

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**

Adriano de Abreu Corteze

**AVALIAÇÃO DA FIBRINA RICA EM TROMBÓCITOS (FRT) NO TRATAMENTO  
DE DEFEITO ÓSSEO MONOCORTICAL EXPERIMENTAL EM TIBIOTARSO DE  
GALINHAS DOMÉSTICAS (*Gallus gallus domesticus*)**

Belo Horizonte  
2024

Adriano de Abreu Corteze

**AVALIAÇÃO DA FIBRINA RICA EM TROMBÓCITO (FRT) NO TRATAMENTO DE  
DEFEITO ÓSSEO MONOCORTICAL EXPERIMENTAL EM TIBIOTARSO DE  
GALINHAS DOMÉSTICAS (*Gallus gallus domesticus*)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiola de Oliveira Paes Leme

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte  
2024

C825a                   Cortezze, Adriano de Abreu, 1982-  
Avaliação da Fibrina rica em trombócito (FRT) no tratamento de defeito ósseo monocortical experimental em tibiotarso de galinhas domésticas (*Gallus Gallus domesticus*) / Adriano de Abreu Cortezze.-2024.  
72 f. il.

Orientadora: Fabiola de Oliveira Paes Leme  
Coorientadora: Eliane Gonçalves de Melo

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Inclui Bibliografia.

1. Ave doméstica - Teses – 2. Galinha - Genética - Teses - I. Paes Leme, Fabiola de Oliveira - II. Melo, Eliane Gonçalves de – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**ADRIANO DE ABREU CORTEZE**

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Medicina e Cirurgia Veterinárias**.

Aprovado(a) em 30 de julho de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Fabíola de Oliveira Paes Leme - Orientador(a)

Dr.(a). Santiago Jaramillo Colorado

Dr.(a). Paulo Vinícius Tertuliano Marinho

Dr.(a). Rubens Antonio Carneiro

Dr.(a). Anelise Carvalho Nepomuceno



Documento assinado eletronicamente por **Fabíola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 31/07/2024, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Vinícius Tertuliano Marinho, Usuário Externo**, em 31/07/2024, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anelise Carvalho Nepomuceno, Professora do Magistério Superior**, em 31/07/2024, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rubens Antonio Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2024, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Santiago Jaramillo Colorado, Usuário Externo**, em 06/08/2024, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3386355 e o código CRC 1FE234E8.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Professora Dr.<sup>a</sup> Fabiola por toda paciência, apoio e por não desistir de mim mesmo eu quase desistindo.

À minha esposa Acacia pela paciência e ajuda durante todos esses anos.

Aos Professores da UFMG: Prof. Marcelo Pires, Prof.<sup>a</sup> Cleuza, Prof. Paulo Marinho, Prof. Rodrigo Horta, Prof.<sup>a</sup> Adriane Pimenta, Prof. Rubens, Prof.<sup>a</sup> Suzane, Prof.<sup>a</sup> Christina Malm e a todos os outros professores que de alguma forma me ajudaram durante todos os 7 anos que passei no Hospital Veterinário e na Escola de Veterinária da UFMG.

Um agradecimento especial à Prof.<sup>a</sup> Eliane Melo que desde o meu início na UFMG sempre me apoiou e acreditou em mim como pessoa e como profissional.

Ao Prof. Paulo Marinho por ter me apoiado e incentivado imensamente nesta fase final do doutorado.

Ao Dr. Santiago pela ajuda no projeto e ao MSc. Felipe pelas anestésias e aos dois pela eterna amizade.

Ao Dr. Matheus Loes por toda a ajuda na parte do processamento e análise histopatológica.

Aos estagiários que estavam envolvidos no projeto: Maria Julia, Bruna, Endy, Daniel, Eduarda, Andressa, sem vocês esse projeto não seria possível.

Ao Hospital veterinário da UFMG por permitir o desenvolvimento da pesquisa e ao setor de imagem pela ajuda na realização dos exames radiográficos.

Ao Laboratório Multilab e ao Professor Marcelo por ceder o espaço para as aves.

À Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, ao Prof. Leonardo Lara (novamente, pois me ajudou no mestrado também) e ao Matheus pelas aves.

E por último, mas não menos importante a todas as galinhas envolvidas no experimento por, literalmente, darem a sua vida a favor da pesquisa e do conhecimento.

## RESUMO

A fibrina rica em plaquetas é uma alternativa barata e de fácil confecção para ser utilizada na rotina clínica veterinária. As plaquetas são capazes de liberar, quando ativadas, diversos fatores de crescimento (FC), os quais irão contribuir para a regeneração de tecidos moles e ósseos. Os FC possuem a capacidade de estimular a multiplicação e a quimiotaxia de diversas células responsáveis pela regeneração do tecido onde estão atuando. As aves não possuem plaquetas, sendo o seu correspondente os trombócitos, que apresentam, basicamente a mesma função no seu organismo. A fibrina rica em trombócitos (FRT) é pouco estudada dentro da medicina veterinária e pouco se sabe sobre a sua influência na regeneração óssea. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia regenerativa da FRT em defeito ósseo monocortical em tibiotarso de galinhas. Foram utilizadas trinta galinhas divididas em dois grupos: tratamento (15 animais) e controle (15 animais). Os animais foram anestesiados e após protocolo de antisepsia foi realizado, com auxílio de um perfurador ósseo e um pino intramedular um orifício de 4mm de diâmetro na porção proximal da face medial do tibiotarso. Nas galinhas do grupo tratamento foi aplicado uma única dose de aproximadamente 0,3ml de FRT no local da lesão. Nas do grupo controle foi realizado o mesmo defeito ósseo, mas sem qualquer outra intervenção. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, com cinco aves, conforme o tempo de avaliação em 10, 20 e 30 dias. As aves foram radiografadas e a lesão avaliada histologicamente em cada tempo de avaliação. Apesar de, radiograficamente o grupo tratamento apresentar uma tendência mais acelerada de regeneração óssea, estatisticamente não houve diferença ( $p>0,05$ ). Na avaliação histológica o grupo tratamento apresentou aumento discreto em algumas variáveis avaliadas (osteoblastos, matriz osteóide e trabéculas ósseas). Na avaliação da densidade óssea relativa (DOR) o grupo tratamento apresentou superioridade na avaliação aos 30 dias ( $p<0,05$ ). Resultados preliminares deste trabalho sugerem que o FRT possui uma tendência em acelerar o processo de regeneração tecidual a longo prazo.

Palavras-chave: ave, osso, regeneração, PRF, plaquetas.

## ABSTRACT

Platelet-rich fibrin is a cheap and easy-to-make alternative for use in routine veterinary clinics. Platelets are capable of releasing, when activated, several growth factors (GF), which will contribute to the regeneration of soft and bone tissues. GF have the ability to stimulate the multiplication and chemotaxis of several cells responsible for the regeneration of the tissue where they are acting. Birds do not have platelets, their counterpart being thrombocytes, which basically have the same function in their body. Thrombocyte-rich fibrin (TRF) is little studied within veterinary medicine and little is known about its influence on wound regeneration. In this context, the present study aimed to evaluate the regenerative efficacy of TRF in a monocortical bone defect in the tibiotarsus of chickens. Thirty chickens were used, divided into two groups: treatment (T=15 animals) and control (C=15 animals). The animals were anesthetized and after an antisepsis protocol, a 4mm diameter hole was made with the aid of a bone drill and an intramedullary pin in the proximal portion of the medial surface of the tibiotarsus. In the treatment group (n=15), a single dose of approximately 0.3ml of TRF was applied to the lesion site. In the control group (n=15), the same bone defect was performed, but without any other intervention. Each group was subdivided into three subgroups, with five birds, according to the evaluation time of 10, 20 and 30 days. The birds were x-rayed and the lesion was evaluated histologically at each evaluation time. Although, radiographically, the treatment group showed a more accelerated tendency for bone regeneration, statistically there was no difference ( $p>0.05$ ). In the histological evaluation, the treatment group showed a slight increase in some variables evaluated (osteoblasts, osteoid matrix and bone trabeculae). In the evaluation of relative bone density (RBD), the treatment group showed superiority in the evaluation at 30 days, with a statistical difference ( $p<0.05$ ). Preliminary results from this work suggest a tendency that TRF can accelerate the tissue regeneration process.

Keywords: bird, bone, regeneration, PRF, platelets

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração demonstrando as 5 fases da consolidação secundária. ....	16
Figura 2 – Micrografia eletrônica de varredura das plaquetas de um cão apresentando vários grânulos no citoplasma. ....	17
Figura 3- Fotomicrografia de um trombócito (seta) e linfócito (ponta de seta) no esfregaço sanguíneo de uma galinha doméstica ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ).....	23
Figura 4 - Ambiente e estante de gaiolas onde as aves ficaram durante todo o experimento. Cada gaiola continha no máximo duas aves, com alimentação e água à vontade. ....	30
Figura 5 – Imagem do preparo da ave no pré-operatório. Ave sedada com medicação pré-anestésica e com todas as penas do membro pélvico direito retiradas para posterior antisepsia pré-operatória.....	31
Figura 6: Imagem do procedimento pré-operatório imediato. Membro pélvico direito da ave exposto para o início da cirurgia. Notar o campo cirúrgico cobrindo o paciente e uma atadura envolvendo a extremidade distal do membro para uma melhor assepsia cirúrgica, deixando apenas a face medial do membro exposta. ....	32
Figura 7 - Imagens transoperatórias. (A) região medial proximal do tibiotarso com a pele incisada e subcutâneo divulsionado com os músculos gastrocnêmio medial e flexor longo do halux expostos. (B) Musculatura rebatida expondo a região proximal do osso a ser perfurada demarcada com um asterisco amarelo. ....	32
Figura 8- Imagens transoperatórias. (A) Local de perfuração do tibiotarso já com o pino posicionado para o início da perfuração óssea monocortical. (B) Setas indicam o local onde ocorreu a perfuração monocortical .....	34
Figura 9 - Imagens do coágulo de fibrina imediatamente após a centrifugação e remoção do coágulo do tubo de coleta. (A) FRT removido inteiro do tubo ainda com as hemácias. (B) Coágulo de fibrina seccionado com uma lâmina 11, deixando-o com aproximadamente 5mm. ....	35
Figura 10 - Momento da realização das imagens radiográficas 20 dias após a cirurgia. (A) Galinha posicionada em decúbito dorsal com o membro pélvico direito em extensão para o posicionamento craniocaudal do tibiotarso. (B) Posicionamento do membro para uma projeção radiográfica mediolateral com o joelho e calcanhar semiflexionado para uma melhor orientação radiográfica. Notar o marcador radiográfico próximo ao local de estudo. ....	35
Figura 11 - Imagens do membro após a remoção para exame anatomopatológico. (A) Membro pélvico direito removido. A linha vermelha representa o local do osso tibiotársico a ser dissecado. (B) Tibiotarso já removido do resto do membro expondo toda a face medial e com todo tecido mole adjacente dissecado, deixando apenas uma fina camada sobre o local da lesão óssea. ....	37
Figura 12 - Comparação entre as frequências de reação periosteal entre grupos e entre dias..	40
Figura 13 - Comparação entre as frequências de radiopacidade entre grupos e entre dias. ....	41
Figura 14 – Fotografias da radiografia comparando um animal do grupo controle e grupo tratamento em cada tempo de pós-operatório demonstrando a evolução da regeneração do defeito ósseo conforme o tempo. ....	42
Figura 15 - Frequência de fibroblastos entre grupos e entre dias. ....	43

Figura 16 - Fotomicrografia do processo de regeneração do defeito ósseo do tibiotarso de uma ave do grupo controle avaliada com 10 dias preenchido com fibroblastos. Coloração de HE (aumento de 400x).....	43
Figura 17 -Frequência de proliferação fibroblástica entre grupos e entre dias. ....	44
Figura 18 – Fotomicrografia do defeito ósseo do tibiotarso de uma ave do grupo tratamento avaliada com 20 dias. Observar a presença de linfócitos (asteriscos), heterofilos (setas) e fibroblastos (cabeça de setas). Coloração de HE, aumento de 400x. ....	45
Figura 19 - Comparação entre a frequência de infiltrado inflamatório entre grupos e entre dias. ....	45
Figura 20 - Comparação entre as frequências de osteoblastos entre grupos e entre dias. ....	46
Figura 21 - Comparação entre as frequências do tipo de matriz osteóide entre grupos e entre dias.....	47
Figura 22- Comparação entre as frequências de trabéculas ósseas entre grupos e entre dias. .	47
Figura 23 – Fotomicrografia da avaliação histopatológica dos tibiotarsos de galinhas com defeito experimental: (A) Grupo controle eutanásia com 10 dias; (B) grupo tratamento eutanásia com 10 dias; (C) grupo controle eutanásia com 20 dias; (D) grupo tratamento eutanásia com 20 dias; (E) grupo controle eutanásia com 30 dias; (F) grupo tratamento eutanásia com 30 dias. Observar nas imagens a presença de proliferação de fibroblastos (asterisco), da descontinuidade óssea (seta), matriz osteóide (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório (positivo).....	48
Figura 24 - Médias estimadas da reação periosteal e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo. ....	50
Figura 25 - Médias estimadas da radiopacidade e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo. ....	50
Figura 26 - Médias estimadas de fibroblastos e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo. ....	51
Figura 27 - - Médias estimadas da proliferação fibroblástica e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.....	51
Figura 28 - Médias estimadas do infiltrado inflamatório e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo. ....	52
Figura 29 - Médias estimadas para osteoblastos e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo. ....	53
Figura 30 - Médias estimadas para matriz osteóide e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo. ....	53
Figura 31 - Médias estimadas para trabéculas ósseas e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo. ....	54
Figura 32 – Gráfico destacando os animais dos grupos distintos explicando a variabilidade total da matriz. ....	56
Figura 33 – Gráfico destacando os animais em cada tempo mensurado. ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores de crescimento encontrados no plasma rico em fibrina (PRF) e sua respectiva função. ....	21
Tabela 2– Fatores de crescimento e sua ação na regeneração óssea. ....	26
Tabela 3 - Valores p para reação periosteal. ....	50
Tabela 4 - Valores p para radiopacidade. ....	50
Tabela 5 – Valores p para fibroblastos. ....	51
Tabela 6 - Valores p para proliferação fibroblástica. ....	51
Tabela 7 - Valores p para infiltrado inflamatório. ....	52
Tabela 8 - Valores p para osteoblastos. ....	53
Tabela 9 – Valores p para matriz osteóide. ....	53
Tabela 10 – Valores p para trabéculas ósseas. ....	54
Tabela 11 -Correlações de Spearman entre os pares das variáveis avaliadas. ....	54
Tabela 12 - Análise descritiva da densidade óssea relativa (DOR) de galinhas dos grupos controle e tratamento nos tempos de avaliação 0, 10, 20 e 30. ....	58
Tabela 13 - Valores de p em cada tempo avaliado (0, 10, 20 e 30) comparando-se a densidade óssea relativa (DOR) de galinhas dos grupos controle e tratamento. ....	58
Tabela 14 – Comparativo da densidade óssea relativa (DOR) de galinhas entre os grupos em cada tempo de avaliação utilizando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – Adenosina difosfato

AINE – Anti-inflamatório não esteroidal

BMP – Proteínas morfogenéticas ósseas

CAM – Concentração alveolar mínima

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CR – Radiografia digital

EFG – Fator de crescimento endotelial

EV – Escola de Veterinária

FEPHB – Fazenda experimental Professor Hélio Barbosa

FGF – fator de crescimento fibroblasto

h – hora

HE – Hematoxilina Eosina

IGF – Fator de crescimento insulínico

IM – Intramuscular

Kv – Kilovoltagem

L-PRF – Plasma rico em plaquetas e leucócitos

mA - miliAmperagem

ml – mililitros

mm – milímetro

MPA – Medicação pré-anestésica

n - número

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PRF – Plasma rico em fibrina

PRP – Plasma rico em plaquetas

PRT – Plasma rico em trombócitos

rpm – Rotações por minutos

s – segundo

SCO – Sistema canalicular aberto

TGF-B – Fator de crescimento beta transformador

FRT – Fibrina rico em trombócitos

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1. Regeneração óssea .....	14
2.2. Plaquetas .....	16
2.2.1. Fibrina rica em plaquetas (PRF).....	19
2.3. Trombócitos .....	23
2.3.1. Fibrina rica em trombócitos – FRT .....	25
2.4. A influência das plaquetas/trombócitos na regeneração óssea .....	25
<b>3. HIPÓTESE</b> .....	28
<b>4. OBJETIVO GERAL</b> .....	28
4.1. Objetivos específicos .....	28
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
5.1. Animais .....	29
5.2. Procedimento cirúrgico para a realização da falha óssea.....	30
5.3. Preparação e aplicação da fibrina rica em trombócitos .....	34
5.4. Avaliação radiográfica .....	35
5.5. Avaliação histopatológica .....	37
5.6. Análise estatística .....	38
5.6.1. Objetivo 1 .....	38
5.6.2. Objetivo 2 .....	39
5.6.3. Objetivo 3 .....	39
<b>6. RESULTADOS</b> .....	40
6.1. Resultados do Objetivo 1 .....	40
6.2. Resultados do Objetivo 2 .....	48
6.2.1. Esclerose óssea .....	49
6.2.2. Radiopacidade .....	50
6.2.3. Fibroblastos .....	50
6.2.4. Proliferação fibroblástica.....	51
6.2.5. Infiltrado inflamatório .....	51
6.2.6. Osteoblastos.....	52
6.2.7. Matriz osteóide .....	53
6.2.8. Trabéculas ósseas .....	53
6.3. Resultados do Objetivo 3 .....	54
6.3.1. Correlações .....	54

6.3.2. Análise de Componentes Principais .....	55
6.4. Densidade Óssea Relativa - DOR.....	57
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa ganhou um forte interesse na comunidade científica, levando ao desenvolvimento de estratégias celulares e moleculares inovadoras, destinadas a estimular a cicatrização de tecidos moles e duros *in vivo*. A cicatrização de feridas e o processo de regeneração óssea são processos biológicos complexos que requerem a interação sinérgica entre diferentes fatores para garantir a recuperação anatômica e funcional do tecido. Hemostasia, proliferação, diferenciação celular e remodelação tecidual são os principais processos que direcionam a cicatrização de feridas. Seu sucesso requer o ajuste fino de interações coordenadas entre células e plaquetas, juntamente com a sinalização apropriada mediada por fatores de crescimento (DIEGELMANN; EVANS, 2004; GURTNER et al., 2008).

Conhecendo os efeitos benéficos dos fatores de crescimento, na década de 1920 começou-se a utilizar o citrato como anticoagulante para a obtenção de concentrados de plaquetas. Na década de 1990, estudos realizados por Anitua (1999) utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) resultaram em uma potencialização na regeneração óssea. Devido às suas excelentes propriedades, o PRP é utilizado dentro da ortopedia para diversas finalidades, como promover a cicatrização de tendões, ligamentos, músculos e cartilagens e no tratamento auxiliar da osteoartrose (MOŚCICKA; PRZYLIPIAK, 2021).

Outra forma de concentrado de plaquetas foi desenvolvida na França por Choukroun et al. (2000) e denominada Fibrina Rica em Plaquetas (PRF), devido à forte polimerização do gel de fibrina da preparação. Essa técnica era tão obviamente diferente de outros PRP's, que foi denominada concentrado de plaquetas de “segunda geração”, embora essa expressão provavelmente não seja adequada devido à longa história de evoluções dos concentrados de plaquetas. Atualmente, é considerado como mais uma alternativa terapêutica. Esta evolução da terminologia foi, no entanto, muito importante, pois foi a primeira vez que um produto era suficientemente distinto dos outros para justificar uma terminologia completamente diferente (DOHAN et al., 2014).

Para a obtenção do PRF o sangue é coletado e imediatamente centrifugado. Ocorre, um processo de coagulação natural, que permite a fácil coleta de um coágulo de fibrina rico em leucócitos e plaquetas (L-PRF), sem a necessidade de nenhuma modificação bioquímica do sangue, ou seja, sem a adição de anticoagulantes, trombina ou cloreto de cálcio para a ativação plaquetária (EHRENFEST et al., 2008).

O baixo custo e a facilidade de obtenção do PRF permitem que esse protocolo seja facilmente utilizado, tornando-o o método mais adequado para o uso generalizado na prática diária. Em alguns países como França, Itália e Israel esse método já se tornou o mais comum, quando comparado com as outras técnicas de obtenção de concentrado de plaquetas (EHRENFEST et al., 2008).

Nas aves o equivalente às plaquetas é o trombócito, que se difere das plaquetas principalmente pela presença de núcleo. Os trombócitos têm como principal função, assim como as plaquetas, participar da hemostasia e da coagulação sendo a segunda célula circulante mais prevalente no sangue das aves, depois dos eritrócitos (WAKENELL, 2010).

Não existem muitos protocolos para a obtenção do plasma rico em trombócitos (PRT) e para fibrina rica em trombócitos (FRT) para as diversas espécies de aves. Geralmente o protocolo utilizado é empírico e extrapolado dos mamíferos domésticos. Para apenas algumas aves existem protocolos documentados para a obtenção do PRT, como o papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), o tucano-toco (*Ramphastos toco*) e a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) (FERNANDES et al., 2019; CORTEZE, 2019).

Assim como nos mamíferos, as aves podem se beneficiar com os preparados de PRT e FRT. Essas terapias celulares podem auxiliar no processo de regeneração óssea, perda de tecidos devido a projéteis balísticos, feridas, acidentes domésticos, entre outras causas. No entanto, devido à escassez de estudos, não é possível afirmar qual o grau de influência que um preparado de trombócitos pode ter sobre a regeneração tecidual (FERNANDES et al., 2019; CORTEZE, 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do FRT na regeneração óssea em defeito ósseo monocortical experimental em tibiotarso de galinhas (*Gallus gallus domesticus*).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Regeneração óssea

A regeneração ou consolidação óssea se difere da cicatrização de tecido mole, por ser capaz de produzir um tecido estruturalmente e funcionalmente semelhante ao anterior. O mecanismo pelo qual um osso fraturado regenera é determinado por vários fatores, incluindo o osso específico que está fraturado, o ambiente mecânico do osso fraturado, a saúde biológica da fratura e do paciente, independentemente de a fratura ser ou não tratada com intervenção cirúrgica e a maneira pela qual a fratura é estabilizada cirurgicamente. Compreender os mecanismos pelos quais o osso regenera e como a tomada de decisão cirúrgica afeta esses processos é essencial para selecionar adequadamente o tratamento cirúrgico adequado para um osso fraturado (MORENO et al. 2018).

Existem dois tipos de consolidação óssea, a primária e a secundária. A consolidação óssea primária ocorre em fraturas quando existe estabilidade no foco da fratura, após a estabilização cirúrgica, apresentando micromovimentação interfragmentar no foco da fratura variando de 0,2% a 2% e um *gap* menor que 1mm. Já a consolidação secundária ocorre quando o foco da fratura apresentar um *strain* maior que 2% e um *gap* maior que 1mm (MINTO; LUCENA, 2022; AMOROSO, 2022).

A consolidação primária pode ocorrer de duas maneiras, com um *gap* máximo de 0,01mm e reconstrução anatômica e com um *gap* variando de 0,01 a 1mm. Na primeira é necessário a compressão interfragmentar e envolve o alongamento dos canais de Havers longitudinalmente para unir diretamente a fratura. Os osteoclastos formam um “cone cortante” que irá atravessar a linha de fratura e remover o osso morto do caminho. Os osteoblastos enfileirados presentes nos canais recém-formados secretam matriz osteóide o qual é mineralizado em osso. Devido ao fato dos canais de Havers serem remodelados naturalmente no osso cortical, é difícil determinar quando a consolidação óssea primária está completa. Estima-se que pode levar até 18 meses para restaurar completamente a estrutura normal e as propriedades mecânicas do osso lesionado (MORENO et al., 2018; MINTO; LUCENA, 2022).

Quando está presente um *gap* variando de 0,01 a 1mm a consolidação primária ocorre de forma um pouco diferente. Inicialmente ocorre a formação de osso lamelar, na falha óssea, em direção perpendicular ao eixo longo do osso por toda a falha óssea. Durante um período de 3 a 8 semanas esse osso mecanicamente mais frágil começa a ser remodelado e gradualmente

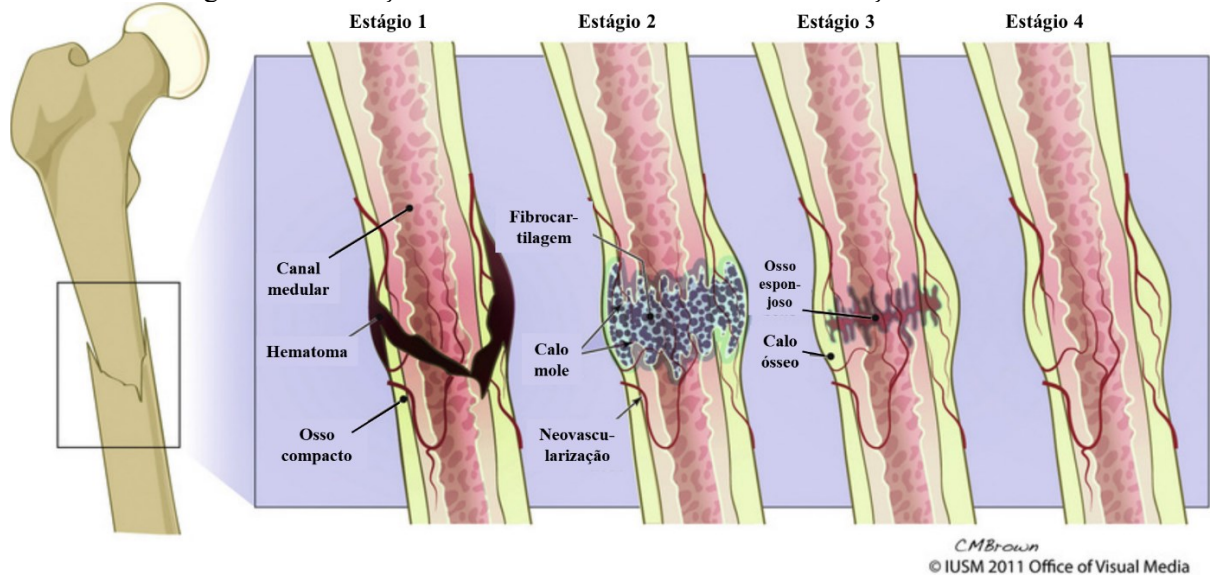
substituído por canais de Havers revascularizados e ricos em células progenitoras. Os osteoblastos provenientes das células progenitoras são responsáveis por produzir a matriz osteóide do novo osso (MORENO et al., 2018; MINTO; LUCENA, 2022).

A regeneração secundária é caracterizada pela sobreposição de cinco fases: inflamação, ossificação intramembranosa, formação de calo mole (condrogênese), formação de calo duro (ossificação endocondral) e remodelação óssea (MORENO et al., 2018).

Na fase inflamatória após fratura ou osteotomia, o suprimento sanguíneo é interrompido, seguido por hemostasia primária (agregação e desgranulação plaquetária) e secundária (formação de hematoma). Esses eventos preparam o ambiente para o reparo com uma matriz provisória rica em fatores de crescimento, leucócitos e células reparadoras. As células inflamatórias irão secretar importantes citocinas (interleucina 1, 2 e 6) que atuam no início da fase de reparação tecidual. As plaquetas são as primeiras fontes de fatores de crescimento (PDGF, TGF B1 e IGF) que irão auxiliar no processo de regeneração óssea (JOHNSON, 2013; MORENO et al., 2018; AMOROSO, 2022).

Na ossificação intramembranosa (2ª fase) no espaço entre o perióstio e o osso subjacente, as células-tronco mesenquimais derivadas do perióstio diferenciam-se em osteoblastos e depositam diretamente o tecido ósseo. Este novo osso formado é insuficiente para consolidar a fratura. Em seguida, na 3ª fase, ocorre a formação de calo mole no centro hipóxico da fratura, devido as células-tronco mesenquimais diferenciarem-se em condroblastos. Na 4ª fase os condrócitos sofrem hipertrofia e calcificam a matriz extracelular, levando à apoptose dos condrócitos e invasão da matriz pela neovascularização, osteoclastos e osteoblastos associados. Os osteoblastos depositam osso entrelaçado, eventualmente formando uma ponte sobre a fratura. Na fase de remodelação (5ª fase) os osteoclastos e osteoblastos convertem o osso formado em osso lamelar, eventualmente restaurando a forma anatômica geral e a resistência do osso fraturado (MORENO et al., 2018) (Figura 1).

Figura 1 – Ilustração demonstrando as 5 fases da consolidação secundária.



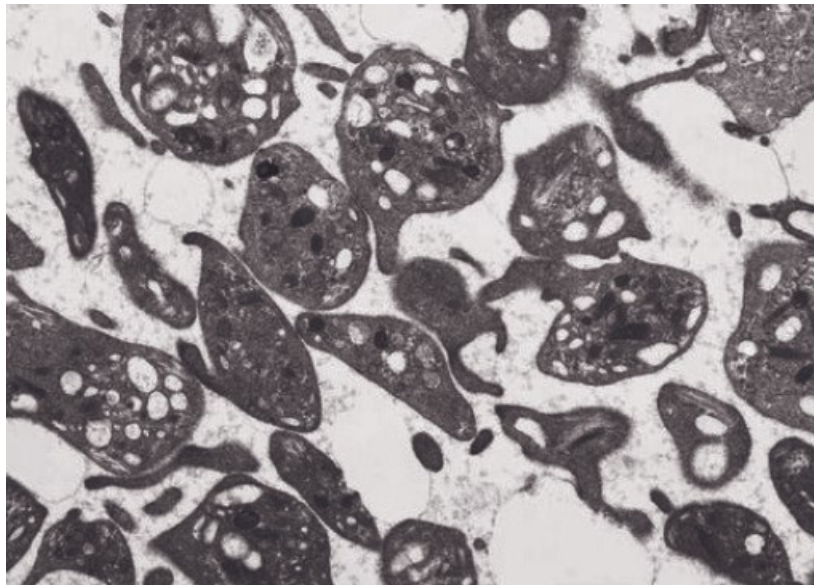
Fonte: Adaptado de Moreno et al. (2018).

Radiograficamente, a união óssea secundária é visível como uma proliferação do osso novo endosteal e periosteal formando uma área esclerótica em ambos os segmentos ósseos na superfície da fratura. Após o calo unir a fratura, a estabilidade é atingida e o remodelamento ósseo ocorre. Esta última etapa é visível com uma diminuição na densidade óssea do calo com o reestabelecimento do canal medular e evidência de osso cortical no local da fratura (JOHNSON, 2013).

## 2.2. Plaquetas

As plaquetas (Figura 1) são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, possuem diversas organelas no citoplasma e apresentam formato de disco plano. Elas são essenciais para a hemostasia e capazes de formar trombina através do complexo tenase/protrombinase na sua superfície. Devido a essa característica, as plaquetas são a primeira linha de defesa contra hemorragias, sendo capazes de cessar temporariamente o fluxo sanguíneo após uma lesão no leito microvascular (BOUDREAUX, 2010; BAKER, 2015).

Figura 2 – Micrografia eletrônica de varredura das plaquetas de um cão apresentando vários grânulos no citoplasma.



Fonte: BOUDREAUX (2010).

A trombina (fator IIa), formada durante a ativação da coagulação, desempenha um papel importante como agonista na ativação plaquetária. Ela atua por meio da sinalização aos receptores PAR-1 e PAR-4 nas plaquetas. As plaquetas podem aderir à membrana basal e ao estroma extravascular, principalmente através de um complexo receptor de superfície chamado glicoproteína [gp] 1b-V-IX. Essa glicoproteína se liga ao fator von Willebrand (vWF), uma proteína plasmática, que, por sua vez, se liga ao colágeno (BOUDREAX, 2010; BAKER, 2015).

Além disso, as plaquetas também podem aderir diretamente ao colágeno por meio de um mecanismo de cisalhamento, especialmente nas artérias e arteríolas, utilizando as proteínas  $\alpha 2$  B1 e GP VI em sua superfície. A ausência do receptor GP1b-V-IX (conhecida como síndrome de Bernard-Soulier) ou do fator vWF (doença de von Willebrand) resulta em hemorragia clínica, cuja gravidade pode ser variável (BOUDREAX, 2010; BAKER, 2015).

Após a adesão inicial, as plaquetas passam por um processo chamado sinalização “*inside-out*” através de receptores do tipo integrina, aumentando sua afinidade ao receptor. Em seguida, ocorre uma segunda onda de sinalização “*outside-in*”, estabilizando ainda mais o desenvolvimento do trombo de plaqueta/fibrina. À medida que as plaquetas se ligam umas às outras através da glicoproteína IIb/IIIa ( $\alpha$ IIB $\beta$ 3) e ao fibrinogênio, elas se intumescem, centralizam suas organelas e formam pseudópodes, caracterizando sua ativação e favorecendo a agregação (BOUDREAX, 2010; BAKER, 2015).

A agregação plaquetária e o recrutamento de plaquetas adicionais são processos induzidos pela reação de liberação e extravasamento do seu conteúdo granular. Essa reação esvazia os produtos dos grânulos plaquetários no plasma. Os fatores de coagulação, armazenados nesses grânulos, desempenham um papel importante na formação da fibrina, necessária para estabilizar o tampão de plaquetas. Os grânulos plaquetários liberam seu conteúdo em duas situações: (a) no sistema canalicular aberto (SCO), que se comunica com o exterior; (b) na superfície das plaquetas, caso elas não apresentem o SCO. Durante a agregação plaquetária, não ocorre lise das plaquetas. Além disso, as plaquetas respondem a agonistas liberados pelos grânulos plaquetários, cuja resposta é mediada por receptores de superfície. Alguns exemplos de agonistas liberados pelas plaquetas incluem a ADP, que estimula os receptores de superfície P2Y<sub>12</sub> (alvo importante para a inibição das plaquetas pelo medicamento clopidogrel), serotonina e histamina (BAKER, 2015).

Outro componente relevante é o tromboxano A<sub>2</sub>, que é produzido e liberado pelas plaquetas. Ele se liga aos receptores de superfície, ativando ainda mais as plaquetas por meio de um mecanismo de retroalimentação positivo. Por outro lado, o ácido acetilsalicílico e outros anti-inflamatórios não esteroides (AINE) inibem a função plaquetária, impedindo a síntese de tromboxano A<sub>2</sub> (BAKER, 2015).

As plaquetas são fundamentais para o processo de cicatrização de feridas. Elas sintetizam, armazenam e liberam, após ativação, vários fatores de crescimento, dentre os quais o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, "platelet derived growth factor"), o fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ , "transforming growth factor beta"), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF, "fibroblast growth factor"), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, "vascular endothelial growth factor"), e o fator de crescimento insulínico (IGF, "insulin-growth factor") e, ainda liberam moléculas quimiotáticas envolvidas na homeostase e proliferação celulares (KIWANUKA et al., 2012; MALHORTA et al., 2015). Os fatores de crescimento liberados pelas plaquetas podem estimular a proliferação de células mesenquimais, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliais, além de modular a migração e ativação de macrófagos, monócitos e células polimorfonucleares (LUCARELLI et al., 2003; ANDIA et al., 2012).

### 2.2.1. Fibrina rica em plaquetas (PRF)

A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um concentrado imunológico e plaquetário que possui em uma única membrana de fibrina todos os constituintes de uma amostra de sangue favoráveis à cura e à imunidade. Está sendo cada vez mais investigada e usada em todo o mundo pelos médicos como um biomaterial autólogo adjuvante, para promover a cicatrização e regeneração óssea e de tecidos moles, por apresentar uma liberação sustentada de fatores de crescimento em um período entre um e quatro semanas, estimulando o ambiente para a cicatrização de feridas em uma quantidade significativamente menor de tempo (CHOUKROUN et al., 2006; BORIE et al., 2015; HARTSHORNE; GLUCKMAN, 2016). Embora as citocinas plaquetárias e leucocitárias desempenhem um papel importante na biologia deste biomaterial, a matriz de fibrina que as suporta, certamente constitui o elemento determinante responsável pelo real potencial terapêutico do PRF (CHOUKROUN et al., 2006; HARTSHORNE; GLUCKMAN, 2016). A diferença entre o coágulo sanguíneo natural e o PRF é que este último é mais homogêneo e estável, fácil de manusear e colocar no local indicado (BORIE et al., 2015).

O padrão ouro para cicatrização e regeneração de tecidos *in vivo* requer a interação mútua entre uma estrutura (matriz de fibrina), plaquetas, fatores de crescimento, leucócitos e células tronco. Estes elementos-chave são todos componentes ativos do PRF e, quando combinados e preparados estão adequadamente envolvidos nos principais processos de cicatrização e regeneração de tecidos, incluindo proliferação e diferenciação celular, síntese de matriz extracelular, quimiotaxia e angiogênese (neovascularização) (HARTSHORNE; GLUCKMAN, 2016).

O uso do PRF é considerado estratégico em relação a outros produtos derivados de plaquetas, como os concentrados de plaquetas (PRPs), principalmente por que: a) é autólogo, eliminando o risco de reações cruzadas/incompatibilidades e transmissão de patógenos transmitidos pelo sangue; b) podem ser produzidos sem manipulação adicional, evitando o risco de infecções cruzadas; c) é obtido a partir de pequeno volume de coletas de sangue; d) é uma técnica de baixo custo e rápida, que pode ser realizada durante o trans cirúrgico; e) é um produto natural como fonte de múltiplos fatores de crescimento e citocinas, com propriedades regenerativas e moduladoras; f) não requer adição de agentes trombogênicos, como a trombina heteróloga, que pode induzir reações imunes; e g) podem ser modulados diretamente (por exemplo, em membranas), em ambientes cirúrgicos (SOARES et al., 2021; GOSWANI et al., 2024).

O PRF é obtido pela centrifugação do sangue total sem quaisquer aditivos a 3000 rpm (aproximadamente 400g) durante 10 minutos. Sem anticoagulante, o PRF forma espontaneamente um coágulo gelatinoso com matriz de fibrina que retém a secreção do fator de crescimento ao local da coagulação. Na reparação tecidual, os fibroblastos recrutados reorganizam esta matriz de fibrina e iniciam a síntese de colágeno. Assim, os efeitos combinados da secreção do fator de crescimento e do recrutamento de fibroblastos na PRF atuam sinergicamente para promover a colagênese e a regeneração tecidual. Esse coágulo é removido com o auxílio de uma pinça e pode, ou não, ser prensado para formar uma tela de fibrina (CHOUKROUN et al., 2000; DOHAN et al., 2006; BORIE et al., 2015; KARIMI e ROCKWELL, 2019).

O sucesso desta técnica depende inteiramente da velocidade de coleta e transferência do sangue para a centrífuga. As amostras de sangue sem anticoagulante começam a coagular quase imediatamente após o contato com o vidro do tubo, e são necessários no mínimo alguns minutos de centrifugação para concentrar o fibrinogênio na parte média e superior do tubo. O manuseio rápido é a única maneira de obter um coágulo clinicamente utilizável. Se o tempo necessário para coletar o sangue e iniciar a centrifugação for excessivamente longo, ocorrerá falha e a fibrina polimerizará de forma difusa no tubo e será obtido um pequeno coágulo sanguíneo sem consistência, não sendo viável para o uso terapêutico (DOHAN et al., 2006).

Depois que as plaquetas são ativadas, elas começam a liberar altas concentrações de fatores de crescimento (Tabela 1). O PRF permanece intacto por pelo menos sete dias e libera continuamente grandes quantidades de fatores de crescimento (como o fator de crescimento transformador- $\beta$  1 [TGF $\beta$ 1], fator de crescimento derivado de plaquetas - AB [PDGF-AB], fator de crescimento endotelial vascular [VEGF]) e principais proteínas ou citocinas da matriz de coagulação e cicatrização (trombospondina-1, fibronectina, vitronectina, osteocalcina, osteonectina) (HARTSHORNE; GLUCKMAN, 2016).

Tabela 1 – Fatores de crescimento encontrados no plasma rico em fibrina (PRF) e sua respectiva função.

FATORES DE CRESCIMENTO	FUNÇÃO
PDGFs	Migração celular, proliferação e formação de colágeno; todos estes desempenham papéis específicos no remodelamento da matriz extracelular para a cicatrização da ferida.
TGF- $\beta$ 1	Produção de matriz extracelular, regulação imunológica e reparo tecidual.
VEGF	Promove a angiogênese e contribui para a remodelação tecidual.
EFG	Crescimento e proliferação de células endoteliais e mesenquimais, o que resulta em epitelização.
IGFs	Tem caráter protetor celular e participa do crescimento e diferenciação de diversos tipos de células.

PDGFs=fatores de crescimento derivados de plaquetas; TGF- $\beta$ 1=fator transformador de crescimento  $\beta$ 1; VEGF=fator de crescimento endotelial vascular; EGF=fator de crescimento endotelial; IGFs = fatores de crescimento semelhantes à insulina. Fonte: Adaptado de Goswani et al. (2024).

Os fatores de crescimento segregados ligam-se imediatamente à superfície externa das membranas celulares das células do enxerto, retalho ou ferida através de receptores transmembranares. Estudos demonstraram que, células-tronco mesenquimais adultas, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células epidérmicas expressam os receptores da membrana celular para fatores de crescimento nas plaquetas. Esses receptores transmembrana, por sua vez, induzem a ativação de uma proteína sinalizadora interna endógena, que desbloqueia uma sequência genética normal da célula, como proliferação celular, formação de matriz, produção de osteóide e síntese de colágeno (MARX, 2004).

Pacientes que apresentam alguma deficiência no sistema imunológico, diabéticos e que são tratados com algum medicamento anticoagulante podem se beneficiar com o uso do PRF como adjuvante para acelerar a recuperação da lesão, pois ele estimula a formação de coágulos sanguíneos (por meio da trombospondina) e o fechamento de feridas (GOSWANI et al., 2024).

O PRF pode ser considerado uma segunda geração, ou seja, um derivado do PRP. No entanto, para uma compreensão mais abrangente, é útil distinguir o PRF de outros concentrados de plaquetas preparados na presença de anticoagulantes. O PRF foi desenvolvido com um conceito inovador, sem a necessidade de anticoagulantes ou fatores de coagulação. Inicialmente, era conhecido como L-PRF (fibrina rica em leucócitos e plaquetas). Posteriormente, o protocolo de preparação foi modificado pelo desenvolvedor do PRF, Joseph

Choukroun, para produzir o PRF avançado (A-PRF) e o PRF injetável (i-PRF), além de outros grupos de produtos. É importante ressaltar que a maioria dessas marcas é protegida como marcas registradas (DOHAN et al., 2006; KAWASE; TANAKA, 2017).

Os esforços contínuos para aprimorar a matriz de fibrina enriquecida com plaquetas resultaram na popularização do termo “PRF” como um nome genérico. Essa designação se refere a uma matriz preparada sem a adição de fatores de coagulação exógenos. Os derivados de PRF mencionados anteriormente são amplamente utilizados em todo o mundo. Embora a velocidade de centrifugação possa modificar o conteúdo das células sanguíneas, todos esses produtos compartilham o mesmo princípio de preparação: a ativação da cascata de coagulação intrínseca (KAWASE; TANAKA, 2017).

Minsk et al. (2020) utilizaram L-PRF em defeitos ósseos monocorticais produzidos na tíbia proximal de cães e notou que o uso do L-PRF acelerou a regeneração óssea quando comparada ao grupo sem tratamento. Outro estudo comparando a utilização de PRF e concentrado de fator de crescimento endotelial vascular (CFC) aplicados em implantes em fêmur de cães, concluíram que a aplicação de CFC obteve uma resposta mais acelerada (HYUN-CHUN et al., 2016). Um estudo realizado por Demir et al. (2022) obteve resultados positivos utilizando PRF para tratamento de úlcera de córnea profunda e que com 20 dias de pós cirúrgico todos os cães apresentavam visão.

Estudos envolvendo PRF em gatos também tiveram resultados positivos. Changrani-Rastogi, et al. (2023) avaliando a cicatrização cutânea em gatos, notaram que o uso do PRF acelerou significativamente a contração da ferida em aproximadamente 20% mais rápida quando comparada ao grupo controle (sem tratamento).

Em humanos o PRF vem sendo muito utilizado e estudado, principalmente dentro da odontologia. Os estudos de regeneração óssea envolvendo osso alveolar demonstram que o uso do PRF, associado ou não a enxerto ósseo, se mostra superior aos grupos controles (MADI; ELAKEL, 2020; FRANCISCO et al., 2020, THEODOSAKI et al., 2022). Apesar dos efeitos benéficos do PRF os autores relatam que é necessária uma melhor padronização nos estudos para uma avaliação e resultados melhores.

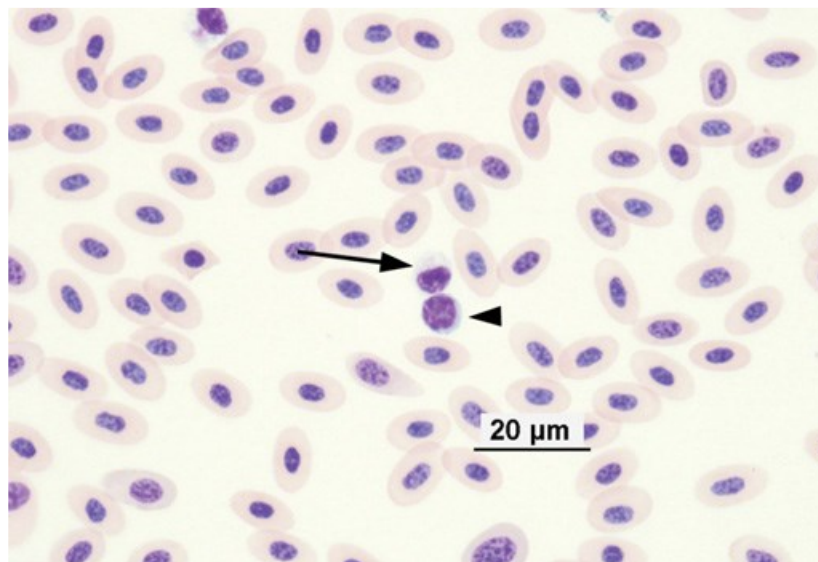
Em contrapartida, Reis et al. (2022) realizaram uma revisão sistemática e meta análise envolvendo 685 estudos do uso do PRF em defeito ósseo em rato. Dos 685 trabalhos apenas quatro foram incluídos na avaliação quantitativa demonstrando que o PRF não proporciona benefícios significativos para o reparo ósseo e produz efeitos imprevisíveis.

Ainda não existe uma classificação adequada para os produtos derivados do PRF. Kawase e Tanaka (2017) propuseram que os pesquisadores alcancem um consenso em relação à terminologia e classificação do 'PRF', o que seria benéfico para a expansão contínua deste campo terapêutico. Esses autores salientaram que, ao invés de depender de conceitos iniciais e/ou contextos comerciais, os cientistas deveriam ser flexíveis e revisar a terminologia e classificação, conforme necessário.

### 2.3. Trombócitos

O trombócito (Figura 2) é uma célula nucleada, pequena e com o seu formato variando de redonda a oval, sendo encontradas no sangue periférico das aves. Apresentam o núcleo com formato de redondo a oval e contém cromatina densamente aglutinada. Geralmente são as menores células do sangue, facilmente confundidas com pequenos linfócitos maduros (WAKENELL, 2010; CAMPBELL, 2015).

Figura 3- Fotomicrografia de um trombócito (seta) e linfócito (ponta de seta) no esfregaço sanguíneo de uma galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*).



Fonte: Campbell (2015).

Os trombócitos têm como principal função, assim como as plaquetas, participar da hemostasia e da coagulação sendo a segunda célula circulante mais prevalente no sangue das aves, depois dos eritrócitos (WAKENELL, 2010; CAMPBELL, 2015). Os trombócitos também são capazes de produzir e liberar uma vasta gama de proteínas bioativas que são moléculas

inflamatórias, antimicrobianas e moduladoras do sistema imunológico (FERDOUS; SCOTT, 2023).

Para a hemostasia ocorrer, os trombócitos liberam tromboplastina que irá polimerizar o fibrinogênio na formação do coágulo. Como os trombócitos participam do processo hemostático, eles tendem a se aglomerar ou formar agregados nas lâminas de esfregaços sanguíneos. Estes trombócitos quando ativados apresentam contornos celulares indistintos, pseudópodos citoplasmáticos e desgranulação de grânulos específicos (CAMPBELL, 2015). Segundo Lam (1997), os trombócitos *in vitro* têm uma vida útil de apenas algumas horas.

Os trombócitos aviários podem desempenhar um papel na imunidade inata porque são capazes de fagocitar e podem participar na remoção de materiais estranhos do sangue. A capacidade fagocitária foi demonstrada pela primeira vez por Glick et al. (1964) em trombócitos de galinhas. Portanto, os trombócitos podem desempenhar um papel no combate à infecção bacteriana, embora os mecanismos pelos quais os trombócitos interagem, aderem ou respondem às bactérias sejam, em grande parte, desconhecidos. A microscopia óptica e eletrônica demonstraram que os trombócitos contêm vesículas lisossômicas e são ativamente fagocíticos *in vitro* para corantes vitais e bactérias gram-positivas incluindo várias cepas de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* (CAMPBELL, 2015; FERDOUS; SCOTT, 2023). Foi demonstrado que os trombócitos de galinha fagocitam cerca de três vezes mais rapidamente que os heterófilos e monócitos, e os trombócitos circulantes fagocitaram quase duas vezes mais bactérias que o heterófilo e o monócito juntos (FERDOUS; SCOTT, 2023).

A trombopoese ocorre em diferentes tecidos das aves adultas. Os trombócitos em aves originam-se de células que se assemelham a progenitores hematopoiéticos multipotentes e são produzidos na região onde as primeiras células hematopoiéticas intraembrionárias se desenvolvem (FERDOUS; SCOTT, 2023). A formação do trombócito pode ser dividida em seis estágios, respectivamente: tromboblastos, trombócitos imaturos precoces, trombócitos imaturos tardios, trombócitos jovens maduros, trombócitos maduros e trombócitos maduros em degeneração (MCNEILIS, 1972).

### 2.3.1. Fibrina rica em trombócitos – FRT

As aves, por possuírem trombócitos, o concentrado de fibrina recebe a denominação de fibrina rica em trombócitos (FRT). Os estudos relacionados à ação regenerativa em feridas dos concentrados de trombócitos em aves não foram encontrados durante a escrita desta tese.

Existem poucos trabalhos que relatam a técnica de obtenção do plasma rico em trombócitos (PRT) (FERNANDES, 2018; CORTEZE, 2019; MINO et al., 2024), e apenas um artigo relatando o método de obtenção do FRT em aves, porém não existem trabalhos avaliando a eficácia regenerativa do FRT (FERNANDES et al., 2019; MINO et al., 2024).

Fernandes e colaboradores (2019) demonstraram em seu estudo realizado em galinhas domésticas (*Gallus Gallus domesticus*), arara-canidé (*Ara ararauna*), tucano-toco (*Ranphastos toco*) e papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) que é possível realizar PRF nestas espécies utilizando o mesmo protocolo proposto para mamíferos e, que o FRT é extremamente similar macro e microscopicamente ao PRF. Porém em seu estudo não houve avaliação clínica da utilização do FRT em lesões nas respectivas aves.

Os trombócitos, diferentemente das plaquetas dos mamíferos, possuem núcleo e são maiores quando comparadas entre si (BOUDREAUX, 2010; WAKENELL, 2010; BAKER, 2015; CAMPBELL, 2015) e isso torna a separação dos trombócitos dos outros componentes celulares extremamente desafiador. Essa dificuldade em separar os trombócitos do soro sanguíneo pode ser explicada pela Lei de Stokes. Segundo Arnoczky et al. (2011) o princípio físico descrito pela lei de Stokes afirma que a velocidade de sedimentação das partículas em um ambiente líquido em resposta às forças gravitacionais é aproximadamente proporcional ao seu diâmetro.

### 2.4. A influência das plaquetas/trombócitos na regeneração óssea

As plaquetas são recrutadas nas primeiras horas após o trauma e, em cooperação com a fibrina promovem a formação de hematomas. Após a ativação, as plaquetas liberam seus fatores de crescimento e citocinas, assim, regulam a fase inflamatória da regeneração óssea e subsequentemente modulam a formação de calos moles e duros e a remodelação (ORYAN et al., 2015).

Os principais fatores de crescimentos envolvidos na reparação óssea (Tabela 2) são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta

(TGF- $\beta$ ), fator de crescimento vascular (EGF), fator de crescimento insulínico (IGF) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (DEL CARLO et al., 2008).

Tabela 2– Fatores de crescimento e sua ação na regeneração óssea.

Estágio da regeneração	Fator de crescimento	Fonte, localização e ação
Resposta imediata ao trauma	BMP	Encontrado em células mesenquimais no hematoma e na camada próxima ao periósteo adjacente à fratura. O mRNA da BMP está presente nas células osteoprogenitoras do periósteo em proliferação, no canal medular e nos músculos próximos à fratura.
	TGF- $\beta$	Liberado pelas plaquetas e células inflamatórias no hematoma da fratura. Estimula a proliferação de células mesenquimais adjacentes ao periósteo.
	PDGF	Liberado pelas plaquetas e células inflamatórias no hematoma da fratura. Encontrado em macrófagos próximos ao periósteo 2 dias após a fratura, diminui a partir do 3º dia. Estimula a proliferação de células mesenquimais na camada adjacente ao periósteo.
Ossificação intramembranosa	BMP	Encontrado em osteoblastos que revestem o osso primitivo (tecido) 6 dias após a fratura. Diminui à medida que o osso amadurece.
	TGF- $\beta$	Encontrado nas células mesenquimais em proliferação, nos osteoblastos que revestem o osso novo e na matriz.
	PDGF	Liberado pelas plaquetas e estimula a formação óssea intramembranosa.
Condrogênese	BMP	As células precursoras condróides coram intensamente antes de se tornarem condrócitos imaturos.
	TGF- $\beta$	Encontrado em células mesenquimais, condrócitos jovens e condrócitos maduros.
	IGF-I	Encontrado em condroblastos jovens na borda do tecido cartilaginosa substituindo o tecido fibroso.
Ossificação endocondral	BMP	Coloração intracelular intensa de osteoblastos que revestem a matriz da cartilagem calcificada.
	TGF- $\beta$	Encontrado na matriz que envolve os condrócitos hipertróficos e nos condrócitos da borda próxima à ossificação.

PDGF - fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformador beta; EGF - fator de crescimento vascular; IGF - fator de crescimento insulínico; BMP - proteínas morfogenéticas ósseas. Fonte: Solhein (1998).

Os numerosos fatores de crescimento presentes nas plaquetas, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF I e II) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) desempenham um papel importante na regeneração óssea (MALHOTRA et al., 2015). A liberação dos fatores de crescimento das plaquetas começa a partir de dez minutos

após a coagulação do sangue e mais de 95% dos fatores de crescimento pré-sintetizados contidos nos grânulos  $\alpha$  são secretados na primeira hora (ORYAN et al., 2015).

Alguns autores consideram que em procedimentos cirúrgicos, o PRF poderia servir como uma membrana reabsorvível para regeneração óssea guiada, evitando a migração de células indesejáveis para o defeito ósseo e fornecendo um espaço que permite o estabelecimento de células osteogênicas e angiogênicas em que o coágulo sanguíneo subjacente mineralize (BORIE et al., 2015).

As interações diretas entre a fibrina e as células ósseas durante a consolidação estão insuficientemente documentadas. Por outro lado, numerosos estudos em animais tratam do efeito da fibrina na regeneração óssea. Os resultados são contraditórios; a consolidação óssea é melhorada ou permanece inalterada. Essas divergências podem ser causadas por diferenças entre os modelos utilizados: tipo de animal, defeito ósseo e gel de fibrina (CHOUKROUN et al., 2006).

A maioria dos estudos *in vitro* pré-clínicos relatam o importante papel das plaquetas na adesão, migração e proliferação de células semelhantes a osteoblastos. Além disso, alguns estudos relataram atividade osteoblástica estimulada pelas plaquetas e liberação de quimiocinas. Os efeitos benéficos das plaquetas em células semelhantes a osteoblastos fornecem evidências convincentes para a aplicação clínica do PRF como uma ferramenta potente para facilitar a regeneração óssea (ZHANG et al., 2021).

A aplicação exógena de fatores de crescimento associados a plaquetas demonstrou estimular a proliferação de osteoblastos em cultura e estimular o recrutamento e proliferação de osteoblastos em defeitos em crânios de coelhos, além de acelerar a regeneração óssea em fraturas de tíbia em ratos e de apresentar resultados promissores quando o PRP foi aplicado em defeitos maxilofaciais e mandibulares (MALHOTRA et al., 2015).

A vascularização é outro fator importante na regeneração óssea, e embora o efeito da angiogênese das plaquetas tenha sido confirmado por muitas pesquisas, ainda são poucos os estudos que relatam o efeito dessa angiogênese no processo de regeneração óssea (ZHANG et al., 2021). O PRP pode ser utilizado como auxílio na consolidação óssea em não uniões, pois as plaquetas irão restaurar o processo de regeneração que foi interrompido, aumentando os níveis de fatores de crescimento que estão baixíssimos no local (MALHOTRA et al., 2015).

Os produtos ricos em fibrina possuem ação osteoindutora (capacidade de induzir a formação de osso ectópico), mas as propriedades de regeneração óssea mostraram resultados divergentes. Isso pode ser atribuído às variações dos locais implantados e até mesmo as

diferenças nos métodos de obtenção dos concentrados (FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2019; ZHANG et al. 2021).

### **3. HIPÓTESE**

O emprego da FRT é benéfico na consolidação do defeito experimental tibiotarso em galinhas domésticas.

### **4. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a consolidação óssea do defeito tibiotarso experimental em galinhas domésticas tratadas ou não com FRT.

#### **4.1. Objetivos específicos**

- 1- Induzir defeito tibiotarso na região metafisária proximal medial do membro direito em 30 galinhas, divididas em grupo controle e tratamento;
- 2- Preparar a FRT autólogo das 15 galinhas do grupo tratado;
- 3- Recobrir o defeito ósseo com FRT nas 15 galinhas do grupo tratamento;
- 4- Avaliar radiograficamente todas as galinhas do experimento;
- 5- Realizar análise histopatológica de tibiotarsos das galinhas aos 10, 20 e 30 dias de consolidação, a depender dos grupos sorteados, avaliando células inflamatórias, tecido cartilaginoso, tecido conjuntivo fibroso, tecido osteóide, atividade osteoblástica, presença de vasos sanguíneos, formação de trabéculas, deposição de fibrina e a continuidade cortical;
- 6- Avaliar o uso do aplicativo ImageJ para avaliação da densidade óssea relativa (DOR) em imagens radiográficas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Animais

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), sendo aprovado sob número do protocolo 134/2021.

Foram utilizadas 30 galinhas poedeiras da linhagem Leghorn pesando em média  $1,8 \pm$  DP kg, com aproximadamente 60 semanas de idade, provenientes da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB), da Escola de Veterinária da UFMG.

Na fazenda as aves estavam alojadas em gaiolas medindo aproximadamente 40 x 40 x 40 cm e em número máximo de quatro animais por gaiola. As gaiolas eram dispostas em fileiras com dois andares em um galpão coberto e fechado por telas nas laterais. Após a transferência para a Escola de Veterinária, foram alojadas no Biotério experimental do MULTILAB, em gaiolas medindo 60 x 60 x 60 cm com, no máximo duas aves por gaiola, recebendo água e alimentação *ad libitum*, e temperatura controlada de 24°C e luminosidade natural (Figura 3).

Figura 4 - Ambiente e estante de gaiolas onde as aves ficaram durante todo o experimento. Cada gaiola continha no máximo duas aves, com alimentação e água à vontade.



Uma única equipe de quatro integrantes foi responsável pelo manejo das galinhas (limpeza das gaiolas, limpeza do local, alimentação e fornecimento de água), durante todo o período do experimento.

Antes da realização do procedimento cirúrgico, para a indução da falha óssea, foi realizado um período de adaptação das aves ao novo manejo e ambiente por 15 dias.

## 5.2 Delineamento experimental

As aves foram divididas aleatoriamente em dois grupos: GC- grupo controle e GT- grupo que recebeu o tratamento com FRT. Cada grupo, por sua vez foi subdividido em três subgrupos, contendo cinco animais cada, de acordo com os tempos de avaliação após a indução da falha óssea: GC1, GC2, GC3, GT1, GT2 e GT3. Nos tempos 1, 2 e 3 as aves foram avaliadas 10, 20 e 30 dias após a cirurgia, respectivamente.

### 5.2. Procedimento cirúrgico para a realização da falha óssea.

A falha óssea monocortical foi realizada em todas as aves dos grupos controle e tratamento. O procedimento cirúrgico foi realizado na sala de técnica cirúrgica do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG mantendo-se toda assepsia cirúrgica necessária. Para a realização do procedimento cirúrgico as aves não passaram por jejum prévio. A medicação pré-anestésica (MPA) consistiu na administração de cetamina (20mg/kg), midazolam (0,25mg/ml) e morfina (0,5mg/kg), aplicados na mesma seringa por via intramuscular (IM). No mesmo momento da MPA foi administrado cefalotina (30mg/kg) por via IM, em dose única.

Após 10 minutos da MPA iniciou-se a remoção das penas de todo membro pélvico direito. Foi realizada antisepsia prévia com clorexedine degermante a 2% e os dígitos do membro foram enfaixados com uma atadura elástica (Figura 5). A indução anestésica foi realizada com máscara de isoflurano, aproximadamente 20 minutos após a MPA. Após a indução anestésica, realizou-se a intubação com uma sonda traqueal nº 2.5 conectada imediatamente ao aparelho de anestesia inalatória com isoflurano (CAM 1.5%) para manutenção anestésica.

Figura 5 – Imagem do preparo da ave no pré-operatório. Ave sedada com medicação pré-anestésica e com todas as penas do membro pélvico direito retiradas para posterior antisepsia pré-operatória.



A coleta da amostra de sangue para o preparo do FRT foi realizada imediatamente após a indução anestésica. Foram coletados 4 ml de sangue pela veia jugular externa direita

diretamente em um tubo Vacutainer® com ativador de coágulo jateado na parede interna do tubo para o processamento do FRT.

A ave foi posicionada em decúbito dorsal e o membro pélvico esquerdo amarrado na mesa cirúrgica deixando apenas o membro pélvico direito livre para a realização do procedimento (Figura 6). Para a antisepsia do membro utilizou-se clorexedine degermante a 2% seguido de clorexedine alcoólica a 0.5% realizada pelo cirurgião paramentado. Após a antisepsia outra atadura, estéril, era colocada ao redor do membro em sua extremidade distal. Foi utilizado um campo cirúrgico medindo 1,5 x 1,5 m recobrimdo toda a mesa e a ave deixando apenas o membro pélvico direito exposto.

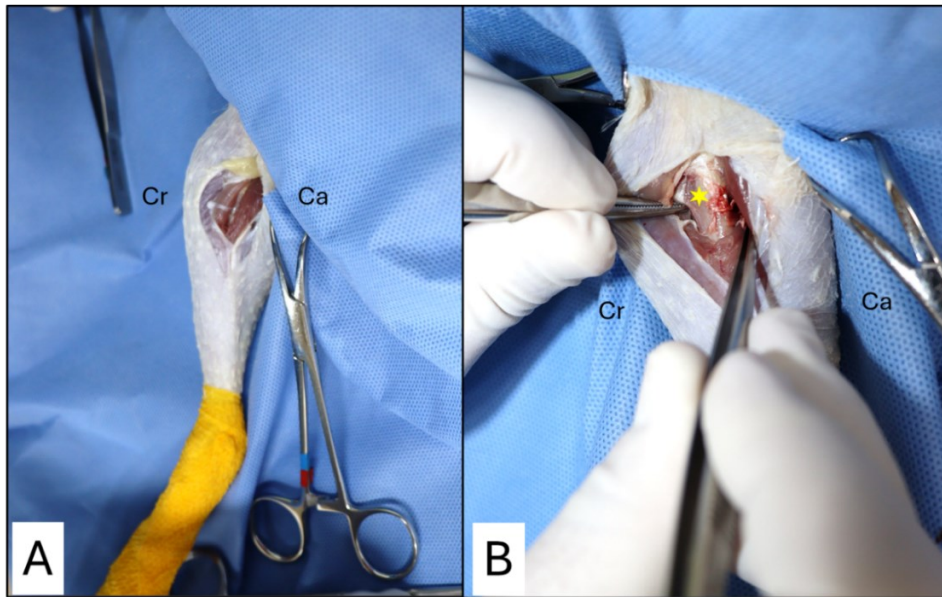
Figura 6: Imagem do procedimento pré-operatório imediato. Membro pélvico direito da ave exposto para o início da cirurgia. Notar o campo cirúrgico cobrindo o paciente e uma atadura envolvendo a extremidade distal do membro para uma melhor assepsia cirúrgica, deixando apenas a face medial do membro exposta.



Para a confecção do defeito ósseo foi realizado acesso medial no terço proximal do tibiotarso direita. A incisão de pele foi realizada com bisturi cabo 3 e lâmina 15 e, com o auxílio de uma tesoura de *Metzemaum* o subcutâneo foi dissecado até a musculatura. Com o auxílio de uma pinça hemostática o músculo gastrocnêmio medial foi rebatido cranialmente e o músculo flexor longo do hálux caudalmente, expondo a face medial proximal do tibiotarso (Figura 7).

Figura 7 - Imagens transoperatórias. (A) região medial proximal do tibiotarso com a pele incisada e subcutâneo divulsionado com os músculos gastrocnêmio medial e flexor longo do halux expostos. (B)

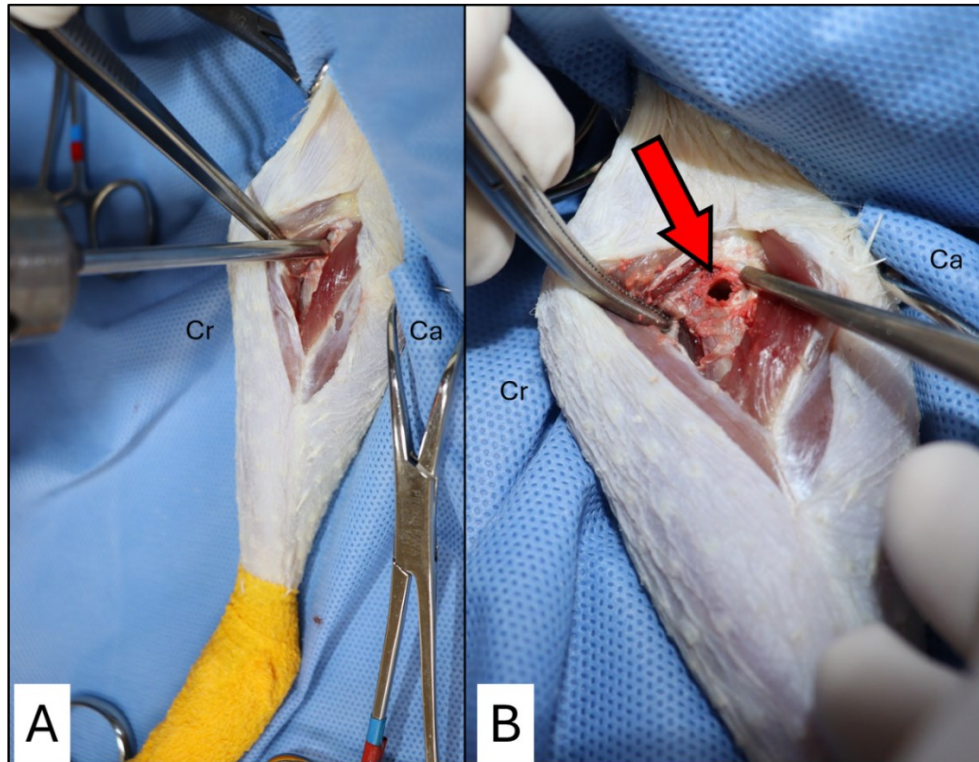
Musculatura rebatida expondo a região proximal do osso a ser perfurada demarcada com um asterisco amarelo.



Cr, cranial; Ca, Caudal.

Após a exposição da face óssea e com auxílio de um perfurador ósseo pneumático (DePuy Synthes®) foi realizada uma perfuração monocortical utilizando-se um pino intramedular de diâmetro 4.0mm (Figura 8). Imediatamente após a perfuração, apenas as galinhas do grupo tratamento receberam a FRT no local da lesão óssea (a técnica de preparação do FRT será explicada mais detalhadamente a frente). A síntese foi realizada com fio poliglecaprone 25 (Carprofyl®) 4-0 aproximando a camada muscular com sutura padrão Sultan e no subcutâneo, utilizando o mesmo fio, em padrão intradérmico contínuo. A dermorrafia foi realizada com fio de mononáilon (Mononylon®) tamanho 4-0 em padrão simples separado.

Figura 8- Imagens transoperatórias. (A) Local de perfuração do tibiotarso já com o pino posicionado para o início da perfuração óssea monocortical. (B) Seta indica o local onde ocorreu a perfuração monocortical



Cr, cranial; Ca, caudal.

Ao término do procedimento cirúrgico um curativo com gaze estéril foi fixado com fita micropore no local da incisão. O retorno anestésico ocorreu na sala de cirurgia com monitoração constante da ave e, após o retorno anestésico as aves foram encaminhadas para o setor de radiologia para a realização de radiografias pós-cirúrgica imediata.

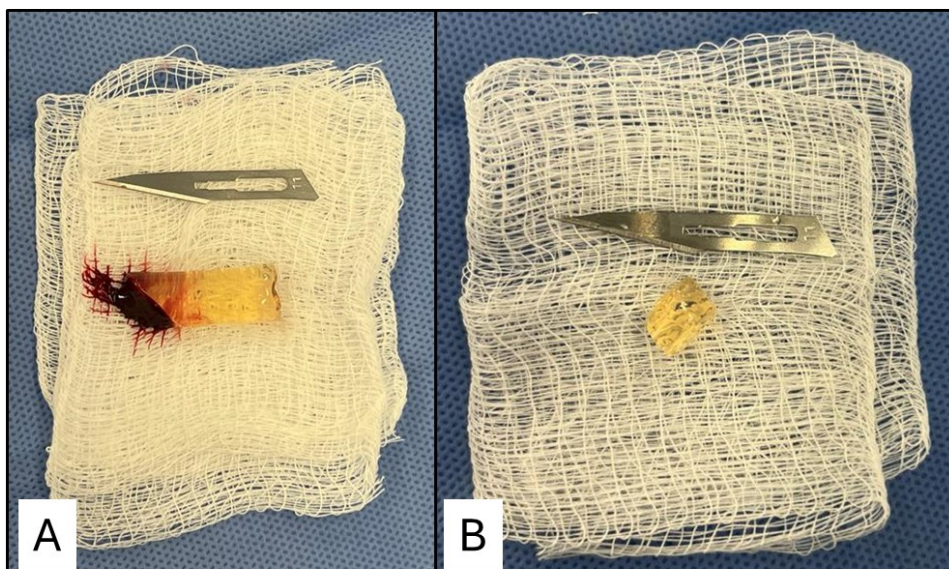
No tratamento pós-cirúrgico foi realizado apenas analgesia com tramadol duas vezes ao dia na dose de 5mg/kg durante três dias consecutivos. Um segundo curativo foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico, retirando o curativo antigo e limpando o local da ferida com solução NaCl 0,9%. Esse segundo curativo permaneceu durante três dias e após a sua remoção não foi realizado mais curativo. Os pontos foram removidos 11 dias após a cirurgia.

A equipe cirúrgica foi a mesma em todos os procedimentos, trocando apenas o auxiliar e permanecendo sempre o mesmo cirurgião e anestesista. Após o término de cada procedimento todo material estéril era trocado para a próxima ave.

### 5.3. Preparação e aplicação da fibrina rica em trombócitos

Imediatamente após a coleta do sangue as amostras foram centrifugadas (Daiki 80-2B-DM®) a 3000 rpm durante 15 minutos. Ao final da centrifugação o tubo foi retirado da centrífuga e a tampa do tubo removida para que o cirurgião pudesse remover o coágulo formado de forma estéril. O coágulo foi removido do tubo com o auxílio de uma pinça anatômica. Com uma lâmina de bisturi número 11 o coágulo de fibrina foi cortado com aproximadamente 5mm (Figura 9) e colocado sobre o defeito ósseo das galinhas do GT. Antes da colocação do coágulo, um ponto de sutura na musculatura era realizado sem o fechamento com o nó para imediatamente após a colocação da FRT realizar o nó e cobrir o defeito ósseo com o coágulo exatamente em cima da lesão óssea.

Figura 9 - Imagens do coágulo de fibrina imediatamente após a centrifugação e remoção do coágulo do tubo de coleta. (A) FRT removido inteiro do tubo ainda com as hemácias. (B) Coágulo de fibrina seccionado com uma lâmina 11, deixando-o com aproximadamente 5mm.

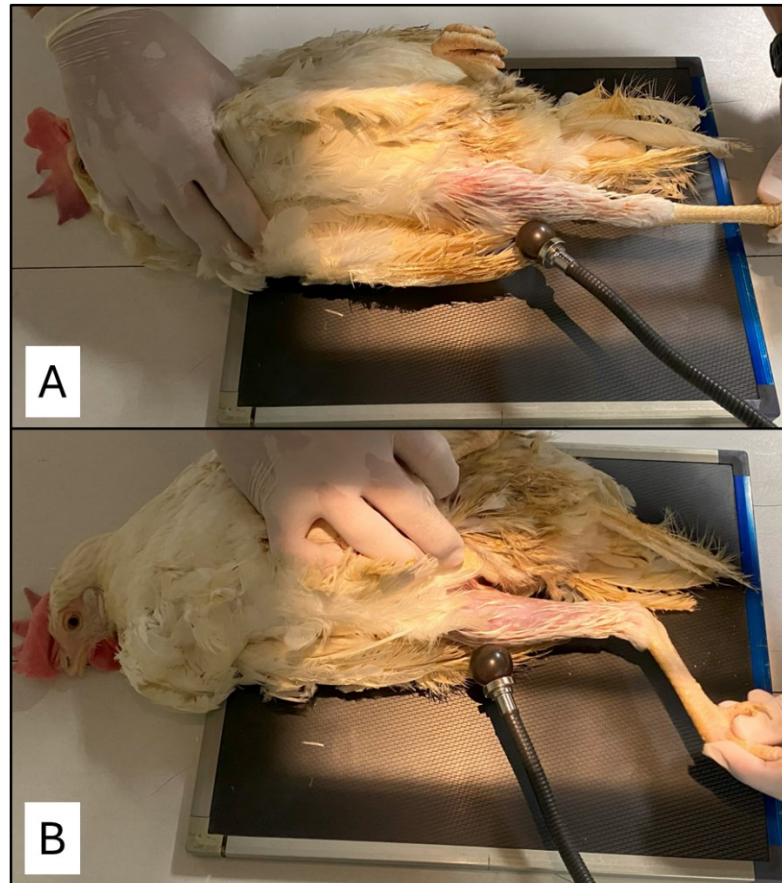


#### 5.4. Avaliação radiográfica

Para a avaliação radiográfica o tibiotarso direito de todas as aves foi radiografado em duas projeções ortogonais (craniocaudal e mediolateral) nos tempos: imediatamente e 10 dias após o procedimento cirúrgico em todos os animais; 20 dias nos grupos GC2, GC3, GT2 e GT3 e 30 dias nos grupos GC3 e GT3 (Figura 10).

Figura 10 - Momento da realização das imagens radiográficas 20 dias após a cirurgia. (A) Galinha posicionada em decúbito dorsal com o membro pélvico direito em extensão para o posicionamento

craniocaudal do tibiotarso. (B) Posicionamento do membro para uma projeção radiográfica mediolateral com o joelho e calcanhar semiflexionado para uma melhor orientação radiográfica. Notar o marcador radiográfico próximo ao local de estudo.



Para a avaliação radiográfica foram utilizados três parâmetros: consolidação óssea completa; reação periosteal; e radiopacidade. Para cada avaliação foi dado os seguintes valores:

- a) Consolidação óssea: não consolidada (1) e consolidada (2);
- b) Esclerose óssea: ausente (1), leve (2), moderada (3) e grave (4).
- c) Radiopacidade: ausente (1), leve (2), moderada (3) e grave (4).

Todos os exames foram realizados no mesmo aparelho (Konica Minolta® Regius model 110) no setor de radiologia do Hospital Veterinário da EV-UFG. Para a técnica radiográfica foi utilizado 50 Kv, tempo de 0.6s e Ma de 200 em todos os exames realizados. O posicionamento foi realizado sempre pela mesma pessoa, que contava com a ajuda de um auxiliar.

Foi avaliada a densidade óssea relativa (DOR) com o auxílio do programa ImageJ, segundo o método de Vaquero et al. (2022). O programa fornece uma média para a escala de

cinza conforme o local selecionado. O local do defeito ósseo foi selecionado e o valor obtido foi dividido pela média selecionada no osso sem lesão. O local sem lesão selecionado foi imediatamente proximal a lesão medindo o mesmo diâmetro do defeito ósseo (4mm).

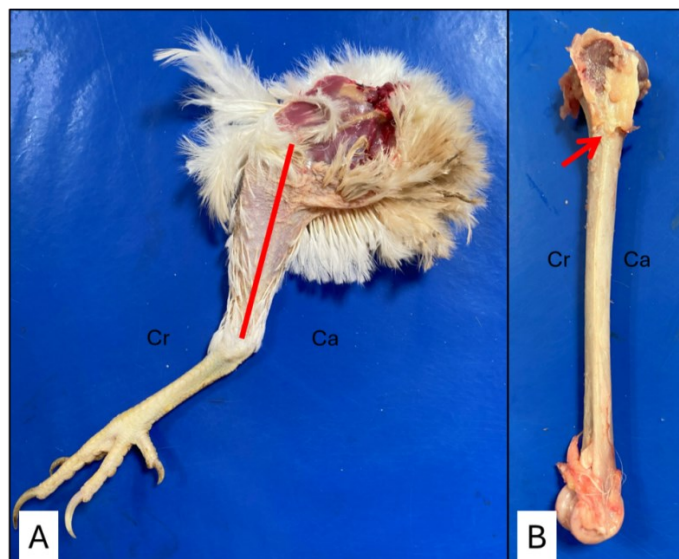
### 5.5. Avaliação histopatológica

Todas as aves foram submetidas à eutanásia para coleta de amostras e avaliação histopatológica da lesão óssea nos tempos 10, 20 e 30 dias nos grupos GC1, GT1; GC2, GT2 e GC3, GT3, respectivamente.

Para a eutanásia a veia jugular direita foi canulada com um cateter 22G e administrou-se tiopental sódico na dose de 45mg/kg seguido de cloreto de potássio 10% na dose de 100 mg/kg, seguindo as recomendações da CEUA -UFMG).

Imediatamente após a eutanásia o tibiotarso direito foi removido e dissecado, deixando apenas uma camada fina de músculo sobre o local onde foi realizado o defeito ósseo (Figura 11). Após a dissecação o tibiotarso foi armazenado em um frasco plástico contendo formaldeído a 10% até o processamento histológico.

Figura 11 - Imagens do membro após a remoção para exame anatomopatológico. (A) Membro pélvico direito removido. A linha vermelha representa o local do osso tibiotársico a ser dissecado. (B) Tibiotarso já removido do resto do membro expondo toda a face medial e com todo tecido mole adjacente dissecado, deixando apenas uma fina camada sobre o local da lesão óssea.



Cr, cranial; Ca, caudal.

Após seis meses imersos no formaldeído, os tibiotarsos foram seccionados transversalmente com 5mm de espessura (englobando toda falha óssea) e colocados em cassetes

histológicos. As amostras foram descalcificadas em solução de ácido fórmico a 24% durante sete dias, neutralizada após esse período com uma solução alcalina de sulfato de sódio a 5%, durante 24 horas.

A inclusão do material em parafina ocorreu logo após a descalcificação ser concluída, quando as amostras foram cortadas utilizando-se micrótomo, com cortes variando de 4 a 6  $\mu\text{m}$  de espessura e fixados em lâminas de vidro para posterior coloração por hematoxilina eosina (HE).

A avaliação histológica foi realizada de forma descritiva e observando-se a presença de descontinuidade óssea, fibroblastos, proliferação fibroblástica, infiltrado inflamatório, osteoblastos, matriz osteóide e trabéculas ósseas. Para cada avaliação foi determinado um sistema de pontuação para a análise estatística: ausente (1); discreta (2); moderada (3); e intensa (4).

## 5.6. Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019). A seguir serão apresentados os métodos de acordo com os diferentes objetivos.

Para a comparação das médias obtidas na DOR foi realizado o teste de Tukey entre todos os grupos e o teste t student para comparar as médias entre os grupos em cada tempo. Para todos os testes o erro tipo I de 5% foi considerado.

### 5.6.1. Objetivo 1

Para primeira análise foi realizada estatística descritiva dos dados mensurados. Esta análise descritiva avaliou todas as variáveis numéricas e categóricas. Para as variáveis numéricas, foram calculados os principais índices (e.g. média, mediana, desvio-padrão, coeficiente de variação, quartis etc.). Esta análise foi realizada para todos os valores disponíveis no banco de dados e separadamente por grupos, afim de fornecer um perfil geral e específico para cada grupo. As seguintes variáveis foram avaliadas:

- a. Consolidação completa;
- b. Esclerose óssea;

- c. Radiopacidade;
- d. Descontinuidade óssea;
- e. Presença de fibroblastos;
- f. Proliferação fibroblástica;
- g. Infiltrado inflamatório;
- h. Presença de osteoblastos;
- i. Matriz osteóide;
- j. Trabéculas ósseas;
- l. Densidade óssea relativa.

#### 5.6.2. Objetivo 2

Para as variáveis descritas no objetivo 1, testou-se diferenças entre os dois grupos de animais, levando em consideração as medidas realizadas em três tempos distintos, caracterizando um modelo de parcelas e subparcelas. Desta forma construiu-se gráficos ilustrativos das diferenças com a Análise de Componentes Principais (análise multivariada), utilizando os dados de todos os tempos, de todos os animais e de todas as variáveis numéricas do objetivo 1. Esta análise avaliou todas as variáveis em conjunto, levando em consideração a correlação entre elas.

Foram ajustados modelos de regressão logística, que são adequados a dados dicotômicos, ou modelos logísticos ordinais, adequados a dados categóricos ordinais, buscando testar diferenças entre grupos, levando em consideração os três períodos avaliados. Um modelo individual foi ajustado para cada variável preditora. Após o ajuste do modelo, testaram-se os efeitos dos grupos, do tempo, da interação entre esses fatores, de forma global (overall), e calcularam-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada estágio e para cada tempo. Para verificar a significância da diferença entre estágios para cada tempo, ou da diferença entre tempos para cada estágio, foi necessária a aplicação de testes de comparações múltiplas (*pairwise*). Para estes testes aplicou-se a correção de Sidak.

#### 5.6.3. Objetivo 3

A correlação entre as variáveis foi avaliada utilizando-se a correlação de Spearman em função da ausência de normalidade dos dados.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados do Objetivo 1

Abaixo serão apresentadas as estatísticas descritivas das variáveis do estudo (Apêndice A). Esta análise foi realizada para todos os pacientes disponíveis no banco de dados e separadamente entre os grupos e os tempos.

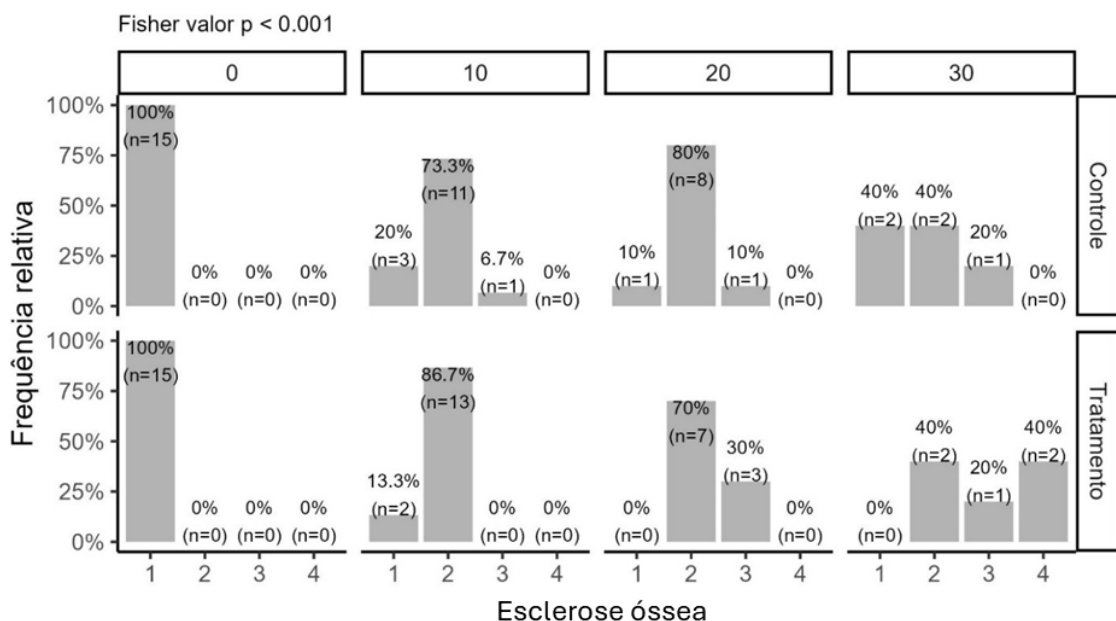
#### Avaliação radiográfica

Não houve fechamento da descontinuidade óssea e nem consolidação completa da lesão óssea em nenhuma ave do experimento, por esse motivo as variáveis “Descontinuidade óssea” e “Consolidação completa” não foram analisadas, pois todos os valores se apresentaram iguais entre eles.

A maior parte da esclerose óssea (47,8%) ocorreu de forma leve. Em 42,2% das amostras a reação foi ausente. Em 40% da amostra a radiopacidade foi ausente e em 30% das amostras ela esteve presente de uma forma leve.

Foi observada uma tendência de aumento dos escores da esclerose óssea ao longo dos dias, sendo esse aumento mais evidente no grupo tratamento (Figura 12).

Figura 12 - Comparação entre as frequências de esclerose entre grupos e entre dias.



Para ambos os grupos observou-se uma tendência de aumento dos escores de radiopacidade ao longo dos dias (Figura 13 e 14).

Figura 13 - Comparação entre as frequências de radiopacidade entre grupos e entre dias.

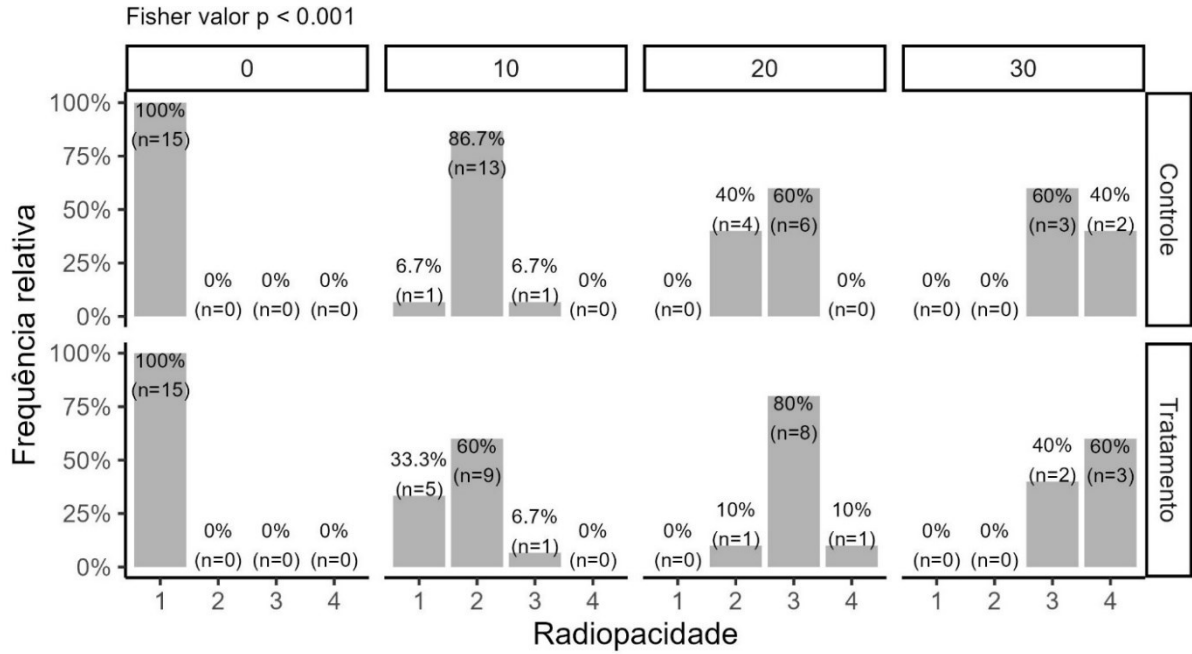
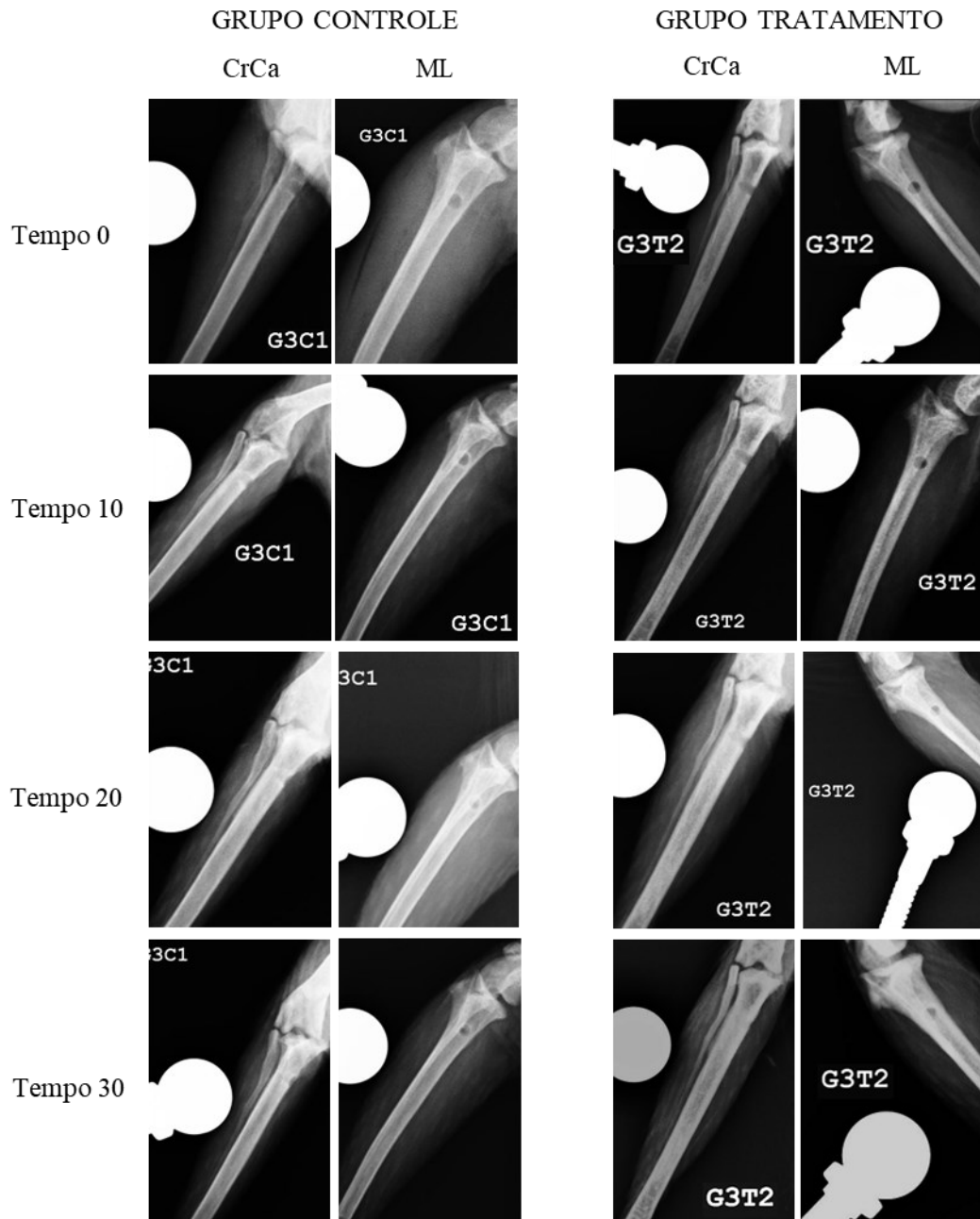


Figura 14 – Fotografias da radiografia comparando um animal do grupo controle e grupo tratamento em cada tempo de pós-operatório demonstrando a evolução da regeneração do defeito ósseo conforme o tempo.



CrCa – craniocaudal; ML – mediolateral.

#### Avaliação histopatológica

A maioria dos fibroblastos (56,7%) se encontrou desorganizados. A maior parte da proliferação fibroblástica (53,3%) era intensa, seguido da classificação moderada (33,3%).

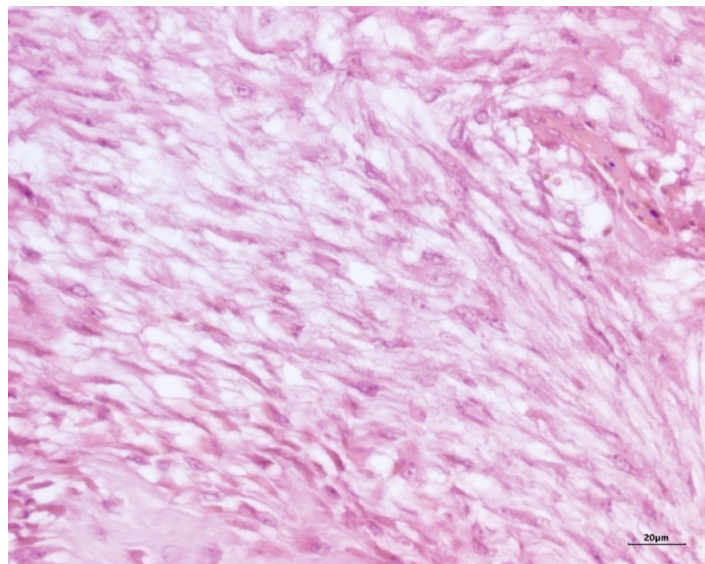
Não foi observado um padrão claro da distribuição das frequências de fibroblastos desorganizados entre grupos e entre tempos (Figura 15 e 16).

Figura 15 - Frequência de fibroblastos entre grupos e entre dias.



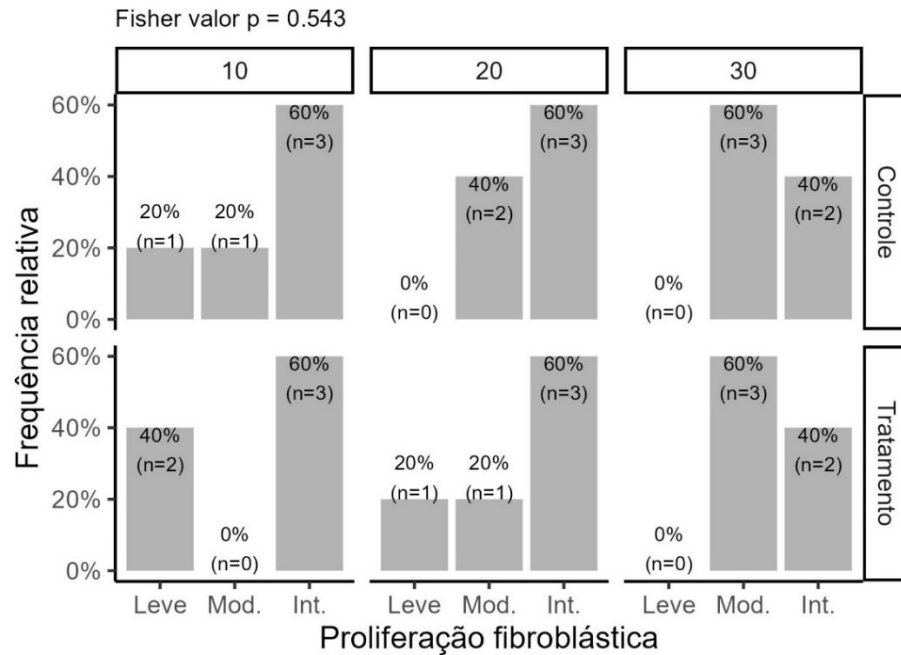
Org. – organizados; Desorg. – desorganizados.

Figura 16 - Fotomicrografia do processo de regeneração do defeito ósseo do tibiotarso de uma ave do grupo controle avaliada com 10 dias preenchido com fibroblastos. Coloração de HE (aumento de 400x).



Verificou-se que a proliferação fibroblástica moderada apresentou uma tendência crescente nos dois grupos. Sendo o oposto verificado para o estágio leve, que apresentou trajetória descendente (Figura 17).

Figura 17 - Frequência de proliferação fibroblástica entre grupos e entre dias.



Mod. – moderado; Int. – intenso.

A maior concentração de infiltrado inflamatório encontrou-se no estágio moderado (53,3%), seguido do estágio leve (30%). A maior parte de osteoblastos (56,7%) foi observado no estágio moderado, seguido do intenso (30%).

Verificou-se que a presença de infiltrado inflamatório no estágio moderado do grupo controle tendeu a crescer (Figura 18). No grupo tratamento, não foi observado um padrão claro (Figura 19).

Figura 18 – Fotomicrografia do defeito ósseo do tibiotarso de uma ave do grupo tratamento avaliada com 20 dias. Observar a presença de linfócitos (asteriscos), heterofilos (setas) e fibroblastos (cabeça de setas). Coloração de HE, aumento de 400x.

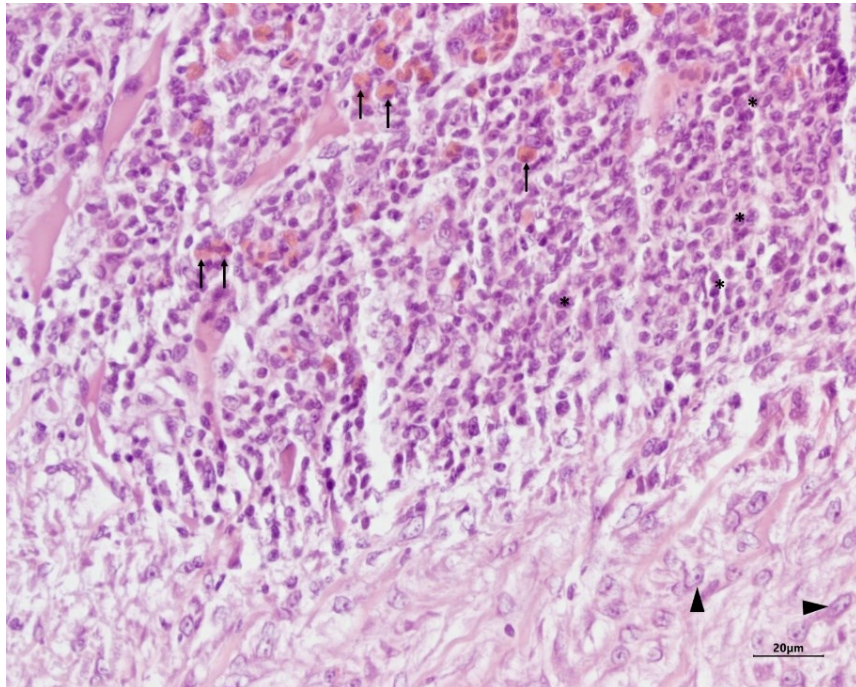
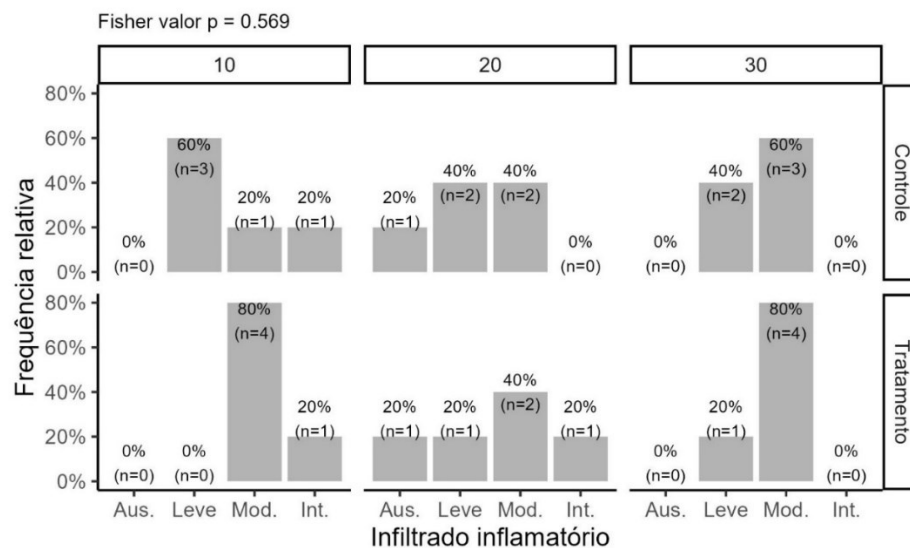


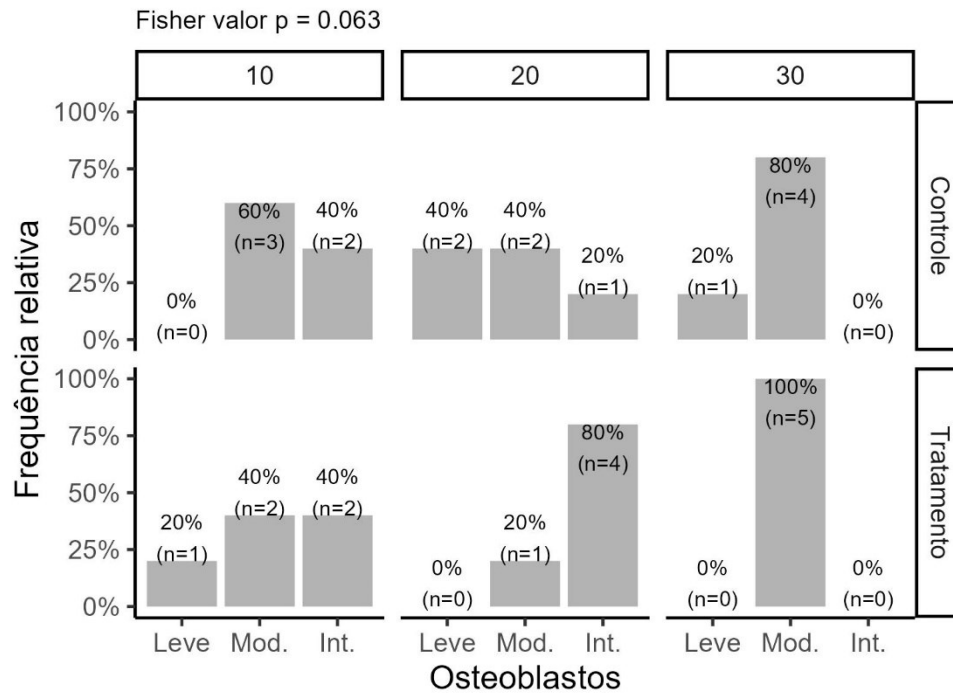
Figura 19 - Comparação entre a frequência de infiltrado inflamatório entre grupos e entre dias.



Aus. – ausente; Mod. – moderado; Int. – intenso.

Verificou-se que os osteoblastos de estágio intenso no grupo controle tenderam a decrescer com o tempo de avaliação. No grupo tratamento não foi observado um aumento com 20 dias para posterior redução, não havendo um comportamento linear (Figura 20).

Figura 20 - Comparação entre as frequências de osteoblastos entre grupos e entre dias.

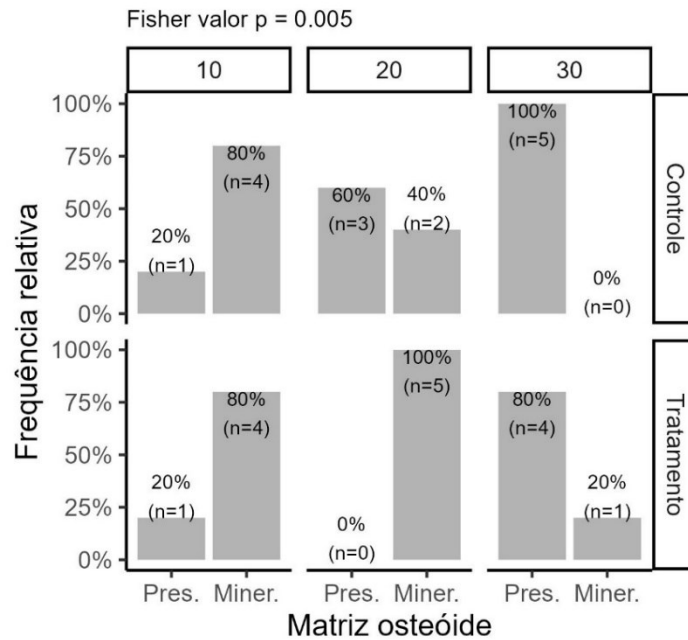


Mod. – moderado; Int. – intenso.

Houve um equilíbrio na frequência de matriz osteóide presente e mineralizada. Aproximadamente dois terços das amostras não apresentavam trabéculas ósseas.

Verificou-se que, no grupo controle a presença de matriz osteóide demonstrou uma tendência crescente ao longo dos dias de avaliação (Figura 21).

Figura 21 - Comparação entre as frequências do tipo de matriz osteóide entre grupos e entre dias.



Pres. – presente; Miner. – mineralizado.

Verificou-se que a frequência da presença trabéculas ósseas apresenta uma tendência de decréscimo em ambos os grupos ao longo dos dias (Figura 22).

Figura 22- Comparação entre as frequências de trabéculas ósseas entre grupos e entre dias.

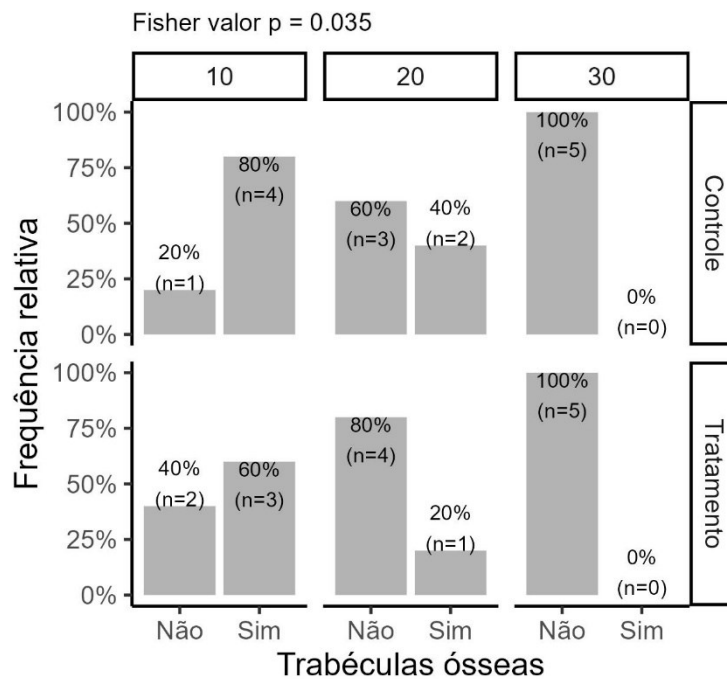
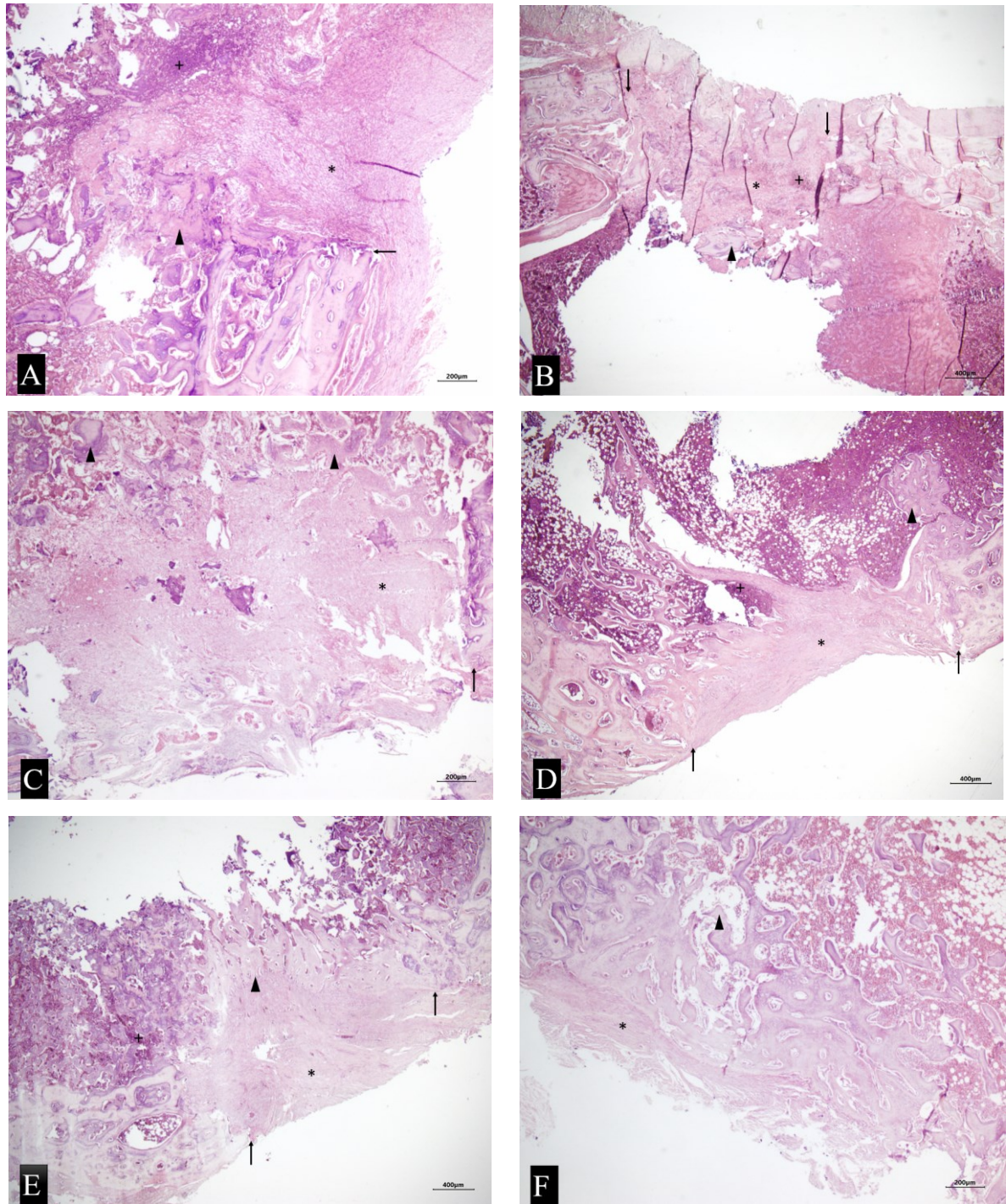


Figura 23 – Fotomicrografia da avaliação histopatológica dos tibiotarsos de galinhas com defeito experimental: (A) Grupo controle eutanásia com 10 dias; (B) grupo tratamento eutanásia com 10 dias; (C) grupo controle eutanásia com 20 dias; (D) grupo tratamento eutanásia com 20 dias; (E) grupo controle eutanásia com 30 dias; (F) grupo tratamento eutanásia com 30 dias. Observar nas imagens a presença de proliferação de fibroblastos (asterisco), da descontinuidade óssea (seta), matriz osteóide (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório (positivo).



## 6.2. Resultados do Objetivo 2

Nesse tópico serão apresentados dois resultados dos modelos de regressão ajustados para cada variável resposta. Inicialmente será apresentada a tabela do efeito global (overall) do grupo, do tempo e da interação entre estas duas variáveis o que significa que o valor de uma altera o comportamento da outra. Para cada variável e para a interação são apresentados valores de “p” (probabilidade de significância estatística). Valores de p menores que 0,05 (ou seja, 5%) indicam que há evidências de que aquela variável teve um efeito sobre a variável resposta. Se a interação entre tempo e grupo for significativa (a interação é representada pelos dois pontos entre os nomes das variáveis), então existe evidência estatística de que a modificação na variável resposta ao longo do tempo foi distinta entre os dois grupos.

Em seguida, será apresentado o gráfico com as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo, em cada tempo. As letras acima de cada tempo representam as comparações múltiplas (pairwise) entre os grupos e os tempos analisados. Pontos que compartilham pelo menos uma letra não possuem diferenças significativas entre si a um nível de significância de 0,05 (5%). Recomenda-se interpretar as diferenças apenas quando ambos os testes (overall e pairwise) forem concordantes, isto é, apenas quando o teste global reportar um valor p significativo e o teste par-a-par evidenciar pelo menos uma dupla diferente entre si.

#### 6.2.1. Esclerose óssea

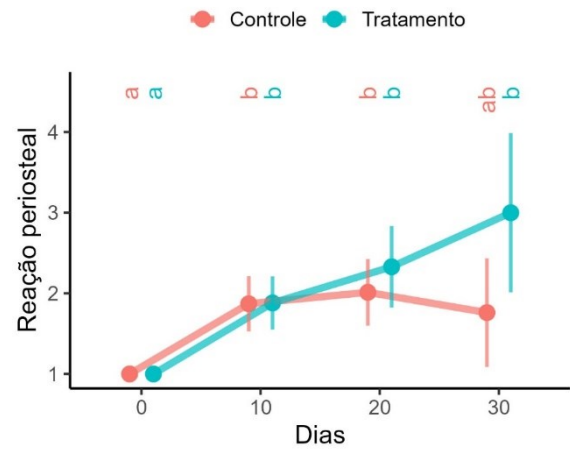
Observou-se um efeito significativo de tempo e marginalmente significativo de grupo (Tabela 3). As comparações múltiplas evidenciaram um aumento para ambos os grupos a partir do dia 10, sendo que o grupo tratamento manteve uma tendência de aumento, enquanto o grupo controle mostrou uma estabilização e uma queda no dia 30 (Figura 24).

Tabela 3 - Valores p para reação periosteal.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
<b>Grupo</b>	3,5	1	0,063
<b>Dias</b>	83,3	3	< 0,001
<b>Grupo:Dias</b>	6,4	3	0,094

G.L. – grau de liberdade.

Figura 24 - Médias estimadas da reação periosteal e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.



### 6.2.2. Radiopacidade

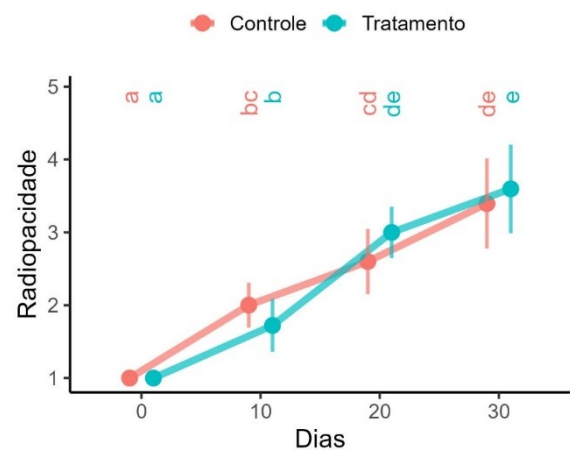
Houve um efeito significativo de tempo (Tabela 4), sendo que os grupos apresentaram um comportamento similar de aumento da radiopacidade ao longo dos dias (Figura 25).

Figura 25 - Médias estimadas da radiopacidade e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.

Tabela 4 - Valores p para radiopacidade.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
<b>Grupo</b>	0,1	1	0,809
<b>Dias</b>	136,5	3	< 0,001
<b>Grupo:Dias</b>	6,3	3	0,099

G.L. – grau de liberdade.



### 6.2.3. Fibroblastos

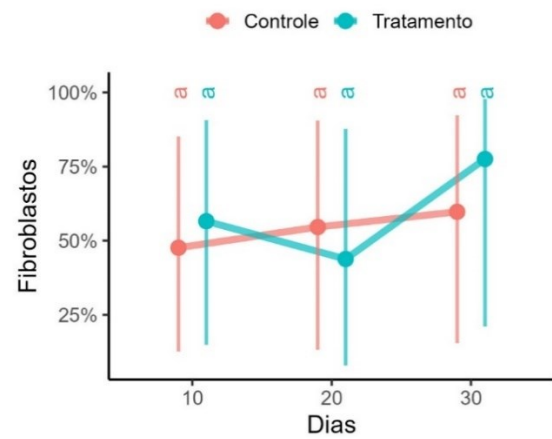
Não foi observado fatores significativos para fibroblastos (Tabela 5 e Figura 26).

Tabela 5 – Valores p para fibroblastos.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
Grupo	0,1	1	0,707
Dias	1,1	2	0,572
Grupo:Dias	0,9	2	0,638

G.L. – grau de liberdade.

Figura 26 - Médias estimadas de fibroblastos e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.



#### 6.2.4. Proliferação fibroblástica

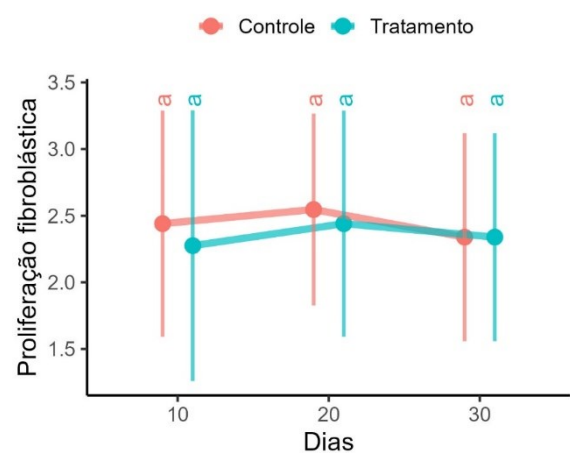
Não foi observado fatores significativos para proliferação fibroblástica (Tabela 06 e Figura 27).

Tabela 6 - Valores p para proliferação fibroblástica.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
Grupo	0,1	1	0,753
Dias	0,3	2	0,860
Grupo:Dias	0,1	2	0,964

G.L. – grau de liberdade.

Figura 27 - - Médias estimadas da proliferação fibroblástica e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.



#### 6.2.5. Infiltrado inflamatório

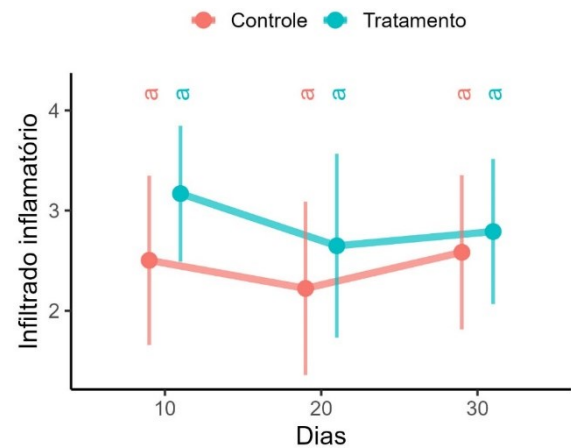
Não foi observado fatores significativos para infiltrado inflamatório (Tabela 7 e Figura 28).

Tabela 7 - Valores p para infiltrado inflamatório.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
<b>Grupo</b>	2,7	1	0,098
<b>Dias</b>	1,7	2	0,431
<b>Grupo:Dias</b>	0,7	2	0,698

G.L. – grau de liberdade.

Figura 28 - Médias estimadas do infiltrado inflamatório e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.



#### 6.2.6. Osteoblastos

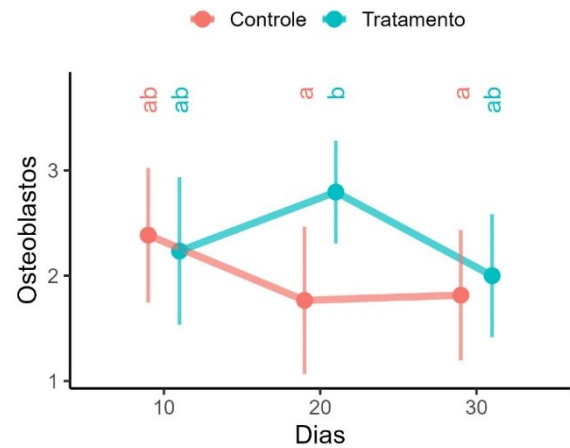
Foi observado um efeito marginalmente significativo da interação entre grupo e tempo (Tabela 8). As comparações múltiplas evidenciam diferenças entre a média do grupo tratamento no dia 20 em relação às médias do grupo controle nos dias 20 e 30, com menores valores para esses últimos (Figura 29).

Tabela 8 - Valores p para osteoblastos.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
<b>Grupo</b>	2,4	1	0,123
<b>Dias</b>	3,4	2	0,178
<b>Grupo:Dias</b>	5,7	2	0,059

G.L. – grau de liberdade.

Figura 29 - Médias estimadas para osteoblastos e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.



### 6.2.7. Matriz osteóide

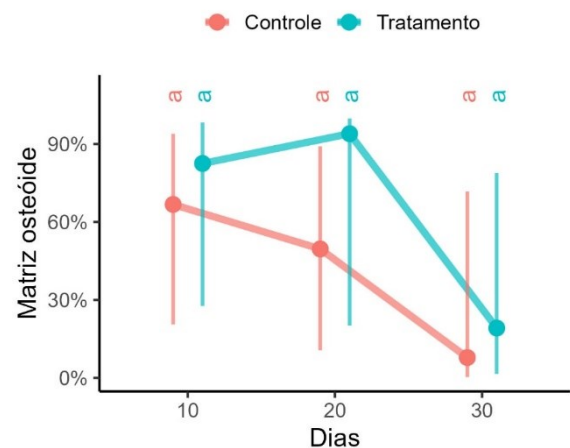
O teste global mostrou um efeito significativo de tempo e marginalmente significativo de grupo (Tabela 9). Entretanto, as comparações múltiplas não evidenciaram diferenças entre nenhum grupo e nenhum tempo (Figura 30). De toda forma, notou-se uma tendência de queda da mineralização da matriz osteóide ao longo do tempo, sendo mais acentuada no grupo controle.

Tabela 9 – Valores p para matriz osteóide.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
<b>Grupo</b>	3,7	1	0,053
<b>Dias</b>	14,3	2	< 0,001
<b>Grupo:Dias</b>	1,2	2	0,557

G.L. – grau de liberdade.

Figura 30 - Médias estimadas para matriz osteóide e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo.



### 6.2.8. Trabéculas ósseas

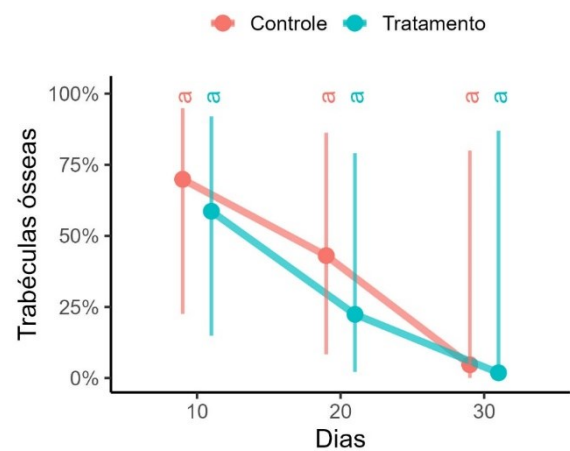
Assim como a matriz osteóide, o teste global mostrou um efeito significativo de tempo (Tabela 10), porém as comparações múltiplas não evidenciaram diferenças entre nenhum grupo e nenhum tempo (Figura 31). Pode-se dizer que a presença de trabéculas reduz ao longo do tempo em ambos os grupos igualmente.

Figura 31 - Médias estimadas para trabéculas ósseas e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo em cada tempo.

Tabela 10 – Valores p para trabéculas ósseas.

Fator	X <sup>2</sup>	G.L.	Valor p
<b>Grupo</b>	1,0	1	0,326
<b>Dias</b>	14,1	2	< 0,001
<b>Grupo:Dias</b>	-1,0	2	1

G.L. – grau de liberdade.



### 6.3.Resultados do Objetivo 3

#### 6.3.1. Correlações

Abaixo a tabela com as correlações entre os pares de variáveis (Tabela 11).

Tabela 11 - Correlações de Spearman entre os pares das variáveis avaliadas.

Variável 1	Variável 2	Correlação	Valor p	Tamanho amostral
<b>Osteobl</b>	<b>MatrOsteo</b>	0,67	0,000	30
<b>MatrOsteo</b>	<b>TrabOss</b>	0,66	0,000	30
<b>TrabOss</b>	<b>Radiopac</b>	-0,58	0,001	30
<b>Osteobl</b>	<b>TrabOss</b>	0,49	0,006	30
<b>Fibrobl</b>	<b>TrabOss</b>	-0,38	0,038	30
<b>Fibrobl</b>	<b>MatrOsteo</b>	-0,28	0,136	30

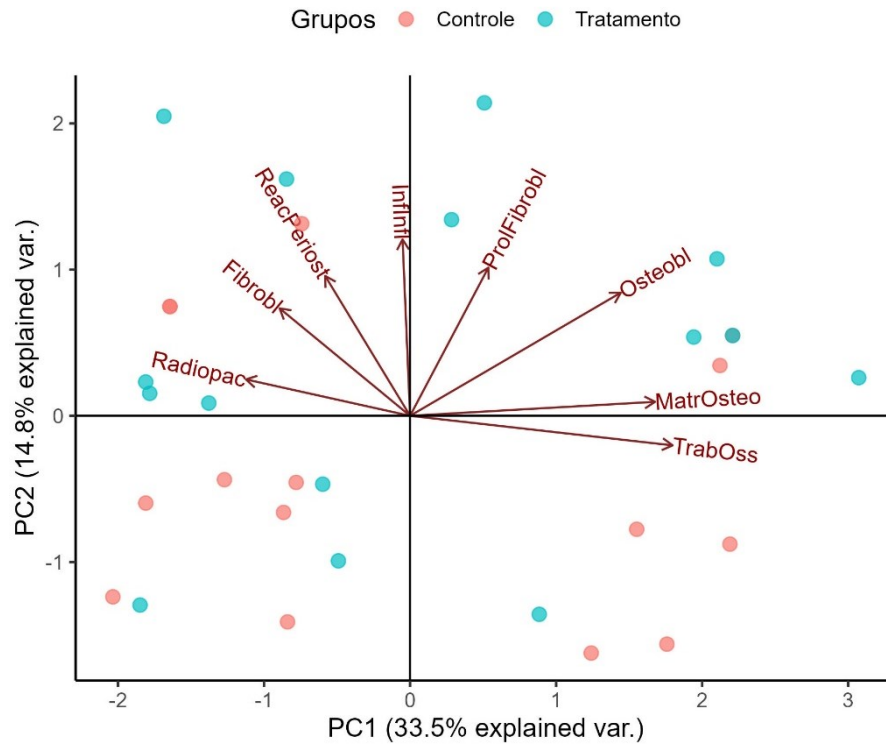
<b>MatrOsteo</b>	<b>Radiopac</b>	-0,28	0,137	30
<b>ProlFibrobl</b>	<b>Osteobl</b>	0,25	0,190	30
<b>Fibrobl</b>	<b>EsclOss</b>	0,22	0,242	30
<b>ProlFibrobl</b>	<b>TrabOss</b>	0,22	0,247	30
<b>TrabOss</b>	<b>EsclOss</b>	-0,21	0,265	30
<b>Fibrobl</b>	<b>Osteobl</b>	-0,19	0,308	30
<b>EsclOss</b>	<b>Radiopac</b>	0,18	0,345	30
<b>Osteobl</b>	<b>Radiopac</b>	-0,15	0,441	30
<b>InfInfl</b>	<b>Osteobl</b>	0,14	0,452	30
<b>ProlFibrobl</b>	<b>Radiopac</b>	-0,13	0,482	30
<b>ProlFibrobl</b>	<b>MatrOsteo</b>	0,11	0,557	30
<b>ProlFibrobl</b>	<b>EsclOss</b>	-0,08	0,674	30
<b>ProlFibrobl</b>	<b>InfInfl</b>	0,06	0,741	30
<b>MatrOsteo</b>	<b>EsclOss</b>	-0,06	0,754	30
<b>Fibrobl</b>	<b>InfInfl</b>	0,06	0,770	30
<b>InfInfl</b>	<b>TrabOss</b>	-0,05	0,776	30
<b>Fibrobl</b>	<b>Radiopac</b>	-0,03	0,878	30
<b>InfInfl</b>	<b>Radiopac</b>	0,03	0,879	30
<b>InfInfl</b>	<b>MatrOsteo</b>	-0,03	0,893	30
<b>InfInfl</b>	<b>EsclOss</b>	0,02	0,927	30
<b>Osteobl</b>	<b>ReacPeriost</b>	0,01	0,949	30
<b>Fibrobl</b>	<b>ProlFibrobl</b>	0,01	0,964	30

Osteobl = osteoblasto; MatrOsteo = matriz osteóide; TrabOss = Trabécula óssea; Fibrobl = fibroblasto; Radiopac = radiopacidade; InfInfl = infiltrado inflamatório; ProlFibrobl = proliferação fibroblástica; EsclOss = reação periosteal.

### 6.3.2. Análise de Componentes Principais

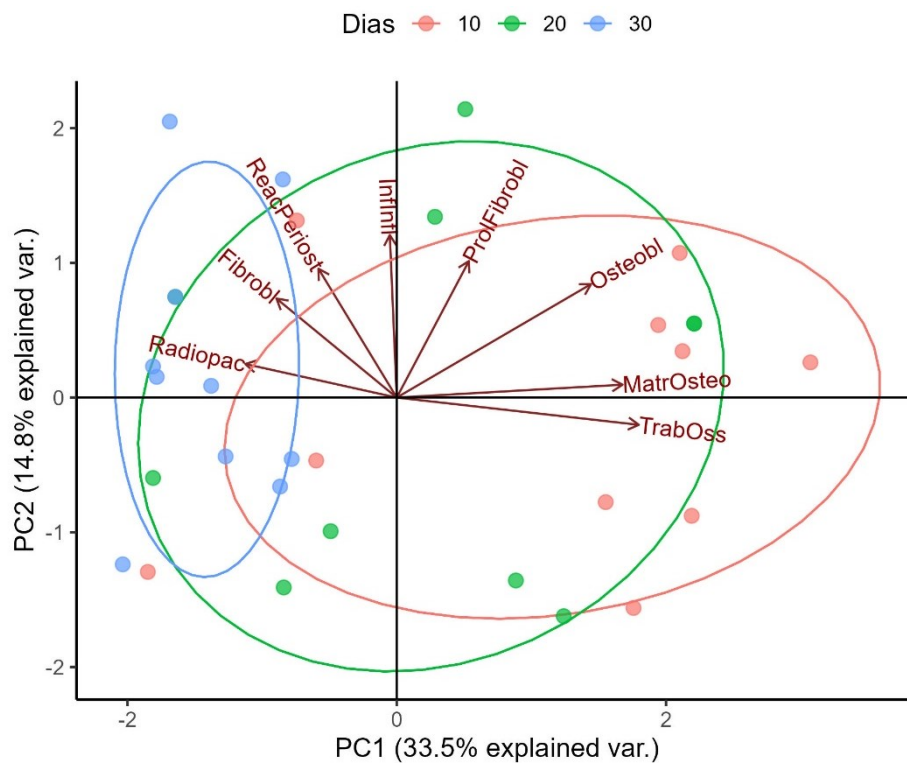
Os dois primeiros componentes explicaram 48,3% da variabilidade total da matriz de dados. Esses dois componentes foram escolhidos para apresentação gráfica. Para a representação gráfica, foram produzidos dois gráficos. Eles são resultado da mesma análise, sendo que a localização das variáveis e dos animais (pontos) são exatamente os mesmos. A única diferença entre os dois gráficos é que o primeiro destaca os animais de grupos distintos (Figura 32), enquanto o segundo gráfico destaca os animais em cada tempo mensurado (Figura 33).

Figura 32 – Gráfico destacando os animais dos grupos distintos explicando a variabilidade total da matriz.



Osteobl = osteoblasto; MatrOsteo = matriz osteóide; TrabOss = Trabécula óssea; Fibrobl = fibroblasto; Radiopac = radiopacidade; Infnfl = infiltrado inflamatório; ProFibrobl = proliferação fibroblástica; EscleOss = reação periosteal.

Figura 33 – Gráfico destacando os animais em cada tempo mensurado.



Osteobl = osteoblasto; MatrOsteo = matriz osteóide; TrabOss = Trabécula óssea; Fibrobl = fibroblasto; Radiopac = radiopacidade; InflInfl = infiltrado inflamatório; ProlFibrobl = proliferação fibroblástica; EsclOss = reação periosteal.

Foi observado a formação de 2 grupos de variáveis. O primeiro grupo formado pelas variáveis Proliferação fibroblástica, Osteoblastos, Matriz osteóide e Trabéculas ósseas todas positivamente correlacionadas entre si. O segundo grupo formado pelas variáveis Fibroblastos, Esclerose óssea e Radiopacidade positivamente correlacionadas entre si e negativamente correlacionadas com as variáveis do primeiro grupo. A variável Infiltrado Inflamatório se encontra em uma posição intermediária demonstrando baixas correlações com as variáveis de ambos os grupos. Observando o primeiro gráfico, não vemos uma separação clara entre as amostras dos dois grupos, pois as nuvens de pontos estão sobrepostas. Há uma leve tendência das amostras do grupo controle estarem concentradas nos dois quadrantes inferiores, indicando menores valores principalmente das variáveis Esclerose óssea, Infiltrado inflamatório e Proliferação fibroblástica. No segundo gráfico, porém, há uma separação evidente, especialmente no período de 30 dias. As mensurações feitas em 10 dias mostraram maiores valores das variáveis do grupo 1. À medida que o tempo passou, as medidas do grupo 1 tenderam a diminuir, enquanto as medidas das variáveis do grupo 2 tenderam a aumentar.

#### 6.4. Densidade Óssea Relativa - DOR

No tempo 0 os grupos controle (n=15) e tratamento (n=15) obtiveram uma média e desvio padrão de 0,861 (0,091) e 0,863 (0,094), respectivamente. Na avaliação com dez dias de pós-cirúrgico a densidade óssea relativa das galinhas do grupo controle apresentou uma média e desvio padrão, 0,912 (0,076), levemente superior ao grupo tratamento, 0,890 (0,079). Com vinte dias de avaliação, após o primeiro período de eutanásia, o grupo controle (n=10) apresentou valores de 0,929 (0,051) e o grupo tratamento 0,923 (0,078). No último período avaliado, com cinco animais em cada grupo, o grupo controle apresentou valores de 0,935 (0,033) e o grupo tratamento de 1,014 (0,074). A Tabela 12 apresenta todo o resultado da análise estatística descritiva da DOR.

Tabela 12 - Análise descritiva da densidade óssea relativa (DOR) de galinhas dos grupos controle e tratamento nos tempos de avaliação 0, 10, 20 e 30.

Estatística descritiva	T0		T10		T20		T30	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Tamanho da amostra =	15	15	15	15	10	10	5	5
Mínimo	0,658	0,651	0,745	0,776	0,861	0,73	0,893	0,961
Máximo	1	0,977	1,011	1,02	0,999	0,99	0,97	1,145
Amplitude Total	0,342	0,326	0,266	0,244	0,138	0,26	0,077	0,184
Mediana	0,851	0,888	0,901	0,923	0,9285	0,934	0,94	0,99
Primeiro Quartil (25%)	0,8035	0,844	0,85	0,8825	0,895	0,9183	0,911	0,979
Terceiro Quartil (75%)	0,935	0,9385	0,943	0,975	0,9695	0,9773	0,963	0,998
Desvio Interquartilico	0,1315	0,0945	0,093	0,0925	0,0745	0,059	0,052	0,019
Média Aritmética	0,8618	0,8634	0,8903	0,9129	0,9293	0,9231	0,9354	1,0146
Variância	0,0083	0,009	0,0063	0,0058	0,0026	0,0062	0,0011	0,0055
Desvio Padrão	0,0913	0,0947	0,0796	0,0764	0,0512	0,0784	0,0331	0,0742
Erro Padrão	0,0236	0,0245	0,0206	0,0197	0,0162	0,0248	0,0148	0,0332
Coefficiente de Variação	10,59%	10,97%	8,94%	8,36%	5,51%	8,50%	3,53%	7,31%
Assimetria (g1)	-0,3725	-0,9637	-0,4325	-0,4726	-0,0312	-1,8955	-0,3251	2,0383
Curtose (g2)	0,2259	0,3897	-0,6155	-0,5789	-1,5287	4,0551	-2,1434	4,3454
Média Harmônica	0,8523	0,8526	0,8834	0,9067	0,9268	0,9162	0,9345	1,0106
N (média harmônica)	15	15	15	15	10	10	5	5
Média Geométrica	0,8571	0,8582	0,8869	0,9099	0,928	0,9198	0,9349	1,0125
N (média geométrica)	15	15	15	15	10	10	5	5
Variância (geom.)	1,0052	1,0059	1,0036	1,0032	1,0013	1,0036	1,0005	1,0021
Desvio Padrão (geom.)	1,1154	1,1234	1,0958	1,0894	1,0568	1,0959	1,0361	1,0727

Aplicando-se o teste de t student, observou-se o valor de p nos tempos 0, 10, 20 e 30 de 0,481039, 0,254104, 0,417694 e 0,044298, respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 - Valores de p em cada tempo avaliado (0, 10, 20 e 30) comparando-se a densidade óssea relativa (DOR) de galinhas dos grupos controle e tratamento.

TEMPO	T0	T10	T20	T30
Valo de p	0,481039	0,254104	0,417694	0,044298

O Teste de Tukey também foi realizado com o objetivo de comparar dentro do grupo e entre os grupos em cada tempo de avaliação. O resultado encontra-se na Tabela 14.

Tabela 14 – Comparativo da densidade óssea relativa (DOR) de galinhas entre os grupos em cada tempo de avaliação utilizando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

VARIÁVEL 1	VARIÁVEL 2	DIFERENÇA	Q	p
GC0	GT0	0,0016	0,078	ns
GC0	GC10	0,0285	1,3903	ns
GC0	GT10	0,0511	2,4915	ns
GC0	GC20	0,0675	2,9417	ns
GC0	GT20	0,0613	2,6715	ns
GC0	GC30	0,0736	2,5358	ns
GC0	GT30	0,1528	5,2646	< 0.01
GT0	GC10	0,0269	1,3123	ns
GT0	GT10	0,0495	2,4135	ns
GT0	GC20	0,0659	2,872	ns
GT0	GT20	0,0597	2,6018	ns
GT0	GC30	0,072	2,4807	ns
GT0	GT30	0,1512	5,2095	< 0.01
GC10	GT10	0,0226	1,1012	ns
GC10	GC20	0,039	1,6982	ns
GC10	GT20	0,0328	1,428	ns
GC10	GC30	0,0451	1,5527	ns
GC10	GT30	0,1243	4,2815	ns
GT10	GC20	0,0164	0,7133	ns
GT10	GT20	0,0102	0,4431	ns
GT10	GC30	0,0225	0,7741	ns
GT10	GT30	0,1017	3,5028	ns
GC20	GT20	0,0062	0,2467	ns
GC20	GC30	0,0061	0,1982	ns
GC20	GT30	0,0853	2,7709	ns
GT20	GC30	0,0123	0,3995	ns
GT20	GT30	0,0915	2,9723	ns
GC30	GT30	0,0792	2,228	ns

GC0 – grupo controle tempo 0; GT0 – grupo tratamento tempo 0; GC10 – grupo controle tempo 10; GT10 – grupo tratamento tempo 10; GC20 – grupo controle tempo 20; GT20 – grupo tratamento tempo 20; GC30 – grupo controle tempo 30; GT30 – grupo tratamento tempo 30; ns – não significativo.

## 7. DISCUSSÃO

O período de adaptação das aves foi importante para elas se acostumarem ao novo ambiente climatizado e às novas pessoas que estavam realizando todo o manejo de alimentação e limpeza da sala e gaiolas. Na FEPHB as galinhas eram alojadas em uma gaiola com outras três aves, o espaço era bem restrito e as brigas comum. No novo manejo, duas aves por gaiolas e gaiolas maiores, foi possível identificar as aves mais agressivas e separá-las em gaiolas individuais. O novo manejo foi tão benéfico que as aves que tinham diminuído ou cessado a postura voltavam com a produção de ovos.

Até o presente momento não existem estudos relacionados ao uso clínico da FRT em aves. Este trabalho foi o primeiro a utilizar a avaliar o seu auxílio na regeneração de ferida. Sabe-se que os trombócitos têm as funções muito similares as das plaquetas dos mamíferos (WAKENELL, 2010; CAMPBELL, 2015; FERDOUS; SCOTT, 2023) podendo também ter ação fagocitária e auxiliar na imunidade inata e na remoção de corpos estranhos em feridas (GLICK et al., 1964; CAMPBELL, 2015; FERDOUS; SCOTT, 2023), sendo, portanto de grande ajuda na regeneração de feridas tanto em tecido mole quanto em tecido ósseo.

Segundo a lei de Stokes (ARNOCZKY et al., 2011) pode-se concluir que a velocidade de sedimentação dos trombócitos é maior, devido ao seu tamanho, quando comparadas com as plaquetas, dificultando assim a sua separação dos outros componentes sanguíneos através da força gravitacional. A preparação do FRT ajuda a prevenir este efeito devido à alta rotação de centrifugação e permite que as trombócitos liberem o seu conteúdo após a ativação fazendo com que o soro coagule separadamente das hemácias.

Apesar de toda a dificuldade para fracionar os trombócitos alguns protocolos de coleta de PRT já foram descritos em aves (FERNANDES, 2018; CORTEZE, 2019) demonstrando ser possível a separação dos trombócitos na rotina clínica, porém a técnica é um pouco trabalhosa e exige bastante prática. A facilidade e o baixo custo da obtenção do FRT o torna uma grande ferramenta no auxílio da regeneração de feridas (DOHAN et al., 2006; KAWASE; TANAKA, 2017; SOARES et al., 2021; GOSWANI et al., 2024) estimulando mais estudos sobre a obtenção e o uso clínico da FRT em aves.

O protocolo de centrifugação utilizado no projeto foi diferente do utilizado por Fernandes et al. (2019) e do proposto por diversos outros autores para o sangue de mamíferos quanto ao tempo de centrifugação (CHOUKROUN et al., 2000; DOHAN et al., 2006; BORIE et al., 2015; KARIMI; ROCKWELL, 2019). Essa mudança no tempo ocorreu devido ao fato

do soro após a centrifugação não estar coagulado em alguns testes realizado antes do projeto. Por esse motivo foi realizado novas centrifugações com o tempo maior (15 minutos) e esse aumento demonstrou ser mais eficaz para o preparo da FRT em galinhas.

A coleta do sangue realizada diretamente do vaso para o tubo vacutainer® e a imediata transferência do tubo para a centrífuga, favoreceram para evitar a coagulação do sangue antes do início da centrifugação contribuindo para o preparo do FRT de melhor qualidade, assim como descreveram DOHAN et al. (2006).

Ainda não existe uma classificação adequada para o PRF (KAWASE; TANAKA, 2017) como existe para o PRP. O termo PRF acaba sendo utilizado de forma genérica para todos os tipos de produtos obtidos. No caso das aves, como ainda não existem muitos protocolos e poucos são os estudos, o termo FRT pode ser utilizado para a denominação do coágulo de fibrina.

Outra possível função importante da FRT seria a ação na imunidade inata, realizando fagocitose e removendo corpos estranhos no local da ferida onde ele é aplicado (GLICK et al., 1964; CAMPBELL, 2015; FERDOUS; SCOTT, 2023). Porém são necessários mais estudos para ter uma comprovação da ação imunitária da FRT.

O tempo de consolidação óssea total de fratura em aves varia de acordo com o tamanho de cada espécie (FERRIGNO; SCHMAEDECK, 2015). Em trabalhos experimentais utilizando galinhas, o tempo médio de consolidação de osteotomias experimentais em ulna foi de 30 dias, avaliando defeito crítico (BOSS, 2017) e enxertia (GUTIERREZ, 2017), estabilizando com pino intramedular nas aves do grupo controle. No estudo de Boss (2017), aos 15 dias já era possível visualizar reação periosteal no foco da osteotomia. Gouvea et al. (2011) utilizando diferentes configurações de microplacas de titânio em tibiotarso de pombos, obteve um tempo médio de consolidação variando de  $26,6 \pm 6,4$  a  $32,9 \pm 9,9$  dias entre os grupos estudados. Diferente dos trabalhos citados acima, no presente trabalho nenhuma ave apresentou consolidação completa do defeito ósseo, tanto na avaliação radiográfica, quanto na avaliação histopatológica até os 30 dias de avaliação.

A lei de Wolff determina que o osso se adapte às forças mecânicas impostas sobre ele, isso quer dizer que o estresse que o osso sofre, influencia na sua densidade e seu formato (MINTO; LUCENA, 2022). No presente projeto o defeito ósseo foi monocortical e, como não teve uma carga suficiente passando sobre a lesão, a consolidação óssea foi mais demorada e não ocorreu completamente no tempo experimental. Mesmo a consolidação total não ocorrendo foi possível avaliar o efeito da FRT durante o processo de regeneração óssea.

Para ocorrer a consolidação primária no defeito ósseo das aves seria necessário um contato ósseo menor que 1mm (MORENO et al., 2018; MINTO; LUCENA, 2022; AMOROSO, 2022). A lesão óssea tinha possivelmente muita estabilidade, menor que 0,2%, e um *gap* ósseo muito grande (4mm na porção maior), esses fatores, possivelmente impediram que ocorresse a consolidação primária na lesão realizada no tempo de 30 dias.

O excesso de estabilidade nas fraturas também interfere na regeneração secundária, pois segundo Moreno et al. (2018) e Johnson (2013) para que ela ocorra é necessária uma micromovimentação (*strain* maior que 2% e menor que 10%) no foco da fratura. A regeneração que estava ocorrendo na lesão óssea realizada foi considerada secundária, apesar da estabilidade do foco da fratura, pois o tamanho do defeito era muito grande impedindo a união do osso pela consolidação primária.

Provavelmente, devido a todos esses fatores expostos acima, a regeneração óssea não ocorreu no mesmo tempo dos trabalhos previamente citados.

A avaliação radiográfica pode ter sido influenciada pela qualidade das imagens. Embora o posicionamento tenha sido feito sempre pelo mesmo manipulador, mesmo utilizando o mesmo aparelho CR e a mesma técnica (Kv, mA e tempo), as imagens apresentaram alguma diferença. Possivelmente isso aconteceu pelo fato da regulagem da imagem ser manual, tornando extremamente difícil a regulagem igual em todos os exames.

Na avaliação radiográfica foi observado um aumento da radiopacidade em ambos os grupos (controle e tratamento) ao longo do experimento, demonstrando que a lesão estava consolidando, porém, comparando os dois grupos não houve diferença entre o aumento da radiopacidade, e os grupos apresentaram o mesmo grau de evolução da radiopacidade durante o período experimental.

A esclerose óssea para ambos os grupos foi mais facilmente observada depois da avaliação do tempo 10. O grupo tratamento apresentou aumento gradual nesta avaliação ao longo do experimento, já o grupo controle teve uma estabilização e uma pequena redução aos 30 dias de avaliação. Possivelmente isto aconteceu devido ao fato da FRT agir de forma mais lenta e prolongada como demonstrado em estudos com o PRF (HARTSHORNE; GLUCKMAN, 2016), fazendo com que haja estímulo de proliferação tecidual mais longo do que no grupo controle.

Nas imagens radiográficas do trabalho foi possível observar o aumento da esclerose óssea ao redor da borda do orifício ocasionado nas duas projeções realizadas e essa esclerose

aumentando conforme o tempo, corroborando com o descrito por Johnson (2013). Porém a redução da esclerose não foi possível observar devido a não conclusão na consolidação óssea.

Todas as análises estatísticas foram direcionadas para que fosse possível realizar a análise de componentes principais (PCA) que, revela que comparando-se os grupos controle com o grupo tratamento, não houve diferença estatística (Figura 37), ou seja, o efeito da utilização da FRT não foi superior para a regeneração óssea no defeito experimental quando comparada ao grupo que não utilizou a FRT (controle). Por mais que algumas variáveis tenham sido discretamente superiores no grupo tratamento (matriz osteóide,  $p = 0,053$ ; osteoblastos,  $p = 0,059$ ) essa diferença não foi o suficiente para que o grupo tratamento fosse superior ao grupo controle.

Quando comparado o fator tempo, no entanto, independentemente do grupo, foi observada diferença estatística entre os tempos avaliados. Conforme o tempo da avaliação foi aumentando observou-se diminuição nas variáveis, trabécula óssea, matriz osteóide, osteoblasto e proliferação fibroblástica e um aumento nas variáveis reação periosteal, fibroblastos e radiopacidade. Esse aumento nestas variáveis é justificado devido ao fato do defeito ósseo estar se regenerando.

O programa ImageJ é utilizado para diversas avaliações de imagens, dentre elas a radiopacidade óssea relativa (DOR). Este método foi validado por Vaquero et al. (2022), permitindo que fosse possível realizar esta avaliação no osso utilizado, devido ao local adjacente ao defeito permitir comparação com a densidade óssea relativa do osso normal, o que reduz a subjetividade da avaliação e minimiza o efeito das diferenças entre exposições.

Na avaliação da DOR comparando-se os grupos, no tempo de avaliação com 30 dias observou-se diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Ao longo de quase todo o período de avaliação, os dois grupos não apresentaram diferença, porém no dia 30 o grupo tratamento mostrou-se superior ao grupo controle (inserir o valor de  $p$ ). Possivelmente isso se deve ao fato da FRT acelerar a formação óssea neste tempo avaliado, aumentando a densidade óssea do local lesionado.

Na comparação da DOR dentro do próprio grupo e entre os grupos revelou que existe diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparados os dois grupos (controle e tratamento) no tempo 0 com o grupo tratamento no tempo 30. Essa diferença estatística nos diz que o grupo tratamento no dia 30 apresentou uma DOR maior quando comparada com os grupos no tempo 10. Isso se deve ao fato do fechamento da lesão óssea estar ocorrendo, tornando o local avaliado de densidade óssea maior.

Na medicina veterinária há poucos trabalhos abordando o efeito da FRT, em contrapartida o PRP vem sendo cada vez mais estudado nestes últimos anos e demonstrando efeitos benéficos quando comparado a grupos que não utilizam outros métodos de auxílio em tratamento de diversas afecções (CORTEZE, 2019). Não existe até o presente momento nenhum estudo da ação da FRT em regeneração óssea em aves.

Por ser o primeiro trabalho utilizando o FRT na regeneração óssea, os resultados apresentados demonstram que o seu uso pode ser bastante promissor, assim como relatado por diversos autores quando utilizam o PRF em outras espécies de mamíferos (HYUN-CHUN ET AL., 2016; MADI; ELAKEL, 2020; FRANCISCO et al., 2020; MINSK et al., 2020; DEMIR et al., 2022; THEODOSAKI et al., 2022; CHANGRANI-RASTOGI, et al., 2023).

Mesmo não havendo consolidação óssea por completa na experiemntal, este trabalho demonstrou que a FRT pode contribuir em algumas etapas no processo de regeneração, como observado pela diferença em algumas avaliações comparativas as do grupo controle. Apesar da pouca diferença estatística ter sido observada, o uso do FRT contribuiu para acelerar o aumento de fibroblastos e de osteoblastos no local da lesão. Estas duas células são de extrema importância para a consolidação óssea. Além disso, o grupo tratamento ainda apresentou superioridade quando avaliado a radiopacidade e a esclerose óssea, demonstrando que, na avaliação radiográfica o uso do FRT teve efeito sobre o processo de consolidação óssea.

Como já demonstrados em alguns estudos em galinhas, os trombócitos também são capazes de produzir e liberar, quando estimulados, fatores de crescimento (LAX et al., 1988; HORIUCHI et al., 1990; KIKUCHI, 1991; WILTING et al., 1993; FERDOUS; SCOTT, 2023). Embora não tenham sido mensurados, provavelmente, a liberação dos fatores de crescimento foi maior no grupo tratamento, auxiliando no processo de regeneração deste grupo a médio prazo, como demonstrado nos resultados apresentados neste trabalho.

De modo geral a maioria dos trabalhos envolvendo PRF apresentam resultados positivos com o seu uso e possivelmente com a FRT não seja diferente. Este foi o primeiro trabalho envolvendo o uso do FRT e apresentou resultados promissores e incentivadores para que novos estudos sejam realizados.

## 8. CONCLUSÃO

Foi possível realizar o defeito ósseo monocortical em tibiotarso de galinhas utilizando um pino de 4mm sem ocasionar fraturas no osso. O protocolo utilizado para a obtenção do FRT foi eficaz, permitindo a sua utilização para recobrir o defeito ósseo experimental.

O uso de FRT favorece a regeneração óssea de defeito monocortical em galinhas.

Novos estudos com diferentes tipos de lesões e maiores intervalos de tempo de observação devem ser realizados para melhor avaliação do efeito da FRT na consolidação óssea das aves.

A aceleração na regeneração tecidual ocasionado pelo FRT pode reduzir o tempo de recuperação das aves, reduzindo o estresse delas em cativeiro. Essa terapia pode ser útil na rotina clínica da medicina de animais silvestres, por ser um auxílio rápido e barato para a cicatrização de feridas.

## 9. REFERÊNCIAS

- AMOROSO, L. Fisiologia Aplicada ao Sistema Musculoesquelético. In: MINTO, B. W.; DIAS, L. G. G. **Tratado de Ortopedia de Cães e Gatos**. São Paulo, MedVet, p. 3-15, 2022.
- ANDIA, I.; SÁNCHEZ, M.; MAFFULLI N. Basic Science: Molecular and Biological Aspects of Platelet-Rich Plasma Therapies. **Operative Techniques in Orthopaedics**, v. 22, p. 3–9, 2012.
- ARNOCZKY, S.P.; DELOS, D.; RODEO, S.A. What Is Platelet-Rich Plasma? **Operation Techniques in Sports Medicine**, v.19, n. 3, p. 142-148, 2011.
- BAKER, D. C. Plaquetas. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2º ed. São Paulo, SP. Editora Roca Ltda. p. 403-406. 2015
- BOOS, M. Z. Determinação do defeito crítico em ulna de *Gallus gallus domesticus*. 2017, 46f. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- BORIE E.; OLIVÍ D. G.; ORSI I. A.; GARLET K.; WEBER B.; BELTRÁN V.; FUENTES R. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. **Int J Clin Exp Med**. May 15, v. 8, n. 5, p. 7922-7929, 2015.
- BOUDREAUX, M. K. Platelets. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Schalm's Veterinary Hematology. 6ºed. Iowa, USA. Wiley-Blackwell, p. 561-568, 2010.
- CAMPBELL, T, W. Hematologia das aves. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2 ed, Ed. Rocca LTDA, 2015.
- CHANGRANI-RASTOGI, A.; SWADI, K.; BARVE, M.; et al. Autologous platelet-rich fibrin promotes wound healing in cats. **Front. Vet. Sci**, v. 10, 2023.
- CHOUKROUN J, ADDA F, SCHOEFLER C, VERVELLE A. Une opportunité en parodontologie: le PRF. **Implantodontia**. v. 42, p. 55-62, 2000.
- CHOUKROUN, J.; DISS, A.; SIMONPIERI, A.; GIRARD, M. O.; et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. v. 101, n. 3, p. E56-E60, 2006.
- CORTEZE, A. A. Plasma rico em trombócitos (PRT) em galinhas adultas (*Gallus Gallus domesticus*). 2019, 36 f. **Dissertação** (Pós-graduação em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte.
- DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, M. Células-tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciência veterinária tropical**. V. 11, suplemento 1, p. 167-169, 2008.
- DIEGELMANN, R. F., EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci**, v. 9, p. 283–289, 2004.
- DOHAN EHRENFEST D. M.; ANDIA I.; ZUMSTEIN M. A.; ZHANG C. Q.; PINTO N. R.; BIELECKI T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current

consensus, clinical implications and perspectives. **Muscles Ligaments Tendons J.** v. 4, n. 1, p. 3-9, 2014.

DOHAN, D. M.; CHOUKROUN, J.; DISS, A.; DOHAN, S. L.; DOHAN, A. J.; MOUHYI, J. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 101, p. E37–E44, 2006.

EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**. v. 27, n. 3, p. 158-167, 2008.

FERDOUS, F.; SCOTT, T. R. The Immunological Capacity of Thrombocytes. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 24, n. 16. 2023.

FERNANDES, L. L. et al. Production and evaluation of leukocyte and thrombocyte-rich fibrin membranes in birds. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 67, v. 2, p. 296–306, 2019.

FERNANDES, L.L. Protocolos para a preparação de concentrados autólogos de trombócitos em aves. 2018, 74 f. **Dissertação** (Pós-graduação em Animais Selvagens). Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

FRANCISCO, I.; FERNANDES, M. H.; VALE, F. Platelet-Rich Fibrin in Bone Regenerative Strategies in Orthodontics: A Systematic Review. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, v. 13, n. 8, 2020.

GLICK B.; SATO K.; COHENOUR F. Comparison of the phagocytic ability of normal and bursectomized birds. **Journal of the Reticuloendothelial Society**. v. 1, p. 442–449, 1964.

GOSWAMI P.; CHAUDHARY V.; ARYA A.; VERMA R.; VIJAYAKUMAR G.; BHAVANI M. Platelet-Rich Fibrin (PRF) and its Application in Dentistry: A Literature Review. **J Pharm Bioallied Sci**. v. 16, v. 1, p. S5-S7, 2024.

GOUVEA, A. S.; ALIEVI, M. M.; NORIEGA, V. et al. Microplacas de titânio em fraturas de tibiotarso em pombos domésticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 3, p. 476-482, 2011.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**; v. 453, p. 314–321, 2008.

GUTIERREZ, L. G. Hidroxiapatita deficiente em cálcio associada a bmp para tratamento de defeito crítico em ulna de *Gallus gallus domesticus*. 2017, 69f. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

HARTSHORNE, J.; GLUCKMAN, H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part 1: Definition, development, biological characteristics and function. **International Dentistry –African Edition**. v. 6, n.5, p. 14-24, 2016.

HORIUCHI, H.; MATSUDA, H.; MURATA, M. Preliminary evidence of growth factor(s) from chicken thrombocytes – growth effects on chicken embryo fibroblasts culture. **Jpn. J. Vet. Sci.** v. 52, n. 3, p. 559-565, 1990.

HYUN-CHUN, P.; SU-GWAN, K.; JI-SU, A.; et al. Early Bone Formation at a Femur Defect Using CGF and PRF Grafts in Adult Dogs: A Comparative Study. **Implant Dentistry**. v. 25, n. 3, p. 387-393, 2016.

- JOHNSON, A. L. Fundamental of Orthopedic Surgery and Fracture Management. In: FOSSUM, T. W. et al. **Small Animal Surgery**. v. 4, p. 1033-1105, St. Louis, Missouri, 2013.
- KARIMI, K.; ROCKWELL, H.; The Benefits of Platelet-Rich Fibrin. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 331-340, 2019
- KAWASE, T.; TANAKA, T. An updated proposal for terminology and classification of platelet-rich fibrin. **Regen Ther**, v. 7, p. 80-81, 2017.
- KIKUCHI, K.; BUONOMO, F. C.; KAJIMOTO, Y.; ROTWEIN, P. Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development get access arrow. **Endocrinology**, v. 128, n. 3, p. 1323-1328, 1991.
- LAM K. M. Activation, adhesion, migration and death of chicken thrombocytes. **Comparative Haematology International**. v. 1, p. 81–87, 1997.
- LAX, I.; JOHNSON, A.; HOWK, R.; et al. Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, n. 5, 1970–1978, 1998.
- LUCARELLI, E.; BECCHERONI, A.; DONATI, D.; SANGIORGI, L.; CENACCHI, A.; DEL VENTO, A. M.; et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials**, v. 24, p. 3095–3100, 2003.
- MADI, M.; ELAKEL, A. M. The clinical implications of platelet-rich fibrin on periodontal regeneration: A systematic review. **The Saudi Dental Journal**, v. 33, n 2, p. 55-62, 2020.
- MALHOTRA, R., KUMAR, V., GARG, B. et al. Role of autologous platelet-rich plasma in treatment of long-bone nonunions: a prospective study. **Musculoskelet Surgery**. v. 99, p. 243–248, 2015.
- MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62. n. 4, p. 489-496, 2004.
- MCNEILIS, T. M. The Origin and Differentiation of the Thrombocytes of the Chicken (*Gallus Domesticus*) (*Gallus Domesticus*). 1972. 50 f. Theses and Dissertations. 3627. University of North Dakota.
- MINO, E. L. I.; FENOY, I. M.; MARURI, A. Effective treatment of a severe neck wound in a greylag goose (*Anser anser*) using autologous thrombocyte-rich plasma and xenogeneic fibrin mesh. **Vet Record Case Reports**, v. 12, 2024.
- MINTO, B. W.; LUCENA, D. V. F. Bases biomecânicas das fraturas. In: MINTO, B. W.; DIAS, L. G. G. **Tratado de Ortopedia de Cães e Gatos**. São Paulo, MedVet, p. 134-148, 2022.
- MORENO, M. R.; ZAMBRANO, S.; DEJARDIN, L. M.; SAUNDERS, W. B. Bone Biomechanics and Fracture Biology. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. M. **Veterinary Surgery: Small Animal**. v. 2, p. 613 – 648, 2018.
- MOŚCICKA, P.; PRZYLIPIAK A. History of autologous platelet-rich plasma: A short review. **Journal Cosmet Dermatol**.v. 20, p. 2712–2714, 2021.
- ORYAN, A.; ALIDADI, S.; MOSHIRI, A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 16, n. 2, p. 213-232, 2015.
- SOARES, C. S.; BABO, P. S.; FARIA, S.; PIRES, M. A.; CARVALHO, P. P. Standardized Platelet-Rich Fibrin (PRF) from canine and feline origin: An analysis on its secretome pattern and architectural structure. **Cytokine**, V. 148, 155695, 2021,

- SOLHEIN, E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics (SICOT)*. v. 22, p. 410–416, 1998.
- THEODOSAKI, A. M.; FILIPPOU, M.; KAZANTZIDIS, G.; DOUFEXI, A. E. Effectiveness of platelet rich fibrin alone or in combination with bone grafts in the treatment of infrabony defects: Systematic review and metanalysis. **Health Sciences Review**, v. 5, 2022.
- VAQUERO, P.; AUDISIO, S.; BUEY, V. Uso del software imageJ para evaluar la reparación radiológica de defectos óseos circulares tratadas con matriz ósea desmineralizada en conejo. **Ciência Veterinária**, v. 24, 2022.
- VILANI, R. G. O. C. Anestesia injetável e inalatória. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Silvestres**. Editora Roca Ltda, São Paulo, 2º ed, 2014.
- WAKENELL, P. S. Hematology of Chickens and Turkeys. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6ºed. Iowa, USA. Wiley-Blackwell, p.958-967, 2010.
- WILTING, J., CHRIST, B., BOKELOH, M. et al. In vivo effects of vascular endothelial growth factor on the chicken chorioallantoic membrane. **Cell Tissue Res**. v. 274, p. 163–172, 1993.
- ZHANG Y, XING F, LUO R, DUAN X. Platelet-Rich Plasma for Bone Fracture Treatment: A Systematic Review of Current Evidence in Preclinical and Clinical Studies. **Front Med (Lausanne)**, v. 8, 2021.

## APÊNDICE A

AR	Grupo	Dias	Subgrupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	1º Quartil (25%)	Mediana (50%)	3º Quartil (75%)	Máxima	Coefficiente de variação (CV)	Tamanho amostral
Fibrobl	GERAL	GERAL	GERAL	57%	50%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	89%	30
Fibrobl	Cont	GERAL	GERAL	53%	52%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	97%	15
Fibrobl	Trat	GERAL	GERAL	60%	51%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	85%	15
Fibrobl	Cont	10,0	GERAL	40%	55%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	137%	5
Fibrobl	Cont	20,0	GERAL	60%	55%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	91%	5
Fibrobl	Cont	30,0	GERAL	60%	55%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	91%	5
Fibrobl	Trat	10,0	GERAL	60%	55%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	91%	5
Fibrobl	Trat	20,0	GERAL	40%	55%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	137%	5
Fibrobl	Trat	30,0	GERAL	80%	45%	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	56%	5
ProlFibrobl	GERAL	GERAL	GERAL	2,4	0,7	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	30%	30
ProlFibrobl	Cont	GERAL	GERAL	2,5	0,6	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	26%	15
ProlFibrobl	Trat	GERAL	GERAL	2,3	0,8	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	35%	15
ProlFibrobl	Cont	10,0	GERAL	2,4	0,9	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	37%	5
ProlFibrobl	Cont	20,0	GERAL	2,6	0,5	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	21%	5
ProlFibrobl	Cont	30,0	GERAL	2,4	0,5	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	23%	5
ProlFibrobl	Trat	10,0	GERAL	2,2	1,1	1,0	1,0	3,0	3,0	3,0	50%	5
ProlFibrobl	Trat	20,0	GERAL	2,4	0,9	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	37%	5
ProlFibrobl	Trat	30,0	GERAL	2,4	0,5	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	23%	5
Inflnfl	GERAL	GERAL	GERAL	1,7	0,8	0,0	1,0	2,0	2,0	3,0	45%	30
Inflnfl	Cont	GERAL	GERAL	1,5	0,7	0,0	1,0	1,0	2,0	3,0	51%	15
Inflnfl	Trat	GERAL	GERAL	1,9	0,7	0,0	2,0	2,0	2,0	3,0	40%	15
Inflnfl	Cont	10,0	GERAL	1,6	0,9	1,0	1,0	1,0	2,0	3,0	56%	5
Inflnfl	Cont	20,0	GERAL	1,2	0,8	0,0	1,0	1,0	2,0	2,0	70%	5
Inflnfl	Cont	30,0	GERAL	1,6	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	34%	5
Inflnfl	Trat	10,0	GERAL	2,2	0,4	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	20%	5
Inflnfl	Trat	20,0	GERAL	1,6	1,1	0,0	1,0	2,0	2,0	3,0	71%	5
Inflnfl	Trat	30,0	GERAL	1,8	0,4	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	25%	5
Osteobl	GERAL	GERAL	GERAL	2,2	0,6	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0	30%	30
Osteobl	Cont	GERAL	GERAL	2,0	0,7	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0	33%	15
Osteobl	Trat	GERAL	GERAL	2,3	0,6	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0	26%	15
Osteobl	Cont	10,0	GERAL	2,4	0,5	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	23%	5
Osteobl	Cont	20,0	GERAL	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	2,0	3,0	46%	5
Osteobl	Cont	30,0	GERAL	1,8	0,4	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	25%	5
Osteobl	Trat	10,0	GERAL	2,2	0,8	1,0	2,0	2,0	3,0	3,0	38%	5
Osteobl	Trat	20,0	GERAL	2,8	0,4	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	16%	5
Osteobl	Trat	30,0	GERAL	2,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0%	5
MatrOsteo	GERAL	GERAL	GERAL	53%	51%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	95%	30
MatrOsteo	Cont	GERAL	GERAL	40%	51%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	127%	15

MatrOsteo	Trat	GERAL	GERAL	67%	49%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	73%	15
MatrOsteo	Cont	10,0	GERAL	80%	45%	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	56%	5
MatrOsteo	Cont	20,0	GERAL	40%	55%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	137%	5
MatrOsteo	Cont	30,0	GERAL	0%	0%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	NA	5
MatrOsteo	Trat	10,0	GERAL	80%	45%	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	56%	5
MatrOsteo	Trat	20,0	GERAL	100%	0%	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
MatrOsteo	Trat	30,0	GERAL	20%	45%	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	224%	5
TrabOss	GERAL	GERAL	GERAL	33%	48%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	144%	30
TrabOss	Cont	GERAL	GERAL	40%	51%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	127%	15
TrabOss	Trat	GERAL	GERAL	27%	46%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	172%	15
TrabOss	Cont	10,0	GERAL	80%	45%	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	56%	5
TrabOss	Cont	20,0	GERAL	40%	55%	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	137%	5
TrabOss	Cont	30,0	GERAL	0%	0%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	NA	5
TrabOss	Trat	10,0	GERAL	60%	55%	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	91%	5
TrabOss	Trat	20,0	GERAL	20%	45%	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	224%	5
TrabOss	Trat	30,0	GERAL	0%	0%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	NA	5
ReacPeriost	GERAL	GERAL	GERAL	1,7	0,7	1,0	1,0	2,0	2,0	4,0	42%	90
ReacPeriost	Cont	GERAL	GERAL	1,6	0,6	1,0	1,0	2,0	2,0	3,0	39%	45
ReacPeriost	Trat	GERAL	GERAL	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	2,0	4,0	44%	45
ReacPeriost	Cont	0,0	GERAL	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	15
ReacPeriost	Cont	10,0	GERAL	1,9	0,5	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0	28%	15
ReacPeriost	Cont	20,0	GERAL	2,0	0,5	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0	24%	10
ReacPeriost	Cont	30,0	GERAL	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	2,0	3,0	46%	5
ReacPeriost	Trat	0,0	GERAL	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	15
ReacPeriost	Trat	10,0	GERAL	1,9	0,4	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	19%	15
ReacPeriost	Trat	20,0	GERAL	2,3	0,5	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	21%	10
ReacPeriost	Trat	30,0	GERAL	3,0	1,0	2,0	2,0	3,0	4,0	4,0	33%	5
ReacPeriost	Cont	0,0	1	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
ReacPeriost	Cont	0,0	2	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
ReacPeriost	Cont	0,0	3	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
ReacPeriost	Cont	10,0	1	2,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0%	5
ReacPeriost	Cont	10,0	2	2,2	0,4	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	20%	5
ReacPeriost	Cont	10,0	3	1,4	0,5	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	39%	5
ReacPeriost	Cont	20,0	2	2,2	0,4	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	20%	5
ReacPeriost	Cont	20,0	3	1,8	0,4	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	25%	5
ReacPeriost	Cont	30,0	3	1,8	0,8	1,0	1,0	2,0	2,0	3,0	46%	5
ReacPeriost	Trat	0,0	1	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
ReacPeriost	Trat	0,0	2	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
ReacPeriost	Trat	0,0	3	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
ReacPeriost	Trat	10,0	1	2,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0%	5
ReacPeriost	Trat	10,0	2	2,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0%	5
ReacPeriost	Trat	10,0	3	1,6	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	34%	5
ReacPeriost	Trat	20,0	2	2,2	0,4	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	20%	5
ReacPeriost	Trat	20,0	3	2,4	0,5	2,0	2,0	2,0	3,0	3,0	23%	5
ReacPeriost	Trat	30,0	3	3,0	1,0	2,0	2,0	3,0	4,0	4,0	33%	5

Radiopac	GERAL	GERAL	GERAL	2,0	1,0	1,0	1,0	2,0	3,0	4,0	48%	90
Radiopac	Cont	GERAL	GERAL	2,0	0,9	1,0	1,0	2,0	3,0	4,0	45%	45
Radiopac	Trat	GERAL	GERAL	2,0	1,0	1,0	1,0	2,0	3,0	4,0	52%	45
Radiopac	Cont	0,0	GERAL	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	15
Radiopac	Cont	10,0	GERAL	2,0	0,4	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0	19%	15
Radiopac	Cont	20,0	GERAL	2,6	0,5	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	20%	10
Radiopac	Cont	30,0	GERAL	3,4	0,5	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	16%	5
Radiopac	Trat	0,0	GERAL	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	15
Radiopac	Trat	10,0	GERAL	1,7	0,6	1,0	1,0	2,0	2,0	3,0	34%	15
Radiopac	Trat	20,0	GERAL	3,0	0,5	2,0	3,0	3,0	3,0	4,0	16%	10
Radiopac	Trat	30,0	GERAL	3,6	0,5	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	15%	5
Radiopac	Cont	0,0	1	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
Radiopac	Cont	0,0	2	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
Radiopac	Cont	0,0	3	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
Radiopac	Cont	10,0	1	2,2	0,4	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	20%	5
Radiopac	Cont	10,0	2	2,0	0,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0%	5
Radiopac	Cont	10,0	3	1,8	0,4	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	25%	5
Radiopac	Cont	20,0	2	2,6	0,5	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	21%	5
Radiopac	Cont	20,0	3	2,6	0,5	2,0	2,0	3,0	3,0	3,0	21%	5
Radiopac	Cont	30,0	3	3,4	0,5	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	16%	5
Radiopac	Trat	0,0	1	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
Radiopac	Trat	0,0	2	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
Radiopac	Trat	0,0	3	1,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0%	5
Radiopac	Trat	10,0	1	2,0	0,7	1,0	2,0	2,0	2,0	3,0	35%	5
Radiopac	Trat	10,0	2	1,6	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	34%	5
Radiopac	Trat	10,0	3	1,6	0,5	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	34%	5
Radiopac	Trat	20,0	2	3,2	0,4	3,0	3,0	3,0	3,0	4,0	14%	5
Radiopac	Trat	20,0	3	2,8	0,4	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	16%	5
Radiopac	Trat	30,0	3	3,6	0,5	3,0	3,0	4,0	4,0	4,0	15%	5