VANESSA COUTO DE MAGALHÃES FERRAZ

Estudo termográfico e histomorfométrico do enxerto pediculado
do músculo peitoral superficial sobre região de excisão parcial do
músculo bíceps braquial em pombos (*Columba livia*)

São Paulo

2013

VANESSA COUTO DE MAGALHÃES FERRAZ

Estudo termográfico e histomorfométrico do enxerto pediculado do músculo peitoral superficial sobre região de excisão parcial do músculo bíceps braquial em pombos
(Columba livia)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Angelo João Stopiglia

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

2785
FMVZ

Ferraz, Vanessa Couto de Magalhães

Estudo termográfico e histomorfométrico do enxerto pediculado do músculo peitoral superficial sobre região de excisão parcial do músculo bíceps braquial em pombos (*Columba livia*) / Vanessa Couto de Magalhães Ferraz. -- 2013.
103 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Angelo João Stopiglia.

1. Aves. 2. Pombos. 3. Enxerto muscular. 4. Histomorfometria. 5. Termografia. I. Título.

*Comissão de Ética para uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo anatômico, termográfico e histomorfométrico da vascularização dos músculos pars metapatagialis e latissimus dorsi pars metapatagialis e músculos bíceps e escápulotriceps. Avaliação da viabilidade do uso dos primeiros como enxerto para revascularização da porção do úmero de aves", protocolado sob o nº1781/2009, utilizando 12 (doze) pombos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/12/2009.

We certify that the Research "Anatomic, thermographic and histomorphometric study of the vascularization of the muscles pars metapatagialis e latissimus dorsi pars metapatagialis and biceps and scapulotriceps. Evaluation of the viability of use of the first muscles as a graft for revascularization of the distal portion of the humerus of birds", protocol number 1781/2009, utilizing 12 (twelve) birds, under the responsibility Prof. Dr. Angelo João Stopiglia, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 12/09/2009.

São Paulo, 10 de dezembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERRAZ, Vanessa Couto de Magalhães

Título: Estudo termográfico e histomorfométrico do enxerto pediculado do músculo peitoral superficial sobre região de excisão parcial do músculo bíceps braquial em pombos (*Columba livia*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais. Eu sempre os amei tanto, mas só agora, que sou mãe,
entendo o quanto me amam.

Ao meu marido, meu mestre, meu melhor amigo. Você me deu paz e tranquilidade, estive do
meu lado, mesmo quando isto foi o mais difícil.

E aos meus filhos: Nicholas e Christopher, vocês me ensinaram que a felicidade é
verdadeiramente infinita e está nas menores coisas.

“The power of imagination makes us infinite”

John Muir

AGRADECIMENTOS

Aos senhores Cláudio Arroyo e Luciano Antas Bugalho, técnicos do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela inestimável ajuda no processamento do material e confecção das lâminas histológicas utilizadas nestes estudo.

Aos enfermeiros Sr. Cledson Lélis dos Santos, Sr. Jesus dos Anjos Vieira, Sr. Otávio Rodrigues dos Santos e Sr. José Miron Oliveira da Silva pela ajuda durante as intervenções cirúrgicas deste experimento, bem como pelos ensinamentos que dividiram comigo durante os anos de estudo.

Ao Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira por me apoiar e acolher os animais durante o período experimental, e por dividir seus valiosos conhecimentos sobre patologia de aves.

Ao Sr. Daniel dos Santos, que me ajudou a cuidar dos animais diariamente durante período experimental.

À Sra. Elza Faquim, bibliotecária da FMVZ-USP, pela ajuda na diagramação da tese.

Aos técnicos do Serviço de Diagnóstico por Imagem, Sr. Hugo Idalgo e Sr. Reginaldo Barbosa pelo auxílio na obtenção das imagens radiográficas dos espécimes durante o experimento, sempre com paciência e boa vontade.

À Dra. Silvana Maria Unruh pela ajuda na obtenção das imagens radiográficas dos espécimes durante o experimento, bem como por todos os ensinamentos e laudos radiográficos de pacientes, que tanto me ajudaram.

À Professora Dra. Eliana R. Matushima pela ajuda na determinação do melhor protocolo a ser seguido na coloração das lâminas histológicas.

À Professora Dra. Silvia R. Gaido Cortopassi, que anestesiou e auxiliou com o protocolo de eutanasia dos animais deste experimento. Professora querida, que esteve ao meu lado não somente cuidando dos meus animais e anestesiando meus pacientes silvetres, mas também como amiga para todas as horas.

Ao Professor Thomas Wronski, BS, PhD, que mais uma vez me acolheu e permitiu o uso de seu laboratório para a análise histomorfométrica dos espécimes deste experimento, enriquecendo de maneira inestimável os resultados aqui obtidos. Também pela amizade, tão importante que dividimos.

Ao colega Dr. Marcos Ishimoto Della Nina, por dividir seus conhecimentos, além da grande ajuda na avaliação termográfica das imagens obtidas durante o experimento, e na

avaliação estatística dos dados. Amigo desde o primeiro ano da graduação, que continua comigo, me ajudando a superar momentos difíceis da pós-graduação, me lembrando que sendo positivo e tendo boa vontade, tudo fica mais fácil.

Ao colega e amigo Dr. Robson Giglio por me auxiliar desde o início com os procedimentos de preparação para a avaliação angiográfica, bem como ajuda na avaliação das imagens radiográficas obtidas durante o experimento. E por tantos bons momentos que vivemos como família, vivendo em outro país.

À colega e grande amiga Dra. Tatiana Casimiro Mariane pela ajuda durante todas as etapas do experimento, participando das intervenções cirúrgicas, avaliações termográficas, tratamentos dos animais e preparação para avaliações radiográficas e histomorfométricas. Sem sua ajuda e apoio este projeto dificilmente teria sido um sucesso! Sua amizade é muito importante para mim!

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Ortopedia e Traumatologia Comparada, Drs.: Kelly Ito, Daniela Izquierdo, Olicies da Cunha, Márcio Poletto, Adriana Figueiredo, Jaqueline França, Renato Cavalcanti, Alexandre Navarro, Isis Dal-Bó. Sua companhia foi inestimável, dividindo comigo seus conhecimentos, me apoiando em minhas ausências, alegrando meus dias, nestes últimos, e tão importantes anos da minha vida acadêmica!

Ao CNPQ pelo auxílio de bolsa.

Ao meu orientador e amigo Prof. Angelo João Stopiglia, que me apoiou e me guiou desde a graduação, sempre lembrando que bom conhecimento anatômico é essencial para se tornar um bom cirurgião. Sempre lembrarei com saudades e alegria do Clube dos Professores!

À minha família; meus pais e irmãos, tão presentes sempre em minha vida, e que dedicaram tanto tempo e carinho à mim e à minha família. Vocês são meu exemplo de vida, e tê-los sempre ao meu lado torna tudo tão mais fácil e divertido!

Cássio, meu amigo, meu mentor, meu amor! Obrigada por tudo o que me ensinou, dentro e fora de nossa profissão, obrigada por sempre acreditar em mim, e por me fazer sempre procurar me aprimorar, e acima de tudo, obrigada por ser parte da parte mais importante da minha vida: minha família!

Nicholas e Christopher, meus filhotes lindos! Quando achamos que já sabemos tudo e que nada pode nos fazer mais feliz, a vida nos dá filhos, e de repente nada mais tem importância! Vocês são a melhor parte de mim, e poder participar de cada conquista de vocês é uma honra! Obrigada por tudo!

RESUMO

FERRAZ, V. C. M. **Estudo termográfico e histomorfométrico do enxerto pediculado do músculo peitoral superficial sobre região de excisão parcial do músculo bíceps braquial em pombos (*Columba livia*)**. [Termographic and histomorphometric study of superficial pectoral muscle pediculated graft over the region of partial excision of the brachial biceps muscle in pigeons]. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Traumas nas asas de aves são muito comuns, causando lesões em tecidos moles e ossos, e tendem, muitas vezes a causar desvascularização da região, o que implica em complicação no tratamento além de facilitar a instalação de processo infeccioso. Com o objetivo de estudar possível vascularização via enxerto muscular pediculado, foram utilizados 12 pombos, divididos em dois grupos iguais (E e S), para a avaliação do uso de enxerto pediculado de músculo peitoral como técnica de revascularização de defeito criado em porção distal de bíceps braquial. As asas contralaterais de todos os animais foram utilizadas para a avaliação termográfica, sendo este grupo de n=12 denominado C. As asas contralaterais de dois animais foram utilizadas como controle anatômico para a avaliação histomorfométrica, grupo este denominado A. Realizaram-se avaliações clínica, termográfica, angiográfica e histomorfométrica para quantificação e qualificação da vascularização, e determinação da viabilidade desta técnica, em até vinte e um dias. A técnica causou pouca morbidade, exceto em dois animais do grupo E que apresentaram necrose parcial do enxerto, porém isto não resultou em falha da técnica. As avaliações termográficas demonstraram que imediatamente após a cirurgia, tanto leito doador, quanto leito receptor apresentaram redução da temperatura, porém esta temperatura aumentou gradativamente, sendo que no grupo E, a temperatura, aos sete dias foi mais baixa, quando comparada ao grupo S e ao grupo A, e aos catorze dias não houve diferença significativa entre os grupos. A avaliação angiográfica *post mortem* determinou patência de vasos principais e secundários em todos os animais, comprovando tratar-se de técnica que causa baixa mortificação do tecido no sítio doador, e na asa. A avaliação histomorfométrica incluiu dados de área total de vasos por amostra, área total de tecido, diâmetro médio dos vasos, número absoluto de vasos, e percentagem de tecido ocupada por vasos. Tal avaliação demonstrou aumento importante da vascularização dos dois grupos avaliados, sendo que o único parâmetro que apresentou diferença entre os dois, foi o número de vasos, aumentado no grupo E. Conclui-se que o enxerto apresenta

neovascularização importante, e provavelmente cria ambiente adequado para promover cicatrização de lesão pobremente vascularizadas em aves.

Palavras chave: Aves. Pombos. Enxerto muscular. Histomorfometria. Termografia.

ABSTRACT

FERRAZ, V. C. M. Termographic and histomorphometric study of superficial pectoral muscle pediculated graft over the region of partial excision of the brachial biceps muscle in pigeons [Estudo termográfico e histomorfométrico do enxerto pediculado do músculo peitoral superficial sobre região de excisão parcial do músculo bíceps braquial em pombos (*Columba livia*).]. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Trauma in avian wings is very common, causing lesions in soft tissue and bones, and they tend to, many times, cause avascularization of the region, which aggravates treatment and allows for the installation of infectious processes. Twelve pigeons, divided in two equal groups (E and S) were used for the evaluation of the use of a pectoral muscle flap as revascularization technique for a distal biceps brachii defect. Contralateral wings of all animals were used for termographic evaluation, and this group with n=12 was called C. Contralateral wings of two animals were used as anatomic control for the histomorphometric evaluation, and this group was called A. Clinical, termographic, angiographic and histomorphometric evaluations were made to quantify and qualify the vascularization, and determine the viability of this technique. The technique caused little morbidity, except for two animals in group E, who had partial necrosis of the grafts, but that didn't result in failure of the technique. Termography showed that after surgery, both, donor and receptor sites had a reduced temperature, but it increased gradually. Group E showed a lower temperature at seven days, when compared to group S and to group C, and at fourteen days, there was no significant difference between groups. Post mortem angiographic evaluation determined patency of main and secondary vessels in all animals, proving to be a low morbidity technique for the donor site and for the wing. Histomorphometric evaluation includes total area of vessels and of soft tissue, mean vessel diameter, total vessel number and percentage of soft tissue covered by vessels. This evaluation showed an important increase of vascularization of both groups, and only total number of vessels was different among groups, being bigger in group E. We conclude that the graft shows important neovascularization, and probably creates adequate environment for the healing of little vascular bird wounds.

Key words: Birds. Pigeons. Muscle grafts. Histomorphometry. Termography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagens angiográficas de membro torácico e hemitórax direito de pombo doméstico (<i>Columba livia</i>).....	25
Figura 2 – Cadáver de ave, demonstrando a técnica cirúrgica empreendida nos animais do experimento.....	49
Figura 3 - Região da incisão da musculatura peitoral superficial de aproximadamente 0,5cm de largura por 3cm de comprimento por 0,1cm de profundidade	49
Figura 4 - Região da excisão de enxerto do músculo peitoral superficial e enxerto deste rebatido sobre a região medial do úmero	50
Figura 5 - Sutura em pontos simples separados do sítio da excisão do enxerto muscular, e enxerto rebatido.....	50
Figura 6 - Detalhe da região de excisão de 1cm do músculo bíceps braquial. Enxerto muscular rebatido.....	51
Figura 7 - Sutura da região doadora do enxerto e pontos de ancoragem do enxerto muscular em tecidos moles adjacentes ao sítio receptor.....	51
Figura 8 - Avaliação termográfica do animal 1, grupo E. Após catorze dias não era possível distinção de temperatura entre sítio cirúrgico e tecidos adjacentes	61
Figura 9 - Avaliação termográfica do animal 1, grupo C, por catorze dias, sem alterações de temperatura.....	61
Figura 10 - Avaliação termográfica do animal 5, grupo S. Após catorze dias não era possível distinção de temperatura entre sítio cirúrgico e tecidos adjacentes	61
Figura 11 - Animal do grupo S, após eutanásia e injeção de contraste.	62
Figura 12 - Animal do grupo E, após eutanásia e injeção de contraste	63
Figura 13 - Imagem radiográfica contrastada de vasos da região peitoral e asa de um exemplar do grupo S, imediatamente após a eutanásia.....	63
Figura 14 - Imagem radiográfica contrastada de vasos de um exemplar do grupo S, imediatamente após a eutanásia	64
Figura 15 - Imagens obtidas no computador durante o procedimento de mensuração histomorfométrica.	65
Figura 16 - Gráfico da média da área ocupada por vasos (em 10 ⁻² centímetros quadrados) no tecido total, para cada grupo (grupo E, grupo S e grupo A) e o desvio padrão observado para cada grupo	66

Figura 17 - Gráfico da média e do desvio padrão da área total (em 10^{-2} centímetros quadrados) ocupada pelo tecido coletado da região distal do úmero, nos grupos E, S e A	66
Figura 18 - Gráfico da média e desvio padrão da média de cada amostra do diâmetro dos vasos (em micrômetros) do tecido coletado da região distal do úmero, nos grupos E, S e A	67
Figura 19 - Gráfico da média e desvio padrão do número total de vasos observados em cada amostra do tecido coletado da região distal do úmero, nos grupos E, S e A.....	67
Figura 20 - Gráfico da porcentagem de tecido ocupado por vasos, das amostras de tecido coletadas da região distal do úmero, nos grupos E, S e A	68

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Hemograma pré operatório dos animais utilizados para o experimento	93
Apêndice B - Dados brutos dos dados: área total dos vasos, área total do tecido, diâmetro médio dos vasos, número total de vasos, percentagem da área de tecido ocupada por vasos; obtidos à partir da avaliação histomorfométrica dos espécimes de cada animal, dividido por grupos com enxerto (E), sem enxerto (S) e controle anatômico (A).....	94
Apêndice C - Temperaturas (em graus Célcus) obtidas através do exame termográfico da região doadora de enxerto (linha 1), da região receptora de enxerto, na asa (linha 2), e de suas regiões correspondentes no lado contralateral. Temperatura mínima e máxima observadas nesta região, bem como a média de todos os pontos nos grupos E, S e C. Pós cirúrgico imediato	95
Apêndice D - Temperaturas (em graus Célcus) obtidas através do exame termográfico da região doadora de enxerto (linha 1), da região receptora de enxerto, na asa (linha 2), e de suas regiões correspondentes no lado contralateral. Temperatura mínima e máxima observadas nesta região, bem como a média de todos os pontos nos grupos E, S e C. Após sete dias da cirurgia	96
Apêndice E - Temperaturas (em graus Célcus) obtidas através do exame termográfico da região doadora de enxerto (linha 1), da região receptora de enxerto, na asa (linha 2), e de suas regiões correspondentes no lado contralateral. Temperatura mínima e máxima observadas nesta região, bem como a média de todos os pontos nos grupos E, S e C. Após catorze dias da cirurgia.....	97
Apêndice F - Diferenças de temperatura entre as linhas 1 e 2 do lado contralateral (grupo C) e do lado operado, nos grupos E e S Pós cirúrgico imediato	98
Apêndice G - Diferenças entre as linhas 1 e 2 do lado contralateral (grupo C) e do lado operado, nos grupos E e S. Aos sete dias.....	99
Apêndice H - Diferenças entre as linhas 1 e 2 do lado contralateral (grupo C) e do lado operado, para os grupos E e S. Aos catorze dias.....	100
Apêndice I - Imagem microscópica de amostra do grupo E, demonstrando áreas de fibras musculares degeneradas (M), áreas de tecido muscular degenerado permeada por colágeno (MC) e vasos sanguíneos (setas). Aumento 4x	101

Apêndice J - Imagem microscópica de amostra do grupo E, demonstrando áreas de fibras musculares degeneradas (M), áreas de tecido conjuntivo (C) e vasos (setas). Aumento 10x.....	101
Apêndice K - Imagem microscópica de amostra do grupo A, demonstrando fibras musculares íntegras. Aumento 10x	102
Apêndice L - Imagem microscópica de amostra do grupo E, demonstrando tecido muscular degenerado permeado por tecido conjuntivo (MC), com presença de inúmeros vasos sanguíneos (setas). Aumento 4x	102
Apêndice M - Imagem microscópica de amostra do grupo S, demonstrando fibras musculares íntegras (M), tecido conjuntivo (C). Aumento 10x.....	103
Apêndice N - Imagem microscópica de amostra do grupo S, com áreas de tecido muscular íntegro (M) e áreas de colágeno (C). Aumento 10x	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
3 LIMITAÇÕES	20
4 SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA	21
5 HIPÓTESES	22
6 REVISÃO DE LITERATURA	23
6.1 ANATOMIA VASCULAR DO MEMBRO TORÁCICO DAS AVES	23
6.2 ANATOMIA NERVOSA DO MEMBRO TORÁCICO DE POMBOS	23
6.3 OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA LESÕES	26
6.4 RETALHOS DE PELE	26
6.5 ENXERTIA MUSCULAR	27
6.5.1 Enxertos musculares livres	29
6.5.2 Enxertos miocutâneos	31
6.6 ENXERTIA MUSCULAR EM AVES	32
6.7 COMPLICAÇÕES RELACIONADAS À ENXERTIA	34
6.8 ESTADO DA ARTE DA ENXERTIA EM MEDICINA VETERINÁRIA	35
6.9 AVALIAÇÃO DO USO DO ENXERTO MUSCULAR	37
6.9.1 Estudo anatômico da vascularização	37
6.9.2 Estudo radiográfico contrastado da vascularização	38
6.9.3 Estudo histológico	40
6.9.4 Termografia	40
6.9.5 Histomorfometria	43
7 MATERIAL E MÉTODOS	45
7.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
7.2 LOCAIS DO EXPERIMENTO	45
7.3 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DO USO DO ENXERTO MUSCULAR	46
7.3.1 Técnica anestésica	46
7.3.2 Preparação cirúrgica	47
7.3.3 Técnica cirúrgica dos grupos: experimental e controle	47
7.3.4 Cuidados pós operatórios	51
7.4 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA: AQUISIÇÃO DE IMAGEM INFRAVERMELHA	52
7.5 EUTANÁSIA	53
7.6 PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES	53

7.7 ESTUDO RADIOGRÁFICO	54
7.8 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA	54
7.8.1 Preparação das lâminas	54
7.8.2 Procedimentos de histomensuração.....	57
7.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
8 RESULTADOS	59
8.1 TÉCNICA ANESTÉSICA	59
8.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA E COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS.....	59
8.3 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA.....	60
8.4 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	62
8.5 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA	64
8.6 ESTATÍSTICA.....	68
9 DISCUSSÃO	70
10 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICES	92

1 INTRODUÇÃO

As asas são a parte mais importante do aparato de vôo das aves, e sua cinemática complexa e perfeito controle aerodinâmico fazem o vôo possível. Qualquer condição que afete uma parte específica da asa pode levar a consequências biomecânicas e aerodinâmicas graves durante o vôo (BEAUFREIRE, 2009).

Feridas cutâneas em aves podem ser causadas por traumas, constrição por anilha, queimaduras, necrose distal avascular, auto-mutilação, queimadura por frio (BAILEY, 2000), gangrena seca e edema, e úlceras (SAMOUR, 2000). Lesões nas extremidades das asas comumente observadas, são também associadas a traumas, normalmente divididas em luxações ou fraturas, feridas ou úlceras, bursite, e edemas e síndrome da gangrena seca. (SAMOUR, 2000)

Aves de rapina apresentam diversas lesões de tratamento complicado, causadas por eletrocussão, cortes e abrasões associados a traumas, lesões por armas de fogo, por arame-farpado, por armadilhas, lesões perfurantes, queimaduras térmicas ou químicas, lesões por frio, alterações de integumento secundárias a fatores nutricionais, e lesões devido a cuidados e habitat inadequados. A natureza fina e delicada da pele das aves torna o tratamento de lesões muito complicado. O mecanismo de cura das lesões é muito semelhante ao dos mamíferos, com fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento (BURKE et al., 2002).

Lesões e úlceras são normalmente observadas em animais de cativeiro que se chocam contra paredes ou grades, e por isto lesões nas pontas das asas são normalmente craniais. Lesões repetitivas do mesmo local tendem a ulcerar, fibrosar e em casos extremos levam à anquilose da articulação acometida (SAMOUR, 2000).

O edema e a gangrena seca são normalmente caracterizados por edema, transudato próximos à base, próximos às rêmiges primárias e sinais de necrose avascular. Não se sabe ao certo sua origem, porém temperaturas baixas provavelmente estão associadas à afecção, pois esta é normalmente observada em locais de clima frio. Além disto, também são mais comumente observados em animais mantidos em pequenas gaiolas, do que em animais que são mantidos em recintos maiores em que podem voar livremente (SAMOUR, 2000).

Imediatamente após a lesão, ocorre vasoconstrição inicial e formação de coágulo para conter a hemorragia nos vasos danificados. Após 30 minutos do trauma primário, os vasos locais se dilatam e heterófilos, células mononucleares, basófilos e alguns linfócitos se agregam nos vasos. Os leucócitos saem dos vasos, para os tecidos lesados, por diapedese, em

aproximadamente 1,5 horas após a lesão, atingindo pico máximo em 12 horas. A fase inflamatória aguda é marcada por células mononucleares e heterófilos em números semelhantes e poucos trombócitos e menos basófilos do que havia nas primeiras três horas após a lesão. Linfócitos infiltram o espaço perivascular entre seis a doze horas após a lesão e predominam até 36 horas. As células mononucleares são as mais ativas na fagocitose, e levam aos sinais de edema, hipertermia e vermelhidão (BURKE et al., 2002).

As feridas cicatrizam de duas maneiras, por primeira intenção ou por granulação (BAILEY, 2000).

A cicatrização por primeira intenção ocorre em feridas com bordos não muito separados, e contidos por coágulos. Os vasos desenvolvem-se dentro dos coágulos e promovem a cicatrização através da produção de tecido conjuntivo em que os bordos estão próximos, o que somente ocorre com sutura ou bandagem (BAILEY, 2000).

A cicatrização por granulação ocorre quando os bordos da lesão estão muito separados, e é processo mais lento. O tecido de granulação é vermelho brilhante, úmido e é formado por grupos de células no tecido exposto da ferida. O tecido de granulação preenche o espaço entre os bordos da ferida e quando está no nível da pele, novas células epiteliais se distribuem sobre este, para completar o processo de cicatrização. O tecido de granulação geralmente ocorre em feridas por laceração, avulsão e feridas infectadas, e o processo de reparação pode levar muitas semanas para findar (BAILEY, 2000; PUERTO, 2005).

O suprimento sanguíneo dos ossos das aves origina-se no perióstio (vindo da musculatura e tecidos moles), canal medular e vasos metafisários e epifisários (MARTIN; RITCHIE, 1994).

A enxertia muscular foi estudada em diversas espécies, inclusive em humanos para determinar a aplicabilidade de seu uso em lesões traumáticas, como meio de melhorar a vascularização local funcionando como leito para a epitelização destas áreas (ANTHONY et al., 1991; MUSHARAFIEH et al., 1999), melhorando o aporte de antibióticos além de componentes do sistema imune (GOSAIN et al., 1990), aumentando a força de união óssea em modelos de fraturas pobremente vascularizadas (RICHARDS et al., 1991), dentre outras vantagens. Degner e Walshaw (1997) acreditam que “flaps” miocutâneos, cutâneos ou musculares livres são geralmente bem sucedidos em casos clínicos, não devendo ser utilizados apenas como último recurso quando outras técnicas falharam.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram os de avaliar a vascularização presente no enxerto muscular pediculado do músculo peitoral superficial, rebatido sobre defeito criado em região distal de músculo bíceps braquial, com o intuito de determinar se o uso de enxerto muscular, com o fim de criar ambiente adequado para cicatrização de lesões traumáticas em aves, é viável.

Da avaliação clínica, objetivou-se determinar se a técnica que causa mortificação tecidual e dor que impeçam a sua utilização.

Da termografia foi determinar, ao longo dos catorze dias após a cirurgia, se há diminuição da temperatura local, compatível com desvascularização e necrose do enxerto.

De realizar angiografia foi a avaliação qualitativa de vasos principais e secundários para determinar se a técnica não lesava tais estruturas.

Da histomorfometria foi determinar se ocorre neovascularização do enxerto.

3 LIMITAÇÕES

O experimento tem como limitações;

- As lesões terem sido induzidas cirurgicamente, em ambiente estéril, e imediatamente corrigidas, não sendo provocadas por traumatismos externos, como é o comumente observado;

- o número estudado de animais ter sido baixo, seis animais do grupo experimental e seis do grupo controle. Nesta situação, variação individual pode levar a alteração dos resultados;

- a técnica termográfica não ser padronizada para membros torácicos de aves;

- não ter sido possível avaliação quantitativa dos exames angiográficos.

4 SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA

O uso de enxertos musculares já é procedimento comumente utilizado na Medicina Humana e na Medicina Veterinária, em cães e gatos, para criar ambiente adequado para reparo de lesões de tecidos moles, facilitando a vascularização e epitelização de lesões complicadas por seu tempo, abrangência, processo infeccioso ou outras complicações.

São frequentes as lesões traumáticas em aves, de cicatrização complicada ou em que muitas vezes não se obtém êxito, culminando até na amputação de membros. O enxerto de pele direto já foi utilizado em algumas circunstâncias, porém a fragilidade vascular deste tecido, muitas vezes torna o processo inviável.

Preparar o leito com enxerto muscular, visando principalmente melhor vascularização para fechamento da pele é técnica inédita neste grupo animal, que possivelmente levará a melhores resultados de tratamentos de lesões de tecidos moles bem como ortopédicas nas aves.

5 HIPÓTESES

As hipóteses deste estudo são que o enxerto muscular irá sobreviver, e que este apresentará vascularização adequada.

6 REVISÃO DE LITERATURA

6.1 ANATOMIA VASCULAR DO MEMBRO TORÁCICO DAS AVES

A formação do tronco braquicefálico comum do pombo ocorre à partir da aorta, e origina os troncos braquiocefálicos direito e esquerdo, que se divide nas artérias subclávia e carótida comum. À partir da artéria subclávia ocorre a emissão dos vasos principais, ambos com 1,5cm: tronco peitoral e da artéria axilar, que não é continuação da artéria subclávia como ocorre em mamíferos, mas um ramo desta. O tronco peitoral arterial se bifurca em artéria peitoral cranial com 3,3cm e artéria peitoral caudal de 2,5cm. À partir da artéria peitoral caudal surge o ramo da artéria cutânea lateral do tronco, de aproximadamente 3cm. Após emissão do primeiro ramo, a artéria coracóide, de 0,8cm e do segundo ramo, a artéria subscapular, de 1,7cm, a artéria axilar passa a se chamar artéria braquial, medindo aproximadamente 2,5cm, sendo uma das principais responsáveis pela irrigação do membro devido à sua localização e ao volume muscular significativo encontrado naquela região. Como principal ramo da artéria braquial profunda, encontra-se a artéria braquial profunda, que possui o mesmo comprimento da artéria da qual se origina. Dois ramos são emitidos a partir da artéria braquial, sendo eles as artérias colaterais ulnar e radial, ambas de 1,2cm de comprimento (FRANCESCHI et al., 2009). (Em ensaio em um pombo, pode-se compreender a descrição de Franceschi et al., 2009, conforme figura 1 A e B).

6.2 ANATOMIA NERVOSA DO MEMBRO TORÁCICO DE POMBOS

O plexo braquial tem origem na intumescência cervical da medula espinhal, que dá origem a dois cordões nervosos, um cordão nervoso ventral, responsável pela inervação dos músculos flexores do membro torácico, de onde surgem os nervos tronco peitoral e medianoulnar, que por sua vez dá origem aos ramos ulnar e mediano, e um cordão nervoso dorsal, responsável pela inervação dos músculos extensores do membro torácico, de onde surgem os nervos axilar e radial. Os nervos que se originam a partir do cordão nervoso dorsal não possuem artérias com trajeto satélites a eles, pois as estruturas vasculares do membro torácico das aves estão

localizadas ventralmente, o que provavelmente ocorre como maneira de proteger os vasos contra eventuais lesões, que poderiam levar a hemorragia fatal (FRANCESCHI et al., 2009).

Os ramos do cordão ventral estão localizados entre a musculatura flexora e, por vezes possuem trajeto satélite às artérias e veias responsáveis pela vascularização do membro torácico do pombo, e devido a isto, estas estruturas geralmente são homônimas (FRANCESCHI et al., 2009).

O nervo medianoulnar encontra-se posicionado cranialmente em relação à artéria e veia braquial em trajeto satélite a estas, onde está localizado no sulco entre os músculos bíceps e escapulotríceps (FRANCESCHI et al., 2009).

O nervo peitoral deixa a cavidade toracoabdominal através de espaço limitado entre a primeira e segunda costelas e os ossos coracóide e subcoracóideo, e penetra na parte dorsal ao músculo peitoral, na junção dos terços cranial e médio. Ao penetrar no músculo, o tronco divide-se em nervo peitoral cranial e nervo peitoral caudal, no mesmo ponto onde ocorre a bifurcação do tronco arterial, sendo responsável pela inervação desta região. A anatomia deste tronco nervoso difere da observada em galinhas (FRANCESCHI et al., 2009).

O nervo axilar segue trajeto dorsalmente posicionado através de pequeno espaço entre articulação do umero, músculo grande dosal e partes escapular e umeral do músculo tríceps braquial, onde ocorre a bifurcação do nervo em ramos proximal e distal, sendo este conhecido como nervo cutâneo axilar, que inerva músculos, articulações e pele da região dorsal do úmero (FRANCESCHI et al., 2009).

O nervo radial é o mais importante dos componentes do plexo braquial, pois seus ramos estão diretamente envolvidos no ato de voar, ligados ao processo de rotação, elevação e depressão das penas principais e secundárias de vôo e contorno, além de possuir pequenas terminações proprioceptivas e terminações sensitivas gerais. Ele segue trajeto delimitando-se com a superfície ventral do músculo escápulo-umeral caudal, onde emite diversos ramos direcionados cranialmente, penetrando na face extensora braquial imediatamente distal à borda caudal da inserção do músculo grande dorsal, entre o músculo umerotríceps e o músculo escapulotríceps, realizando espiral dorso-lateralmente ao redor da superfície caudal do úmero. Ao deixar a cobertura do músculo escapulotríceps, o nervo situa-se subcutânea e diretamente localizado no bordo dorsal do terço distal do úmero, emitindo nervo dorsal do pró-patágio que se ramifica extensivamente, sob a pele dorsal do pró-patágio e o nervo cutâneo dorsal antebraquial. O nervo radial continua seu percurso em espiral ao redor do úmero penetrando no olécrano, cranialmente à extremidade distal do músculo bíceps braquial. Um importante ponto a ser notado acerca do nervo radial é um ramo emitido por ele, próximo

à região braquial e ao longo de sua borda caudal, que é responsável pela inervação do músculo grande dorsal, que em pombos e outras aves domésticas e selvagens apresenta apenas a cabeça cranial, diferentemente de galinhas. A importância deste ramo encontra-se na atividade realizada pelo músculo por ele innervado: tracionar caudalmente o membro torácico, flexionando e elevando o úmero e sua articulação, além de comandar movimentos realizados durante o vôo pelos músculos do membro que atuam nesta ação, os músculos peitorais e supracoracóideos (FRANCESCHI et al., 2009).

Figura 1 - Imagens angiográficas de membro torácico e hemitórax direito de pombo doméstico (*Columba livia*)

Fonte: Ferraz (2012)

Legenda: A: vista ventro dorsal. B: vista cranio-caudal. Demonstração das principais artérias segundo Franceschi e colaboradores (2009). Tronco peitoral (TP), e suas ramificações peitoral cranial (P) e caudal (p) e desta última a cutânea lateral do tronco (C); Axilar (A), e suas ramificações: coracóide (co) e subscapular (s). A axilar continua-se como braquial (B), que divide-se em radial (R) e ulnar (U)

6.3 OPÇÕES DE TRATAMENTO PARA LESÕES

Para o tratamento de lesões de pele nas aves é importante ter conhecimentos adequados dos mecanismos de cura de lesões, familiaridade com o uso e aplicação de técnicas terapêuticas atuais. (BURKE et al., 2002).

O tratamento de lesões e úlceras inclui o debridamento do tecido fibroso e suturas. Compressa e bandagem são essenciais para o tratamento de lesões, além de proteger a asa de novas lesões. É importante lembrar-se de ancorar a bandagem às penas, pois muitas vezes esta tende a escorregar, e deve-se proteger as paredes da gaiola ou ambiente onde o animal será mantido (SAMOUR, 2000).

Deve-se buscar a recuperação de vascularização adequada além de antibioticoterapia e uso de anti-inflamatórios esteroidais, no tratamento de edema e gangrena seca, porém o prognóstico é reservado, e muitas vezes faz-se necessária a amputação da ponta da asa (SAMOUR, 2000).

Durante a fase de muda de penas ocorre aumento da vascularização de folículos e papilas das penas, na derme de aves (STETTENHEIM, 2000).

6.4 RETALHOS DE PELE

Retalhos de padrão axial de pele são úteis na reconstrução de alguns defeitos cutâneos em cães e gatos, porém são limitados pela dependência da preservação de um pedículo vascular intacto, o que impede seu uso em lesões distais de membro e face. (CALFEE et al., 2004).

O uso de “flap” de músculo livre microvascular tem como vantagens possibilitar o uso de enxerto de pele livre, o que facilita o crescimento de pêlos na direção correta, bem como escolha de sítio doador que cause menos morbidade (CALFEE et al., 2004).

Em caso de lesão traumática da face extensora do joelho em um cão, White (1999) fez a utilização de enxerto da pele da parede caudolateral abdominal direita, e para prevenir tensão do sítio do enxerto, ele fixou a articulação tibio-társica deste membro, em posição flexionada, com flexão automática da articulação do joelho, devido às propriedades de reciprocção destas articulações. Ele não observou alterações articulares que poderiam ser acarretadas devido à imobilização por longo período de tempo, no caso, seis semanas (WHITE, 1999).

A superfície transposta do músculo pode oferecer recipiente suficientemente vascularizado para enxertia de pele imediata, mas em situações em que a superfície se encontra irregular, pode ser necessário aguardar granulação do tecido antes da enxertia de pele (CHAMBERS et al., 1998).

6.5 ENXERTIA MUSCULAR

Os retalhos cutâneos, miocutâneos ou musculares livres são geralmente bem sucedidos em casos clínicos, não devendo ser utilizados como último recurso após técnicas tradicionais de reparação de lesões terem falhado (DEGNER; WALSHAW, 1997)

A sobrevivência de enxertos livres de pele é diretamente proporcional à neovascularização provida pelo leito da lesão, o que requer região bem vascularizada, como tecido de granulação saudável ou musculatura. Lesões localizadas sobre ossos, ligamentos e tendões são pouco vascularizadas. Para ocorrer neovascularização não pode haver movimento entre o leito da lesão e o enxerto, além de não poder haver infecção, hematoma ou seroma após a enxertia. (DEGNER; WALSHAW, 1997)

O músculo tem um suprimento sanguíneo inerente muito rico, que aumenta a tensão de oxigênio local no tecido além de facilitar a chegada de antibióticos e componentes do sistema imune em lesões desvascularizadas (GOSAIN et al., 1990). A transferência de músculo livre microvascularizado é comumente utilizada para o tratamento de osteomielite em humanos (ANTHONY; MATHES; ALPERT, 1991; MUSHARAFIEH et al., 1999), promove cicatrização de lesões ortopédicas através da melhoria do suprimento sanguíneo (FISHER; WOOD, 1987; RICHARDS et al., 1989) e aumenta a força de união óssea em fases precoces, em modelos de fraturas pobremente vascularizadas (RICHARDS, et al., 1991). Além disto, a transferência de músculo provê barreira física para tecidos recipientes comprometidos e pode servir como leito para enxertia aguda de pele (ANTHONY; MATHES; ALPERT, 1991; MUSHARAFIEH, et al., 1999).

O retalho músculo-cutâneo tem as vantagens de melhor distribuição de oxigênio para tecidos isquêmicos, melhor vascularização em ossos descobertos e maior resistência à infecção, quando comparados aos enxertos de pele simples, além de prover forma e contorno, quando há grande defeito de tecidos moles. Feridas abertas cicatrizam por granulação, contração e epiteliação, e a cicatrização muitas vezes restringe a mobilidade do membro

locomotor. Os pedículos cutâneos aumentam a vascularização local, porém somente podem ser usados em leitos de lesões saudáveis e sem exposição óssea. Os pedículos microvasculares livres podem ser utilizados em feridas contaminadas, em feridas distantes, reconstrução precoce de feridas pobremente vascularizadas, porém requerem treinamento especial em microcirurgia, sendo que os instrumentos e conhecimento normalmente não estão disponíveis na medicina veterinária. (SMITH et al., 1991; PUERTO, 2005).

Os enxertos musculares a princípio aparentam ser grandes e grosseiros, porém devido à atrofia pela denervação, eles tendem a diminuir em 1% ao dia, durante os primeiros dois meses, levando o enxerto a se incorporar melhor anatomicamente. (MATHES; ALPERT; CHANG, 1982¹ apud DEGNER; WALSHAW, 1997; CHAMBERS et al., 1998).

Para o estudo do processo de epitelização de enxertos miofasciais, Wada et al. (2001), em estudo experimental, utilizaram enxerto do músculo *latísimus dorsi* em defeitos da cavidade oral de ratos Wistar.

Em lesões orais de ratos, observa-se em um dia a presença de material semelhante à fibrina, amarelado, o que é histologicamente compatível com tecido grosseiro de superfície irregular composto por células sanguíneas e inflamatórias, em três dias a separação de tecido necrótico do tecido são e aos cinco dias, diminuição da superfície. Histologicamente ocorre tecido de granulação com abundância de novos vasos, porém com diminuição do espaço do defeito original, provavelmente devido ao encolhimento do tecido adjacente e contração do tecido de granulação. Observa-se neste período, início da epitelização à partir da margem incisada da mucosa recipiente. Após duas semanas a epitelização está quase completa e às três semanas, o epitélio regenerado consiste de células escamosas estratificadas com ortoqueratose, mas é fino comparado à mucosa normal. Uma característica é a redução do espaço do defeito de tecido mole quando da formação de tecido de granulação (WADA et al., 2001).

Em lesões orais com o uso de enxerto miofascial, em um dia observa-se histologicamente o enxerto coberto de camada fina de produtos inflamatórios. Aos três dias células inflamatórias estão infiltradas na camada fascial e tecido de granulação cresceu à partir da porção profunda. Aos cinco dias o enxerto está recoberto de material semelhante à fibrina, com aumento do tecido de granulação. O espaço do defeito é matado pelo tecido miofascial granulado e a epitelização somente se inicia aos sete dias. A epitelização continua progredindo às duas semanas e demora mais de três semanas para se completar. O epitélio

¹ Mathes S. J., Alpert B.S., Chang N. Use of the muscle flap in chronic osteomyelitis: experimental and clinical correlation. **Plastic Reconstructive Surgery**. v. 69, n. 5, p. 815–829, 1982

regenerado é bastante fino. A cicatrização da lesão com o uso de enxerto miofascial é marcada pela epitelização que ocorre sem contratura cicatricial, apesar do atraso na cicatrização (WADA et al., 2001).

Ocorrem três fases principais que se sobrepõe durante o processo de cicatrização de lesões: inflamatória, proliferativa e maturação. A fase inflamatória é caracterizada por hemorragia ou exsudação plasmática no sítio da lesão, quando coágulo de fibrina é formado como resultado da produção de tecido conjuntivo imaturo e altamente vascularizado. Este tecido é tipificado pelo acúmulo de células proliferativas endoteliais, miofibroblastos, macrófagos e linfócitos. A angiogênese é evento proeminente na formação do tecido de granulação. A fase de maturação é caracterizada por restituição do tecido anterior, até certo nível, com vários níveis de reposição deste tecido por tecido fibroso conjuntivo (WADA et al., 2001).

Em grandes lesões, com grande perda de tecido superficial, a reposição regenerativa da mucosa epitelial geralmente leva à contração da lesão pela formação do tecido de granulação e isto pode causar disfunção local, no caso da mucosa oral, por exemplo, pode levar à alterações da vocalização, dificuldade em abrir a boca e disfagia (WADA, et al., 2001).

Os enxertos miofasciais epitelizam rapidamente, restaurando a mucosa normal na cavidade oral (WADA, et al., 2001).

A regeneração do epitélio se inicia à partir das margens do epitélio mucoso recipiente, indo em direção à porção central na miofáscia granulada no nível imediatamente inferior à camada de tecido rugoso. O tecido tende a ser inicialmente fino. A miofáscia provavelmente não tem nenhum potencial de epitelização, pois não são encontrados pontos multifocais de epitelização no mesmo. O enxerto de miofáscia preenche o espaço da lesão, prevenindo encolhimento e contratura cicatricial da lesão, porém a miofáscia granulada pode induzir a regeneração do epitélio, mas na ausência de enxerto, a epitelização pode se iniciar rapidamente e se completar precocemente, devido à granulação do tecido na lesão e encolhimento da lesão, portanto os enxertos devem ser usados em lesões com grande perda de tecido, em que a contratura e granulação não sejam capazes de fechar o defeito (WADA et al., 2001).

6.5.1 Enxertos musculares livres

A transferência de tecido livre microvascularizado é baseado no conceito de angiossomos, que são regiões definidas de tecido perfundido por uma única artéria e veia nutrícia. A transferência de tecido livre microvascularizado pode ser feita com pele, ossos, omento, músculo, coxins e combinações destes e permite o movimento de tecidos para lesões distantes (CALFEE et al., 2004).

Músculos utilizados para transferência livre microvascular devem ter função dispensável, serem facilmente acessíveis, ter pedículo vascular confiável e produzir morbidade mínima no sítio doador após sua remoção. Além disto, devem ter um comprimento mínimo de pedículo vascular de 10mm e diâmetro de vasos de no mínimo 0,5mm (CALFEE et al., 2004).

Foi realizada avaliação clínica do uso do músculo reto abdominal como enxerto de músculo livre microvascular para ser implantado no membro distal de cães, num defeito criado à partir da região média do fêmur até a região proximal da articulação tarsocrural, envolvendo 50% da circunferência do membro. Ácido acetilsalicílico foi administrado. O músculo foi transposto, os pedículos das artéria e veia safena e caudoepigástrica foram ligados, em anastomose ponta-ponta e enxerto de pele em tela foi realizado. Após eutanásia foram realizados angiogramas para determinar a patência das anastomoses arterial e venosa e perfusão muscular. Três dos sete enxertos apresentavam áreas de necrose superficial de aproximadamente 1cm de diâmetro e os enxertos aparentavam estar ainda edemaciados. A maioria das fenestrações havia se fechado e era possível visualizar tecido de granulação através das janelas que não havia se fechado. Às quatro semanas, os enxertos de pele não apresentavam discoloração e já era possível notar crescimento de pêlos. O estudo foi concluído entre quatro e meia e seis semanas, quando os enxertos tinham aparência igual à pele à sua volta, e quantidade moderada de pêlos ocorria em todas elas. Complicações observadas incluíram necrose de pequenas áreas do enxerto, auto-traumatismo do enxerto de pele e presença de hematomas e seroma na região doadora, todas sem maiores consequências para a implantação do enxerto. Histologicamente observaram núcleos aumentados e arredondados periferalmente e ocasionalmente na região central de fibras musculares individuais, além de fibras de menor diâmetro com maior separação entre elas, que são alterações compatíveis com atrofia muscular neurogênica (CALFEE et al., 2004).

O uso do músculo grande dorsal como enxerto livre de músculo foi avaliado experimentalmente em gatos, por meio de angiografia da artéria subescapular em cadáveres, e clinicamente em animais, através do transplante vascularizado deste músculo. Sua viabilidade foi considerada entre 66 e 100%, e todos os casos de falência do “flap” foram causados por trombozes arterial e venosa. O músculo grande dorsal é adequado para uso como enxerto

livre, preenchendo os critérios para reconstrução microvascular, sendo o padrão vascular apropriado e consistente e de fácil acessibilidade, e demonstra patência e viabilidade a longo prazo (NICOLL et al., 1996).

Em enxertos livres de músculos, a perfusão tanto com sangue autólogo heparinizado quanto com sangue autólogo com citrato diminuem os efeitos deletérios da isquemia prolongada (FOWLER et al., 1999).

6.5.2 Enxertos miocutâneos

O uso de rotação de músculos baseado em pedículos vasculares consistentes se tornou técnica estabelecida para a reconstrução de lesões traumáticas em animais domésticos de pequeno porte. Uma de suas principais vantagens é que este não requer as complexas microanastomoses necessárias nos enxertos livres vascularizados. Algumas lesões traumáticas envolvem avulsão da pele, fáscia, ligamentos, cápsula articular e ossos, com lesão vascular associada. A área envolvida geralmente fica altamente instável, contaminada e isquêmica. Os tecidos não se regeneram e os tecidos em volta geralmente são insuficientes para fechamento local. Quanto mais tempo a lesão permanece aberta, maior a probabilidade de infecção, mesmo com os melhores cuidados. A cicatrização por formação de tecido de granulação e reepitelização é um processo prolongado, e muitas vezes a articulação adjacente pode precisar de estabilização cirúrgica. O recobrimento precoce da lesão com músculo vascularizado pode prevenir muitos destes problemas (CHAMBERS et al., 1998).

Existem diversos fatores que devem ser considerados na seleção de um músculo para que este seja utilizado como enxerto miocutâneo. O tamanho do músculo deve ser suficiente para encobrir o defeito da lesão, após sua rotação, o local de doação deve ser próximo da lesão, a vascularização do pedículo deve ser suficiente para suprir o músculo a ser transportado, e este deve ser acessível para dissecação. É adequado optar por um músculo que possua outro grupo muscular de função sinérgica a este, para minimizar as perdas causadas por sua ausência do sítio doador. Há também técnicas de preservação de função, como a transposição de apenas parte do músculo (PUERTO, 2005). É importante que o músculo usado para o enxerto preencha alguns requisitos importantes como “flap” de transposição; ele deve ser de tamanho adequado para recobrir o defeito, ser relativamente superficial e facilmente acessível e ser

funcionalmente desprezível devido a músculos de função sinérgica (CHAMBERS et al., 1998).

A cor e sangramento da porção incisada podem ser inspecionados durante a intervenção cirúrgica para monitorar sua viabilidade e adequada perfusão durante e após a rotação. O músculo é rotacionado sobre a lesão e fixado com pontos simples separados (CHAMBERS et al., 1998).

Em alguns casos, músculos locais podem ser utilizados para recobrir defeitos, como no caso descrito por Gradner et al. (2007), em que após a excisão de um tumor ósseo da 13ª costela de um gato (osteocondromatose), com remoção das três costelas caudais, usou-se, além do omento para fechar internamente o defeito, o restante do latísimus dorsi cranialmente, após a separação de sua origem na fáscia toracolombar e rotacionado caudoventralmente fechando parcialmente o defeito. Caudalmente o músculo externo oblíquo abdominal lombar foi dissecado, separado dorsalmente ao longo da fáscia toracolombar e ventralmente na direção de suas fibras, com cuidado para não lesar ramos da artérias abdominal cranial, e este músculo foi transposto cranialmente, completando assim o fechamento da parede torácica caudal.

Nos dois casos clínicos descritos por Chambers e colaboradores (1998), as lesões eram graves, uma causada por arma de fogo e a outra causada por abrasão devido a acidente automobilístico. Optaram por tratar a ferida aberta, após fixação provisória da articulação, por cinco dias com lavagens, debridamentos diários e bandagens. Ao sexto dia foi realizado procedimento cirúrgico para a rotação do “flap” do músculo flexor carpo ulnar, que preencheu a lesão. O músculo permaneceu viável e tecido de granulação recobriu quase toda sua área exceto por uma área tendinosa, em uma semana. O tendão foi debridado, e então toda a lesão foi recoberta por tecido de granulação, e duas semanas após a intervenção inicial, enxerto de pele livre foi feito no local. Dentro de 6 semanas da intervenção inicial de ambos os casos, a pele estava completamente incorporada e a lesão havia cicatrizado.

O uso de “flap” rotacionado do músculo sartorio também demonstrou ser útil como processo de salvamento de enxertos vasculares anteriormente usados no tratamento de lesões femorais complicadas (LANDRY et al., 2009).

6.6 ENXERTIA MUSCULAR EM AVES

No estudo de Walro et al. (1982) os músculos *serratus superficialis metapatagialis* (SSM) e *biventer cervicis* posterior (BVC) de pombos adultos foram transplantados de maneira livre para o local do músculo *latissimus dorsi* anterior de fibras de contração lenta. Os enxertos foram preparados para avaliação histoquímica com intervalos de poucos dias a até 23 meses. Observaram que poucas fibras musculares originais sobreviveram ao trauma da enxertia. Enxertos de um a quatro meses do SSM regeneraram padrão segregado de fibras lentas e rápidas, semelhantes ao controle desse mesmo músculo, enquanto o BVC regenerou um arranjo em mosaico característico de músculos BVC. A porcentagem de fibras lentas em até 4 meses não diferiu significativamente dos controles, o que indica que o músculo doador influencia o padrão dos tipos de fibra que são originalmente manifestados, e este padrão é mantido relativamente intacto por 4 meses, mas eventualmente o nervo do sítio receptor modifica este padrão e as fibras do enxerto assumem características histoquímicas do músculo original removido do sítio receptor. Além disso, o tempo necessário para estabilização histoquímica de fibras musculares de enxertos autólogos de aves é mais longo do que em ratos ou mesmo para preparações de músculos picados de aves, mas é compatível com músculo de aves tenotomizado. Após tenotomia do músculo *latissimus dorsi* em sua origem ou no meio do músculo, observou-se sua transformação em músculo de contração rápida, mais rapidamente do que ocorre em situação semelhante em pintinhos, e ocorreu mais rapidamente em animais mais velhos, quando comparados aos animais mais jovens que sofreram mesmo processo (HIKIDA, 1981). Enxerto de músculos que não contém fusos musculares originalmente, foram enxertados em sítios de músculos que normalmente possuem fusos musculares, e o enxerto reverso também foi feito. Em dois a oito meses, o enxerto de músculo sem fusos havia se regenerado em músculos contendo fusos, enquanto o enxerto recíproco de músculo que continha fusos, transplantados em sítio que não continha inervação para fusos, não possuía mais fusos ou mesmo remanescentes dos fusos. Ficou comprovado que inervação adequada é necessária para a formação dos fusos, fusos originais não sobrevivem transplantes e partes originais de fusos não são necessárias para regeneração destes (MACKENSON-DEAN et al., 1981).

Em estudos sobre o comportamento de enxertos musculares triturados em pintinhos, demonstrou-se que cadeias leves de miosina têm sua relação quantitativa alterada, afetando função muscular (SOOD et al., 1996), enquanto o músculo gastrocnêmio, quando enxertado livre, predenervado ou com seu nervo esmagado, demonstra sequência idêntica de degeneração-regeneração, quando observou-se atrofia das fibras durante degeneração isquêmica, acompanhada de perda de peso, proteínas não colágenas e aumento de enzimas

líticas (fosfatase ácida e alcalina), glucose 6 fosfatase, glicogênio e desidrogenase succinato. A regeneração foi mais rápida em enxerto livre muscular regular. Insultos tróficos ao músculo pela denervação e trituração do nervo prévias ao transplante não influenciaram na renovação do enxerto, quando comparadas ao enxerto livre regular, porém recuperação levemente aumentada foi observada em enxertos pre denervados (KUMAR et al., 1994). Expressão de isoformas de troponina T específicas do sítio doador foi observada em enxerto muscular regenerado. Durante a regeneração, houve crescimento celular e expressão de isoformas de troponina T de maneira similar à de músculos normais em desenvolvimento, e por volta de 6 meses, o músculo expressou a forma adulta de troponina T, e baseado nestes fatos, determinou-se que um tipo de músculo esquelético tem potencial inerente de crescer e coexistir com outros tipos musculares por longo prazo (YAO et al., 1994). Células miogênicas apresentaram migração entre 2 a 4 dias após transplante mesenquimal de origem somítica de perdizes para pintinhos, e estas se espalharam em direção proximo-distal em direção ao ápice do membro, demonstrando que o movimento celular tem papel na miogênese em membros de aves (LEE et al., 1989). Aloenxertos foram realizados dos músculos extensores carpo radial longo entre pintinhos distróficos e normais, para na avaliação da etiologia da distrofia muscular nestes animais, e determinou-se que existe alguma alteração do ambiente hospedeiro do pintinho distrófico e que provavelmente ocorre alguma alteração genética do próprio tecido muscular (HIRONAKA et al., 1984). Mas embriões de pintinhos que receberam células de hibridoma enxertadas ao nível de sômitos ou do celoma, apresentaram falha no crescimento de músculos da parede do corpo do lado do enxerto ao nível de sômitos, e agenesia total dos músculos abdominais foi induzida (JAFFREDO et al., 1988).

6.7 COMPLICAÇÕES RELACIONADAS À ENXERTIA

Possíveis complicações de pedículos vasculares incluem avulsão da anastomose venosa, congestão venosa pós-operatória, seroma, deiscência da ferida em áreas de necrose (SMITH et al. 1991; DEGNER; WALSHAW, 1997). A causa mais comum de insuficiência venosa de enxertos livres é a trombose da veia, mais frequentemente causada pela sutura da parede posterior da veia à parede anterior. Os enxertos livres são resistentes à até 24 h de insuficiência venosa. Um retalho deve ser de 15% a 20% mais longo do que o leio da lesão

quando o defeito se estende por toda a circunferência do membro, para acomodar o edema pós-cirúrgico. (DEGNER; WALSHAW, 1997)

O uso de biomateriais como o politetrafluoretileno (PTFE) pode aumentar a resistência à tração na interface implante/ hospedeiro em enxertos musculares. Há presença de tecido fibroso preso firmemente a este biomaterial, com fibroblastos em seu interstício, e a presença destas células nos espaços vazios da estrutura do polímero propiciam a síntese de colágenos, resultando em reparo estável e resistente (FALCÃO et al., 2008).

6.8 ESTADO DA ARTE DA ENXERTIA EM MEDICINA VETERINÁRIA

Transferência de enxerto livre fasciocutâneo da safena foi feito em oito cães, sendo que dentre estes, três enxertos incluíram a cabeça caudal do músculo sartório, formando assim um enxerto miocutâneo. Os vasos do enxerto foram anastomosados aos vasos recipientes, adjacentes às lesões. Os enxertos miocutâneos foram usados para corrigir fístula nasocutânea (um animal), para recobrir lesão em metatarso, pois o quinto metatarsiano apresentava osteomielite recorrente (um animal), e foi utilizada para aumentar a vascularização de lesão após remoção cirúrgica de neoplasias (seis animais), com sobrevivência de todos os enxertos. Um dos animais apresentou congestão venosa após três dias da cirurgia, e doppler ultrassônico colorido demonstrou a patência da anastomose arterial, porém não da anastomose venosa, quando tentou-se remover algumas suturas, para diminuir o efeito de torniquete do edema, mas com pouco sucesso. Sendo assim, o enxerto foi tratado com sanguessugas (*Hirudo medicinalis*), o que melhorou a congestão venosa, e garantiu sua sobrevivência, já que elas injetam hirudina, um anti-coagulante e vasodilatador potente e de longa duração, resultando em aumento do tempo de coagulação, melhorando a circulação sanguínea e aumentando a drenagem venosa, o que pode salvar enxerto que está tendendo a falhar devido a drenagem venosa ruim. (DEGNER; WALSHAW, 1997). O sítio doador foi fechado com sutura festonada e padrão simples interrupto no subcutâneo, e ácido acetilsalicílico foi dado aos animais durante 4 dias para diminuir a adesão de plaquetas. (DEGNER; WALSHAW, 1997)

O enxerto livre fasciocutâneo de safena medial é confiável e aceitável cosmeticamente para reparação de defeitos de pele, e leva à menor morbidade em menor tempo de internação. (DEGNER; WALSHAW, 1997)

Fratura traumática de tíbia, com perda de tecidos moles adjacentes foi tratada com fixação externa linear bipolar. Enxerto cutâneo de músculo semitendinoso foi utilizado para recobrir completamente a falha de musculatura e pele nos aspectos cranial e medial da tíbia onde houve perda da metade distal da musculatura tibial cranial. Houve necrose do enxerto de pele que recobria a porção distal da lesão. À avaliação inicial o animal havia perdido a sensibilidade cutânea na porção dorsal do pé e dígitos, mas esta retornou em seis semanas. Observaram sinais radiográficos de osteomielite às quatro semanas, que foi tratada com amoxicilina e ácido clavulânico e enrofloxacina por 16 semanas, e após a resolução radiográfica, preconizou-se a enxertia autóloga esponjosa, levando à união óssea, porém devido à natureza frágil do calo obtido, optou-se por segunda enxertia de mesma natureza, doze semanas após a primeira, quando houve recorrência da infecção óssea, que foi tratada com cefoxitina por seis semanas. O fixador foi removido às 50 semanas quando o animal apresentava boa função do membro, andando e trotando. (PUERTO, 2005)

Retalho de diafragma foi usado experimentalmente para corrigir defeito da parede esofágica, em sete cães. Dentre os casos que falharam, dois cães foram eutanaziados; o primeiro devido à necrose isquêmica do “flap”, no terceiro dia pós-cirúrgico, o outro devido à infecção da incisão, no 13º. dia pós-cirúrgico. Neste caso, à necropsia observou-se aderências flexíveis do lobo diafragmático pulmonar direito, aos locais de implantação, e adesão do fígado ao defeito diafragmático. Apenas um animal veio a óbito por causas naturais, possivelmente por infecção respiratória, aos trinta dias pós-cirúrgicos. Os outros animais foram avaliados através de esofagoduodenoscopia aos quarenta dias após a cirurgia, e foram observados calibre e peristaltismo adequados, presença de leve retração cicatricial, que não causou estenose, tecido fibroso e mucosa vermelha, porém friável. A porção diafragmática de onde foi obtido o enxerto foi suturada, deixando-se apenas a base aberta, com o intuito de evitar seu estrangulamento. O retalho diafragmático garante rápida angiogenese, e aos 24 dias observou-se epitelização do implante através de endoscopia (PAULO et al., 2007).

A eficácia de enxerto de pedículo de músculo enervado para restaurar a função de vias aéreas superiores durante o exercício foi testada em equinos com hemiplegia laringeal induzida. Após doze semanas da enxertia, impedância e fluxo de ar respiratórios estavam significativamente melhores do que imediatamente após a neurectomia laringeana. Após 52 semanas, notou-se fluxo de ar e impedância semelhantes aos níveis pré neurectomia, e com isto concluiu-se que o enxerto de pedículo de músculo enervado pode restaurar a função respiratória superior nos animais com hemiplegia laringeana (FULTON et al. 1991).

O retalho pediculado de pele com artéria torácica lateral foi utilizado em dois gatos com traumas extensos de membro torácico, para a reconstrução da pele nestes membros com sucesso e sem necessidade de segunda intervenção cirúrgica. (BENZIONI et al., 2009).

Estudos cirúrgicos do uso de artéria auricular caudal para determinar as orientações cirúrgicas e taxa de sobrevivência de retalho axial baseado nestes vasos foram feitos em 12 cães. A mesma técnica foi utilizada bilateralmente, porém uma artéria era escolhida aleatoriamente para ser ligada, servindo como controle. A determinação da viabilidade do retalho foi feita através da avaliação da temperatura e cor da pele entre cinco e dez dias após a cirurgia. Em média, o comprimento que garantiu sobrevivência, foi de aproximadamente 15 cm para o lado experimental e de aproximadamente 11 cm para o controle, sendo que 11 entre 12 controles sofreram necrose. Com este estudo determinou-se que retalhos axiais baseados em ramos da artéria auricular caudal do esternocleidomastóideo têm maior sobrevivência em comprimento do que retalhos que dependem do plexo subdérmico. Este retalho pode ter aplicação na reconstrução facial após lesões ou ressecções radicais (SMITH et al. 1991).

6.9 AVALIAÇÃO DO USO DO ENXERTO MUSCULAR

6.9.1 Estudo anatômico da vascularização

Diversas técnicas para o estudo anatômico de vascularização cutânea foram realizadas, como a utilização de Azul de Metileno, para localização da artéria torácica lateral em gatos, com o intuito de determinar as possíveis dimensões de um retalho axial de pele (BENZIONI et al., 2009). Primeiramente buscou-se facilitar a dissecação da axila, e para tanto, a artéria torácica interna foi canulada e injetada com heparina durante a eutanásia dos animais. Então esta foi injetada com Azul de Metileno a 1%, e assim localizou-se a artéria torácica lateral. Esta por sua vez foi canulada, e injetada com Azul de Metileno a 1%, e assim seu tronco principal e ramificações ficaram visíveis, facilitando a dissecação (BENZIONI et al., 2009).

Também foi realizado estudo da artéria auricular caudal em cães. Na primeira parte do estudo, seis cadáveres de cães receberam injeção de látex intravascular para a determinação da localização desta artéria. Na segunda parte, outros três cadáveres de cães receberam primeiramente injeção de 10 mL de sulfato de heparina intravascular. Então a carótida foi

cateterizada após a eutanásia, uma porção da pele entre a cartilagem auricular e o ombro foi dissecada, e uma mistura de 50% de látex e 50% de metrizamida foi injetada manualmente após a injeção em bolus de NaCl, quando pôde ser realizada a avaliação da origem e orientação do suprimento sanguíneo da artéria em questão, através de observações visuais e radiográficas (SMITH et al., 1991).

Para estudo anatômico de vasos do membro torácico de pombos, foi feita, após autanásia dos animais, abertura da cavidade toracoabdominal, canulação do ventrículo esquerdo do coração e obliteração do tronco braquiocefálico direito (sendo que o membro a ser estudado era o esquerdo), injeção de água a 60°C na cânula, seguida de injeção de látex sintético bicentrifugado adicionado de corante eosina (FRANCHESCHI et al., 2009).

6.9.2 Estudo radiográfico contrastado da vascularização

A técnica para o estudo radiográfico da vascularização cutânea já é consagrada. No estudo contrastado da artéria torácica lateral de gatos, para avaliação de seu potencial uso na reconstrução da pele de membro torácico em lesões extensas, foi utilizado sulfato de bário injetado na artéria torácica lateral canulada, enquanto o retalho de pele era radiografado. Apesar do uso obrigatório de contraste diluído (para atingir a microvascularização), observou-se opacificação adequada do retalho (BENZIONI et al., 2009). Solução de contraste radiopaco (Renografin – 76) foi injetada através de cateterização da artéria carótida em cadáveres de cães, para a visualização dos ramos da artéria auricular caudal e sua relação espacial com marcadores anatômicos (SMITH et al., 1991).

O uso da combinação de diferentes proporções de sulfato de bário e látex foi extensamente estudado, para a determinação da melhor quantidade de cada uma destas substâncias para a avaliação angiográfica e posteriormente anatômica, já que o contraste sozinho tende a drenar de vasos, durante sua dissecação. Determinou-se que não há diferença significativa na quantidade de vasos observados – mesmo com grande variação de tamanho entre elas – com a concentração de bário entre 25 – 95%, porém com baixas concentrações de bário o contraste é menor, sendo mais difícil visualizar os vasos, por outro lado, quando a proporção de bário-látex é muito alta, a solução tem menor penetração em vasos menores, pois a molécula do bário é grande, aumentando sua viscosidade. Além disto, a dissecação posterior é prejudicada, pois com menor quantidade de látex, os vasos ficam mais friáveis. A injeção da

substância em temperatura ambiente ou aquecida não demonstrou diferença na eficiência da técnica. Para a avaliação da melhor concentração entre bário e látex, foram feitas análises de radiopacidade de artérias principais selecionadas, através do uso de densímetro, e então avaliaram a presença ou ausência de 18 vasos de tamanho intermediário a grande. Concluíram que a concentração de aproximadamente 50% de bário e de látex seria a mais indicada pois a quantidade de bário seria suficiente para possibilitar bom contraste radiográfico dos vasos, porém sua diluição em quantidade igual de látex garantiria a perfusão de pequenos vasos (pois as partículas de bário são grandes demais, aumentando a viscosidade da solução), permitindo o preenchimento de vasos pequenos e distais, além da melhor dissecação, sem extravasamento da solução (SEDLMAYR; WITMER, 2002).

Avaliação angiográfica do músculo reto abdominal foi feita em cadáveres para avaliar a possibilidade de seu uso como “flap” de músculo para transferência livre microvascular. Após dissecação total do músculo, a artéria pudendoepigástrica foi cateterizada, e foi injetada suspensão de 3:1 de água:sulfato de bário, e os músculos foram refrigerados a -9.°C por 24 horas para permitir a solidificação da infusão de sulfato de bário. Foram feitas mensurações do diâmetro e do comprimento arterial da base do tronco pudendoepigástrico (CALFEE et al., 2004).

O uso de maior concentração de sulfato de bário é importante para garantir contraste radiográfico, porém o uso de material muito viscoso limita sua penetração em vasos sanguíneos pequenos, e injeção sob pressão pode causar ruptura de vasos e extravasamento do contraste. O uso de solução diluída de bário resulta em opacificação adequada do “flap”. Estudos de injeção de corante ou contraste não podem representar acurada ou objetivamente a perfusão fisiológica, e não se pode contar com eles para determinar bordos seguros de um “flap”, que requer avaliação de viabilidade in vivo (BENZIONI et al., 2008).

Em estudo para avaliar a anatomia vascular da cabeça de flamingos (*Phoenicopterus ruber*) baseada em técnica inédita de injeção vascular combinada com análises de tomografia computadorizada, Holliday, et al. (2006) descrevem a infusão das veia jugular e artéria carótida comum com água durante 10 minutos. Então a veia foi injetada com solução de bário (BaSO_4) e látex azul (na proporção de 3:7) e a artéria foi injetada com solução de bário (BaSO_4) e látex vermelho (na proporção de 4:6). As densidades diferentes de bário utilizadas tiveram o propósito de diferenciar veias e artérias na angiografia. Consideraram que o tamanho da partícula do bário impossibilita sua passagem em capilares, o que permitiu a separação completa do meio injetado em veias e artérias. O espécime foi refrigerado por diversos dias e então congelado novamente. Foram então obtidas imagens tomográficas dos

especímenes, e finalmente foi feita a dissecação destes para a confirmação da anatomia vascular. Concluíram que os novos protocolos propostos de injeção vascular são adequados para a distinção e visualização da anatomia tri-dimensional de artérias e veias em imagens tomográficas (SEDLMAYR; WITMER, 2002).

Também um método alternativo para a avaliação radiográfica foi estudado, para melhorar a visualização da angiografia, permitindo uma análise em três dimensões, diferentemente da avaliação radiográfica comum que somente pode ser estudada em duas dimensões. Tal técnica consistiu na obtenção de duas imagens do espécime com leve alteração de seu posicionamento através da variação de sua angulação. Ambas as imagens foram posicionadas sob um estereoscópio para avaliação, possibilitando assim visualização em três dimensões, o que melhoraria a clareza e detalhamento anatômicos em relação à obtenção de imagens em duas dimensões (radiografias comuns), que determinam superposição de estruturas contralaterais, além de dificultarem a determinação da relação de diferentes estruturas entre si. (SEDLMAYR; WITMER, 2002).

Não foi comprovado que o corante fluorescente prediz consistentemente a sobrevivência de “flaps” vasculares (SMITH et al., 1991).

6.9.3 Estudo histológico

A técnica de coloração Masson já foi utilizada para a avaliação do impacto de fármacos na disfunção miocárdica (ZHANG et al., 2012), para avaliar o efeito hepatoprotetor de drogas (GAO et al., 2012), para examinar as variações juncionais do músculo elevador da pálpebra superior e aponeurose em humanos (KAKIZAKI et al., 2011), para investigar a função biológica do fator de crescimento transformador- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) durante fibrose em músculo esquelético denervado (FANBIN et al., 2011), para avaliar os efeitos da isquemia em miocárdio de coelhos (HU et al., 2010)

6.9.4 Termografia

Os tecidos podem apresentar incremento de temperatura no caso de processos inflamatórios ou infecciosos, ou diminuição quando acometidos por processos isquêmicos. Tal diferença pode ser avaliada pela técnica semiológica de palpação apenas com variações térmicas maiores que 2 °C, devido a dificuldade do ser humano em distinguir diferenças de temperatura menores que estes valores (BRIOSCHI, 2003).

O raio infravermelho (IR) é uma radiação não visível do espectro eletromagnético com comprimento de onda entre 0,75 a 100 µm, emitido por todos os corpos acima de - 273 °C, indicando o grau de agitação molecular (BRIOSCHI, 2007).

Técnicas para estimar o fluxo sanguíneo, incluindo fotopletismometria, medidores de micro-fluxo, Dopplers e diversos aparelhos para a aferição da temperatura, possibilitam a não utilização de procedimentos bilaterais para a avaliação de fluxo sanguíneo em enxertos (SMITH et al., 1991).

A termografia, ou imagem pelo calor, surgiu durante a Segunda Guerra Mundial com o aperfeiçoamento dos filmes infravermelhos, com sensibilidade abaixo do espectro visível. Após o término da guerra iniciou-se a utilização desta tecnologia com outras finalidades (BRIOSCHI, 2007).

A temperatura da pele é influenciada pela atividade microcirculatória controlada pelo sistema neurovegetativo simpático e pela produção de calor conduzida para a superfície gerada em tecidos mais profundos, normalmente até 6 milímetros de profundidade (BRIOSCHI, 2007).

A pele em geral possui simetria térmica entre os lados homólogos do corpo (dimídios) indicativo de normalidade (GARCIA, 2004). Em ambiente termoneutro os dimídios são considerados quase que simétricos, com alguns décimos de graus de diferença ($\pm 0,3$ °C), sendo que uma diferença de pelo menos 0,5 °C entre o ponto-gatilho miofascial e seu ponto simétrico do lado oposto é considerada assimetria térmica com significância diagnóstica (BRIOSCHI, 2007). Por estes motivos a avaliação termográfica cutânea padronizada internacionalmente é realizada comparando-se sempre as metades correspondentes (dimídios) do corpo humano (BRIOSCHI, 2003).

A termografia é considerada teste não invasivo e não destrutivo de sensoriamento remoto que se baseia na detecção da radiação térmica emitida por todos os corpos de temperatura não nula (HOLST, 2000).

Os primeiros trabalhos realizados utilizando-se a termografia foram na área de oncologia, quando foram observados que tumores mamários na espécie humana causavam aumento na temperatura da pele (CHRISTIANSEN; GEROW, 1990).

Embora ainda seja pouco usada no Brasil, em países da América do Norte a termografia vem encontrando largo emprego na área médica. Beneliyahu (1989) descreve que atualmente não existem motivos para que um médico atualizado e consciente submeta seu paciente a múltiplas radiações ionizantes de raios-X ou densitometria óssea, quando pode utilizar um exame não invasivo, indolor e bem tolerado, como a termografia.

Cook, et al. (2005) descreveram que os maiores problemas relacionados à utilização da termografia como meio diagnóstico são a falta de especificidade na identificação da região e natureza da doença e a dificuldade em se estabelecer os parâmetros normais como referência.

Ainda segundo Cook et al. (2005), apesar da termografia não substituir o raio-X como meio diagnóstico, pode ser importante exame adjuvante na avaliação clínica e no exame radiográfico, aumentando a sensibilidade do exame clínico, auxiliando na localização da lesão e evitando exposições radiográficas desnecessárias.

Loughin e Marino (2007) realizaram estudo avaliando termograficamente os membros torácicos e pélvicos de 10 cães normais visando estabelecer protocolos e avaliaram o efeito da tricotomia prévia nos resultados dos exames, e chegaram a conclusões de que apesar da presença de pêlos na região avaliada reduzir a temperatura média local, não impediu a correta avaliação comparativa entre os dicótomos, e que os resultados das avaliações médias de temperatura não sofreram alterações estatisticamente significantes entre os grupos de sessenta minutos e vinte e quatro horas pós-tricotomia.

Em estudo realizado avaliando 32 pacientes acometidos por infecções em tecidos moles, comparando-se o local infectado com a região contralateral íntegra, demonstrou-se que as áreas infectadas apresentavam temperatura média superior de 2,9 graus Celsius em relação à área não infectada e os autores comprovaram a viabilidade do exame termográfico de quantificar o aumento de temperatura causado por processos infecciosos (CAPRARO et al., 2008).

Tenorio, et al. (2008) demonstraram a possibilidade de utilização do exame termográfico no reconhecimento de falhas de perfusão em retalhos cutâneos, permitindo ao cirurgião atuar rapidamente e de forma precoce, pois as alterações vasculares foram detectadas previamente a mudanças macroscópicas do tecido.

Em estudo avaliando-se 110 pacientes entre dois e 77 anos de idade a termografia demonstrou ser extremamente útil na detecção de nódulos tireoideanos de indicação cirúrgica, detectando uma diferença de 0,9 graus Celsius entre nódulos benignos e malignos (ALVES, et al., 1988).

Nas afecções inflamatórias por trauma, reumáticas ou infecciosas, há a produção e liberação das prostaciclina e bradicinina, potentes vasodilatadores que, por sua vez irão provocar a liberação de substância P e óxido nítrico, causando aumento significativo da emissividade dos raios infravermelhos (hiper radiação) (ANDRADE FILHO, 1999).

A termografia tem sido utilizada para avaliações, tanto em fase pré-clínica ou clínica, de artrites e processos inflamatórios, com resultados rápidos e confiáveis (COLLINS, 1974; SANCHEZ, 2008).

O estudo termográfico aplicado à ortopedia é relatado na área médica humana desde a década de cinquenta (LOUGHIN; MARINO, 2007), porém em medicina veterinária estes estudos ainda não aproveitaram todo o potencial deste meio diagnóstico, que têm a grande vantagem de ser exame extremamente seguro e pouco invasivo ao paciente.

6.9.5 Histomorfometria

Histomorfometria é a mensuração de componentes morfológicos, tais como número de células, estimativas de superfícies e volumes, profundidade de erosão, a largura do osteóide e a grossura da parede óssea; estas são variáveis estáticas que são medidas diretamente. Há a possibilidade de se utilizar marcadores fluorescentes, administrados em intervalos de tempo, que se integram na formação óssea, e com isto pode-se avaliar a aposição mineral ocorrida em um dado intervalo de tempo; estas são as variáveis quinéticas (ERIKSEN; AXELROD; MELSEN, 1994).

A análise microscópica quantitativa é feita com microscópio de luz normal, polarizada ou fluorescente, sistemas de enquadramento e equipamentos de digitalização computadorizada, o que é usado para quantificar o tamanho e o número de estruturas em osso cortical e esponjoso (ERIKSEN; AXELROD; MELSEN, 1994).

Após a fixação, o material deve ser desidratado seguindo protocolo adequado, e emblocado com material plástico. Yingling et al. (2007) descrevem o uso de formalina neutra a 10% para a fixação do material, e éter monoetil glicol etileno para a desidratação, para o estudo de tíbias descalcificadas de camundongos. Após a coloração, fizeram a análise da massa e arquitetura ósseas através do uso do sistema OsteoMeasure® (Osteometrics, Atlanta, GA, USA). As propriedades estruturais (estáticas) pesquisadas foram: área óssea, perímetro

ósseo e área total de tecido, e com isto acessaram os valores de diâmetro, e porcentagem de trabéculas ósseas (YINGLING et al., 2007).

Em estudo sobre a modulação do “turnover” ósseo pela força mecânica, em camundongas ovariectomizadas, o seguinte protocolo para a fixação e emblocamento para posterior seccionamento e avaliação histomorfométrica de fêmures, foi utilizado: os fêmures congelados foram fixados em etanol 70% por no mínimo dois dias, desidratados em série ascendente de concentrações crescentes de etanol, emblocados não descalcificados em mistura de metil metacrilato/ 2-hidroxietil metacrilato (12.5:1), e seccionados em largura indicada de cinco μm . Procedimentos histomorfométricos dos fêmures foram feitos com o uso de um sistema de análise de imagem semi-automático SMI-Microcomp (Southern Micro Instruments, Atlanta) consistindo de um computador Compaq com software Microcomp interconectado com um microscópio e sistema de análise de imagem. Neste sistema, uma câmera de alta resolução montada em um microscópio Olympus H-2 mostrava a imagem do espécime em um monitor colorido. O movimento de uma caneta em uma plataforma gráfica super-impunha o traçado do espécime em questão na tela de vídeo. Por este método, a região de interesse era traçada, e o comprimento da linha e área formados pelo traçado foram calculados. Os sítios amostrais do fêmur distal consistiam da epífise ($12 \text{ mm}^2/\text{osso}$) e da área imediatamente distal à placa de crescimento, estendendo 7 mm para enquadrar a metáfise inteira (35 mm^2) (WESTERLIND, et al., 1997).

7 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi previamente autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, segundo o protocolo número: 1781/ 2009, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal desta comissão

7.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a pesquisa, foram utilizados 12 pombos (*Columba livia*), adquiridos 30 dias antes do início do experimento, e mantidos em gaiolas de 60x60x60cm, dentro de sala fechada com ventilação e iluminação naturais. Não foi feito controle de temperatura. Foi oferecida ração comercial adequada para pombos, duas vezes ao dia e água *ad libidum*. Um dia após sua aquisição, iniciou-se tratamento com enrofloxacin² por via oral, durante cinco dias na dose de 10mg/kg, uma vez ao dia. Tal tratamento teve o propósito de eliminar possíveis infecções subclínicas pré-existentes nos animais, que pudessem ser exacerbadas após o ato cirúrgico. Antes do procedimento cirúrgico os animais foram pesados e submetidos ao exame clínico.

7.2 LOCAIS DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo. Durante todo o período de experimento, os animais foram mantidos no Serviço de Ornitopatologia, do Departamento de Patologia da mesma faculdade, as intervenções cirúrgicas bem como as eutanásias e preparações dos espécimes, foram realizadas no Setor de Técnica Cirúrgica; os exames radiográficos foram realizados no Serviço de Diagnóstico por Imagem, e as lâminas histológicas foram preparadas no Serviço de Patologia, todos desta mesma instituição. As

² Baytril 5%, Bayer®, São Paulo, SP

avaliações histomorfométricas foram realizadas no Laboratório Experimental de Histomorfometria, do *Department of Physiological Sciences, University of Florida*, EUA.

7.3 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DO USO DO ENXERTO MUSCULAR

Os doze animais foram divididos em dois grupos; o grupo E, com enxerto, consistiu de seis animais que foram utilizados para a avaliação da viabilidade do uso de enxerto do músculo peitoral para recobrir defeito promovido pela remoção parcial de tecidos moles (bíceps) distais de úmero, e o grupo S, sem enxerto, que não receberam o enxerto sobre o defeito criado no músculo bíceps braquial. Dois animais dentre estes grupos foram selecionados aleatoriamente para comporem o grupo controle anatômico (A), sendo utilizado o membro contralateral não operado para tal avaliação. Para fins de avaliação termográfica, todas as asas contralaterais às operadas foram incluídas no grupo controle (C), com um total de doze asas. Antes do início do experimento foram realizados hemogramas de todos os animais para a avaliação de sua higidez e possibilidade de participarem do experimento (Anexo A).

7.3.1 Técnica anestésica

Depois de adequada contenção física, os animais receberam por meio da via intramuscular, butorfanol³ na dose de 2,0 mg/kg. Decorridos 15 a 20 minutos, a indução da anestesia foi realizada com a administração intramuscular (i.m.) de quetamina⁴, na dose de 5 mg/kg, nalbufina⁵ na dose de 5mg/kg e midazolam⁶, na dose de 0,5mg/kg. Uma vez apresentando perda dos reflexos de endireitamento, interdigital e laringotraqueal, foi realizada a intubação orotraqueal com sonda endotraqueal 2,5 sem balonete. A mesma foi acoplada ao circuito sem reinalação (Maplessen D), onde os animais receberam isofluorano em fluxo de oxigênio de 1,5L/min. A anestesia foi avaliada por meio dos seguintes parâmetros: frequência

³ Torbugesic®, 10mg/mL, Fort Dodge, Campinas, SP

⁴ Ketamin®, 50mg/mL, Cristalia, Itapira, SP

⁵ Nubain®, 10mg/mL, Cristalia, Itapira, SP

⁶ Dormire®, 15mg/mL, Cristalia, Itapira, SP

cardíaca (batimentos por minuto) e frequência respiratória (respiração por minuto), concentração de dióxido de carbono inspirado e expirado (mmHg)⁷, concentração de isoflurano⁸ inspirado e expirado (%)⁷.

7.3.2 Preparação cirúrgica

O local da intervenção cirúrgica foi preparado com colchão moldável, garantindo melhor posicionamento do animal, e foi colocada sobre o colchão, bolsa térmica aquecida, coberta por tecidos de algodão. O animal foi então posicionado sobre estes.

Preceitos básicos de assepsia e antisepsia foram seguidos para o ato operatório. As penas do sítio cirúrgico foram removidas, e este foi realizada antisepsia com clorexidine⁹. As penas da porção distal da asa foram envolvidas com faixa elástica¹⁰. As penas adjacentes ao sítio cirúrgico foram umedecidas com clorexidine e contidas com esparadrapo, evitando que ocupassem o sítio cirúrgico. O campo cirúrgico consistiu de pano cirúrgico em torno do animal e a ponta da asa foi então coberta por luva cirúrgica estéril.

7.3.3 Técnica cirúrgica dos grupos com enxerto (E) e sem enxerto (S)

Os animais sofreram incisão da pele da região toracoabdominal de aproximadamente 3 cm, iniciando-se lateralmente ao gradil costal imediatamente cranial à região da articulação coxo-femoral e se estendendo até a região caudo-distal à articulação úmero escapular. O músculo peitoral superficial sofreu incisão de aproximadamente 3 cm de comprimento por 0,5cm de largura em direção às fibras musculares, à partir da região proximal, em direção à região distal (Figuras 2 e 3). Com incisão de aproximadamente 0,1cm de profundidade, e com preservação do pedículo (em região proximal), tal musculatura foi elevada, por meio de divulsão cuidadosa com tesoura, de todo o seu comprimento, formando-se assim um “flap” pediculado (Figura 4). Foi realizada síntese do músculo peitoral superficial remanescente

⁷ Poet IQ2®, Criticare Systems, Inc. EUA

⁸ Isoforine®, Cristalia, Itapira, SP

⁹ Riohex® 4%, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP

¹⁰ Vetrap®, 3M, EUA

(Figura 5). Então, os animais sofreram segunda incisão de pele em região medial à asa ipsilateral de aproximadamente 2,5cm à partir da região de articulação úmero-rádio-ulnar em direção proximal. Aplicou-se excisão de 1cm de comprimento da porção distal do músculo bíceps braquial (Figura 6), com cuidado para não lesar a artéria braquial. O lado do procedimento foi selecionado de maneira aleatória no primeiro animal, e intercalado em sequência nos próximos animais.

A partir desta etapa o grupo E, recebeu o seguinte tratamento: o enxerto muscular foi rebatido, passando-se através de túnel de pele em região axilar, e posicionado sobre o úmero, com a fáscia voltada para o periósteo umeral, atingindo a região de articulação úmero-rádio-ulnar. O músculo foi então fixado com fio náilon 4-0 absorvível aos músculos e subcutâneo adjacentes ao sítio de recepção do enxerto (Figura 7). A pele foi suturada com fio de náilon 4-0. Para ilustrar, as figuras 2 a 7 demonstram sequência realizada em uma ave (*Amazona aestiva*) que sofreu óbito por causas não relacionadas.

O grupo S, recebeu o seguinte tratamento: o enxerto de músculo peitoral foi completamente excisado, Com incisão de aproximadamente 0,1cm de profundidade, e com preservação do pedículo (em região proximal), tal musculatura foi elevada, por meio de divulsão cuidadosa com tesoura, de todo o seu comprimento, formando-se assim um “flap” pediculado (Figura 4). Foi realizada síntese do músculo peitoral superficial remanescente (Figura 5). A pele das incisões da região torácica e umeral foi suturada com fio de náilon 4-0, e nenhum enxerto foi utilizado nestes animais.

Figura 2 – Cadáver de ave, demonstrando a técnica cirúrgica empreendida nos animais do experimento

Fonte: Ferraz (2009)

Figura 3 - Região da incisão da musculatura peitoral superficial de aproximadamente 0,5cm de largura por 3cm de comprimento por 0,1cm de profundidade

Fonte: Ferraz (2009)

Figura 4 - Região da excisão de enxerto do músculo peitoral superficial e enxerto deste rebatido sobre a região medial do úmero

Fonte: Ferraz (2009)

Figura 5 - Sutura em pontos simples separados do sítio da excisão do enxerto muscular, e enxerto rebatido

Fonte: Ferraz (2009)

Figura 6 - Detalhe da região de excisão de 1cm do músculo bíceps braquial. Enxerto muscular rebatido

Fonte: Ferraz (2009)

Figura 7 - Sutura da região doadora do enxerto e pontos de ancoragem do enxerto muscular em tecidos moles adjacentes ao sítio receptor

Fonte: Ferraz (2009)

7.3.4 Cuidados pós operatórios

Após o término da intervenção cirúrgica, foi administrado antiinflamatório: carprofeno¹¹ na dose de 4mg/kg pela via intramuscular.

Durante os sete dias consecutivos ao ato operatório, foi administrada dipirona sódica¹² na dose de 50mg/kg por via oral aos animais. Além disto, foi administrado carprofeno¹¹ na dose de 4mg/kg durante os três dias consecutivos à cirurgia.

Foi realizada antibioticoterapia preventiva da seguinte forma: Os animais receberam amoxicilina¹³, 50mg pela via oral, a cada vinte e quatro horas, a partir do primeiro dia cirúrgico, e durante os seis dias posteriores.

Foram feitas bandagens em “oito”, prendendo a asa ao corpo do animal, constituídas de gaze e bandagem elástica, sendo a última utilizada, a fim de evitar aderência de cola de esparadrapo nas penas, e por ser de mais fácil manipulação. A bandagem foi retirada diariamente para avaliação da incisão, bem como para a mobilização passiva e controlada da asa. As bandagens foram mantidas por sete dias.

7.4 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA: AQUISIÇÃO DE IMAGEM INFRAVERMELHA

Foi utilizada uma câmera¹⁴ de aquisição de imagens infravermelhas termográficas com sensibilidade térmica de 0,05 graus Celsius.

A câmera foi posicionada a aproximadamente 30 cm de distância da área de avaliação.

Imediatamente após as intervenções cirúrgicas e aos sete e aos catorze dias, foram obtidas imagens tradicionais e termográficas da região de leito doador de enxerto, no músculo peitoral e de da região receptora do enxerto, em suas asas, após contenção física do animal, com exposição primeiramente da asa operada, e então da asa contralateral, com o objetivo de comparação direta entre as temperaturas das mesmas. As imagens obtidas de todos os animais e em todos os períodos foram então analisadas através de programa de computador específico¹⁵, quando foi traçada linha sobre a região do leito doador (denominada linha 1), e linha sobre a região receptora do enxerto (linha 2). O programa faz mensurações pontuais da

¹¹ Rimadyl® 5%, Pfiser, São Paulo, SP

¹² Novalgina®, 50mg/mL, Sanofi-Aventis, São Paulo, SP

¹³ Amoxicilina Medley®, 125mg/5mL, Medley, São Paulo, SP

¹⁴ Flir Systems®: modelo Thermacam T400®, EUA

¹⁵ FLIR QuickReport 1.2 SP1, EUA

temperatura e oferece valores de temperatura mínima, temperatura máxima e média entre todos os pontos analisados.

Além da temperatura média para cada região (peitoral e umeral) de cada um dos grupos (E e S), foi calculada também a diferença de temperatura entre o lado contralateral (grupo C) e o lado operado de cada animal, para cada uma das linhas (1 e 2).

7.5 EUTANÁSIA

Os doze pombos (*Columba livia*) utilizados no projeto foram eutanasiados aos vinte e um dias de experimento. Depois de adequada contenção física, os animais receberam, através da via intramuscular (i.m.), 20mg/kg de tiletamina-zolazepam¹⁶, até que se atingisse a parada cardíaco-respiratória. A morte foi confirmada por meio da auscultação cardíaca.

7.6 PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Para o estudo radiográfico contrastado dos vasos da região enxertada, bem como da região de sítio doador, foram realizados os seguintes procedimentos: imediatamente após a eutanasia procedeu-se a incisão de pele e musculatura de cavidade celomática para exposição do coração. O átrio direito foi incisado, o ventrículo esquerdo foi canulado e foi injetada, através desta cânula, solução fisiológica contendo 2% de heparina para lavagem dos vasos sanguíneos em volume de aproximadamente 8% do peso do animal, até que não fossem mais observados traços de sangue na solução expelida pelo átrio direito. Então solução de bário, látex, corante para tecidos e solução fisiológica diluídos em porções de 15ml de bário, 15ml de látex, 15 gotas de corante (na cor verde) e 10mL de solução fisiológica, foi infundida através da cânula, em volume de aproximadamente 5mL, ou o suficiente para que se observasse drenagem esverdeada de vasos principais, além de pulmões, intestinos, coronárias, e então extravasamento desta solução através do átrio direito.

¹⁶ Zoletil®, 50mg/mL, Virbac, São Paulo, SP

Neste momento, toda a pele que recobria a musculatura peitoral, bem como a pele das asas foi retirada. Foi realizada osteotomia do esterno, imediatamente lateral à quilha, do lado contralateral à asa operada, e osteotomia das costelas do lado da asa operada, imediatamente lateral à sua junção com as vértebras, além de desarticulação das articulações úmero-coracóide-fúrcula e carpo-rádio-ulnar, formando o espécime a ser estudado.

Em dois animais, preservou-se também o lado contra-lateral, para avaliação radiográfica contrastada da anatomia normal destes vasos (grupo A).

7.7 ESTUDO RADIOGRÁFICO

Os espécimes foram então imediatamente radiografados nas posições cranio caudal e médio-lateral, com as asas abertas, utilizando-se o protocolo de 40kv e 2 ma. As imagens angiográficas foram utilizadas para demonstrar aumento, diminuição ou manutenção da quantidade de vasos na região de músculo peitoral, sítio de origem do enxerto muscular, e da região distal de úmero, sítio receptor do enxerto muscular, de maneira qualitativa.

7.8 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

Histomorfometria é a mensuração de componentes morfológicos, variáveis estáticas que são medidas diretamente (ERIKSEN; AXELROD; MELSEN, 1994), e tal técnica foi utilizada para permitir mensuração quantitativa do número absoluto de vasos e diâmetro individual, bem como médio dos vasos presentes nas amostras, permitindo uma avaliação objetiva da neovascularização do enxerto.

7.8.1 Preparação das lâminas

Imediatamente após exames radiográficos, foi excisado 1cm referente à porção mais distal do músculo bíceps da asa operada, e este espécime foi colocado no sentido transverso no

interior do cassete, para garantir que a avaliação histológica fosse realizada neste sentido, em todas as amostras, para que fosse possível mensurar o número e os diâmetros dos vasos, em secção transversa completa do tecido. As amostras foram conservadas em Bouin durante 48 horas, ao final das quais, o material foi lavado em água por seis horas, e finalmente mantido em álcool 70%.

Composição do conservante Bouin:

- Solução saturada de ácido pícrico – 15 partes
- Formol – 5 partes

Imediatamente antes do uso, foi feita solução do Bouin com ácido acético na proporção de 95:5.

O material então foi processado como se segue.

Para o processamento do tecido foi utilizado processador de tecidos¹⁷. Foram realizados dois banhos em álcool 95% de uma hora cada, seguidos de quatro banhos de álcool absoluto de uma hora e meia cada, e então três banhos em xilol, também de uma hora e meia cada e por fim, dois banhos em parafina de três horas cada.

Para a inclusão em parafina, foi utilizado inclusor de parafina¹⁸.

Foram feitos cortes do tecido de 5µm, com microtomo¹⁹.

Os cortes de tecido foram colocados sobre lâmina de vidro, e foram feitas as colorações Hematoxilina e Eosina e Tricrômio de Masson.

Para a coloração Hematoxilina, o processo foi como segue:

- Três banhos em xilol de 10 minutos cada
- Um banho em álcool absoluto de 3 minutos
- Um banho em álcool 95% de 3 minutos
- Um banho em álcool 70% de 3 minutos
- Foram deixados em água corrente por 3 minutos
- Banhados em hematoxilina por 3 minutos
- Deixados novamente em água corrente para tirar-se o excesso do corante
- Inseridos em banho de álcool ácido e retirados rapidamente
- Novamente foram deixados em água corrente por 10 minutos
- Embanhados em eosina por 1 minuto
- Inseridos em álcool 95% e retirados rapidamente

¹⁷ Processador de tecidos Leica TP 1020, Alemanha

¹⁸ Inclusor Leica EG 1150H, Alemanha

¹⁹ Microtomo Leica RM 2245, Alemanha

- Duas passagens rápidas em álcool absoluto
- Embebidos em álcool absoluto por 2 minutos
- Inseridos em solução de álcool e xilol (50%) durante 2 minutos
- Inseridos em xilol diafanizado durante 2 minutos
- E por fim, inseridos novamente em xilol durante 2 minutos

Para obter-se a coloração com Tricrômio de Masson, foram seguidos os seguintes passos:

- Três banhos em xilol de 10 minutos cada
- Um banho em álcool absoluto de 3 minutos
- Um banho em álcool 95% de 3 minutos
- Um banho em álcool 70% de 3 minutos
- Foram deixados em água corrente por 3 minutos
- Embebidos na solução A por 2 minutos
- Lavados em água corrente para que fosse retirado o excesso de corante
- Embebidos na solução B durante 15 minutos
- Imediatamente inseridos na solução C por 5 minutos
- Lavados em água corrente para que fosse retirado o excesso das soluções
- Inseridos em álcool 95% e retirados rapidamente
- Duas passagens rápidas em álcool absoluto
- Embebidos em álcool absoluto por 2 minutos
- Inseridos em solução de álcool e xilol (50%) durante 2 minutos
- Inseridos em xilol diafanizado durante 2 minutos
- E por fim, inseridos novamente em xilol durante 2 minutos

Composição da solução A:

- 0,1g de fucsina
- 0,9g de escarlate Biebrich
- 1mL de ácido acético

Composição da solução B:

- 5g de ácido fosfomolibdico
- 5g de ácido fosfotúngstico
- 200mL de água destilada

Composição da solução C:

- 2,5g de azul de anilina
- 100mL de água destilada
- 2mL de ácido acético

Foi então posicionada e anexada lamínula de vidro sobre o tecido corado, para que este pudesse ser estudado.

7.8.2 Procedimentos de histomensuração

Para a análise das secções, foram utilizadas as lâminas coradas com Tricrômio de Masson. Programa de computador específico²⁰ foi utilizado. Microscópio de luz com uma câmera especial anexada, e mouse de computador para osteomensuração, em placa especial²¹ foram usados para delinear os parâmetros específicos para o estudo.

Foi avaliada uma lâmina para cada indivíduo, sendo seis lâminas do grupo E, seis lâminas do grupo S, e ainda duas lâminas do grupo A.

O microscópio, a luz e a câmera foram ajustados antes de cada mensuração e a área de interesse foi encontrada. Após finalizada cada mensuração, o computador gerou imagem digitalizada do tecido com os parâmetros mensurados (Figura 15), bem como dados numéricos para cada um.

Os parâmetros medidos foram:

- Área total de tecido
- Área dos vasos em mm²
- Diâmetro dos vasos
- Número de vasos
- Percentagem da área do tecido ocupada por vasos

Tais resultados foram submetidos à análise estatística

²⁰ OsteoMeasure®, EUA

²¹ Mercury 100, EUA

7.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste ANOVA com nível de significância de 5% foi utilizado para a interpretação dos resultados obtidos nas avaliações termográficas neste experimento, procurando verificar possíveis diferenças significativas entre as temperaturas obtidas tanto na região peitoral, do leito doador do enxerto e seu correspondente contralateral, quanto nas asas dos grupos E, S e C.

Foi realizada análise estatística para acessar as diferenças entre os dados obtidos através da análise histomorfométrica dos dois grupos E e S. Os dados foram: área de tecido em corte transversal, área ocupada por vasos, média do diâmetro dos vasos, número absoluto de vasos presentes por amostra e finalmente porcentagem de tecido ocupada por vasos, comparando valores entre os grupos. Foi utilizado o teste *t student*, com nível de significância de 5%.

8 RESULTADOS

8.1 TÉCNICA ANESTÉSICA

O protocolo anestésico utilizado permitiu a realização dos procedimentos sem intercorrências. A indução anestésica se deu de maneira rápida e tranquila. A manutenção do plano anestésico foi adequada para o procedimento realizado, sendo que nenhum animal apresentou superficialização importante do plano anestésico, sendo leve taquicardia em algumas situações o único sinal de eventual superficialização notado, tendo esta sido controlada rapidamente, quando necessário. A recuperação anestésica também ocorreu de maneira tranquila e rápida em todos os doze casos.

8.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA E COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

Todos os animais apresentaram comportamento adequado após a intervenção cirúrgica, se alimentando e bebendo água em até no máximo duas horas após o final do procedimento. Os doze pombos, independente do grupo, se E ou S apresentaram postura corporal adequada. Imediatamente após o procedimento as aves apresentaram dificuldade de recolhimento da asa operada, porém ao longo dos dias, eram capazes de recolher melhor o membro anterior, e ao final do experimento todas tinham melhor controle da asa, porém em nenhum caso essa estava exatamente simétrica à contralateral, nos dois grupos avaliados. Durante o período de avaliação, de três semanas, nenhuma pomba apresentou sinais de alteração comportamental e todos permaneceram hígidos, apesar de algumas intercorrências que serão descritas a seguir.

O animal de número 3 do grupo E apresentou sangramento intenso na região doadora do enxerto, no músculo peitoral superficial ao 4º. dia após o ato cirúrgico, quando o sítio cirúrgico foi novamente abordado. Havia sangramento generalizado da musculatura, e este foi controlado com nova sutura, e posteriormente com bandagem compressiva. Este animal recebeu carprofeno por mais dois dias e dipirona e amoxicilina (nas doses citadas anteriormente) até o 10º. dia após a primeira intervenção cirúrgica. Ele não apresentou outro episódio de hemorragia, e mostrou-se hígido.

O animal de número 5 do grupo E apresentou sangramento moderado na região doadora do enxerto, no músculo peitoral superficial ao 4º. dia após o ato cirúrgico sendo necessário o uso de bandagem compressiva. A hemorragia foi controlada e a bandagem foi refeita diariamente para avaliação de possíveis sangramentos, sendo mantida por outros quatro dias. O animal apresentou higidez normal, e mais nenhum episódio hemorrágico.

O animal de número 6 do grupo E apresentou a bandagem úmida ao 3º. dia após o ato cirúrgico, provavelmente tendo entrado no bebedouro durante a noite. A bandagem foi retirada e observou-se deiscência de dois pontos de sutura distais no sítio doador do enxerto. O animal foi mantido sem bandagem. Ao 4º. dia observou-se discreta área de necrose no local da deiscência, porém o animal apresentava-se com higidez normal.

Optou-se pela manutenção de todos os animais no experimento, em ambos os grupos E e S, pois nenhuma complicação demonstrou-se indicativa de alteração importante.

8.3 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA

A avaliação termográfica foi realizada com os animais acordados, com contenção física para os exames pós cirúrgicos. Observou-se que todos os animais apresentavam, aos catorze dias, início de empenamento nas asas dos grupos E e S e principalmente nas asas do grupo C, mas ainda foi possível a realização de avaliação termográfica neste período. Em todos os animais de ambos os grupos observou-se, imediatamente após a intervenção cirúrgica, diminuição da temperatura na região da incisão. Após sete dias, a região apresentava temperatura mais homogênea em relação aos tecidos adjacentes, porém com focos de diminuição branda da temperatura sobre a linha de incisão quer nos animais dos grupo E e S. Aos catorze dias pós-operatórios, não era mais possível observar diferenças de temperatura entre o sítio cirúrgico e os tecidos adjacentes (Figuras 8, 9 e 10). As asas contralaterais foram também avaliadas (grupo C) para fins de comparação destas com as asas operadas (grupos E e S), não apresentando alterações de temperatura ao longo do período do experimento. (Anexos C, D, E, F, G e H)

Figura 8 - Avaliação termográfica do animal 1, grupo E

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: Sítios doador e receptor do enxerto com menor temperatura (setas) (A) pós cirúrgico imediato, (B) após sete dias, (C) após catorze dias

Figura 9 - Avaliação termográfica do animal 1, grupo C, por catorze dias

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: (A) pós cirúrgico imediato, (B) após sete dias, (C) após catorze dias

Figura 10 - Avaliação termográfica do animal 5, grupo S

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: Sítios cirúrgicos com diminuição de temperatura (setas) (A) pós cirúrgico imediato e (B) após 1 semana. (C) Após catorze dias

8.4 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

A preparação dos espécimes foi feita imediatamente após a eutanásia, sendo que imediatamente à constatação da parada cardíaca, a cavidade era acessada somente pela incisão da musculatura caudal ao gradil costal, o ventrículo esquerdo era canulado, e o átrio incisado, e iniciava-se a injeção, quando era feita abordagem completa da cavidade celomática, através da osteotomia do esterno, lateralmente à quilha. Quando não eram mais observados traços de sangue saindo do átrio direito, iniciava-se a injeção do contraste, rapidamente e sob pressão, na concentração de 15ml:15ml:10ml de látex:bário:solução fisiológica (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Animal do grupo S, após eutanasia e injeção de contraste.

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: Cicatrização adequada do sítio doador (ainda com pontos de sutura - seta azul), vasos preenchidos por contraste (na cor verde) percorrendo a asa, além de cicatriz organizada, aproximando o músculo bíceps braquial de sua inserção distal (seta branca)

Figura 12 - Animal do grupo E, após eutanásia e injeção de contraste

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: Contraste na cor verde. É possível observar enxerto degenerado (seta)

As imagens angiográficas demonstraram manutenção do lumen vascular na região de músculo peitoral, sítio de origem do enxerto muscular, e da região distal de úmero, sítio receptor do enxerto muscular, de maneira qualitativa. Foi possível observar patência de todos os vasos principais nos animais do grupo E quanto nos animais do grupo S (Figuras 13 e 14)

Figura 13 - Imagem radiográfica contrastada de vasos da região peitoral e asa de um exemplar do grupo S, imediatamente após a eutanásia

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: Nas posições ventro-dorsal (A) e cranio-caudal (B)

Figura 14 - Imagem radiográfica contrastada de vasos de um exemplar do grupo S, imediatamente após a eutanásia

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: Vasos da região peitoral (setas brancas) e asa (setas amarelas). Posições ventro-dorsal (A) e cranio-caudal (B)

8.5 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

Durante a análise histomorfométrica, foi possível observar a simulação realizada pelo programa de computador, estilizando graficamente cada espécime, o que permitiu a avaliação qualitativa de cada uma das amostras, bem como determinação de se a análise estava completa, englobando todo o tecido, como é possível observar nas figuras 15 A e B. Foi possível inferir que a vascularização foi maior e composta de microvasos em alguns espécimes, como exemplifica a figura 15 A, e mais escassa em outros, como exemplificado na figura 15 B, sendo que o corte transversal do tecido total está representado em azul e os vasos sanguíneos, em verde.

Figura 15 - Imagens obtidas no computador durante o procedimento de mensuração histomorfométrica.

Fonte: Ferraz (2011)

Legenda: Os vasos estão marcados na cor verde (setas). É possível observar a diferença entre um espécime ricamente vascularizado (A) e um com menor vascularização (B)

Os dados obtidos à partir da análise histomorfométrica das lâminas, foram tabulados (Anexo B) e foram obtidos gráficos das médias e desvio padrão para cada parâmetro estudado, que são: 1 - área do tecido total ocupada por vasos (Figura 16), 2 - área total ocupada pelo tecido (Figura 17), 3 - diâmetro médio dos vasos do tecido (Figura 18), 4 - número total de vasos para cada amostra (Figura 19), 5 - porcentagem de tecido ocupado por vasos (Figura 20). Em números absolutos, foi possível observar que todos os parâmetros, exceto a área total de tecido (Figura 17), eram maiores para ambos os grupos E e S, quando comparados ao grupo A, e que em todos os parâmetros, o grupo E apresentava números absolutos maiores do que o grupo S, especialmente para diâmetro (Figura 18) e número total de vasos no tecido (Figura 19). A avaliação da porcentagem de tecido ocupada por vasos (Figura 20) permitiu a comparação proporcional da área ocupada por vasos pelo tamanho da amostra.

Figura 16 - Gráfico da média da área ocupada por vasos (em 10^{-2} centímetros quadrados) no tecido total, para cada grupo (grupo E, grupo S e grupo A) e o desvio padrão observado para cada grupo

Fonte: Ferraz (2012)

Figura 17 - Gráfico da média e do desvio padrão da área total (em 10^{-2} centímetros quadrados) ocupada pelo tecido coletado da região distal do úmero, nos grupos E, S e A

Fonte: Ferraz (2012)

Figura 18 - Gráfico da média e desvio padrão da média de cada amostra do diâmetro dos vasos (em micrômetros) do tecido coletado da região distal do úmero, nos grupos E, S e A

Fonte: Ferraz (2012)

Figura 19 - Gráfico da média e desvio padrão do número total de vasos observados em cada amostra do tecido coletado da região distal do úmero, nos grupos E, S e A

Fonte: Ferraz (2012)

Figura 20 - Gráfico da porcentagem de tecido ocupado por vasos, das amostras de tecido coletadas da região distal do úmero, nos grupos E, S e A

Fonte: Ferraz (2012)

8.6 ESTATÍSTICA

Para avaliação estatística dos dados termográficos, foi utilizado o teste ANOVA com intervalo de confiança de 95%, em populações que seguiam distribuição Gaussiana, passando no teste de normalidade, utilizando-se do método de Kolmogorov e Smirnov. Através do teste de Bartlett, determinou-se que não havia diferenças entre os desvios padrões entre os grupos em ambas as áreas, no pós cirúrgico imediato, aos sete e aos catorze dias.

No pós cirúrgico imediato, a diferença de temperatura nas linhas 1 e 2 entre os grupos E e S não foi significativa com $P > 0.05$, mas entre os grupos com enxerto e controle foi significativa com $P < 0.01$, e entre o grupo sem enxerto e controle foi muito significativa com $P < 0.001$.

Aos sete dias, a diferença de temperatura na linha 1 entre os grupos não foi muito significativa, com $P = 0.0553$, e a diferença entre os desvios padrão não foi significativa. Porém na linha 2, houve diferença significativa entre os grupos com e sem enxerto ($P < 0.05$) e entre os grupos com enxerto e controle ($P < 0.05$), e não houve diferença significativa entre os grupos sem enxerto e controle ($P > 0.05$).

Aos catorze dias, a diferença de temperatura na linha 1 entre os grupos não foi significativa, com $P = 0.3999$, e a diferença entre os desvios padrão também não foi significativa ($P =$

0,1014). Também na linha 2, no mesmo momento, não houve diferença significativa ($P=0,1275$) nem diferença entre desvios padrão ($P=0,1538$).

Para a avaliação estatística da diferença de temperatura entre os dois grupos: com e sem enxerto e o lado contralateral (controle) do próprio animal, foi utilizado teste *t student*, com intervalo de confiança de 95%, em populações que seguiam distribuição Gaussiana, passando no teste de normalidade, utilizando-se do método de Kolmogorov e Smirnov. Através do teste de Bartlett, determinou-se que não havia diferenças entre os desvios padrões entre os grupos em ambas as áreas, no pós cirúrgico imediato, aos sete e aos catorze dias.

A diferença entre os grupos com e sem enxerto não foi significativa no pós cirúrgico imediato ($P=0,6643$ e $P=0,7644$, respectivamente), ou na linha 1 (região de músculo peitoral) nas duas datas ($P=0,2246$ aos sete dias e $P=0,2071$ aos catorze dias), porém na região receptora de enxerto, no bíceps braquial, foi pouco significativa aos sete dias ($P=0,0908$) e significativa aos catorze dias ($P=0,0466$).

Para a avaliação estatística dos dados histomorfométricos, foi utilizado teste *t student* não pareado com intervalo de confiança de 95%, em populações que seguiam distribuição Gaussiana, passando no teste de normalidade pelo método de Kolmogorov e Smirnov.

A área total ocupada por vasos em cada amostra não demonstrou diferença significativa entre os dois grupos, com $P = 0,9871$ ou entre os desvios padrão, com $P = 0,7062$.

A área ocupada pelo tecido, obtida pelo corte transversal das amostras, não demonstrou diferença significativa entre os dois grupos ($P = 0,1663$) ou entre os desvios padrão ($P = 0,1666$).

O diâmetro médio dos vasos observado em cada amostra também não teve diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,3744$, e também os desvios padrões não demonstraram diferença significativa, com $P = 0,2139$.

O número absoluto de vasos demonstrou diferença significativa entre os grupos, com $P = 0,0112$, porém a diferença entre os desvios padrão não foi muito significativa, com $P = 0,0865$.

No que tange a comparação da percentagem da área ocupada por vasos, entre os dois grupos não houve diferenças significantes, com $P = 0,9593$, ou quanto aos desvios padrão entre eles: $P = 0,8177$.

9 DISCUSSÃO

As asas são a parte mais importante do aparato de vôo das aves, e sua cinemática complexa e perfeito controle aerodinâmico fazem o vôo possível e segundo Beaufriere (2009), qualquer condição que afete uma parte específica da asa pode levar a impossibilidades biomecânicas e aerodinâmicas graves durante o vôo. Lesões traumáticas das asas de aves têm causas diversas (BAILEY, 2000; SAMOUR, 2000; BURKE, et al., 2002), e comumente afetam diversos tecidos, incluindo músculos e vasos. Em muitas situações, a vascularização remanescente é inadequada para a manutenção das funções e muitas vezes do próprio membro.

Os enxertos cutâneos, miocutâneos e musculares livres são geralmente bem sucedidos em casos clínicos, não devendo ser utilizados como último recurso (DEGNER; WALSHAW, 1997), Enxertos musculares já foram utilizados em diversas circunstâncias, como enxertos musculares vasculares como método de salvaguardar membros de animais de pequeno porte após lesões traumáticas complicadas (CHAMBERS et al., 1998; LANDRY et al., 2009), como enxerto local, por meio de sua rotação, auxiliando no fechamento de defeitos após excisão de neoplasias (GRADNER et al., 2007), como enxertos miocutâneos vascularizados para auxiliar no tratamento de osteomielite recorrente (DEGNER; WALSHAW, 1997), como enxerto muscular associado à pedículo cutâneo em traumas com grande perda de tecidos moles (PUERTO, 2005), até mesmo enxerto pediculado de diafragma para tratar defeitos de parede esofágica já foi utilizado em cães (PAULO et al., 2007). Enxertos musculares foram também utilizados em outras espécies, como os cavalos, na forma de músculo enervado para restaurar função na afecção de hemiplegia de laringe, com sucesso (FULTON et al., 1991). Baseando-se nesta extensa literatura sobre uso de enxertia muscular em seres humanos, assim como nas diversas descrições de seu uso em casos clínicos de cães, gatos e cavalos, para preenchimento de espaços vazios, assim como para garantir melhor vascularização local, facilitando a chegada de medicamentos, incluindo antibióticos, possibilitando o sucesso de enxertos de pele e ainda melhorando as condições para a consolidação óssea em alguns casos, decidiu-se estudar mais profundamente seu uso em aves. Os enxertos musculares já foram estudados em aves, especificamente os xenoenxertos (LEE et al., 1989) e aloenxertos (HIRONAKA et al., 1984; JAFFREDO et al., 1988) para o estudo de afecções de desenvolvimento, visando a melhor compreensão de tais afecções, mas nunca com o objetivo de fazer seu uso em pacientes que apresentam lesões avasculares, como foi o objetivo deste

trabalho. Esta pesquisa possivelmente permitirá o uso de enxertos musculares em aves nas diversas situações clínicas já descritas em outros animais.

Enxertos musculares têm como vantagem apresentarem suprimento sanguíneo muito rico, aumentando a vascularização local, facilitando a chegada de antibióticos e componentes do sistema imune (GOSAIN et al., 1990), promove a cicatrização de lesões ortopédicas (FISHER; WOOD, 1987; RICHARDS et al., 1989), aumenta a força de união óssea em fases precoces (RICHARDS et al., 1991), auxilia no tratamento de osteomielite e provê barreira física para tecidos recipientes comprometidos, podendo servir como leito para enxertia de pele aguda (ANTHONY; MATHES; ALPERT, 1991; MUSHARAFIEH et al., 1999), sendo que enxertos músculocutâneos têm melhor distribuição de oxigênio para tecidos isquêmicos do que enxertos simples de pele (SMITH et al., 1991; PUERTO, 2005). Não há relatos na literatura do uso de enxertos musculares pediculados em aves, e este trabalho visou demonstrar a aplicabilidade do uso de enxertia muscular como condutor de neovascularização para sítio de lesões na parte distal da região do úmero, possivelmente levando a novos estudos sobre o uso de enxertia muscular em aves.

A abordagem da região do músculo bíceps braquial para excisão de sua porção distal foi simples, e seguindo-se a descrição anatômica de Francenschi et al. (2009), foi possível observar as principais estruturas anatômicas, incluindo a artéria braquial e suas ramificações; artérias radial e ulnar, bem como o nervo radial.

O nervo radial é o mais importante dos componentes do plexo braquial, pois seus ramos estão diretamente envolvidos no ato de voar, ligados ao processo de rotação, elevação e depressão das penas principais e secundárias de vôo e contorno. Este nervo emite ramo, próximo à região braquial, responsável pela inervação do músculo grande dorsal, responsável por tracionar caudalmente o membro torácico e por comandar movimentos realizados durante o vôo (FRANCESCHI et al., 2009). Tomou-se cuidado para não lesar o nervo radial que foi protegido durante a excisão do músculo bíceps braquial, com auxílio de pinça, evitando o contato da lâmina com a estrutura nervosa. Foi necessária muita delicadeza da parte do cirurgião para evitar ao máximo o contato com tal estrutura, e tal precaução é fundamental quando se pretende retorno ao vôo dos animais tratados. Além disto é preciso avaliar a viabilidade do nervo previamente ao ato cirúrgico, pois muitas vezes o trauma em si pode lesá-la, inviabilizando o tratamento como um todo.

Quanto à vascularização, o tronco peitoral, que se bifurca em artérias peitorais cranial e caudal foram preservados, quando da preparação do enxerto. Também a artéria braquial foi preservada, pois esta é responsável pela vascularização da asa distalmente ao úmero, através

de suas ramificações (FRANCESCHI et al., 2009). O trabalho teve como objetivo a avaliação da vascularização intrínseca da musculatura, e acreditamos que a presença de tal vaso, embora faça parte da vascularização da área estudada, era fundamental para a manutenção do membro, e sua remoção culminaria na necessidade de remoção da asa, não só inviabilizando o trabalho como também, em um caso real de lesão desta área, com secção da artéria braquial, determinaria necessidade de amputação do membro.

O protocolo anestésico, bem como o tratamento pós operatório foram adequados para a realização das intervenções cirúrgicas e manutenção após as mesmas, nos animais do experimento, e podem ser utilizados em intervenções cruentas em aves, garantindo bom plano anestésico e boa analgesia respectivamente.

Durante o ato cirúrgico observou-se que o enxerto sofria contratura, ficando, portanto, mais curto. Calfee et al. (2004) indicaram a importancia de se obter enxerto de comprimento suficiente, porém não foram observados relatos sobre a contração muscular transcirúrgica. É importante levar em consideração este fato que demonstrou a necessidade de coleta de enxerto mais longo.

A tunelização do enxerto foi realizada com grande cautela para não lesar importantes estruturas, como plexo braquial e artéria axilar, porém o uso de agulhas hipodérmicas para mobilizar o enxerto poderia ter facilitado tal manobra e diminuído quaisquer lesões ao músculo, causadas pela manipulação. Não foi encontrada citação na literatura sobre tal cuidado.

Observou-se durante o ato cirúrgico que o enxerto manteve cor e sangramento normais, o que demonstrou sua viabilidade e adequada perfusão durante e após a rotação, o que está de acordo com o observado por Chambers et al., (1998).

Sobre a enxertia muscular livre vascularizada, Calfee et al. (2004), inferiram que o músculo utilizado como doador deve ter função dispensável, ser facilmente acessível, ter pedículo vascular confiável e produzir morbidade mínima no sítio doador, após sua remoção. Já sobre enxertos pediculados, Chambers et al. (1998) e Puerto (2005) afirmaram que estes devem ter também, tamanho suficiente para encobrir o defeito da lesão, após sua rotação, sendo o local de doação próximo da lesão, ter vascularização suficiente para suprir o músculo a ser transplantado, além de o músculo doador ser acessível para dissecação. Nosso estudo envolveu o uso de flaps pediculados, que não requerem complexas microanastomoses, necessárias nos enxertos livres microvasculares (CHAMBERS et al., 1998), e seguindo os preceitos estabelecidos pelos diversos autores já citados, optamos pelo uso de enxerto pediculado do músculo peitoral superficial, pois este era pequeno o suficiente para permitir a

síntese dos bordos remanescentes do músculo doador sem tensão importante, porém apresentava tamanho suficiente para encobrir o defeito criado no biceps, após sua rotação, além de estar imediatamente adjacente ao sítio receptor, facilitando seu alcance. Acreditamos a confecção do enxerto não afete a função de vôo,

A rotação do enxerto foi feita rebatendo-se a fáscia sobre a região de excisão, não sendo possível girar o enxerto em seu eixo para evitar que a fáscia ficasse nesta posição, o que garantiria contato do tecido muscular com a área do defeito criado, pois durante os procedimentos cirúrgicos determinou-se que tal manobra culminaria na lesão e possivelmente ruptura do enxerto. Trata-se de músculo ricamente vascularizado, portanto acredita-se, durante o delineamento deste experimento, que seria capaz de garantir fluxo sanguíneo para o sítio receptor, mantendo alta tensão de oxigênio no local, fator considerado importante para Gosain et al. (1990), que ainda destaca que tal característica facilita a chegada de antibióticos e componentes do sistema imune em lesões desvascularizadas.

O uso de sangue heparinizado ou com citrato (FOWLER et al., 1999), não foi considerado necessário, tratando-se de enxerto pediculado. Durante a concepção da técnica, determinou-se que não seria possível basear o enxerto muscular no uso de vaso principal do músculo peitoral para aporte sanguíneo do enxerto, pois o tronco peitoral faz apenas duas ramificações importantes, as artérias peitorais cranial e caudal, que são vitais para a manutenção do músculo peitoral. Determinou-se que o enxerto seria confeccionado sem qualquer vaso principal, e a hipótese era de que somente a vascularização periféria seria suficiente para nutri-lo.

O enxerto preparado foi de comprimento suficiente para atingir a região desejada, e de largura suficiente para manter sua estrutura, e embora quando posicionado sobre o úmero, ocupasse volume importante, não interferiu com a síntese da pele. À necrópsia observou-se que o mesmo apresentava-se reduzido em volume, comparativamente; o que está de acordo com os trabalhos publicados anteriormente que demonstraram que enxertos musculares que inicialmente aparentam ser grandes e grosseiros sofrem atrofia pela denervação, tendendo a diminuir 1% ao dia durante os primeiros dois meses (MATHES; ALPERT; CHANG, 1982 apud DEGNER; WALSHAW, 1997; CHAMBERS et al., 1998).

Calfee et al. (2004) observaram histologicamente em enxertos musculares de cães, alterações compatíveis com atrofia muscular neurogênica. Por nosso estudo tratar de enxerto muscular pediculado, possivelmente a atrofia muscular seja menor, pois é possível que haja manutenção de alguns ramos nervosos, mas mesmo assim, a degeneração muscular observada foi importante em todos os enxertos, inclusive com diminuição de volume de tecidos moles.

Em estudo sobre enxertos livres musculares em pombos, Walro et al. (1982) notaram que poucas fibras musculares originais sobreviveram ao trauma da enxertia, sendo que o músculo doador influencia o padrão de tipos de fibras (contração rápida ou lenta) que são originalmente manifestados, padrão este que é mantido por até quatro meses, mas eventualmente o nervo do sítio receptor modifica tal padrão e as fibras do enxerto assumem características histoquímicas do músculo original removido do sítio receptor. Tal processo ocorre mais rapidamente em aves adultas do que em jovens (HIKIDA, 1981). Porém, foi posteriormente determinado que em aves, um tipo de músculo esquelético, quando enxertado em outro local tem potencial inerente de crescer e coexistir com outros tipos musculares por longo prazo (YAO et al., 1994). Também é sabido que inervação adequada é necessária para a formação de fusos, e fusos originais não sobrevivem a transplantes (MACKENSON-DEAN et al., 1981), porém quando triturado, o enxerto muscular sofre alteração de cadeias leves de miosina, afetando função muscular (SOOD et al., 1996). Nosso estudo não visou a avaliação do tipo de fibras ou presença de fusos no músculo enxertado, porém para a avaliação da capacidade de vôo em animais que recebam enxertos, especialmente a longo prazo, possivelmente seja necessário estudo específico, avaliando tais componentes ao longo do tempo.

Não foi o escopo deste trabalho quantificar o dano causado aos nervos do enxerto durante sua preparação, porém é fato conhecido que o uso de enxertos livres denervados em aves leva à atrofia de fibras, com perda de peso, de proteínas não colágenas e aumento de enzimas líticas, porém, apesar de a regeneração ser mais rápida em enxerto livre muscular com a inervação intacta, a denervação do enxerto livre não influencia em sua regeneração, o que demonstra que mesmo sem avaliação específica das estruturas nervosas, era possível imaginar que isto não influenciaria na regeneração de nosso enxerto (KUMAR et al., 1994).

Biomateriais já foram utilizados para aumentar a resistência de enxertos musculares à tração (FALCÃO et al., 2008), porém em nosso estudo, nenhum material foi utilizado com este propósito, e não foi observada avulsão ou retração do enxerto em nenhum animal.

Em estudo de um caso, para a manutenção adequada de enxerto de pele na face extensora do joelho de um cão, White (1999) fixou a articulação tibio-társica deste membro, em posição flexionada, com flexão automática da articulação do joelho, devido às propriedades de reciprocção destas articulações, com sucesso, e sem causar danos às articulações envolvidas. Em nosso experimento os animais foram mantidos com bandagens por aproximadamente cinco dias para prevenir a movimentação do membro. A bandagem é maneira simples de manter o membro imóvel, bem como de proteger parcialmente a incisão cirúrgica, porém

também pode causar problemas; alguns animais tiveram dificuldade em se adaptar à mesma, tentando tira-la e por vezes prendendo os pés nestas. Na maioria dos casos a bandagem foi efetiva, porém em um dos casos o animal molhou a mesma no bebedouro durante a noite, permanecendo um período de possivelmente até 12 horas com esta molhada. À necropsia, este animal apresentou necrose de parte do enxerto, possivelmente devido à contaminação causada por este incidente (mesmo que tenha sido mantida a antibioticoterapia por tempo prolongado).

Complicações associadas a enxertos vasculares incluem pequenas áreas de necrose no enxerto, auto-traumatismo, presença de hematomas e seroma na região doadora, deiscência da ferida, todas sem maiores consequências para a implantação do enxerto (SMITH et al., 1991; DEGNER; WALSHAW, 1997; CALFEE et al. 2004). As complicações observadas em nosso experimento incluíram necrose parcial de dois enxertos, porém histologicamente, a parte não necrótica destes apresentava grande vascularização. Após alguns dias da cirurgia observou-se deiscência de alguns pontos dos sítios de coleta de enxerto de alguns animais, possivelmente por se tratar de área de muita tensão e que sofria movimentação importante, porém optou-se por não realizar nova síntese, sendo que já havia transcorrido entre 3 a 6 dias, e estas lesões sofreram cicatrização por segunda intenção. Não se observou no sítio de coleta de enxerto destes animais, qualquer alteração importante, como secreção ou necrose da pele. Após a eutanásia, foi possível notar que tais locais apresentavam reação tida como inflamatória e cicatricial semelhante aos locais equivalentes de animais que não apresentaram deiscência de pontos, além de não se tratar da área de principal interesse deste projeto, sendo portanto possível inferir que tal complicação, não alterou os resultados.

Durante a intervenção cirúrgica observou-se pequeno sangramento no leito doador de enxerto, sem correlação com um vaso específico, em alguns animais, sem maiores decorrências, porém dois dos animais apresentaram hemorragia desta região dois dias após a cirurgia. Um dos animais apresentou hemorragia importante, e foi re-operado nesta ocasião, quando fonte específica de sangramento não foi localizada, sendo este atribuído à musculatura, que foi suturada novamente, e não se observou mais sangramento. Após a eutanásia, durante a coleta de material, observou-se que o enxerto deste animal estava parcialmente necrosado, (sendo ele um dos dois animais supra citados, com necrose parcial do enxerto), e apesar de se tratar de região diversa ao enxerto, é possível que tal sangramento tenha feito papel importante no processo de necrose. O segundo animal apresentou sangramento moderado após dois dias, porém optou-se por fazer bandagem compressiva para controlar o sangramento, e tal tratamento foi efetivo, não sendo possível observar traços de sangue na bandagem dentro de poucas horas. Após a eutanásia, durante a coleta de material, o

enxerto estava normal. Foram observados edema, hipertermia e vermelhidão até os sete dias após o ato cirúrgico em todos os animais dos grupos E e S, o que está de acordo com o observado por Burke et al. (2002)

Em estudo para avaliar a implantação de enxerto de músculo livre microvascular e enxerto de pele em tela, em defeito criado no membro pélvico de cães, Calfee et al. (2004) observaram que à eutanásia, em quatro e meia a seis semanas, os enxertos tinham aparência igual à da pele à sua volta, com quantidade moderada de pêlos. Apesar de não ter sido feita avaliação quantitativa, observou-se claramente um maior empenamento na asa contralateral à da cirurgia em todos os animais estudados, possivelmente pela presença de melhor vascularização da pele íntegra. Já às 3 semanas empenamento moderado da região de enxerto dificultou melhor acesso clínico da pele e de tecido subcutâneo, e impossibilitou avaliação termográfica. É sabido que ocorre aumento da vascularização de folículos e papilas das penas, na derme de aves durante a fase de muda de penas (STETTENHEIM, 2000). Estudo específico sobre a relação da neovascularização com o empenamento pode ser importante, para que tal dado possa ser usado como avaliação clínica da enxertia muscular, quando esta técnica for utilizada clinicamente em aves.

O protocolo adotado para a eutanásia dos animais, com tiletamina-zolazepam na dose de 20mg/kg foi considerado satisfatório, levando ao óbito em poucos minutos após a injeção, além de preservar a vascularização, sendo que a injeção intravenosa de qualquer agente que levasse ao óbito do animal, poderia causar danos aos vasos, interferindo com a injeção de contraste.

Nosso estudo anatômico e radioangiográfico foi realizado à partir da injeção de solução de látex com corante e contraste, pois pretendia-se usar as mesmas peças anatômicas para o estudo histológico e radiográfico. O corante verde facilitou a observação a olho nú da perfusão pretendida para o contraste no momento da injeção, o que possibilitou a avaliação imediata da adequação deste para o propósito da angiografia, sendo que era possível visualizar a coloração esverdeada nos vasos atingindo até as extremidades distais dos membros. Azul de Metileno (BENZIONI et al., 2009) e corante eosina (FRANCHESCHI et al., 2009) já foram utilizados para este fim, porém acreditamos que o corante para tecidos é alternativa barata e de fácil aquisição. O látex foi utilizado (SEDLMAYR; WITMER, 2002; HOLLIDAY et al., 2006) como diluente do bário, permitindo sua melhor penetração em vasos sanguíneos pequenos, já que seu uso na forma concentrada o torna muito viscoso e prejudica tal perfusão (BENZIONI et al., 2008). Observou-se que quanto mais rapidamente após a constatação do óbito, fosse feita a abordagem da cavidade celomática e injeção da solução fisiológica

heparinizada no coração, mais fácil era o procedimento seguinte, de injeção de contraste. Só então era realizada abordagem mais ampla da cavidade e incisão do átrio direito.

Determinou-se que se utilizada maior concentração de látex na diluição com o bário, ao exame radiográfico, a visualização era dificultada pelo baixo contraste oferecido, porém com o aumento da concentração de bário era mais difícil a injeção do soluto, que eventualmente não atingia vasos menores. Determinou-se que a maior concentração de bário testada e adição de solução fisiológica (15:15:10 látex:bário:solução fisiológica) combinada à injeção do contraste feita rapidamente e sob pressão, geravam a melhor imagem radiográfica. Se perfundido lentamente, o látex tendia a se solidificar rapidamente, impedindo adequada perfusão, e não observou-se ruptura de vasos decorrente da infusão sob pressão, como foi observado por Benzioni et al. (2008). Notou-se também que a diluição entre os solutos deveria ser feita de maneira lenta e cuidadosa, evitando-se a formação de bolhas, pois estas poderiam causar a presença de microbolhas nos vasos, o que pode ser observado nas imagens radiográficas na forma de lacunas nos vasos. Os espécimes estudados podem ser refrigerados após a injeção da solução de bário, com o intuito de melhor preservar os vasos para a dissecação após obtenção das imagens radiográficas (CALFEE et al., 2004; HOLLIDAY et al., 2006), porém sua refrigeração não é necessária, e maior concentração de látex ajuda na preservação dos vasos sem que estes se tornem mais friáveis (SEDLMAYR; WITMER, 2002; BENZIONI et al., 2008). Em nosso estudo optamos por seguir os estudos de Sedlmayr e Witmer (2002), não refrigerando os espécimes, pois não seria realizada dissecação anatômica dos vasos e consideramos que a concentração de látex seria suficiente para manter a estrutura anatômica dos vasos, especialmente sendo que os espécimes eram frescos e nunca antes congelados.

A análise dos tecidos coletados nos sítios de cirurgia do grupo S, demonstrou que em todos os casos ocorreu cicatrização bastante organizada macroscopicamente, sendo que a falha apresentava-se menor do que a originalmente criada, levando à aproximação do músculo à região de inserção original. Wada et al. (2001) também observaram redução do espaço do defeito de tecido mole, quando da formação de tecido de granulação. Tal formação cicatricial é esperada, porém é possível que isto tenha afetado a amostra coletada na região distal do músculo para análise histomorfométrica. Foi coletado 1cm distal, de comprimento da circunferência total, o que possivelmente englobou parte do músculo bíceps parcialmente degenerado, ao invés do tecido de cicatrização que esperava-se encontrar nesta área, enquanto na amostra coletada dos animais que receberam enxerto, o espécime ateu-se apenas ao enxerto. A comparação se deu portanto entre músculo enxertado e músculo bíceps

degenerado. Em uma situação real de trauma, possivelmente o tecido cicatricial seria maior e menos organizado, e o suprimento sanguíneo menos abundante. Já nos espécimes do grupo E, não foi observada contratura do tecido cicatricial, assim como ocorreu nos estudos de Wada et al. (2001).

À colheita dos espécimes foi possível observar que o músculo bíceps braquial dos animais do grupo S, estava atrofiado, quando comparado aos músculos equivalentes dos animais do grupo E. Durante o processo de cicatrização de lesões, ocorrem três fases principais: inflamatória, proliferativa e de maturação, sendo que a angiogênese é evento proeminente na formação do tecido de granulação e a fase de maturação é caracterizada por restituição do tecido anterior por tecido fibroso conjuntivo (WADA et al., 2001), como foi observado ao final de três semanas após o ato cirúrgico, em todas as aves. No grupo S, observou-se tecido conjuntivo apenas na região distal do músculo, onde foi feita excisão de sua porção distal, e no grupo E, em toda a extensão do enxerto. Haley et al. (2002) estudaram os processos de cicatrização em aves a curto prazo, porém estudos a longo prazo são necessários para determinar precisamente o significado destas alterações observadas nos enxertos deste estudo.

O exame radiográfico contrastado foi utilizado para qualificar a vascularização local do enxerto, além de demonstrar qualquer alteração ou causa de falha do mesmo. Nicoll et al. (1996) observaram, por meio de angiografia de cadáveres, viabilidade de 66 a 100% do enxerto do músculo *latíssimus dorsi* como “flap” livre, sendo que todas as falências foram causadas por trombozes arterial e venosa. Não observamos trombose em nenhum animal, porém a comparação com estes estudos não é direta, já que se tratava de enxerto pediculado, e os principais vasos presentes em nossa área de estudo eram as artérias braquial e subscapular, não excisadas quando da confecção do defeito. Tais vasos são vitais para o membro e não poderiam ser excisados. O estudo visou a avaliar a microvascularização formada na região estudada. Estudo histológico mais aprofundado seria necessário para determinar a presença de microtrombos, porém o estudo histomorfométrico demonstrou importante microvascularização em todos os enxertos, portanto, se presentes tais microtrombos, estes não afetaram correto suprimento sanguíneo. O estudo radiográfico contrastado permitiu determinar que em todos os espécimes coletados, a preparação do enxerto não interferiu com a vascularização principal do músculo doador: músculo peitoral superficial, ainda colaborando com a conclusão de que é um sítio doador viável.

Talvez estudo tomográfico possibilitasse melhor avaliação da microvascularização presente nos espécimes, com auxílio do contraste, oferecendo imagens bidimensionais, ou até

possivelmente utilizar o recurso de reconstrução oferecido por alguns sistemas, o que facilitaria a avaliação qualitativa das amostras.

As imagens radiográficas permitiram apenas a determinação da presença de grandes vasos, que, como discutido anteriormente, não foram excisados. Também o enxerto não foi confeccionado incluindo um vaso principal, mas sim com a expectativa de que garantisse importante microvascularização local, pela presença de vasos menores. Não foi possível visualizar a microvascularização presente nas área de estudo através do exame radiográfico, e portanto, este teve somente a função de garantir patência de vasos principais e secundários, e avaliação qualitativa demonstrou não haver importantes diferenças entre os grupos S e E, o que era esperado, já que em nenhum animal ocorreu necrose de qualquer área que não fosse diretamente pertinente ao estudo, e mesmo nas áreas estudadas, ocorreu apenas necrose parcial do enxerto de dois animais, e esta foi provavelmente relacionada a causas diversas, que não a deficiência vascular do membro.

A termografia é teste não invasivo, indolor e bem tolerado que se baseia na radiação térmica emitida pelos corpos (BENELIYAHU, 1989; HOLST, 2000), porém a dificuldade em estabelecer parâmetros normais como referência é um limitante da técnica (COOK et al., 2005). Utilizamos a asa contralateral para obtenção de parâmetros normais de temperatura das regiões estudadas nos animais.

Esta técnica demonstrou ser importante em humanos, na área de oncologia, para determinar aumento de temperatura em tumores mamários (CHRISTIANSEN, GEROW, 1990), e para determinar diferença de temperatura entre nódulos benignos e malignos em tireóide (ALVES et al., 1988), demonstrando sua eficácia na determinação de alterações superficiais de temperatura causadas por diversos processos patológicos.

Processos inflamatórios, infecciosos, traumáticos ou reumáticos podem aumentar a temperatura dos tecidos, enquanto processos isquêmicos tendem a diminuir sua temperatura (COLLINS, 1974; ANDRADE FILHO, 1999; BRIOSCHI, 2003; CAPRARO et al., 2008; SANCHEZ, 2008). Aparelhos para a aferição da temperatura possibilitam a não utilização de procedimentos bilaterais para a avaliação de fluxo sanguíneo em enxertos (SMITH et al., 1991) e Tenorio et al. (2008) utilizaram a termografia para reconhecer falhas na perfusão de retalhos cutâneos, já que a temperatura da pele é influenciada pela atividade microcirculatória e pela produção de calor conduzida para a superfície, gerada em tecidos mais profundos, até 6 milímetros (BRIOSCHI, 2007). Baseando-nos nestes trabalhos, optamos pela utilização da termografia como método adicional de avaliação clínica da patência do enxerto durante as duas semanas que se seguiram ao procedimento cirúrgico. À segunda semana após a cirurgia,

os animais já apresentavam leve empenamento, porém Loughin e Marino (2007) estudando a influência na temperatura pela presença de pêlos em membros de cães, determinaram que mesmo com sua diminuição, não há impedimento na comparação entre membros contralaterais. Na última semana antes da eutanásia, todos os animais já apresentavam empenamento importante. O arrancamento de penas é processo muito doloroso, podendo ser realizado somente sob anestesia, além disto, ao final de duas semanas foi possível observar que não havia focos de variação importantes de temperatura nos locais de cirurgia, portanto optou-se por não submeter os animais à anestesia com o único fim de coletar imagens termográficas. Imagens termográficas do lado contralateral foram obtidas de todos os animais, para fins comparativos, sendo que a pele possui simetria térmica entre os lados homólogos do corpo (GARCIA, 2004).

Imediatamente após as intervenções cirúrgicas, a temperatura tanto da área doadora de enxerto, quanto na área receptora de enxerto estava diminuída (em média 32°C no grupo S e entre 32,5°C e 33°C no grupo E), não apresentando diferença significativa entre os dois grupos, porém, os dois grupos eram diferentes significativamente do grupo controle (que apresentou temperatura média de 34°C a 35°C) (Anexo C). A temperatura média da pele, mesmo no grupo C, estava abaixo da observada em aves, pois as imagens foram obtidas imediatamente após a intervenção cirúrgica, com os animais ainda voltando de plano anestésico profundo, que geralmente causa diminuição da temperatura dos animais. Como a comparação foi feita diretamente entre os três grupos, nesta situação, tal diminuição não foi levada em consideração. Também a menor média foi observada no grupo sem enxerto, o que seria esperado, pois foi realizada excisão da porção distal do músculo bíceps braquial, permanecendo esta área livre. Em todos os casos, é possível observar temperatura diminuída ao longo das linhas de incisão de ambas as áreas, leito doador de enxerto, e região do bíceps braquial. Tal fato é esperado, pois a intervenção cirúrgica em si causa rupturas de vasos, além da obliteração de vasos pelos fios de sutura.

Aos sete dias após a cirurgia, a temperatura de ambos sítios cirúrgicos do grupo com enxerto foi significativamente mais baixa do que a observada nos sítios cirúrgicos do grupo sem enxerto e dos locais correspondentes do grupo controle (Anexo D). Entre estes dois grupos, não houve diferença significativa. Aos catorze dias não houve diferença significativa entre nenhum grupo (Anexo E).

É interessante, no entanto notar que quando calculamos a diferença de temperatura do membro controle para o membro operado em cada animal, em média, no pós cirúrgico imediato, a temperatura dos grupos E e S estão mais baixas do que do grupo C e (Anexo F), o

que é esperado devido à isquemia gerada pela intervenção cirúrgica em si, já discutida previamente, porém aos sete dias, a temperatura do grupo E foi mais baixa quando comparada ao grupo S, sendo a temperatura do sítio cirúrgico do grupo S semelhante à observada no membro contralateral para cada animal (Anexo G). E ainda aos catorze dias, a temperatura das regiões operadas do grupo E continuava mais baixa do que para a região contralateral correspondente do mesmo animal, porém mais alta do que aos sete dias. Por outro lado, a temperatura do lado operado do grupo S estava de fato mais alta do que para o lado contralateral, como é possível observar no anexo H.

O intuito de avaliar a temperatura ao longo tempo após a cirurgia, para a linha 1 (região peitoral) foi comprovar que este é sítio doador de enxerto adequado, e a comparação entre as temperaturas desta área com a do lado contralateral do mesmo animal demonstrou que nos três momentos: pós cirúrgico imediato ($P=0,6643$), aos sete dias ($P=0,2246$) e aos catorze dias ($P=0,2071$), não houve diferença significativa entre as médias dos grupos E e S, sendo que para esta região, ambos grupos receberam tratamento muito semelhante, portanto era esperado que não houvesse diferenças importantes entre ambos. E com isto é possível inferir que apesar de ser procedimento cruento, a excisão de parte da musculatura para formação do enxerto não apresentou grande morbidade local, sem causar lesões isquêmicas.

Na comparação da diferença de temperatura entre asa operada e não operada de um mesmo animal, imediatamente após a cirurgia, não houve diferença estatística significativa entre a asa do grupo E e a asa do grupo S ($P=0,7644$), porém é possível notar tendência de aumento de temperatura em ambas, aos sete e aos catorze dias. Nas asas do grupo E, em ambos os momentos, a temperatura esteve abaixo da temperatura observada na asa contralateral (C) do mesmo animal, enquanto no grupo sem enxerto, a temperatura esteve acima da do membro contralateral (Anexos F, G e H), sendo que estatisticamente houve diferença um pouco significativa ($P=0,0908$) entre os dois grupos, aos sete dias, e houve diferença significativa ($P=0,0466$) entre os dois grupos aos catorze dias.

A temperatura da asa do grupo E esteve sempre abaixo da temperatura da asa contralateral (C), e é possível que este fato tenha ocorrido pela degeneração do enxerto, com substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo, o que foi observado macroscopicamente. Apesar de a temperatura estar mais baixa ao longo do tempo, não foi possível imaginar que haja necrose muscular, o que foi constatado microscopicamente, quando foi constatada vascularização abundante, que garantiu a sobrevivência do tecido. Avaliação a prazo mais longo é necessária para acompanhar as possíveis alterações que ocorrem neste enxerto, e determinar melhor o padrão de temperatura ao longo do tempo.

A temperatura da asa sem enxerto, por sua vez, aos sete e aos catorze dias, esteve sempre acima da temperatura da asa contralateral do mesmo animal. A presença de musculatura à avaliação microscópica pode estar, em parte, associada a este processo, mas isto não responderia ao aumento da temperatura acima da considerada normal (grupo C). Possivelmente isto se deu por processo inflamatório exacerbado no local. Estudos mais específicos sobre processos inflamatórios em músculos de aves são necessários para determinar a causa deste fato. A avaliação termográfica em nosso estudo foi utilizada meramente para determinar a patência do enxerto no grupo E ao longo de duas semanas, antes da eutanásia dos animais.

A termografia pode ser modalidade diagnóstica importante na avaliação de enxertos de maneira não invasiva, quando a técnica de enxertia muscular em aves for usada clinicamente.

Quando da preparação das lâminas histológicas, foi possível observar que todas as amostras do grupo S apresentavam tecido muscular compatível com músculo normal, não degenerado (Anexos M e N). Por precaução, foi realizado novo corte histológico, para garantir que o material a ser estudado seria apenas o tecido fibroso formado no defeito criado no local, porém, mesmo após aprofundar os cortes (distanciando estes do local inicial da excisão), observou-se exatamente o mesmo tipo de tecido. Apesar de não haver nenhum trabalho em aves para corroborar o fato, acreditamos se tratar de processo de recuperação das aves, a contratura da cicatriz, com aproximação dos tecidos adjacentes, no caso, provavelmente o próprio biceps braquial, com a finalidade de preencher o espaço vazio, e suprir a função mecânica de apoio do músculo, para permitir sua contração.

Talvez novo trabalho para determinar se a criação de defeito maior causaria então o preenchimento do espaço por tecido fibroso apenas, e não por músculo adjacente.

O mesmo não ocorreu no grupo E, sendo que em nenhuma lâmina foi observado tecido muscular intacto. Foi observado tecido muscular levemente degenerado em algumas áreas (Anexo I), e na maior parte das lâminas, observou-se tecido muscular permeado por tecido conjuntivo (Anexos I e J), denotando maior degeneração nestas áreas. Também foi possível observar grande vascularização, especialmente nestas regiões (Anexo L).

Foi possível observar grande vascularização das amostras tanto do grupo E quanto do grupo S, e em ambos os casos, a vascularização pareceu maior do que para o grupo A (Anexo K). É possível inferir que o processo inflamatório em si provavelmente cause estímulo para que ocorra neovascularização nas aves, e tenha portanto causado não só aumento nas amostras do grupo E, como também no tecido muscular observado no grupo S, que era maior do que a vascularização observada no músculo sem tratamento algum, do grupo A.

A coloração Masson para espécimes histológicos já foi utilizada em diversos trabalhos para avaliação muscular (HU et al., 2010; KAKIZAKI et al., 2011; FANBIN et al., 2011; ZHANG et al., 2012; GAO et al., 2012) e em nosso trabalho foi técnica adequada, facilitando a visualização dos vasos, o que permitiu seu delineamento durante a avaliação histomorfométrica.

A histomorfometria permite a mensuração de componentes morfológicos (ERIKSEN; AXELROD; MELSON, 1994), sendo área, perímetro e área total de tecido (YINGLING et al., 2007) alguns dos parâmetros que podem ser avaliados. Em nosso trabalho foram mensurados o diâmetro, área e número de vasos, avaliação fundamental para determinação da vascularização dos espécimes estudados. Para as mensurações, é necessário computador com software específico interconectado a microscópio e câmera de alta resolução, que mostra a imagem do espécime em monitor colorido, e sistema que permite que com o movimento de uma caneta ou mouse, o traçado do espécime seja super imposto na tela. Assim a região de interesse é traçada e o comprimento da linha e área são calculados pelo software (WESTERLIND et al., 1997; YINGLING et al., 2007). Nós utilizamos o sistema OsteoMeasure®, com o uso de mouse em placa Mercury 100®, sistema de fácil utilização, que possibilitou as mensurações sem dificuldades.

O intuito de coletar dados do grupo A foi apenas de padronizar a técnica de avaliação e como comparativo para os dois grupos deste estudo, e tais dados foram expostos nos gráficos (Figuras 16, 17, 18, 19, 20) meramente para demonstração de dados basais. Contudo não foi realizada comparação com fins estatísticos entre este grupo e os dois outros, devido ao número amostral ser muito baixo ($n = 2$). Possivelmente para futuras comparações, seja interessante a coleta de dados histomorfométricos da vascularização de espécimes normais, para comparação direta, e, então sim, avaliação estatística.

Não houve diferença significativa entre a área total de tecido de cada amostra. Este dado é simplesmente a mensuração da área do corte transversal do tecido que correspondia à 1cm distal do músculo biceps braquial, fosse este tecido a parte final do enxerto (no grupo com enxerto) ou o tecido observado na mesma região de onde foi excisada parte do músculo bíceps braquial (no grupo S). Tal dado foi obtido apenas para servir como base para outros dados obtidos (porcentagem de tecido ocupado por vasos). É interessante observar que apesar da semelhança estatística, o grupo S é menor dos que os outros dois, e isto foi observado macroscopicamente quando da coleta do material. Tal fato é esperado por se tratar de região de onde foi retirado o músculo que recobria o osso, sem substituição por qualquer outro tecido, permanecendo assim, uma área vazia, até que fosse preenchida por tecido cicatricial.

Não houve diferença significativa entre as médias dos diâmetros dos vasos para cada amostra (Figura 18) ou entre as médias da área ocupada por vasos no tecido total, de cada amostra (Figura 16), entre os dois grupos, mas é importante salientar que estes dados demonstram apenas a média para cada espécime, ou seja, uma amostra com um vaso de grande calibre e muitos de pequeno calibre, apresentaria resultado semelhante a uma amostra com alguns vasos de médio calibre. É possível imaginar que isto ocorreu, quando comparado ao dado de número absoluto de vasos por amostra (Figura 19).

Houve diferença significativa entre os dois grupos, quanto ao número absoluto de vasos presentes na amostra, sendo que o grupo E apresentou quantidade muito elevada de vasos em relação ao grupo S, e ainda ao grupo A (não foi realizada comparação estatística com o último) (Figura 19). É possível que este número tão elevado, especialmente quando comparando-se aos dados da porcentagem de tecido ocupada por vasos, demonstre grande quantidade de vasos de pequeno calibre (Anexo L) (enquanto o grupo S provavelmente apresentou menos vasos, sendo estes de maior calibre), o que nos leva a crer tratar-se de neovascularização do tecido.

Não houve diferença significativa na comparação da porcentagem da área ocupada por vasos entre os grupos E e S, porém é possível inferir que ambos os grupos apresentaram aumento na porcentagem de tecido ocupado por vasos, quando comparados a espécimes normais, observando os resultados do grupo A (Figura 20). Este dado é interessante, pois permite a comparação direta da vascularização presente no tecido, independentemente de se tratarem de poucos vasos de maior calibre, ou muitos vasos de pequeno calibre.

A preparação, passagem e fixação do enxerto muscular pediculado são técnicas que exigem destreza e delicadeza, porém são factíveis.

Pelas observações clínicas, termográficas e histomorfométricas, é possível inferir que a lesão causada no grupo S foi eficientemente controlada por processos cicatriciais dos animais. Possivelmente por se tratar de lesão fresca e limpa, realizada cirurgicamente, mas ainda, apesar de o defeito provocado pela excisão perfazer aproximadamente um quarto do comprimento total do músculo, talvez não ser de tamanho suficiente, a cicatrização natural dos animais foi suficiente, especialmente pelo processo de contratura do tecido cicatricial, aproximando músculos adjacentes, para garantir vascularização adequada e manutenção de funções mínimas de movimentação da asa (sendo que a função de vôo não foi avaliada). Por estas observações, acredito que em situação semelhante, o uso de enxerto não seria indicado.

Por outro lado, em muitas situações clínicas, observei lesão grave de tecidos musculares que impediu consolidação óssea, fechamento de pele e até a necrose de tecidos moles

adjacentes à lesão, por desvascularização local, que teriam sido beneficiados por enxerto muscular que melhorasse a circulação sanguínea local.

10 CONCLUSÕES

Frente ao método empregado e os resultados obtidos, é lícito afirmar-se que:

A técnica cirúrgica estudada não causa dor ou mortificação incompatíveis com a qualidade de vida do animal, não sendo impeditiva sua utilização.

A termografia foi técnica adequada e não invasiva para a avaliação dos enxertos musculares pediculados nas aves e que não houve diminuição importante da temperatura que indicaria desvascularização ou necrose do enxerto.

A angiografia possibilitou a avaliação da manutenção de vasos principais nas regiões de campos cirúrgicos.

A histomorfometria foi exame importante para determinar a ocorrência de neovascularização do enxerto muscular pediculado.

Considerando-se observações clínicas, alterações *post mortem*, resultados de termografia, radiográficos e especialmente histomorfométricos, é possível afirmar que o enxerto permaneceu viável em todas as aves, apresentando neovascularização importante.

A utilização de enxertos musculares em aves como meio de garantir vascularização a locais desvascularizados é possível, mas ainda há muitos fatores a serem estudados e muitas perguntas a serem respondidas, inclusive quanto ao funcionamento dos processos cicatriciais das aves, sendo um trabalho inicial visando expandir o universo das referências de aves e nossas ferramentas no tratamento desta classe de animais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. L. D.; ANDRADE, J.; CHERRI, J.; MORIYA, T.; PICCINATO, C. E.; OKANO, N.; VELLUDO, M. A. L.; IAZIGI, N. Papel da termografia da seleção de nódulos tireoideanos de indicação cirúrgica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 32, n. 4, p. 97-99, 1988.
- ANDRADE FILHO, A. C. Teletermografia: princípios físicos, fisiológicos e fisiopatológicos da produção da imagem e suas indicações na clínica de dor e reabilitação. **Acta Fisiátrica**, v. 6, n. 2, p. 55-59, 1999.
- ANTHONY J.P.; MATHES S.J.; ALPERT B.S.: The muscle flap in the treatment of chronic lower extremity osteomyelitis: Results in patients over 5 years after treatment. **Plastic and Reconstructive Surgery Journal**, v. 88, p. 311–318, 1991
- BAILEY, T. A., Wounds, In: Samour, J.; **Avian Medicine**, China: Mosby, 2000, p.166 – 169
- BEAUFREERE, H., A review of biomechanic and aerodynamic considerations of the avian thoracic limb. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 23, n. 3, p. 173-185, 2009
- BENELIYAHU, D. J. Thermography in the diagnosis of sympathetic maintained pain. **American Journal of Chiropractic Medicine**, v. 2, n. 2, p. 55-60, 1989.
- BENZIONI, H.; SHAHAR, R.; YUDELEVICH, S.; SHIPOV, A.; MILDRAH, J.: Lateral thoracic artery axial pattern flap in cats. **Veterinary Surgery**, v. 38, n. 1, p. 112-116, 2009.
- BRIOSCHI, M. L.; MACEDO, J. F.; MACEDO, R. A. C. Termometria cutânea: novos conceitos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, n. 2, p. 151-160, 2003.
- BRIOSCHI, M. L.; YENG, L. T.; PASTOR, E. M. H.; COLMAN, D.; SILVA, F. M. R. M.; TEIXEIRA, M. J. Documentação da síndrome dolorosa miofascial por imagem infravermelha. **Acta Fisiátrica**, v. 14, n. 1, p. 41-48, 2007.
- BURKE, H. F.; SWAIM, S. F.; AMALSADVALA, T. Review of wound management in raptors; **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 16, n. 3, p.180-191, 2002.
- CALFEE, E. F.; LANZ, O. I.; DEGNER, D. A.; PETERSON, S. L.; DUNCAN, R. B.; BROADSTONE, R.V.; MARTIN, R. A.; AUSTIN, B.: Microvascular free tissue transfer of the rectus abdominis muscle in dogs, **Veterinary Surgery**, v. 31, n. 1, p.32-43, 2004.
- CAPRARO, G. A.; NATHARSON, B. H.; JASIENOWSKI, S.; REISER, M.; BLANK, F. S. Can the heat of localized soft tissue infections be quantified non-invasively using an infrared thermography camera? **Annals of Emergency Medicine**, v. 52, n. 4, p. 157, 2008.
- CHAMBERS, J. N.; PURINTON, P. T.; ALLEN, S. W.; SCHNEIDER, T. A.; SMITH, J. D.: Flexor carpi ulnaris (humeral head) muscle flap for reconstruction of distal forelimb injuries in two dogs, **Veterinary Surgery**, v. 27, p. 342-347, 1998.

CHRISTIANSEN, J.; GEROW, G. **Thermography** Baltimore: Williams & Wilkins, 1990.

COLLINS, A. J.; RING, E. F. J.; COSH, J. A.; BACON, P. A. Quantitation of thermography in arthritis using multi-isothermal analysis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 33, p. 113-115, 1974.

COOK, R. J.; THAKORE, S.; NICHOL, N. M. Thermal imaging – a hotspot for the future? A case report. **Injury Extra**, v. 36, p. 395-397, 2005.

DEGNER, D. A., WALSHAW, R.: Medial saphenous fasciocutaneous and myocutaneous free flap transfer in eight dogs. **Veterinary Surgery**, v. 26, n. 1, p. 20-25, 1997.

ERIKSEN, E. F.; AXELROD, D. W.; MELSEN, F. **Bone histomorphometry**, New York Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

FALCÃO, S. C.; JOAQUIM EVÊNCIO, J. N.; COELHO, A. R. B.: Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats; **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.23 n.1, 2008

FANBIN, M.; JIANGHAI, C.; JUAN, L, YANG, W.; YUXIONG, W.; YANHUA, C.; TAO, L.; ZHENBING, C. Role of transforming growth factor- β 1 in the process of fibrosis of denervated skeletal muscle. J Huazhong. **University of Science and Technology- Medical Sciences**, v. 31, n. 1, p. 77-82, 2011

FISHER, J.; WOOD, M. B.: Experimental comparison of bone revascularization by musculocutaneous and cutaneous flaps. **Plastic Reconstructive Surgery**, v. 79, p. 81–90, 1987.

FOWLER, J. D.; LI, X.; COOLEY, B. L. Brief ex vivo perfusion with heparinized and/or citrated whole blood enhances tolerance of free muscle flaps to prolonged ischemia. **Microsurgery**, v. 19, n. 3, p. 135-140, 1999.

FRANCESCHI, R. C.; SOUZA, D. A. S.; PROVENCIO, M.; PEREIRA, M. A. M.: Estudo da inervação e vascularização do membro torácico de *Columba livia*, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 507-514, 2009.

FULTON, A. C.; DERKENSEN, F. J.; STICK, J. A.; ROBINSON, N. E.; WALSHAW, R.: Treatment of left laryngeal hemiplegia in Standardbreds, using nerve muscle pedicle graft. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n.9, p. 1461-1467, 1991.

GARCIA, D.R.: Validação da termografia no diagnóstico de lesões por esforços repetitivos/distúrbios osteomusculares relacionadas ao trabalho. 2004. 78p. Dissertação (mestrado) Ciências do Movimento Humano, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GAO H. Y.; LI G. Y.; LOU M. M.; LI X. Y.; WEI X. Y.; WANG J. H.: Hepatoprotective effect of Matrine salvianolic acid B salt on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis. **Journal of Inflammation**. v. 9, n. 16, 2012.

GOSAIN A.; CHANG N.; MATHES S.; A study of the relationship between blood flow and bacterial inoculation in musculocutaneous and fasciocutaneous flaps. **Plastic Reconstructive Surgery**, v. 86, p. 1152–1162, 1990.

GRADNER, G.; WEISSENBOCK, H.; KNEISSL, S.; BENETKA, V.; DUPRE, G. Use of latissimus dorsi and abdominal external oblique muscle for reconstruction of a thoracic wall defect in a cat with feline osteochondromatosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 88-94, 2008.

HIKIDA R. S. Tenotomy of the avian anterior latissimus dorsi muscle. II. Can regeneration from the stump occur in the pigeon? **American Journal of Anatomy**, v. 160, n. 4, p. 409-418, 1981.

HIRONAKA, T.; IKARI, Y.; MIYATA, Y.; MORIMOTO, S.; TSUNOO, A.: Transplantation of extensor carpi radialis longus muscle in normal and dystrophic chicks; **Experimental Neurology**, v. 83, n. 2, p.392-402, 1984.

HOLLIDAY, C. M.; RIDGELY, R. C.; BALANOFF, A. M.; WTIMER, L. M.: Cephalic vascular anatomy in flamingos (*Phoenicopterus ruber*) based on novel vascular injection and computed tomographic imaging analyses, **The Anatomical Record** v. 288A, p. 1031-1041, 2006.

HOLST, C. G. **Common sense approach to thermal imaging**. Washington, SPIE Optical Engineering Press, 2000.

HU, N.; STRAUB, C. M.; GARZARELLI, A. A.; SABEY, K. H.; YOCKMAN, J. W.; BULL, D. A. Ligation of the left circumflex coronary artery with subsequent MRI and histopathology in rabbits. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Sciences**, v. 49, n. 6, p. 838-44, 2010.

JAFFREDO, T.; HORWITZ, A. F.; BUCK, C. A.; RONG, P. M.; DIETERLEN-LIEVRE, F. Myoblast migration specifically inhibited in the chick embryo by grafted CSAT hybridoma cells secreting an anti-integrin antibody; **Development**, v. 103, n. 3, p. 431-446, 1988.

KAKIZAKI, H.; IKEDA, H.; NAKANO, T.; SELVA, D.; LEIBOVITCH, I. Junctional variations of the levator palpebrae superioris muscle, the levator aponeurosis, and Müller muscle in Asian upper eyelid. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 27, n. 5, p. 380-383, 2011.

KUMAR, P.; KATOCH, S. S. Effects of denervation and nerve crushing on chicken muscle; **Indian Journal of Experimental Biology**, v.32, n. 6, p.396-401, 1994.

LANDRY, G. J.; CARLSON, J. R.; LIEM, T. K.; MITCHELL, E. L.; EDWARDS, J. M.; MONETA, G. L.: The sartorius muscle flap: an important adjunct for complicated femoral wounds involving vascular grafts; **American Journal of Surgery**, v. 197, n. 5, p. 655-659, 2009

LEE, K. K.; EDE, D. A. A study on skeletal myogenic cell movement in the developing avian limb bud; **Anatomy and Embryology**, v. 180, n. 3, p. 293-300, 1989.

- LOUGHIN, C. A.; MARINO, D. J.: Evaluation of thermographic imaging of the limbs of healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 10, p. 1064-1069, 2007.
- MACKENSON-DEAN, C. A.; HIKIDA, R. S.; FRANGOWLAKIS, T. M. Formation of muscle spindles in regenerated avian muscle grafts. **Cell Tissue Research**, v. 217, n. 1, p. 37-41, 1981.
- MUSHARAFIEH, R.; OSMANI, O.; MUSHARAFIEH, U.: Efficacy of microsurgical free-tissue transfer in chronic osteomyelitis of the leg and foot: Review of 22 cases. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 15, p. 239–244, 1999.
- NICOLL, S. A.; FOWLER, J. D.; REMEDIOS, A. M.; CLAPSON, J. B.; GEORGE, D. Development of a free latissimus dorsi muscle flap in cats. **Veterinary Surgery**, v. 25, p. 40-48, 1996.
- PAULO, N. M.; MIRANDA, W.; ATAYDE, I. A.; SIQUEIRA, J. T. J.; AZEVEDO, E. M. R.; LIMA, F. G.; FRANCO, L. G.; FARIA, C. M. C. Reconstruction of thoracic esophagus with pediculated diaphragmatic flap in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 8-11, 2007
- PUERTO, D. A.; ARONSON, L. R. Use of a Semitendinosus Myocutaneous Flap for Soft-Tissue Reconstruction of a Grade IIIB Open Tibial Fracture in a Dog, **Veterinary Surgery**, v. 33, n. 6, p. 629-635, 2005.
- RICHARDS, R. R.; SCHEMITSCH, E. H. Effect of muscle flap coverage on bone blood flow following devascularization of a segment of tibia: An experimental investigation in the dog. **Journal of Orthopedic Research**, v. 7, p. 550–558, 1989
- RICHARDS R. R.; McKEE M. D.; PAITICH C. B.; ANDERSON, G. I.; BERTOIA, J. T. A comparison of the effects of skin coverage and muscle flap coverage on the early strength of union at the site of osteotomy after devascularization of a segment of canine tibia. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 73, p. 1323–1330, 1991.
- SAMOUR, J. Trauma-related medical conditions: wing tip injuries, In: SAMOUR, J. **Avian Medicine**, China: Mosby 2000, p. 124 -124.
- SANCHEZ, B. M.; LESCH, M.; BRAMMER, D.; BOVE, S. E.; THIEL, M.; KILGORE, K. S.: Use of a portable thermal imaging unit as a rapid, quantitative method of evaluating inflammation and experimental arthritis. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 57, p. 169-175, 2008.
- SEDLMAYR, J. C.; WITMER, L. M. Rapid technique for imaging the blood vascular system using stereoangiography, **The Anatomical Record**, v. 267, p. 330-336, 2002.
- SMITH, M. M.; PAYNE, J. T.; MOON, M. L.; FREEMAN, L. E. Axial pattern flap based on the caudal auricular artery in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 6, p. 922-925, 1991.
- SOOD, A.; MALHOTRA, R. K. Myosin light chains in regenerating graft in chick gastrocnemii. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 34, n. 8, p. 799-801, 1996.

STETTENHEIM, P. R. The Integumentary Morphology of Modern Birds - An Overview. **Integrative and Comparative Biology**, v. 40, n. 4, p. 461-477, 2000.

TENORIO, X.; MAHAJAN, A. L.; WETSTEIN, R.; HARDER, Y.; PAWLOVSKI, M.; PITTET, B. Early detection of flap failure using a new thermographic device. **Journal of Surgical Research**, v. 151, n. 1, p. 15 – 21, 2009.

ZHANG, Y.; HU, N.; HUA, Y.; RICHMOND, K. L.; DONG, F.; REN J. Cardiac Overexpression of Metallothionein Rescues Cold Exposure-Induced Myocardial Contractile Dysfunction through Attenuation of Cardiac Fibrosis Despite Cardiomyocyte Mechanical Anomalies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 2, p. 194-207, 2012.

WADA, T.; OKAMOTO, K.; NAKANISHI, Y.; IWAGAMI, Y.; MORITA, N. Myofacial flap without skin for intra-oral reconstruction 1: animal studies, **International Journal of Clinical Oncology**, v. 6, p. 40-44, 2011.

WALRO, J. M.; HIKIDA, R. S.; FRANGOWLAKIS, T. M.: Patterns of avian muscle fiber type regeneration. Evidence for a myotrophic influence, **Journal of Neurologic Sciences**, v. 55, n. 3, p. 327- 338, 1982.

WESTERLIND, K. C.; WRONSKI, T. J.; RITMAN, E. L.; LUO, Z. P.; AN, K. N.; BELL, N. H.; TURNER, R. T. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 4199-4209, 1997.

WHITE, R. N. Management of a proximal pelvic limb skin laceration in a dog using a skin flap and an external fixator, **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, p. 84-87, 1999.

YAO, Y.; KIRINOKI, M.; HIRABAYASHI, T. Persistent expression of tissue-specific troponin T isoforms in transplanted chicken skeletal muscle, **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 15, n. 1, p. 21-28, 1994.

YINGLING, V. R.; XIANG, Y.; RAPHAN, T.; SCHAFFLER, M.; KOSER, K.; MALIQUE, R.: The effect of a short-term delay of puberty on trabecular bone mass and structure in female rats: A texture-based and histomorphometric analysis, **National Institute of Health Public Access**, v. 40, n. 2, p. 419 – 424, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A - Hemograma pré operatório dos animais utilizados para o experimento

Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ref.
Eritrócitos (x10⁶ /μL)	3,35	3,16	2,91	3,44	3,07	2,11	****	3,18	1,82	2,45	3,1	2,84	2,65 - 4,59
Hemoglobina (g/dL)	11,0	10,9	7,3	13,0	8,8	8,9		9,9	4,0	9,1	10,7	10,3	11,2 - 18,0
Hematócrito(%)	50	49	48	55	47	50		51	28	48	53	51	43 - 53
V.C.M. (fl)	149,3	155,1	164,9	159,9	153,1	237,0		160,4	153,8	195,9	171,0	179,6	100,9 - 191,1
H.C.M. (pg)	32,8	34,5	25,1	37,8	28,7	42,2		31,1	22,0	37,1	34,5	36,3	33,5 - 59,9
C.H.C.M. (g/dL)	22,0	22,2	15,2	23,6	18,7	17,8		19,4	14,3	19,0	20,2	20,2	22,7 - 35,3
Obs.	*	*	*	*	*	*		*	***	*	*	*	
	**	**	**	**	**	**		**	**	**	**	**	
Leucócitos (x10³ /μL)	8,0	24,5	14,5	15,5	18,5	8,5		17,5	24,5	28,0	17,0	7,5	4,83 - 24,16
Heterófilos	2,08	3,19	7,11	1,86	10,18	2,30		5,43	18,87	14,84	5,61	2,55	0,08 - 11,75
Linfócitos típicos	5,52	20,58	7,25	13,49	7,77	5,02		11,9	5,64	12,6	10,71	4,88	1,95 - 13,35
Linfócitos atípicos	0,0	0,25	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0	0,17	0,0	-
Eosinófilos	0,32	0,25	0,0	0,16	0,37	0,6		0,0	0,0	0,28	0,0	0,0	0 - 1,53
Monócitos	0,08	0,25	0,15	0,0	0,19	0,6		0,0	0,0	0,28	0,51	0,08	0 - 2,19
Basófilos	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0		0,18	0,0	0,0	0,0	0,0	0 - 0,73

Fonte: Ferraz (2013)

* Eritrócitos jovens(+), hematozoário sugestivos de *Haemosporida* (+)

** Inclusões citoplasmáticas linfocitárias

*** Eritrócitos jovens (+++)

**** A amostra do animal 7 coagulou e não foi possível sua avaliação

Apêndice B - Dados brutos dos dados: área total dos vasos, área total do tecido, diâmetro médio dos vasos, número total de vasos, percentagem da área de tecido ocupada por vasos; obtidos à partir da avaliação histomorfométrica dos espécimes de cada animal, dividido por grupos com enxerto (E), sem enxerto (S) e controle anatômico (A)

		Área total dos vasos	Área total do tecido	Diâmetro médio dos vasos	Número total de vasos	Percentagem da área de tecido ocupada por vasos
Grupo enxerto (E)	1	1.1727	86.017	1215.7	384	1.363335155
	4	0.0812	85.5768	210.4	28	0.09488553
	5	0.1866	88.3874	291.4	361	0.211116064
	6	0.4423	78.0993	469.8	216	0.5663303
	7	0.3476	85.4931	616.9	224	0.40658252
	8	0.68	77.3663	3284.6	348	0.878935661
Grupo sem enxerto (S)	2	0.5676	82.8292	168.7	64	0.685265583
	3	0.9233	76.9462	185.4	7	1.199929301
	9	0.2743	81.8685	18.4	85	0.3350495
	10	0.0805	78.3905	148	36	0.102691015
	11	0.2575	79.8742	872.3	176	0.322381946
	12	0.7863	82.1852	1662.5	81	0.956741603
Grupo controle anatômico (A)	1	0.1975	84.1693	545.6	24	0.234646124
	2	0.1599	81.469	25.4	28	0.196270974

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice C - Temperaturas (em graus Célcus) obtidas através do exame termográfico da região doadora de enxerto (linha 1), da região receptora de enxerto, na asa (linha 2), e de suas regiões correspondentes no lado contralateral. Temperatura mínima e máxima observadas nesta região, bem como a média de todos os pontos nos grupos E, S e C. Pós cirúrgico imediato

Animal		Cirurgia						Contralateral					
		Linha 1			Linha 2			Linha 1			Linha 2		
		min	máx	média	min	máx	média	min	máx	média	min	máx	média
Enxerto (E)	1	29.4	32.7	31.5	31.2	33.4	32.4	33.3	35	34.2	34.2	34.8	34.6
	4	30.7	35.4	33.5	33	36.4	34.8	35.5	37.4	36.6	36.3	37.8	37.1
	5	33.5	36.8	35	34	36.9	35.2	36.4	37.6	37	37	37.7	37.5
	6	29.3	32.8	30.9	29	33.8	31.1	33.4	34.2	33.9	33.2	34.6	34.3
	7	31.5	34.2	32.5	30.3	34.4	32.2	34.7	35.6	35.4	33.9	36.2	35.4
	8	30.6	33.4	32.1	30.6	32.6	31.9	32.1	33.3	33	33.5	34.7	34.2
	Média	30.83	34.2	32.5	31.3	34.5	32.9	34.2	35.5	35.0	34.6	35.9	35.5
Sem enxerto (S)	2	31.6	34.8	33.2	31.6	34.7	33.2	33.7	35.4	35.1	34.5	35.1	34.8
	3	29.5	35.2	32.8	31	33.3	32.1	33.5	35.2	34.8	35	35.5	35.3
	9	30.4	33.9	32.1	31.7	34.4	32.7	34.2	34.9	34.6	32.9	35.3	34.5
	10	29.1	32.8	31.1	29.6	32.3	30.6	32.9	34	33.6	33.4	34.3	33.8
	11	28.9	32.3	31	28.9	33.1	30.6	33.3	34.1	33.7	33.7	34.6	34.1
	12	30.7	33.5	32.1	32.8	34.3	33.7	33.7	34.9	34.1	34.8	35.3	35.1
	Média	30.0	33.7	32.0	30.9	33.6	32.1	33.5	34.7	34.3	34.0	35.0	34.6

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice D - Temperaturas (em graus Célcus) obtidas através do exame termográfico da região doadora de enxerto (linha 1), da região receptora de enxerto, na asa (linha 2), e de suas regiões correspondentes no lado contralateral. Temperatura mínima e máxima observadas nesta região, bem como a média de todos os pontos nos grupos E, S e C. Após sete dias da cirurgia

Animal		Cirurgia						Contralateral					
		Linha 1			Linha 2			Linha 1			Linha 2		
		min	máx	média	min	máx	média	min	máx	média	min	máx	média
Enxerto (E)	1	36.5	39.3	38.1	36.2	39.1	37.8	3.7	39.5	38.8	36.3	39.7	39
	4	34.3	38.3	37	34.8	39.6	37.9	37.1	39.1	38.1	25.9	38.6	36.8
	5	32.9	38.7	37.5	33.5	39.8	37.6	37.5	39.4	38.7	37.3	40	39.4
	6	39.6	41.1	40.3	37.7	40.2	39.4	39.6	41	40.2	37.1	41	40.1
	7	35.4	39.4	38.2	33.8	40.3	37.3	36.6	40.5	39.8	38.2	41.1	40.7
	8	35.7	39.5	38.8	37.3	40.3	39	38.1	41	39.8	38.2	41.2	40.7
	Média	35.7	39.3	38.3	35.5	39.8	38.1	32.1	40.0	39.2	35.5	40.2	39.4
Sem enxerto (S)	2	36.5	39.6	38.5	38.2	39.6	38.9	38.3	39.9	39.3	35.9	39.9	39.2
	3	38.6	41	40	36.3	39.8	39.2	38.1	39.9	39.1	38	40.6	39.9
	9	38.3	41.1	39.8	36.6	41.5	40.1	39.5	40.6	40.3	36.9	41.2	40.3
	10	37.7	39.3	38.4	39.7	40.6	40.2	38.8	40	39.5	38.5	40.5	39.8
	11	36.5	40.3	38.6	39.7	40.5	40.3	38.5	39.4	38.9	35.6	40.3	39.6
	12	36.7	40.1	39.1	38.7	40.8	39.8	39.2	40.5	39.9	37.4	40.8	40.2
	Média	37.3	40.2	39.0	38.2	40.4	39.7	38.7	40.0	39.5	37.0	40.5	39.8

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice E - Temperaturas (em graus Célcus) obtidas através do exame termográfico da região doadora de enxerto (linha 1), da região receptora de enxerto, na asa (linha 2), e de suas regiões correspondentes no lado contralateral. Temperatura mínima e máxima observadas nesta região, bem como a média de todos os pontos nos grupos E, S e C. Após catorze dias da cirurgia

Animal		Cirurgia						Contralateral					
		Linha 1			Linha 2			Linha 1			Linha 2		
		min	máx	média	min	máx	média	min	máx	média	min	máx	média
Enxerto (E)	1	36.3	38.5	37.5	35.1	38.2	37.1	33.7	39.6	38.3	37.4	39.5	38.8
	4	36.8	39.9	38.9	29.6	40.2	37.8	31.9	40.2	36.6	34.6	39.9	38.8
	5	33	40.6	37.6	31.2	40.7	37.1	39.1	41.4	40.4	39.2	41.7	41.1
	6	34.6	39.7	37.9	32.5	39.4	38	33.6	39.5	37.2	31.5	38.8	36.3
	7	38.8	40.1	39.6	33.8	40.2	38.5	33.7	40.3	39.2	37.6	40.4	39.7
	8	35	39.8	38.6	34.6	40	38.2	34.7	39.6	38.7	37	40.1	39.4
	Média	35.7	39.7	38.3	32.8	39.7	37.7	34.45	40.1	38.4	36.2	40.0	39.0
Sem enxerto (S)	2	31.7	40.3	38	30.5	39.6	37.7	27.7	38.4	34.5	26.1	38.7	36.3
	3	34.4	41.2	39.5	32.6	39.9	38.4	30.4	41.2	38.3	30.5	41.1	38.9
	9	++	40.6	39.6	36.6	40.5	39.3	35.4	41.1	39.4	29.8	40.8	39.5
	10	33.2	40.3	38.2	34.9	40.2	38.8	34	39.6	36.6	35	39.2	37.9
	11	32.6	41.5	40	38.5	41.6	40.6	37.8	41	39.7	37.2	40.8	39.1
	12	34.9	40.7	39.5	39.1	40.9	40.1	37.6	40.3	39.5	36.5	40.5	39.5
	Média	34.1	40.7	39.1	35.3	40.4	39.1	33.8	40.2	38	32.5	40.1	38.5

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice F - Diferenças de temperatura entre as linhas 1 e 2 do lado contralateral (grupo C) e do lado operado, nos grupos E e S Pós cirúrgico imediato

	Animal	Diferença entre linhas 1	Diferença entre linhas 2
Com enxerto (E)	1	2.7	2.2
	4	3.1	2.3
	5	2	2.3
	6	3	3.2
	7	2.9	3.2
	8	0.9	2.3
	Media	2.433333333	2.583333333
Sem enxerto (S)	2	1.9	1.6
	3	2	3.2
	9	2.5	1.8
	10	2.5	3.2
	11	2.7	3.5
	12	2	1.4
	Média	2.266666667	2.45

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice G - Diferenças entre as linhas 1 e 2 do lado contralateral (grupo C) e do lado operado, nos grupos E e S. Aos sete dias

	Animal	Diferença entre linhas 1	Diferença entre linhas 2
Enxerto (E)	1	0.7	1.2
	4	1.1	-1.1
	5	1.2	1.8
	6	-0.1	0.7
	7	1.6	3.4
	8	1	1.7
	Média	0.916666667	1.283333333
Sem enxerto (S)	2	0.8	0.3
	3	-0.9	0.7
	9	0.5	0.2
	10	1.1	-0.4
	11	0.3	-0.7
	12	0.8	0.4
	Média	0.433333333	0.083333333

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice H - Diferenças entre as linhas 1 e 2 do lado contralateral (grupo C) e do lado operado, para os grupos E e S. Aos catorze dias

	Animal	Diferença entre linhas 1	Diferença entre linhas 2
Enxerto (E)	1	0.8	1.7
	4	-2.3	1
	5	2.8	4
	6	-0.7	-1.7
	7	-0.4	1.2
	8	0.1	1.2
	Média	0.05	1.233333333
Sem enxerto (S)	2	-3.5	-1.4
	3	-1.2	0.5
	9	-0.2	0.2
	10	-1.6	-0.9
	11	-0.3	-1.5
	12	0	-0.6
	Média	-1.133333333	-0.616666667

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice I - Imagem microscópica de amostra do grupo E, demonstrando áreas de fibras musculares degeneradas (M), áreas de tecido muscular degenerado permeado por colágeno (MC) e vasos sanguíneos (setas). Aumento 4x

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice J - Imagem microscópica de amostra do grupo E, demonstrando áreas de fibras musculares degeneradas (M), áreas de tecido conjuntivo (C) e vasos (setas). Aumento 10x

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice K - Imagem microscópica de amostra do grupo A, demonstrando fibras musculares íntegras. Aumento 10x

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice L - Imagem microscópica de amostra do grupo E, demonstrando tecido muscular degenerado permeado por tecido conjuntivo (MC), com presença de inúmeros vasos sanguíneos (setas). Aumento 4x

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice M - Imagem microscópica de amostra do grupo S, demonstrando fibras musculares íntegras (M), tecido conjuntivo (C). Aumento 10x

Fonte: Ferraz (2013)

Apêndice N - Imagem microscópica de amostra do grupo S, com áreas de tecido muscular íntegro (M) e áreas de colágeno (C). Aumento 10x

Fonte: Ferraz (2013)