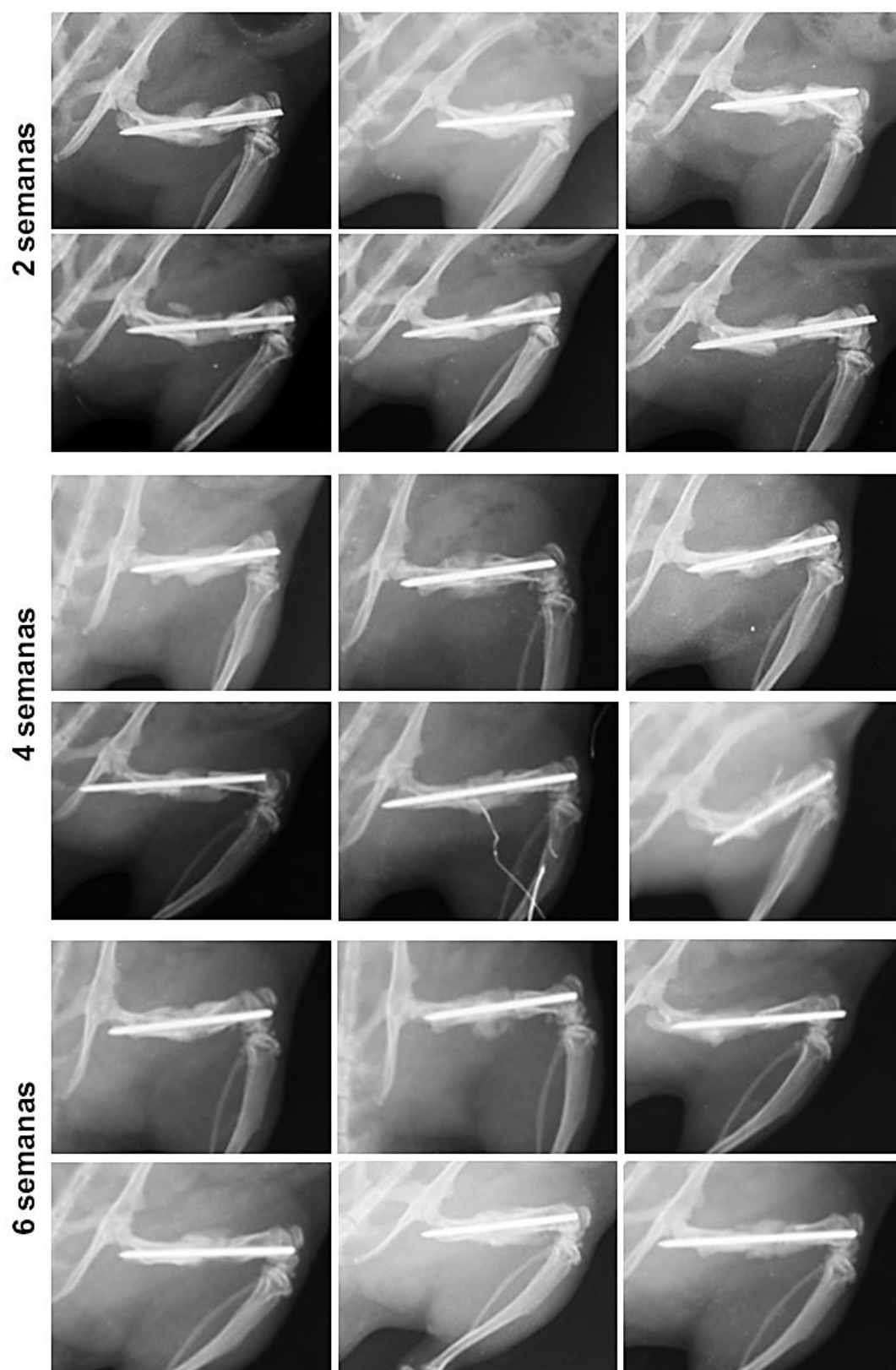


Figura 9: Imagens radiográficas pós-operatórias demonstrativas do ancoramento trocantérico obtido pelo fio de Kirschner.

Com relação aos três animais que apresentaram falha na fixação do modelo proposto, uma ocorreu no grupo de 4 semanas e duas no grupo de 6 semanas. A primeira falha ocorreu no grupo de 4 semanas e foi decorrente da utilização de um fio intramedular curto, que não atingiu a região trocantérica do fêmur, e na evolução dos casos ocorreu a perda da estabilização, levando a uma deformidade em extensão do fêmur (Figura 10A). Os outros dois casos de falha ocorreram no grupo de seis semanas e também foram decorrentes de erro da técnica. Em ambos os casos ocorreu falha de fixação no segmento proximal do fêmur, com consequente migração do fio intramedular e completo deslocamento do espaçador de PMMA, evoluindo com contato entre os fragmentos ósseos e perda do defeito diafisário. (Figura 10B e C). Todos os animais que apresentaram falha no ancoramento trocantérico foram excluídos do estudo.



Figura 10: Imagens radiográficas pós-operatórias demonstrativas da falha de ancoramento trocantérico obtido pelo fio de Kirschner.

5.2 Achados histológicos da membrana induzida

O componente inflamatório nas membranas induzidas apresentou uma redução gradual ao longo do tempo e foi representado em todos os animais por uma resposta difusa e inespecífica, caracterizada pela presença de células mononucleares (linfócitos e alguns plasmócitos) (Figura 11). Em nenhuma amostra foi observada a formação de abscesso ou evidências de associação com processo inflamatório agudo.

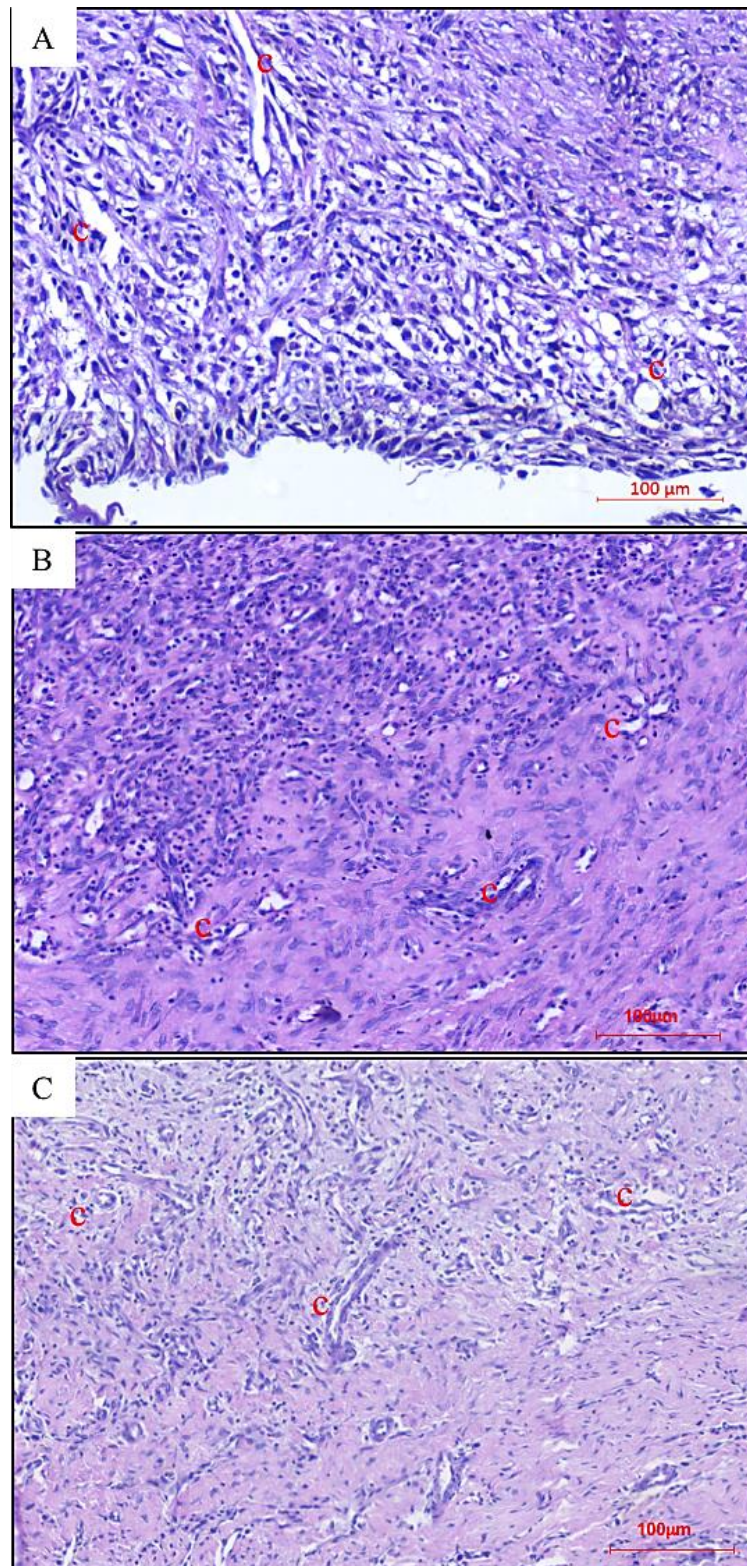


Figura 11. Avaliação do componente inflamatório nas membranas induzidas. (A) 2 semanas: infiltrado inflamatório mononuclear difuso predominando linfócitos e capilares sanguíneos neoformados (c). (B) 4 semanas: infiltrado inflamatório mononuclear difuso e capilares neoformados (c). (C) 6 semanas: poucos linfócitos dispersos no tecido conjuntivo e vasos neoformados com endotélio tumefeito (c).

O componente hemorrágico do tecido conjuntivo das membranas, à semelhança do processo inflamatório, reduziu ao longo do tempo. No primeiro ponto de observação, ou seja, duas semanas após a cirurgia, eram frequentes extensas áreas de hemorragia, congestão vascular e depósitos de material amorfo eosinofílico (fibrina) (Figura 12A). Nos pontos subsequentes, a presença de macrófagos com pigmento acastanhado no citoplasma (hemossiderina) indica a resolução de processo hemorrágico prévio (Figura 11B e C).

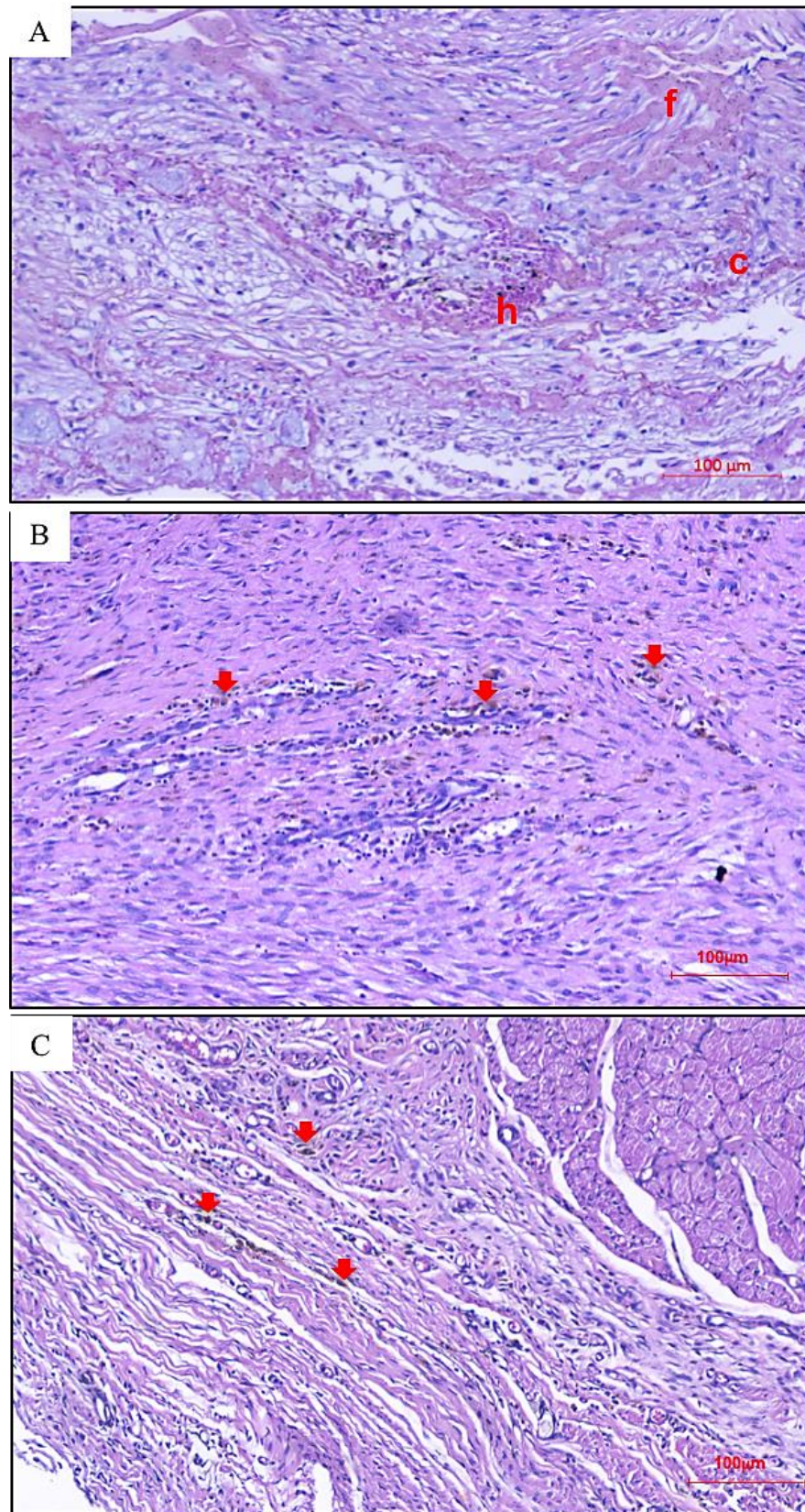


Figura 12. Avaliação do componente hemorrágico nas membranas induzidas. (A) 2 semanas: Focos de hemorragia (h), congestão vascular (c) e deposição de fibrina (f) no estroma frouxo da membrana induzida. (B e C) 4 e 6 semanas: Macrófagos contendo pigmento acastanhado, possivelmente hemossiderina (seta), indicando resolução de processo hemorrágico prévio.

O potencial osteogênico intrínseco da membrana foi demonstrado nos três tempos de observação (Figura 13A). A neoformação óssea observada nas membranas ocorreu principalmente pela via endocondral a partir de focos de cartilagem contendo condrócitos proliferativos e hipertróficos relacionados com matriz parcialmente mineralizada (Figura 13B). O osso neoformado teve padrão lamelar e não lamelar, mostrando relação com osteoblastos ativos e com medula óssea hematopoética.

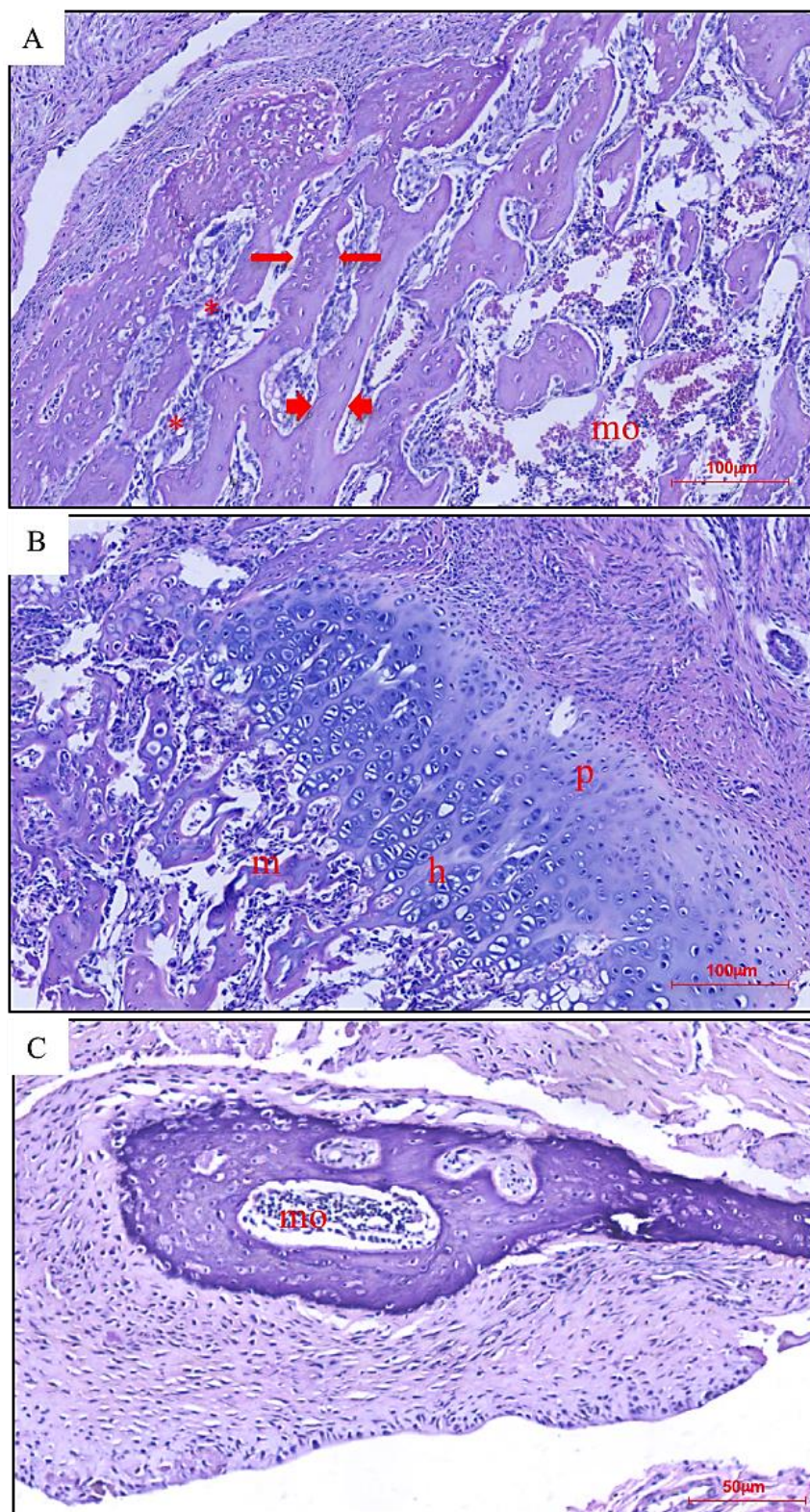


Figura 13. Potencial osteogênico nas membranas induzidas. (A) 2 semanas: neoformação de osso lamelar (seta grossa) e não lamelar (seta fina) no tecido conjuntivo da membrana, com padrão trabecular, recoberto por cordões de osteoblastos cuboidais (*) e contendo medula óssea hematopoética (mo). (B) 4 semanas: foco de ossificação do tipo endocondral com condrócitos proliferativos (p) e hipertróficos (h) e matriz condróide parcialmente mineralizada (m), recoberta por osso neoformado e osteoblastos. (C) 6 semanas: neoformação óssea no tecido conjuntivo fibroso da membrana induzida contendo medula óssea hematopoética (mo).

Nos tempos de 2 e 4 semanas as membranas formadas em todos os animais apresentavam uma zona nítida de demarcação com o tecido muscular subjacente (Figura 14A e B). Em geral essa zona de transição era constituída por tecido conjuntivo frouxo vascularizado. Com 6 semanas, o tecido conjuntivo das membranas penetrava o tecido muscular subjacente, isolando pequenos grupamentos de fibras musculares atroficas. O “ancoramento” da membrana induzida no tecido muscular adjacente foi um evento observado em todos os animais deste grupo experimental (Figura 14C).

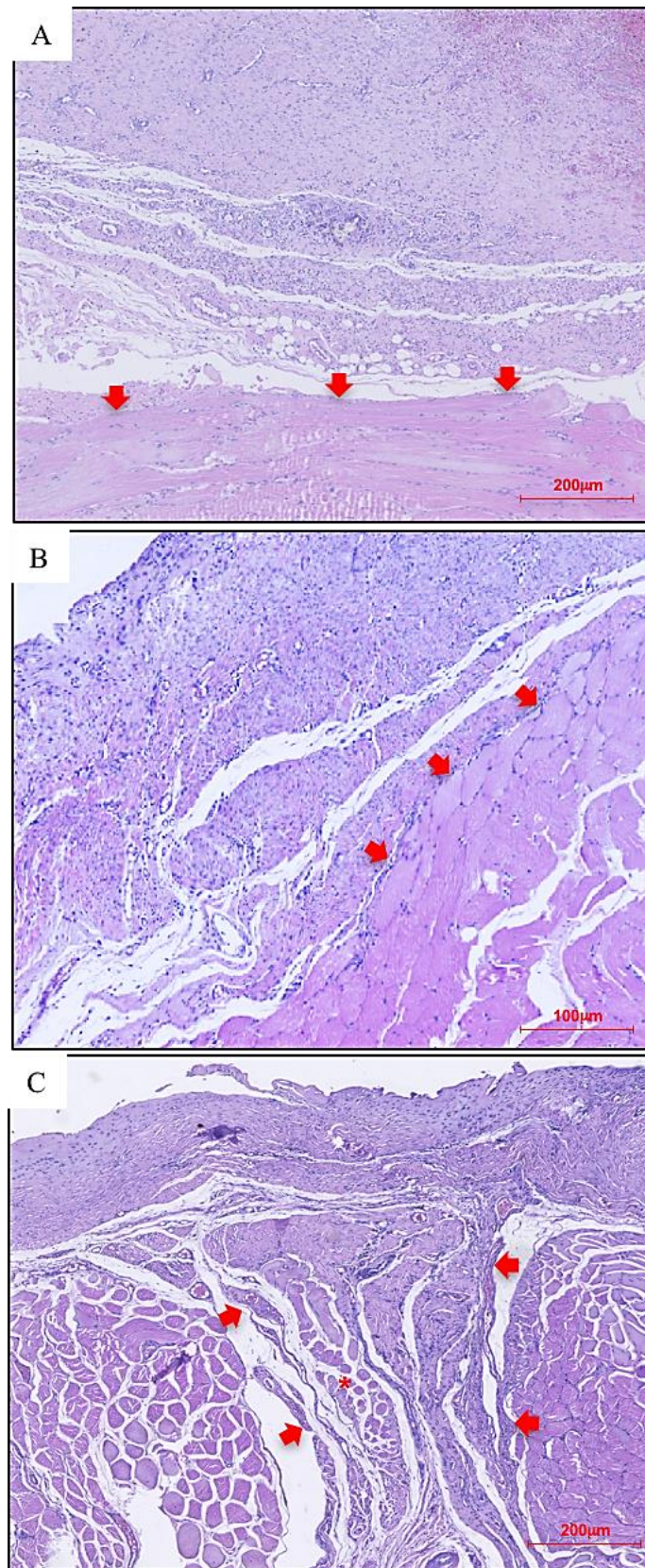


Figura 14. Avaliação do ancoramento da membrana no tecido muscular. (A e B) 2 e 4 semanas: zona de demarcação entre a membrana e o tecido muscular bem definida (setas). (C) 6 semanas: ancoramento da membrana no tecido muscular (seta), isolando fibras musculares atroficas (*) no tecido conjuntivo fibroso.

O resultado da avaliação semi-quantitativa do tecido conjuntivo está representado no Quadro 1. A densidade do tecido conjuntivo aumentou ao longo do tempo. Paralelamente, houve redução gradativa da densidade dos capilares sanguíneos na membrana (Figura 15). Com duas semanas as membranas eram representadas por tecido conjuntivo ricamente vascularizado com deposição de matriz extracelular amorfa relacionada com fibroblastos jovens (Figura 15A). A partir da quarta semana, os fibroblastos adquiriram aspecto mais alongado e a matriz extracelular passou a ter aspecto mais fibrilar (Figura 15B). Com seis semanas, o componente vascular foi nitidamente menor do que nos tempos anteriores e o tecido conjuntivo da membrana mostrou-se rico em fibroblastos alongados aprisionados em matriz colágena densa com fibras dispostas paralelamente, semelhante ao aspecto observado nos tecidos conjuntivos modelados (Figura 15C).

Quadro 1. Análise histológica semi-quantitativa do nível de vascularização e de fibrose das membranas de Masquelet

	2 semanas	4 semanas	6 semanas	p
Vascularização	Escore 1: 1/6 (17%) Escore 2: 0/6 (0%) Escore 3: 5/6 (83%)	Escore 1: 1/6 (17%) Escore 2: 0/6 (0%) Escore 3: 5/6 (83%)	Escore 1: 0/6 (0%) Escore 2: 4/6 (67%) Escore 3: 2/6 (33%)	0,066
Fibrose	Escore 1: 2/6 (33%) Escore 2: 3/6 (50%) Escore 3: 1/6 (17%)	Escore 1: 0/6 (0%) Escore 2: 4/6 (67%) Escore 3: 2/6 (33%)	Escore 1: 0/6 (0%) Escore 2: 1/6 (17%) Escore 3: 5/6 (83%)	0,02

Porcentagens obtidas a partir da análise de cada membrana dos grupos de duas, quatro e seis semanas. p=teste qui-quadrado para tendência.

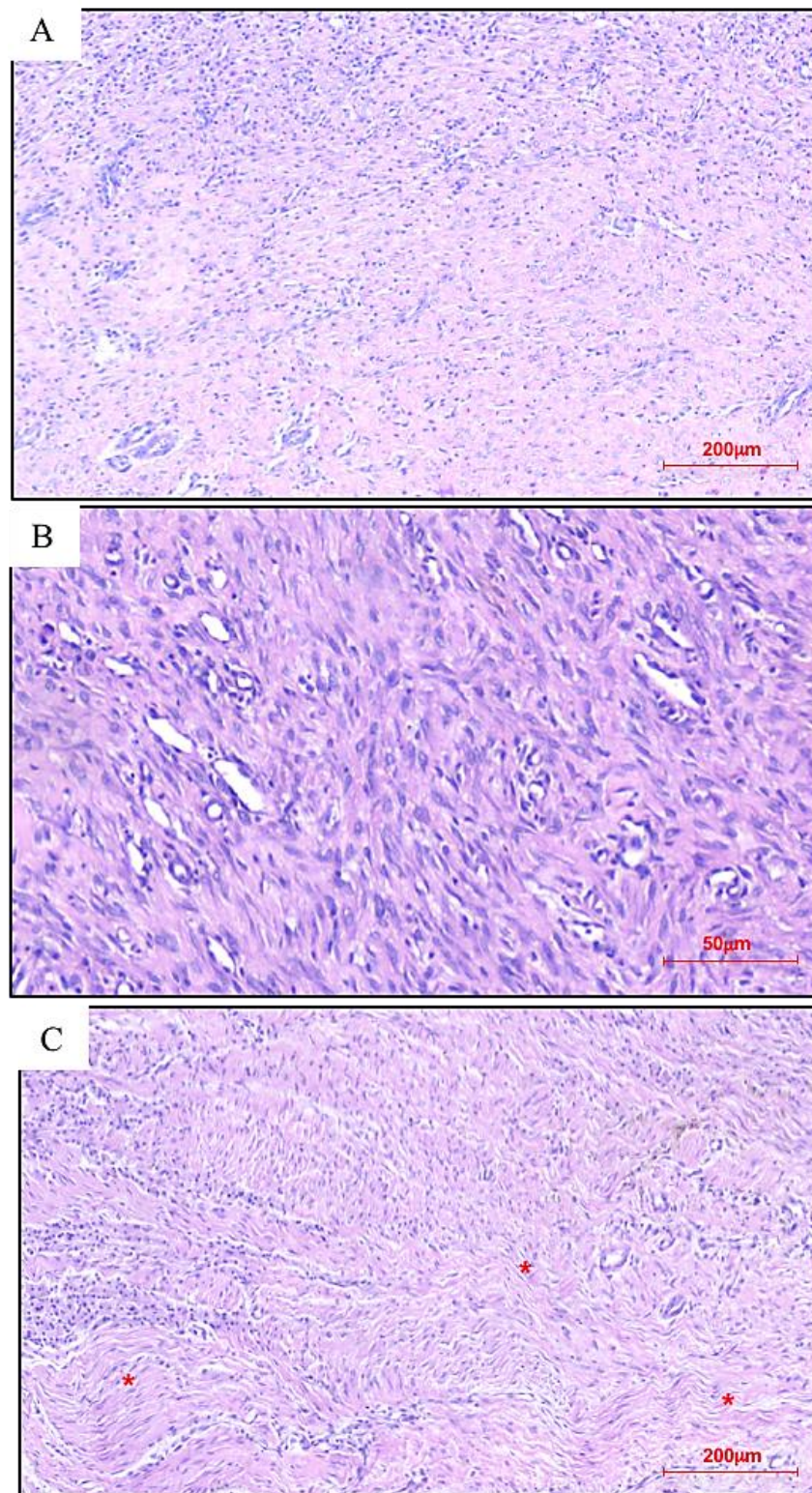


Figura 15. Avaliação da densidade do tecido conjuntivo das membranas. (A) 2 semanas: tecido conjuntivo ricamente vascularizado contendo fibroblastos com núcleos claros, citoplasma com limites imprecisos tendo de permeio matriz extracelular amorfa. (B) 4 semanas: os fibroblastos adquirem morfologia alongada e a matriz extracelular passa a ter aspecto fibrilar. (C) 6 semanas: a matriz extracelular tem aspecto denso e a disposição das fibras colágenas em feixes paralelos (asterisco) sugere a possibilidade de processo de modelamento do tecido conjuntivo. O componente vascular é nitidamente menor do que nos tempos anteriores.

A estabilização de falhas ósseas em modelos murinos está bem estabelecida com a utilização de implantes de microfragmentos. Entre os artigos publicados sobre o tema, a utilização de placa e parafusos na estabilização da falha óssea segmentar é a mais comum (MANASSERO et al, 2016; DROSSE et al, 2007; BOSEMARK et al, 2015). A utilização das placas em modelos animais remete ao tratamento historicamente mais utilizado em humanos e com resultados funcionais consolidados (PERREN, 2002). Outros dispositivos empregados são a haste intramedular (MONTIJO et al, 2012; LUANGPHAKDY, et al 2017) e o fixador externo (SATO et al, 2014; ZHAO et al, 2009; DROSSE et al, 2007). Em estudos da membrana induzida, o implante mais frequentemente empregado para a fixação dos segmentos ósseos é a placa bloqueada com parafusos (BOSEMARK et al, 2015; MA et al, 2017; NAU et al, 2016; GOURON et al, 2014; HENRICH et al, 2013). Contudo, os materiais para execução desse modelo em ratos são de elevado custo, sendo o custo total para uma montagem (um animal), incluindo uma placa e oito parafusos, cotado em 370,00 francos suíços (uma placa: CHF 58,00, RIS.602.105 RatFix Plate, 8 hole 0.8 mm; um parafuso: CHF 39,00, RIS.402.125 RatFix ShoulderScrew 0.8x6.5 mm). Valor esse convertido na média de R\$ 1384,00 por animal, excetuando isso os custos com importação e impostos, tornando essa metodologia inviável para alguns grupos de pesquisa. Por outro lado, o fio de Kirschner, amplamente empregado para cirurgias de trauma em humanos, representa um implante compatível com o tamanho do canal medular do rato, sendo também de fácil acesso e baixo custo (aproximadamente R\$9,00 a unidade).

A técnica de fixação da falha óssea de tamanho crítico empregada em nosso estudo foi inspirada pela técnica proposta por Küntscher, em 1958, para a fixação de fraturas diafisárias em humanos com hastes intramedulares. Por esta técnica, a haste era primeiramente

introduzida no fragmento proximal do fêmur, através do foco de fratura, sendo progredida de maneira retrógrada até ser exteriorizada na região do grande trocânter. Por um novo acesso na região proximal, a haste era introduzida através de impacção no segmento distal do fêmur, após a redução direta da fratura promovendo, assim, a estabilização de alguns tipos de fratura do fêmur.

Em nosso modelo, inserimos o fio de Kirschner através da falha óssea, de forma anterógrada no fragmento distal, com saída pela região intercondiliana. Na sequência, retornamos o fio e o fixamos na região trocantérica, mantendo-se o tamanho da falha gerada. Notamos que é de fundamental importância a fixação da ponta rosqueada do fio com duas a três voltas da rosca na região trocantérica, de modo a aumentar a estabilidade e impedir a migração do fio. Acreditamos que o principal motivo para as falhas de fixação em nosso estudo tenha sido a ausência de imagem no peroperatório, deixando a técnica sujeita a erros no alinhamento dos segmentos ósseos e no sítio de ancoramento do fio. Logo, deve-se ressaltar a necessidade de uma equipe cirúrgica experiente para a realização do procedimento. Ainda assim, encontramos uma taxa de sucesso de 86% em nosso procedimento.

De maneira similar ao procedimento realizado nos pacientes, o espaçador de PMMA foi utilizado para o preenchimento completo do espaço gerado pela osteotomia mimetizando, assim, o osso removido. Em nosso modelo, o espaçador também assumiu um papel importante para a estabilidade do sistema, proporcionando uma técnica de fixação compatível com a mobilização e marcha do animal, com carga no membro e sem alterações clínicas. Por outro lado, a função estabilizadora do espaçador impõe também uma limitação da técnica, pois não é compatível com estudos que avancem para a segunda etapa da técnica de Masquelet, ou seja, que englobem a remoção do espaçador para posterior enxertia do defeito ósseo. Na segunda etapa da técnica de Masquelet, o espaçador é substituído por enxerto ósseo esponjoso que não apresenta as características estruturais do cimento. Somado à mobilidade

da fixação dos fragmentos ósseos com o fio de Kirschner, o colapamento do fêmur ocorreria ao ser submetido à carga da marcha do animal. O estudo, portanto, consiste de uma técnica cirúrgica de simples realização e de baixo custo, R\$9,00 em média, relacionado aos materiais cirúrgicos necessários ao procedimento, adequado ao estudo da membrana induzida em si.

Como desdobramento do modelo estabelecido, optamos por realizar a avaliação histológica das membranas formadas em três pontos temporais: 2, 4 e 6 semanas após interposição do espaçador no defeito ósseo. A escolha dos tempos foi baseada em estudos prévios do modelo murino da membrana induzida, de forma que pudéssemos compara nossos achados com metodologias bem estabelecidas (BOSEMARK et al, 2015; PELISSIER et al, 2004; HENRICH et al, 2013; MA et al, 2017; NAU et al, 2016, GOURON et al, 2014).

Com duas semanas de formação, observamos predominância de células inflamatórias, focos de hemorragia, vasos sanguíneos de pequeno calibre e em grande número, além de matriz colágena associada à presença de fibroblastos jovens, representando um granuloma de tipo corpo estranho. Esses achados estão de acordo com os resultados encontrados por Pellisier e colaboradores (2004), os quais observaram intensa vascularização e pouco depósito de colágeno em modelo de coelhos. Assim como no trabalho de Ma e colaboradores (2017), com ratos da mesma linhagem utilizada em nosso estudo. Ao analisarmos as membranas de quatro semanas, observamos a manutenção da vascularização, enquanto os capilares sanguíneos tornam-se mais calibrosos em comparação às membranas duas semanas, assim como reportado anteriormente (BOSEMARK et al 2015; MONES et al, 2015). Sendo assim, podemos inferir que a membrana com duas a quatro semanas de formação oferece intensa vascularização ao sítio do defeito ósseo.

Em seis semanas, as membranas apresentam-se como um tecido conjuntivo denso, com prevalência de fibras colágenas organizadas em paralelo à superfície do cimento e menor celularidade. Também observamos um permeio do tecido da membrana às fibras musculares

adjacentes, o que sugere uma maior integração entre os dois tecidos. Nesse ponto temporal, portanto, a membrana apresenta uma característica mais resistente à tensão, podendo assumir uma função predominante de proteção à reabsorção do enxerto na segunda etapa do procedimento (HENRICH et al, 2013).

Uma característica atemporal das membranas estudadas foi a presença de neoformação óssea no interior da membrana. Observamos focos de ossificação endocondral, com zonas de condrócitos proliferativos e focos de mineralização. Essa característica se mostrou bastante singular em nosso modelo, não sendo observada em outros modelos animais, exceto por um estudo em caprinos (VIATEAU et al, 2006). Contudo, nos dois estudos existentes da membrana induzida em humanos, focos de ossificação endocondral também foram reportados (AHO et al, 2013; GRUBER et al, 2016). Vale ressaltar que a maioria dos modelos animais emprega fixação com placa e parafusos que oferecem uma fixação mais rígida em relação ao fio intramedular utilizado em nosso estudo. Isso nos leva a um novo questionamento: estaria o grau de mobilidade presente em nosso modelo relacionado à ossificação endocondral da membrana induzida? Além disso, qual seria o papel dessa ossificação na resolução final do defeito ósseo?

No campo ortopédico ainda se encontra em discussão qual seria o melhor emprego da membrana: utilizá-la em seu maior potencial biológico, ou seja, quando ela é ricamente vascularizada e secretora de fatores de crescimento, ou mais tardiamente, quando ela é constituída por um tecido conjuntivo denso atuando como uma barreira protetora para o enxerto. Segundo Alain Masquelet, o tempo para a realização da enxertia não está relacionado com um melhor desfecho final da consolidação óssea (MASQUELET, 2017), enquanto Aho relata que o potencial biológico da membrana não deve ser desperdiçado na resolução das perdas de tamanho crítico. Já Giannoudis relata que apesar do potencial secretor da membrana em humanos ser maior entre 4 e 6 semanas, no artigo publicado em 2016, relata que não há

maiores problemas na segunda etapa ocorrer entre 6 e 8 semanas, onde existe ainda algum grau de secreção dessa.

O método proposto por Alain Masquelet apresenta ainda muitos questionamentos a serem respondidos, como por exemplo na substituição do cimento ósseo e a utilização de outro tipo de espaçador. Ou ainda qual o melhor antibiótico a ser utilizado e se há alguma diferença entre os antibióticos disponíveis. Nesse mesmo modelo, aproveitando o achado da neoformação óssea nesta etapa inicial, a substituição do implante para a realização da segunda etapa cirúrgica, mantendo a membrana formada, levaria a uma melhor consolidação? Qual a similaridade desta membrana com o periósteo? Desta forma existe espaço para a aplicação do modelo estabelecido no auxílio das dúvidas que visam desenvolver o tratamento.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Modelo reprodutível com defeito ósseo de 0,7 cm na diáfise femoral de ratos;
- ✓ O emprego de fio de Kirschner associado ao espaçador de cimento ósseo de PMMA se mostrou estável no modelo murino de perda óssea crítica segmentar do fêmur;
- ✓ A membrana induzida estava presente nos três tempos analisados no estudo;
- ✓ As propriedades biológicas da membrana são moduladas pelo tempo;
- ✓ A membrana induzida possui potencial osteogênico inerente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANJOS, K. C. **Implicações sociais e econômicas nos pacientes vítimas de acidentes com motocicleta internados no IOT-HCFMUSP**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BOSEMARK P.; PERDIKOURI C.; PELKONEN M.; ISAKSSON H.; TAGIL M.; al. The masquelet induced membrane technique with BMP and a synthetic scaffold can heal a rat femoral critical size defect. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 33, n. 4, p. 488-495, 2015.

BOSSE M. J.; MACKENZIE E. J.; KELLAM J. F; An analysis of outcomes of reconstruction or amputation after leg-threatening injuries. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 24, p. 1924-1931, 2002.

CHADAYAMMURI V.; HAKE M.; MAUFFREY C.; Innovative strategies for the management of long bone infection: a review of the Masquelet technique. **Patient safety in surgery**, v. 9, n. 1, p. 32, 2015.

CHARAN J.; KANTHARIA N.D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 303–306, 2013.

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

CLOUGH, Bret H.; MCCARLEY, Matthew R.; GREGORY, Carl A. A simple critical-sized femoral defect model in mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 97, 2015.

DE BASTIANI G.; ALDEGHERI R.; RENZI-BRIVIO L.; TRIVELLA G.;. Limb lengthening by callus distraction (callotaxis). **Journal of pediatric orthopedics**, v. 7, n. 2, p. 129-134, 1987.

DE MONÈS E.; SCHLAUBITZ S.; OLIVEITRA H.; ELBEE J.M.; BAREILLE R.; BOURGET C.; COURAD L.; CHRISTOPHEFRICAIN J.; . Comparative study of membranes induced by PMMA or silicone in rats, and influence of external radiotherapy. **Acta biomaterialia**, v. 19, p. 119-127, 2015.

DROSSE I.; VOLKMER E.; SEITZ S.; SEITZ H.; PENZKOFER R.; ZAHN K.; MATIS U.; MUTSCHLER W.; AUGAT P.; SCHEIKER M.; Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 14, n. 1, p. 79-88, 2008.

EL-GAMMAL T.A., SHIHAA.E., EL-DEEN M.A., EL-SAYED A, KOTB M., ADDOSOOKI A.I, RAGHEB Y.F., SALEH W.R. Management of traumatic tibial defects using free vascularized fibula or ilizarov bone transport: a comparative study. **Microsurgery**, v 28, p 339–346, 2008

FLAMANS, B.; PAUCHOT, J.; PETITE, H.; BLANCHET N.; ROCHET S.; GARBUIO P.; TROPET Y.; OBERT L.; Use of the induced membrane technique for the treatment of bone defects in the hand or wrist, in emergency. **Chirurgie De La Main**, v. 29, n. 5, p. 307–314, 2010.

FINKEMEIER, C.G. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes **The Journal Of Bone & Joint Surgery**, v. 84-A, s. 3, p.454 – 464, Março, 2002

GIANNOUDIS, P.V.; EINHORN, T.A.; MARSH, D.; Fracture healing: the diamond concept. **Injury**, v. 38, p. S3-S6, 2007.

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

GIANNOUDIS, Peter V. Treatment of bone defects: bone transport or the induced membrane technique?. **Injury**, v. 47, n. 2, p. 291-292, 2016.

GIANNOUDIS P.V.; HARWOOD P.J.; TOSOUNIDIS T.; KANANARIS N.; Restoration of long bone defects treated with the induced membrane technique: protocol and outcomes. **Injury**, v. 47, p. S53-S61, 2016.

GOURON R.; PETIT L.; BOUDOT C.; SIX L.; BRAZIER M.; KAMEL S.; MENTAVERRI R.; Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 11, n. 2, p. 382-389, 2017.

GRUBER H.E.; ODE G.; HOELSCHER G.; INGRAM J.; BETHEA S.; BOSSE M.J.; Osteogenic, stem cell and molecular characterisation of the human induced membrane from extremity bone defects. **Bone & joint research**, v. 5, n. 4, p. 106-115, 2016.

HENRICH D.; SEEBACH C.; NAU C.; BASAN S.; RELJA B.; WHITHELM 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. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 10, n. 10, p. E382-E396, 2016.

HILDEBRAND, F.; PAPE, H. C.; KRETTEK, C. The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction. **Der Unfallchirurg**, v. 108, n. 10, p. 793-4, 796-803, 2005.

ILIZAROV, G. A.; LEDYAEV, V. I. The replacement of long tubular bone defects by lengthening distraction osteotomy of one of the fragments. 1969. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 280, p. 7–10, 1992.

INDREKVAM K.; HUSBY O. S.; GJERDET N. R.; ENGESTER L. B.; LANGE LAND N.; Age-dependent mechanical properties of rat femur: measured in vivo and in vitro. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 62, n. 3, p. 248-252, 1991.

KARGER, C.; KISHI T.; SCHNEIDER L.; FITOUSSI F.; MASQUELET A.C.;. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 98, n. 1, p. 97-102, 2012.

KEATING, J.F.; SIMPSON, A.H.R.W.; ROBINSON, C. M.; The management of fractures with bone loss. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. British Volume, v. 87, n. 2, p. 142–150, 2005.

KÜNSTSCHER G.B.G. The Küntscher method of intramedullary fixation. **JBJS**, v. 40, n. 1, p. 17-26, 1958.

LIU H.; HU G.; SHANG P.; SHN Y.; NIE P.; PENG L.; XU H.; Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research** v. 99, s.8, p. 959-964, 2013.

LUANGPHAKDY V.; ELIZABETH P.; PIUZZI N.S.; D'ALLEYRAND J.C.; CARLSON C.S.; BECHOLD J.E.; FORSBERG J.; MUSCHLER G.F.; The effect of surgical technique and spacer texture on bone regeneration: a caprine study using the masquelet technique. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 475, n. 10, p. 2575-2585, 2017.

MA Y.F.; JIANG N.; ZHANG X.; QIN C.H.; WANG L.; HU YJ.; LIN Q.R.; YU B.; WANG B.W.; Calcium sulfate induced versus PMMA-induced membrane in a critical-sized femoral defect in a rat model. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 637, 2018.

MACKENZIE E.J.; BOSSE M.J.; Factors influencing outcome following limb-threatening lower limb trauma: lessons learned from the Lower Extremity Assessment Project (LEAP). **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 14, n. 10, p. S205-S210, 2006.

MANASSERO M.; VIATEAU V.; MATTHYS R.; DESCHEPPER M.; VALLEUOCO R.; BENSIDHOUM M.; PETITE H.;. A novel murine femoral segmental critical-sized defect model stabilized by plate osteosynthesis for bone tissue engineering purposes. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 19, n. 4, p. 271-280, 2012.

MASQUELET, A. C. Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 388, n. 5, p. 344-346, 2003.

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

MASQUELET A.C. Induced membrane technique: pearls and pitfalls. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, p. S36-S38, 2017.

MALIZOS K.N.; ZALAVRAS C.G.; SOUCACOS P.N.; BERIS A.E.; URBANIK J.R.;Free vascularized fibular grafts for reconstruction of skeletal defects. **JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 12, n. 5, p. 360-369, 2004.

MARAIS L.C.; FERREIRA N.; Bone transport through an induced membrane in the management of tibial bone defects resulting from chronic osteomyelitis. **Strategies in Trauma and Limb Reconstruction**, v. 10, n. 1, p. 27-33, 2015.

MCCLURE P.K.; ALRABAI H.M.; CONWAY J.D. Preoperative Evaluation and Optimization for Reconstruction of Segmental Bone Defects of the Tibia. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, p. S16-S19, 2017.

MCNALLY M.; FERGUSON J.; KUGAN, R.; STUBBS, D.;. Ilizarov treatment protocols in the Management of Infected Nonunion of the tibia. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, p. S47-S54, 2017.

MOLINA C.S., STINNER D.J., OBREMSKEY, W.T., Treatment of Traumatic Segmental Long-Bone Defects. **JBJS**. v 2, s 4, p 1-11, Abril 2014

MONTIJO H.E.; KELLAM J.F.; GETTYS F.K.; STARMAN J.S.; NELSON M.K.; BAYOUMI E.M.; BOSSE M.J.; GRUBER H.E.;. Utilization of the AO LockingRatNail in a novel rat femur critical defect model. **Journal of Investigative Surgery**, v. 25, n. 6, p. 381-386, 2012.

MORELLI I.; DRAGO L.; GEORGE D.A.; GALLAZZI E.; SCARPONI S.; ROMANO C.L.; Masquelet technique: myth or reality? A systematic review and meta-analysis. **Injury**, v. 47, p. S68-S76, 2016.

MYEROFF, C.; ARCHDEACON, M.; Autogenous bone graft: donor sites and techniques. **JBJS**, v. 93, n. 23, p. 2227-2236, 2011.

NAU C.; SEEBACH C.; TRUMMA A.; SCHAIBLEA A.; KONTRADOWITZA K.; MEIERA S.; BUECHNERB H.; MARZIA I.; HENRICHA 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.

NUSBICKEL, F.R.; DELL, P.C.; MCANDREW, M.P.; MOORE, M.M.; Vascularized autografts for reconstruction of skeletal defects following lower extremity trauma. A review. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 243, p. 65-70, 1989.

OBREMSKEY, W.; MOLINA, C.; COLLINGE, C.; TORNETA, P.; SAGI, C.; SCHMIDT, A.; PROBE, R.; AHN, J.; NANA, A. Current practice in the management of open fractures among orthopaedic trauma surgeons. Part A: initial management. A survey of orthopaedic trauma surgeons. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 28, n. 8, p. e198-e202, 2014.

PELISSIER, P.; CASOLI, V.; DEMIRI, E.; MARTIN, D.; BAUDET, J. Soleus-fibula free transfer in lower limb reconstruction. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 2, p. 567-573, 2000.

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. **Journal of orthopaedic research**, v. 22, n. 1, p. 73-79, 2004.

PERREN, S.M.; Evolution of the internal fixation of long bone fractures: the scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 84, n. 8, p. 1093-1110, 2002.

QUINNAN, Stephen M. Segmental Bone Loss Reconstruction Using Ring Fixation. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, p. S42-S46, 2017.

REICHERT, J.C.; SIAMAK S.; DUDA, G.N.; SCHELL, H.; GRIENSVEN, M.; REDL, H.; HUTMACHER, D.W.. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2149-2163, 2009.

ROSSI E.; BERNABEU C.; SMADJA D.M.; Endoglin as an Adhesion Molecule in Mature and Progenitor Endothelial Cells: a function beyond TGF- β . **Frontiers in Medicine**, v. 6, p. 10, 2019.

SATO K.; WATANABE Y./ HARADA N.; ABE S.; MATSUSHITA T.; YAMANAKA K.; KANEKO T.; SAKAI Y.;. Establishment of reproducible, critical-sized, femoral segmental bone defects in rats. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 12, p. 1037-1041, 2014.

SCHEMITSCH, E.H. Size matters: defining critical in bone defect size!. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, p. S20-S22, 2017.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 205, p. 299-308, 1986.

SEN, M. K.; MICLAU, T.; Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?. **Injury**, v. 38, n. 1, p. S75-S80, 2007.

STORM T.R.; COHEN J.; NEWTON, E.D.; Free vascularized bone graft. **The Journal of foot and ankle surgery**, v. 35, n. 5, p. 436-439, 1996.

TANG C. Reconstruction of the bones and joints of the upper extremity by vascularized free fibular graft: report of 46 cases. **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 8, n. 04, p. 285-292, 1992.

TARCHALA M.; . **Deciphering the Masquelet Technique-a Treatment Option for Critical-sized Bone Defects**. 2017. Tese de Doutorado. McGill University Libraries.

TAYLOR G.I.; MILLER, G.D.; HAM, F.J.; The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 55, n. 5, p. 533-544, 1975.

TOSOUNIDIS T.H.; GIANNOUDIS, P.V.; Biological Facet of Segmental Bone Loss Reconstruction. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, p. S27-S31, 2017.

TOOGOOD P.; MICLAU T.;. Critical-Sized Bone Defects: Sequence and Planning. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, n. Suppl 5, p. S23-S26, 2017.

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

WANG X.; WANG Z.; FU J.; HUANG K.; XIE Z.; Induced membrane technique for the treatment of chronic hematogenous tibia osteomyelitis. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 18, n. 1, p. 33, 2017.

WANG X.; LUO F.; HUANG K.; XIE Z.; Induced membrane technique for the treatment of bone defects due to post-traumatic osteomyelitis. **Bone & joint research**, v. 5, n. 3, p. 101-105, 2016.

YEE M.A.; MEAD M.P.; ALFORD A.I.; HAK D.J.; MAUFFREY C.; HAKE M.E.; Scientific Understanding of the Induced Membrane Technique: Current Status and Future Directions. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 31, p. S3-S8, 2017.

ZHAO Z.; YANG D.; MA X.; ZHAO H.; NIE C.; SI Z. Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 219, n. 2, p. 115-120, 2009.

ANEXO A. Licença da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/INTO)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA DO INTO

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Criação de modelo murino para estudo da biomembrana de Masquelet" protocolado sob o número 006/2017, utilizando 24 (vinte e quatro) ratos Sprague Dawley, sob a responsabilidade do pesquisador Breno Jorge Braga Scorza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia e foi aprovado na reunião da Comissão em 24 de janeiro de 2018.

(We certify that the research "Murine model to study the biomembrane of Masquelet", protocol number 006/2017, utilizing 24 (twenty four) Sprague Dawley rats, under the responsibility of the researcher Breno Jorge Braga Scorza, agree with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Ethic Commission on Animal Use of the National Institute of Traumatology and Orthopedics, and was approved at the first meeting of the Commission on January 24, 2018).

Rio de Janeiro, 24 de Janeiro de 2018.

Assinatura: _____

Diego Pinheiro Aguiar

Coordenador da Comissão

