








# Caracterização da membrana induzida pela técnica de Masquelet em modelo murino de defeito ósseo segmentar

## Characterization of the Masquelet Induced Membrane Technique in a Murine Segmental Bone Defect Model

João Antonio Matheus Guimarães<sup>1</sup>  Breno Jorge Braga Scorza<sup>1</sup>   
Jamila Alessandra Perini Machado<sup>1,3</sup>  Amanda dos Santos Cavalcanti<sup>1</sup>  Maria Eugênia Leite Duarte<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Coordenador de pós-graduação, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Cirurgião ortopédico, Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa, IDOR, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup> Pesquisadora, Laboratório de Pesquisa de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil

Endereço para correspondência João Antonio Matheus Guimarães, MD, PhD, Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Av. Brasil, 500, Caju, Rio De Janeiro, RJ, 20940-070, Brasil (e-mail: jmatheusguimaraes@gmail.com).

Rev Bras Ortop 2023;58(5):e798–e807.

### Resumo

**Objetivo** Reproduzir em modelo animal a técnica cirúrgica de Masquelet utilizada no tratamento de defeitos ósseos críticos e analisar as características da membrana formada em torno do cimento ósseo.

**Métodos** Um defeito crítico de 10mm foi realizado na diáfise femoral de 21 ratos Sprague-Dawley. Após a ressecção da porção central da diáfise o defeito foi estabilizado com fio de Kirschner introduzido pelo canal medular e com a interposição de espaçador de cimento ósseo. Após 2, 4, e 6 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados e avaliados em radiografias do membro posterior quanto ao tamanho do defeito, o alinhamento e a estabilidade da osteossíntese. As membranas formadas em torno do espaçador foram submetidas a análise histológica para avaliação da espessura, da maturação do tecido conjuntivo e da densidade vascular.

**Resultados** Ao longo do tempo as membranas inicialmente constituídas por tecido conjuntivo frouxo foram substituídas por membranas representadas por tecido conjuntivo denso, rico em fibras colágenas espessas. Com seis semanas a espessura das membranas foi maior ( $565 \pm 208 \mu\text{m}$ ) do que com quatro ( $186,9 \pm 70,21 \mu\text{m}$ ,  $p = 0,0002$ ) e duas semanas ( $252,2 \pm 55,1 \mu\text{m}$ ,  $p = 0,001$ ). Todas as membranas do tempo inicial apresentaram focos de diferenciação osteogênica que reduziram progressivamente ao longo do tempo.

### Palavras-chave

- ▶ modelos animais
- ▶ membrana induzida
- ▶ osso e ossos
- ▶ regeneração óssea
- ▶ técnica de Masquelet

*Trabalho desenvolvido no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

recebido  
23 de Setembro de 2022  
aceito  
16 de Dezembro de 2022

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0043-1771490>.  
ISSN 0102-3616.

© 2023. Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. All rights reserved.

This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial-License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Thieme Revinter Publicações Ltda., Rua do Matoso 170, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20270-135, Brazil

**Conclusão** Além da função estrutural e protetora da membrana, suas características biológicas intrínsecas podem contribuir ativamente para a regeneração óssea. A atividade biológica atribuída pela presença de focos de osteogênese confere à membrana potencial de osteoindução que favorece as condições locais para a integração do enxerto ósseo.

## Abstract

**Objective** To reproduce in an animal model the surgical technique of Masquelet used in the treatment of critical bone defects and to analyze the characteristics of the membrane formed around the bone cement.

**Methods** A 10mm critical defect was created in the femoral shaft of 21 Sprague-Dawley rats. After resection of the central portion of the diaphysis, the defect was stabilized with a Kirschner wire introduced through the medullary canal and with the interposition of a bone cement spacer. After 2, 4, and 6 weeks of the surgical procedure, the animals were euthanized and evaluated on radiographs of the posterior limb regarding the size of the defect, alignment and stability of the osteosynthesis. The membranes formed around the spacer were subjected to histological analysis to assess thickness, connective tissue maturation and vascular density.

**Results** Over time, the membranes initially made up of loose connective tissue were replaced by membranes represented by dense connective tissue, rich in thick collagen fibers. At six weeks, membrane thickness was greater ( $565 \pm 208\mu\text{m}$ ) than at four ( $186.9 \pm 70.21\mu\text{m}$ ,  $p = 0.0002$ ) and two weeks ( $252.2 \pm 55.1\mu\text{m}$ ,  $p = 0.001$ ). All membranes from the initial time showed foci of osteogenic differentiation that progressively reduced over time.

**Conclusion** In addition to the structural and protective function of the membrane, its intrinsic biological characteristics can actively contribute to bone regeneration. The biological activity attributed by the presence of foci of osteogenesis confers to the membrane the potential of osteoinduction that favors the local conditions for the integration of the bone graft.

## Keywords

- ▶ bone and bones
- ▶ Masquelet technique
- ▶ models, animal
- ▶ membrane induced
- ▶ regeneração óssea

## Introdução

Os defeitos segmentares críticos são definidos como uma falha óssea segmentar com comprimento 2 a 2,5 vezes maior do que o diâmetro do osso e que não regeneram espontaneamente.<sup>1,2</sup> Defeitos com essas dimensões são lesões complexas de difícil abordagem e representam um desafio para o ortopedista.<sup>3</sup> Em animais, um defeito ósseo crítico é definido como um defeito que não regenera espontaneamente ou que apresenta menos de 10% de regeneração óssea ao longo da vida do animal.<sup>4</sup>

As principais estratégias terapêuticas para os defeitos segmentares críticos são a distração osteogênica ou o transporte ósseo interno com fixador externo (técnica de Ilizarov),<sup>5</sup> os enxertos ósseos vascularizados<sup>6</sup> e a técnica da membrana induzida descrita por Alain Masquelet.<sup>7,8</sup>

Inicialmente, a técnica cirúrgica de Masquelet foi descrita para o tratamento das perdas ósseas secundárias à infecção e passou a ser progressivamente utilizada na reconstrução dos defeitos ósseos críticos. Na técnica, realizada em dois tempos, é feito o desbridamento da lesão com colocação do espaçador temporário (cimento) no primeiro tempo e, após cerca de seis semanas, é realizada a reconstrução com enxerto

ósseo.<sup>7,8</sup> O racional da técnica se baseia na formação de uma membrana fibrosa induzida pela resposta inflamatória do tipo corpo estranho em torno do cimento interposto no local da ressecção do osso.<sup>9,10</sup> No segundo tempo cirúrgico, o cimento é retirado e o material de enxertia é introduzido na câmara formada no local de defeito.<sup>11,12</sup>

Relatos da literatura já descreveram as propriedades biológicas da membrana induzida que favorecem a consolidação do defeito após a enxertia óssea.<sup>8,13-16</sup> Além da barreira mecânica à reabsorção do enxerto, a membrana é fonte de moléculas bioativas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsável pela modulação do padrão de vascularização da membrana ao longo do tempo<sup>14,17</sup> e o fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), relacionado com a regulação da proliferação e diferenciação de condrócitos e osteoblastos na membrana.<sup>15,17-19</sup>

O objetivo deste estudo foi reproduzir em um modelo animal a técnica cirúrgica de Masquelet e analisar ao longo do tempo as características da membrana induzida formada em torno do cimento ósseo. No contexto da pesquisa ortopédica, o modelo poderá contribuir para (i) identificar achados relacionados com o favorecimento das condições locais

para a consolidação óssea e (ii) possibilitar a realização de experimentos com novos materiais utilizados para o preenchimento inicial ou na reconstrução dos defeitos.

## Materiais e Métodos

### Animais

Utilizamos neste estudo 21 ratos Sprague-Dawley machos com 12-14 semanas e peso médio de 350 g, adquiridos no Biotério Central da Unicamp (Campinas, São Paulo). Os animais foram alojados em ambiente com luz e temperatura controladas e receberam ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes publicadas na Lei 11.794 que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais e com a aprovação do comitê institucional de cuidados com animais (CEUA 006/2017).

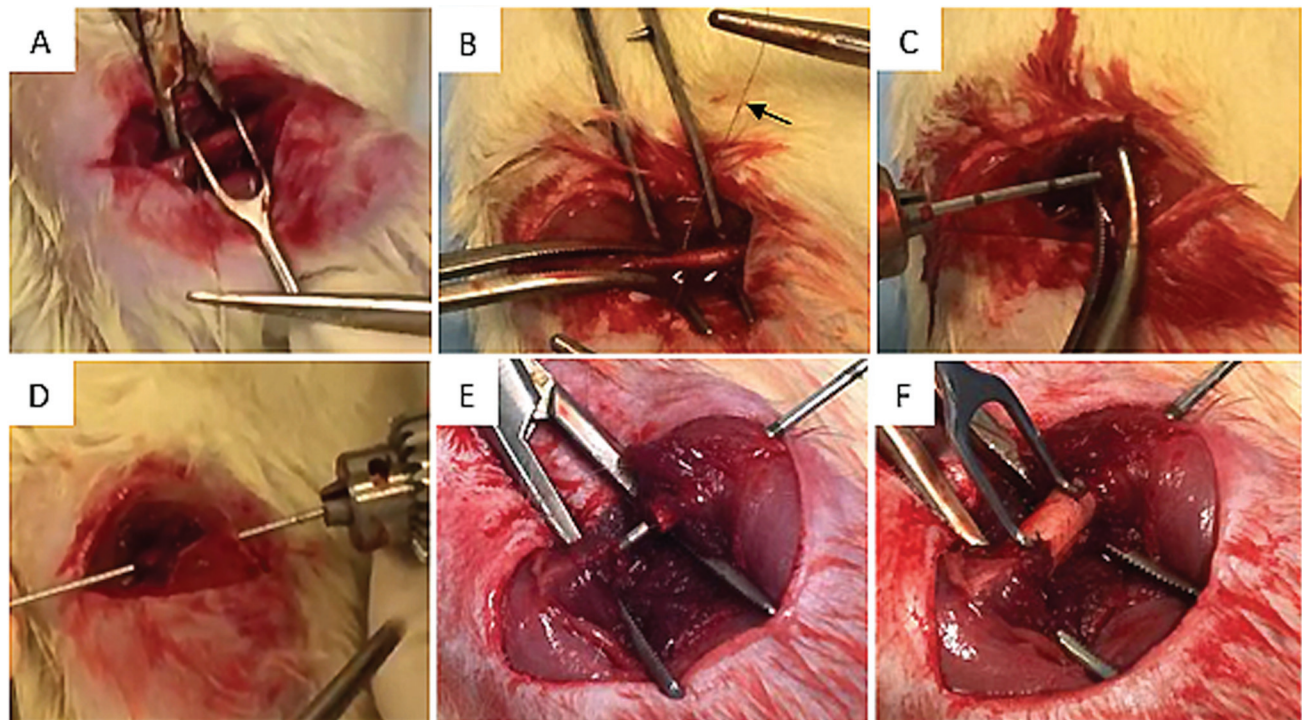
### Modelo Experimental

O procedimento cirúrgico foi realizado após indução anestésica em câmara com concentração alveolar de isoflurano (Biochimico, Itatiaia, Rio de Janeiro) de 4-5%. A seguir o animal foi transferido para máscara facial e mantido com concentração de 2,5% (Vaporizador Universal, Insight Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo). A analgesia foi realizada com 5 mg/kg de cloridrato de tramadol (Hipolabor, Sabará, Minas Gerais) associado a 5 mg/kg cetoprofeno (Ketoprofeno 1%, Vencofarma, Londrina, Paraná) por via subcutânea no pré-

operatório e mantida com dose diária por três dias consecutivos no pós-operatório. A antibioticoterapia profilática foi realizada com uma dose diária de 50 mg/kg de cefazolina sódica (Fazolom®, Blau Farmacêutica, São Paulo) por via intraperitoneal por três dias consecutivos. Após a cirurgia os animais foram mantidos individualmente em estantes ventiladas.

As cirurgias foram realizadas em condições estéreis com o animal em decúbito lateral esquerdo. Após tricotomia e assepsia do membro posterior direito com etanol 70%, foi realizada incisão cutânea longitudinal de 40 mm na face lateral da coxa. Após a incisão da fáscia lata, o músculo vasto lateral foi divulsionado para exposição do fêmur direito (►Fig. 1A). Para criação do defeito foi realizada ostectomia de 10 mm na porção central da diáfise femoral com o auxílio de serra de Gigli com 0,22 mm de espessura (RISystem AG, Landquart, Suíça) (►Fig. 1B).

Após a ressecção da porção central da diáfise foi inserido um fio de Kirschner com ponta rosqueada e espessura de 1,5 mm através do canal medular do segmento ósseo distal em direção ao joelho (►Fig. 1C). Após a luxação da patela e a visualização da extremidade do fio na fossa intercondílea, com auxílio de um motor manual, o fio foi progredido retrogradamente pelo canal medular através da falha óssea (►Fig. 1D) e ancorado pela rosca na região trocântérica do fêmur (►Fig. 1E). O tamanho da falha foi confirmado com um afastador de gancho duplo. A estabilização do defeito foi



**Fig. 1** Etapas do procedimento cirúrgico para criação de defeito crítico na diáfise femoral em modelo animal e reconstrução com cimento ósseo. (A) Exposição do fêmur por acesso anterolateral e demarcação do local da criação do defeito crítico com gancho duplo na porção médio-diafisária. (B) Ostectomia (10 mm) realizada na porção central da diáfise com o auxílio de serra de Gigli (seta). (C) Inserção de fio de Kirschner (1,5 mm) através do canal medular do segmento ósseo distal em direção ao joelho. (D) Após a visualização da extremidade do fio na fossa intercondílea, com auxílio de um motor manual o fio foi progredido retrogradamente pelo canal medular através da falha óssea. (E) Ancoramento do fio na região trocântérica do fêmur e delimitação do defeito crítico. (F) Estabilização do defeito com a interposição de um espaçador cirúrgico de cimento ósseo (PMMA).

obtida com a interposição de um espaçador cirúrgico de cimento ósseo (polimetilmetacrilato, PMMA) preparado em capela de exaustão com a mistura de 1 g de polimetilmetacrilato com 487  $\mu$ L de líquido ativador (Smartset GMV Endurance, Gentamicin in Bone Cement, DePuy International, Leeds, Inglaterra) (**Fig. 1F**). Uma vez iniciado o processo de polimerização, o PMMA foi moldado sobre a falha óssea e, após a secagem, foi feita sutura por planos.

Os animais foram eutanasiados duas, quatro e seis semanas após a cirurgia com injeção intravenosa de solução saturada de KCl sob efeito de anestesia inalatória profunda. Após a eutanásia foram realizadas radiografias do membro posterior direito na incidência em perfil para avaliar o tamanho do defeito, o alinhamento e a estabilidade da osteossíntese. O tamanho dos defeitos ósseos foi medido utilizando programa de processamento de imagem radiográfica (mDicomViewer, Microdata versão 3.0).

### Análise histológica

Após a eutanásia, o membro posterior direito foi desarticulado no quadril, os tecidos moles foram removidos e o fêmur foi exposto. As membranas recobrimo o PMMA foram retiradas com auxílio de pinça e bisturi e fixadas sobre papel de filtro em formol tamponado a 10% (pH 7,4). Após 48 horas foram seccionadas em fragmentos longitudinais, incluídos em blocos de parafina para obtenção de cortes histológicos com 5  $\mu$ m de espessura e, posteriormente, corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H&E) (**Fig. 2**). As imagens foram obtidas no sistema ApoTome 2 em câmera de alta resolução AxioCam HRm (Zeiss Axiozoom v.16, Carl Zeiss, Munique, Alemanha) e digitalizadas no programa de análise Zeiss Zen 2 core (Carl Zeiss).

A medida da espessura foi obtida em pontos equidistantes em toda a extensão das membranas utilizando o software Image J (disponível gratuitamente no site <https://imagej.nih.gov/ij/>).



**Fig. 2** Após a fixação em formol tamponado a 10% por 48h as membranas foram seccionadas em fragmentos longitudinais equidistantes, incluídas em parafina e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H&E).

Os graus de maturação do tecido conjuntivo (frouxo, denso e muito denso) e a vascularização (baixa, intermediária e alta) das membranas foram definidos por avaliação semi-quantitativa.

### Análise estatística

Os tamanhos dos defeitos e a espessura das membranas em micra foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e comparados utilizando o ANOVA *one way* seguido de pós teste de Holm-Sidak's. Foram considerados significativos valores para  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.3 para iOS (Home-graphpad.com).

## Resultados

### Procedimento cirúrgico

As cirurgias tiveram duração média de 32 minutos. Apesar dos animais apresentarem algum grau de claudicação após a recuperação anestésica, eles se mantiveram ativos durante o período experimental. Ao final do terceiro dia, após a suspensão dos esquemas de analgesia e antibioticoterapia, os animais recuperaram a funcionalidade do membro operado.

### Controle radiográfico

O tamanho médio dos defeitos ósseos foi  $7 \pm 1,5$  mm. Nenhum animal apresentou deslocamento do cimento ósseo ou infecção no sítio cirúrgico. Em dezoito animais a osteossíntese garantiu a estabilidade dos segmentos ósseos, com boa sobreposição do PMMA inserido ao longo do defeito (**Fig. 3**). Três animais que apresentaram sinais de falha da osteossíntese por perda do ancoramento trocântérico (**Fig. 4**) foram submetidos a eutanásia e excluídos do estudo.

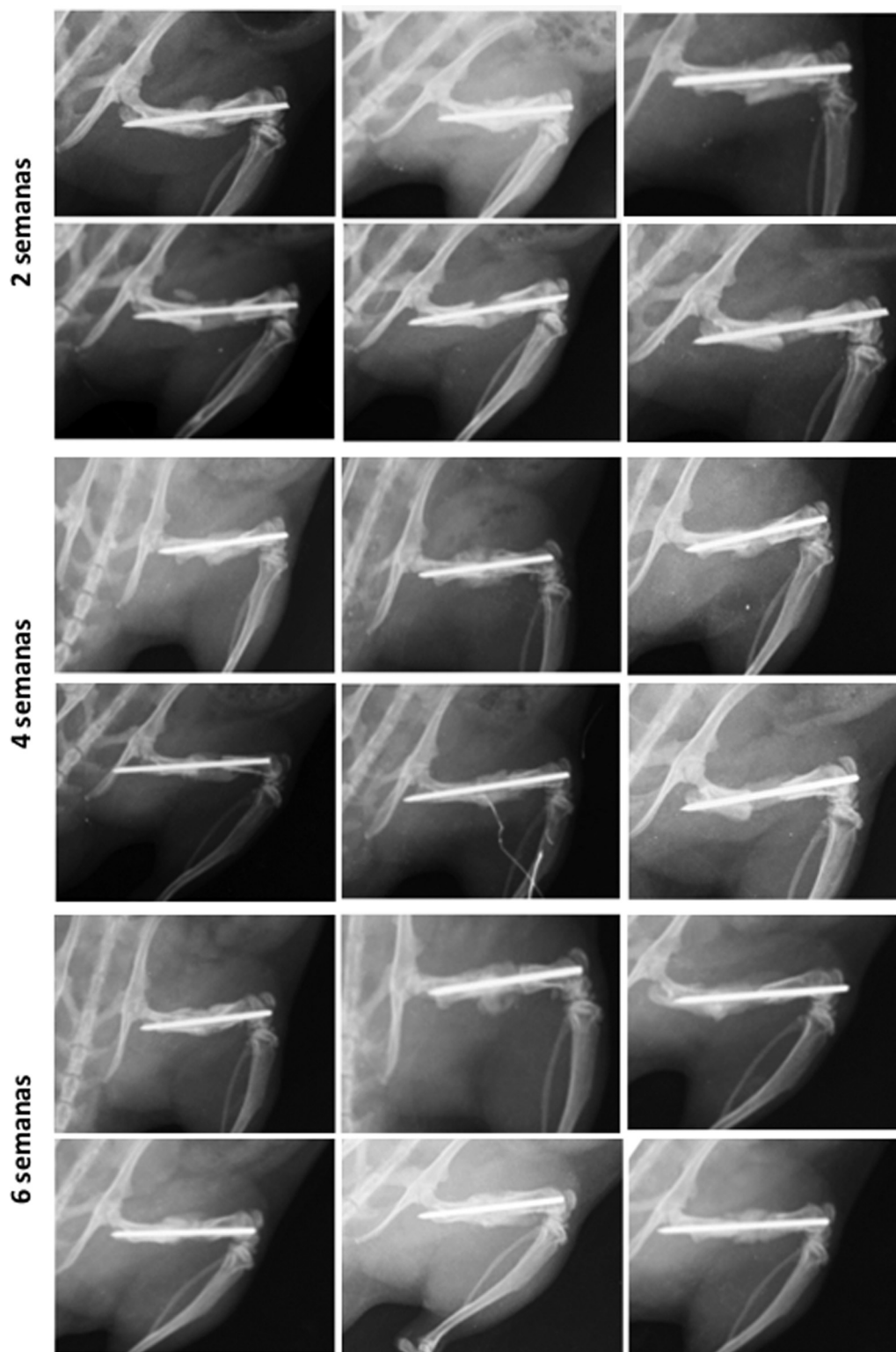
### Morfologia das membranas

Em todos os animais as membranas envolviam completamente o espaçador de PMMA (**Fig. 5**). Microscopicamente, a porção superficial em contato com o cimento era representada por camada densamente celular (**Fig. 6**). Apesar da nítida delimitação entre o revestimento celular e a porção fibrosa superior da membrana, não havia evidência da presença de membrana basal.

A densidade do tecido conjuntivo alterou ao longo do tempo (**Tabela 1**). Em duas semanas, as membranas eram representadas por tecido de granulação ou conjuntivo ricamente vascularizado com deposição de matriz extracelular amorfa relacionada com fibroblastos jovens (**Fig. 7A**). A partir da quarta semana os fibroblastos são alongados e a matriz extracelular adquire aspecto fibrilar (**Fig. 7B**). Com seis semanas o tecido conjuntivo é rico em fibroblastos alongados e matriz colágena densa (**Fig. 7C**). Exceto pelo discreto aumento da espessura da parede dos vasos na avaliação mais tardia, o padrão da neoformação vascular não mostrou relação com o tempo (**Tabela 1**).

A espessura das membranas aumentou significativamente ao longo do tempo (**Fig. 8**). Com seis semanas as membranas tinham espessura média de  $565 \pm 208$   $\mu$ m e, na maior parte dos animais o tecido conjuntivo penetrava o músculo





**Fig. 3** Radiografias em perfil do membro posterior realizadas após a eutanásia para avaliar o tamanho do defeito, o alinhamento e a estabilidade da osteossíntese.

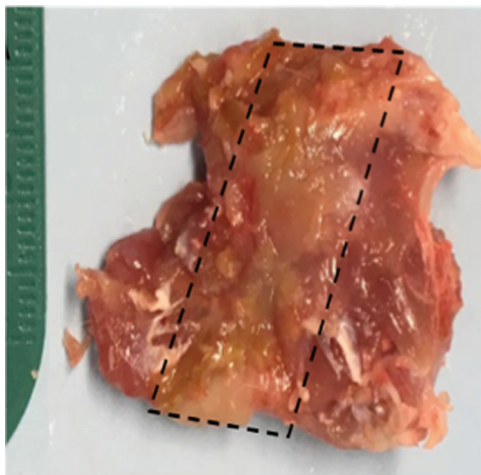
esquelético subjacente, promovendo o ancoramento da membrana no local do defeito ósseo (►Fig. 9). Com quatro e duas semanas a espessura média foi respectivamente  $186,9 \pm 70,21$  e  $252,2 \pm 55,1 \mu\text{m}$ .

Quanto ao potencial intrínseco para diferenciação osteogênica, todas as membranas avaliadas no tempo inicial de

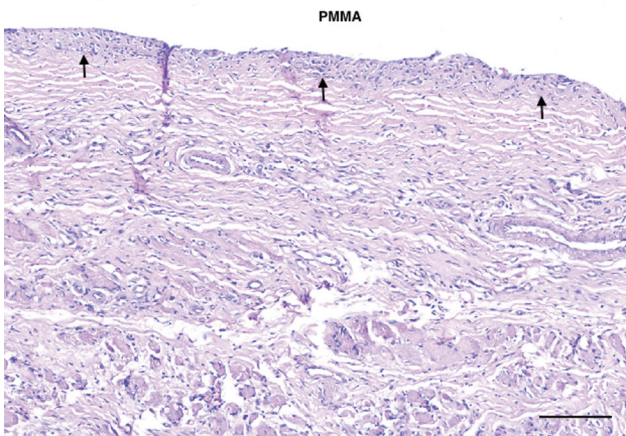
duas semanas (6/6) mostraram focos de ossificação endocondral. Ao longo do tempo este potencial reduziu progressivamente (4/6 com quatro semanas e 1/6 com seis semanas). Independente do ponto de observação, a neoformação óssea ocorreu em todas as regiões da membrana, sem definição de um padrão preferencial de localização (►Fig. 10). Em



**Fig. 4** Radiografias em perfil do membro posterior dos animais que apresentaram falha da osteossíntese por perda do ancoramento trocântérico. (A) Deslocamento completo do fio de Kirschner e sultura do espaçador. (B e C) Deslocamento parcial do fio de Kirschner com sultura do espaçador.



**Fig. 5** Aspecto macroscópico da membrana induzida de Masquelet em modelo murino com a face brilhante relacionada com o espaçador de polimetilmetacrilato (PMMA) voltada para cima (retângulo pontilhado).



**Fig. 6** Microfotografia da membrana induzida de Masquelet em modelo murino quatro semanas após a criação de defeito crítico no fêmur. Revestimento da superfície em contato com o com o espaçador de polimetilmetacrilato (PMMA) representado por camada densamente celular, com interface (setas) bem definida da porção superior da membrana. Coloração H&E. Barra = 150µm.

**Tabela 1** Análise histológica semi-quantitativa dos graus de maturação do tecido conjuntivo e da neoformação vascular nas membranas

Parâmetro		2 semanas (n = 6)	4 semanas (n = 6)	6 semanas (n = 6)
Densidade do conjuntivo da membrana	frouxo	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)
	denso	3 (50%)	4 (67%)	1 (17%)
	muito denso	1 (17%)	2 (33%)	5 (83%)
Vascularização	baixa	1 (17%)	1 (17%)	0 (0%)
	intermediária	0 (0%)	0 (0%)	4 (67%)
	alta	5 (83%)	5 (83%)	2 (33%)

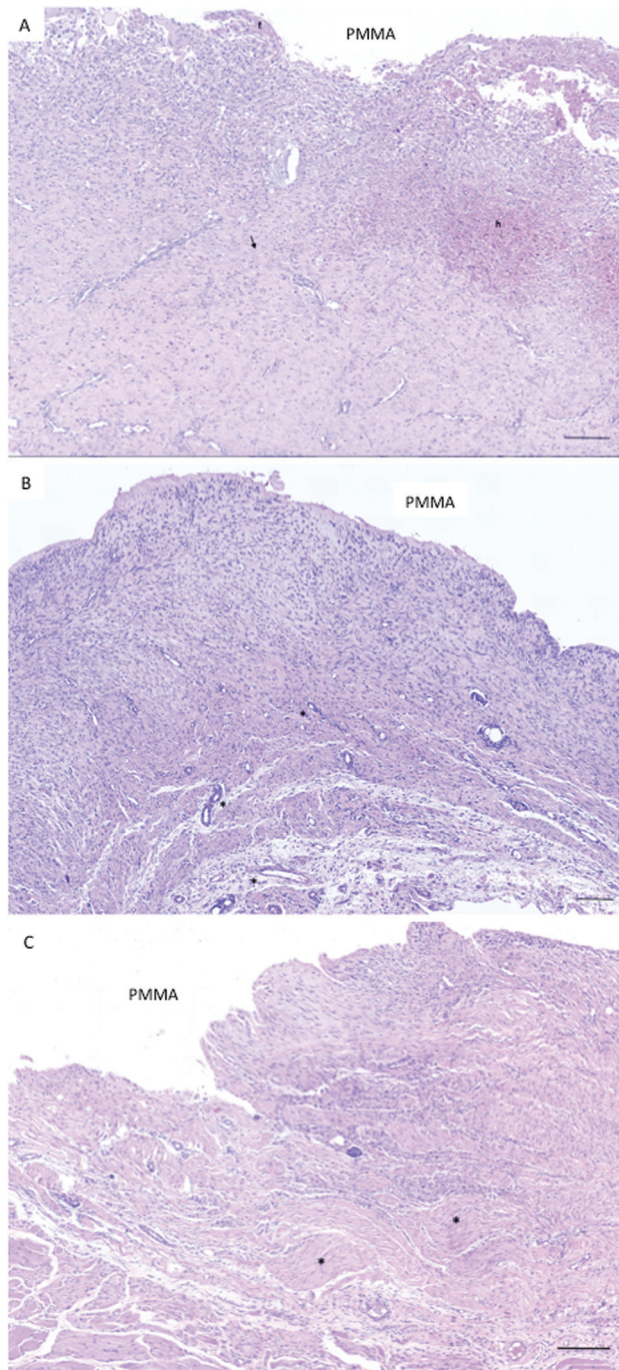
algumas membranas havia associação do osso neoformado com células hematopoéticas.

## Discussão

Neste estudo estabelecemos um modelo murino de falha óssea médio-diafisária no fêmur com a colocação de haste intramedular retrógrada (fio de Kirschner rosqueado) a fim de mimetizar a técnica de Masquelet. Modelos animais que mimetizam a situação clínica são particularmente interessantes para teste de estratégias de bioengenharia ortopédica baseadas no desenvolvimento de substitutos ósseos. No nosso modelo, reproduzimos a formação da membrana e mostramos o seu potencial intrínseco para diferenciação osteogênica e a organização e maturação do tecido conjuntivo ao longo do tempo.

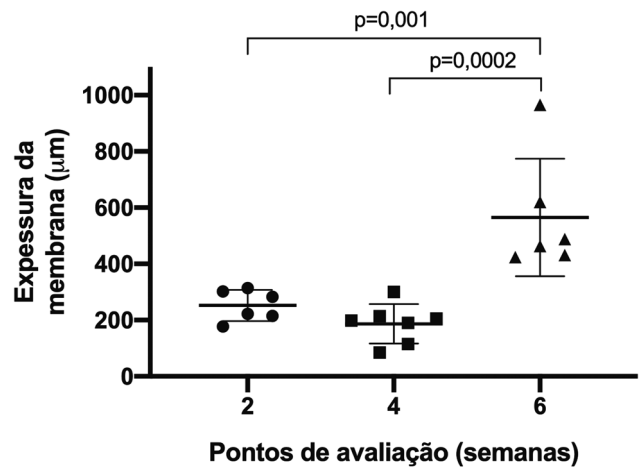
O tecido de granulação e a matriz extracelular das membranas dos tempos iniciais se torna progressivamente mais denso e rico em fibras colágenas espessas. Em coelhos<sup>19</sup> e ovelhas<sup>13</sup> não foram observadas alterações estruturais relacionadas com o envelhecimento da membrana. Contudo, em um dos principais estudos clínicos desenvolvido para investigar a biologia das membranas, com o tempo, o tecido conjuntivo se tornou mais colagenizado e menos vascularizado atingindo sua composição final três a seis meses depois da colocação do espaçador.<sup>14</sup> A partir da segunda semana após o procedimento cirúrgico observamos em todos os animais a formação de membrana fibrosa envolvendo o





**Fig. 7** Microfotografia das membranas induzidas ilustrando as características do tecido conjuntivo fibroso duas, quatro e seis semanas após a criação de defeito crítico no fêmur. (A) Duas semanas: tecido conjuntivo ricamente vascularizado associado com matriz extracelular amorfa relacionada com fibroblastos jovens (seta), focos de hemorragia (h) e depósitos de fibrina (f). (B) Quatro semanas: vascularização exuberante (\*) e matriz extracelular com aspecto fibrilar relacionada a fibroblastos com morfologia alongada. (C) Seis semanas: tecido conjuntivo rico em fibroblastos aprisionados em matriz colágena densa com fibras dispostas paralelamente (\*). PMMA = polimetilmetacrilato. Coloração H&E. Barra = 200µm (A, B e C).

espaçador. Diversos relatos confirmam a semelhança morfoestrutural da membrana formada em torno do PMMA em humanos e em animais.<sup>12</sup> Em ambos os cenários ela é constituída por tecido conjuntivo bem estruturado organi-

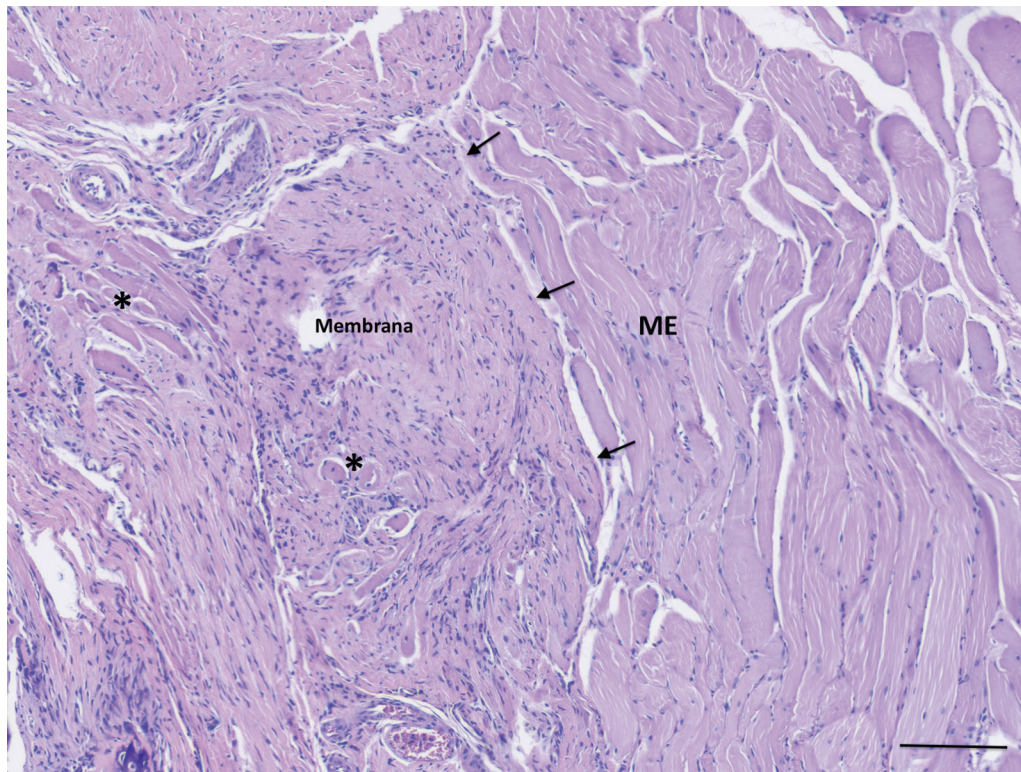


**Fig. 8** Relação entre temporalidade e espessura das membranas. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA *one way* seguido de pós teste de Holm-Sidak's.

zado em camadas.<sup>15,20</sup> A porção superficial da membrana em contato com o cimento é revestida por células poliédricas dispostas em camadas, semelhante aos revestimentos epiteliais.<sup>8</sup> As camadas subsequentes são constituídas por fibroblastos, miofibroblastos, e matriz extracelular rica em colágeno tipo I.<sup>8,15,16,19,21</sup>

A não ser pelo espessamento da parede vascular, não observamos influência do tempo sobre a vascularização da membrana. Apesar da vascularização reduzir a medida que a membrana se torna mais colagenizada,<sup>14</sup> é possível que a forma de avaliação comparativa que utilizamos para quantificar a densidade dos vasos não tenha confirmado este achado. A redução de 60% da vascularização do primeiro para o terceiro mês foi descrita em fragmentos da membrana obtidos por biópsias sequenciais realizadas no mesmo paciente.<sup>14</sup> Outro ponto a ser considerado é que, em geral a avaliação do padrão de vascularização é feita após a reconstrução do defeito.<sup>20</sup> Possivelmente a enxertia óssea interfere na dinâmica de remodelação das membranas dificultando a comparação com membranas formadas antes da reconstrução do defeito.

Os relatos quanto a espessura da membrana em modelos animais, variando entre 100-200µm<sup>16,20,22,23</sup> a 1000 µm<sup>17,19</sup> estão de acordo com a faixa de valores obtidos no presente estudo. Como outros autores,<sup>17,18,23,24</sup> observamos que as membranas se tornaram mais espessas ao longo do tempo, que pode ser justificado pelo maior acúmulo de tecido conjuntivo e de fibras colágenas espessas. Estudos realizados em ratos<sup>22</sup> e em coelhos<sup>17,20</sup> mostram que, com o tempo, a membrana se torna mais delgada. Em nenhum desses estudos os autores sugerem as bases biológicas/biomecânicas para justificar os seus resultados. À semelhança do padrão de vascularização é possível que esta discrepância esteja relacionada com a obtenção de valores da espessura da membrana antes e depois do segundo procedimento cirúrgico. Um resultado adicional do nosso estudo observado tardiamente foi a extensão do tecido conjuntivo das membranas para o músculo esquelético. As vantagens e desvantagens da fixação



**Fig. 9** Na avaliação mais tardia (seis semanas) o tecido conjuntivo da membrana (setas) penetra no músculo esquelético (ME) subjacente promovendo o ancoramento da membrana no local do defeito ósseo e atrofia das fibras musculares esqueléticas (\*). PMMA = polimetilmetacrilato. Coloração H&E. Barra = 200µm

local da membrana podem vir a ser tema de investigações futuras em estudos clínicos voltados para a definição do melhor momento para realizar o segundo procedimento cirúrgico da técnica de Masquelet.

O potencial intrínseco das membranas para diferenciação osteogênica demonstrado no presente estudo e em membranas humanas<sup>14,25</sup> e de animais<sup>16,18</sup> reduziu ao longo do tempo.<sup>14,16,18,24,26</sup> O tecido de granulação formado nas fases iniciais do processo induzido por grandes corpos estranhos é rico em estroma mesenquimal indiferenciado e contém células que expressam marcadores de pluri e de multipotencialidade.<sup>27</sup> Esta composição confere elevado potencial local para diferenciação nas linhagens mesenquimais, justificando a neoformação óssea em todas as membranas avaliadas com duas semanas. A redução progressiva da população de progenitores mesenquimais, a medida que o tecido da membrana sofre maturação, explicaria o menor percentual de focos de osteogênese tardiamente.

A escolha pela fixação intramedular com fio de Kirshner conferiu estabilidade mecânica no local do defeito. Ocorreram três falhas de fixação (3 em 21 casos), decorrentes de erro técnico do ancoramento da rosca do fio na região trocântérica do fêmur. Existem outros implantes desenvolvidos para este fim, porém o alto custo inviabiliza a utilização em pesquisa básica no nosso meio. O modelo mostrou-se eficiente, simples, reprodutível e de baixo custo.

Uma limitação do nosso estudo foi não ter reproduzido o segundo procedimento cirúrgico da técnica de Masque-

let. Outra limitação que pode ser corrigida em estudos futuros é a identificação de moléculas bioativas e de progenitores mesenquimais que atuam na regulação local da membrana, utilizando técnicas de biologia molecular e isolamento celular. Para assegurar a reprodutibilidade do modelo, um ponto crítico a ser observado durante a abordagem cirúrgica é a manutenção do espaço criado pela osteotomia até o final do processo de polimerização do PMMA.

## Conclusão

Além da função estrutural e protetora da membrana, suas características biológicas intrínsecas podem contribuir ativamente para a consolidação do defeito. A atividade biológica atribuída pela presença de focos de osteogênese confere a membrana potencial de osteoindução que favorecem as condições locais para a integração do enxerto ósseo. O modelo proposto pode contribuir em pesquisas futuras voltadas para estudar esse microambiente favorável e potencializador da regeneração óssea.

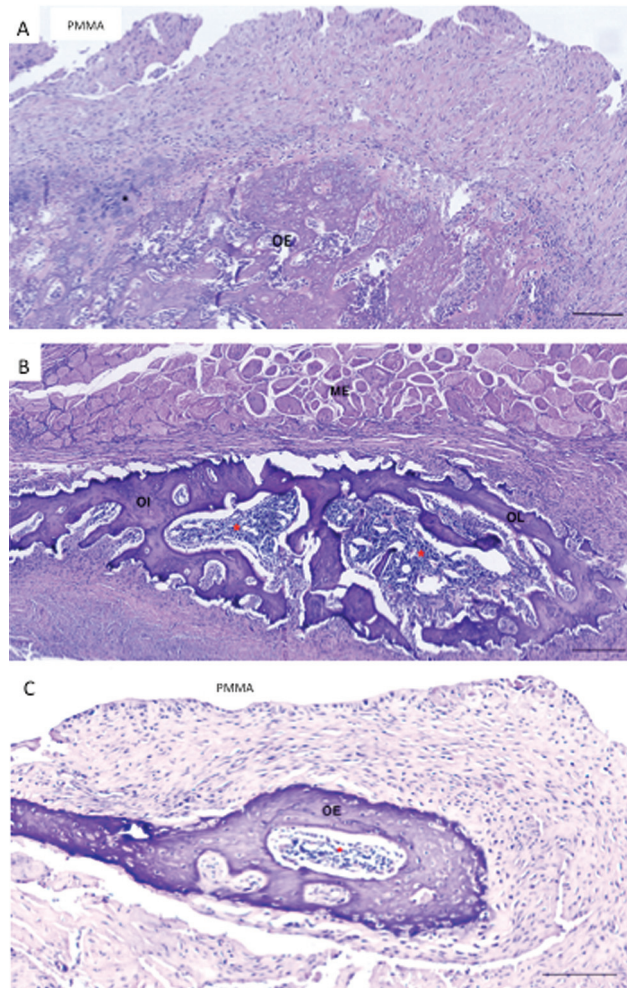
### Suporte Financeiro

Os autores declaram que não receberam apoio financeiro de fontes públicas, comerciais ou sem fins lucrativos.

### Conflito de Interesses

Os autores não têm conflito de interesses a declarar.





**Fig. 10** Potencial intrínseco das membranas para indução de diferenciação osteogênica. (A) Foco de ossificação endocondral (OE) localizado próximo à superfície da membrana. Condrócitos proliferativos e hipertróficos (\*) podem ser identificados em relação com a formação óssea (duas semanas). (B) Foco de ossificação localizado próximo ao plano muscular (ME) constituído por osso lamelar (OL) e não lamelar imaturo (OI) e células hematopoéticas (\*) (4 semanas). (C) Foco de ossificação endocondral (OE) localizado próximo a superfície da membrana constituído por osso imaturo contendo osteoblastos aprisionados na matriz óssea e células hematopoéticas (\*). PMMA = polimetilmetacrilato. ME = Músculo esquelético Coloração H&E. Barra = 100µm (A e B) e 50µm (C).

## Referências

- Wiese A, Pape HC. Bone defects caused by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions. *Orthop Clin North Am* 2010;41(01):1-4
- Mauffrey C, Giannoudis PV, Conway JD, Hsu JR, Masquelet AC. Masquelet technique for the treatment of segmental bone loss have we made any progress? *Injury* 2016;47(10):2051-2052
- Kadhim M, Holmes L Jr, Gesheff MG, Conway JD. Treatment options for nonunion with segmental bone defects: systematic review and quantitative evidence synthesis. *J Orthop Trauma* 2017;31(02):111-119
- Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99(02):148-154
- Giannoudis PV. Treatment of bone defects: Bone transport or the induced membrane technique? *Injury* 2016;47(02):291-292
- Ren GH, Li R, Hu Y, Chen Y, Chen C, Yu B. Treatment options for infected bone defects in the lower extremities: free vascularized fibular graft or Ilizarov bone transport? *J Orthop Surg Res* 2020;15(01):439-450
- Masquelet AC, Fitoussi F, Bégue T, Muller GP. Reconstruction des os longs par membrane induite et autogreffe spongieuse. *Ann Chir Plast Esthet* 2000;45(03):346-353
- Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am* 2010;41(01):27-37
- Masquelet A, Kanakaris NK, Obert L, Stafford P, Giannoudis PV. Bone repair using the Masquelet technique. *J Bone Joint Surg Am* 2019;101(11):1024-1036
- Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride-Gagyi S. Masquelet's induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *J Orthop Res* 2021;39(04):707-718
- Giannoudis PV, Harwood PJ, Tosounidis T, Kanakaris NK. Restoration of long bone defects treated with the induced membrane technique: protocol and outcomes. *Injury* 2016;47(Suppl 6):S53-S61
- Klein C, Monet M, Barbier V, et al. The Masquelet technique: Current concepts, animal models, and perspectives. *J Tissue Eng Regen Med* 2020;14(09):1349-1359
- Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res* 2004;22(01):73-79
- Aho OM, Lehenkari P, Ristiniemi J, Lehtonen S, Risteli J, Leskelä HV. The mechanism of action of induced membranes in bone repair. *J Bone Joint Surg Am* 2013;95(07):597-604
- Christou C, Oliver RA, Yu Y, Walsh WR. The Masquelet technique for membrane induction and the healing of ovine critical sized segmental defects. *PLoS One* 2014;9(12):e114122
- Gourón R, Petit L, Boudot C, et al. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11(02):382-389
- Wang X, Wei F, Luo F, Huang K, Xie Z. Induction of granulation tissue for the secretion of growth factors and the promotion of bone defect repair. *J Orthop Surg Res* 2015;10(01):147
- Henrich D, Seebach C, Nau C, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 2016;10(10):E382-E396
- Viateau V, Bensidhoum M, Guillemin G, et al. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *Orthop Clin North Am* 2010;41(01):49-56
- Liu H, Hu G, Shang P, et al. Histological characteristics of induced membranes in subcutaneous, intramuscular sites and bone defect. *Orthop Traumatol Surg Res* 2013;99(08):959-964
- Viateau V, Guillemin G, Calando Y, et al. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet Surg* 2006;35(05):445-452
- Gruber HE, Gettys FK, Montijo HE, et al. Genomewide molecular and biologic characterization of biomembrane formation adjacent to a methacrylate spacer in the rat femoral segmental defect model. *J Orthop Trauma* 2013;27(05):290-297
- Tang Q, Tong M, Zheng G, Shen L, Shang P, Liu H. Masquelet's induced membrane promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by activating the Smad and MAPK pathways. *Am J Transl Res* 2018;10(04):1211-1219
- Nau C, Seebach C, Trumm A, et al. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic

- enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury* 2016;47(02):325–334
- 25 Gruber HE, Ode G, Hoelscher G, Ingram J, Bethea S, Bosse MJ. Osteogenic, stem cell and molecular characterisation of the human induced membrane from extremity bone defects. *Bone Joint Res* 2016;5(04):106–115
- 26 Gruber HE, Riley FE, Hoelscher GL, et al. Osteogenic and chondrogenic potential of biomembrane cells from the PMMA-segmental defect rat model. *J Orthop Res* 2012;30(08):1198–1212
- 27 Patel J, Gudehithlu KP, Dunea G, Arruda JAL, Singh AK. Foreign body-induced granulation tissue is a source of adult stem cells. *Transl Res* 2010;155(04):191–199