PAULO PAES PEREIRA

**Integração do tendão do músculo semitendíneo na
reconstrução do ligamento cruzado anterior: Estudo
biomecânico, histológico e ressonância magnética em
coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
doutor em Ciências

Área de Concentração: Ortopedia e
Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luis
Camanho

São Paulo
2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

ALICE, aquela que me gerou e me ensinou os primeiros passos... Me acompanhou nas primeiras letras. Aquela que me transmitiu energia, segurança, disciplina persistência e perseverança para alcançar os meus objetivos profissionais e JOSÉ, querido pai, amigo e bom companheiro, batalhador e incentivador incansável na minha formação acadêmica e profissional sempre presente, seguro, respeitoso que acompanhou e deu sustentação aos meus objetivos de vida a serem alcançados.

À minha esposa Alessandra, que sabe me compreender e entender e me mostra os encantos da vida, que gerou o meu amado filho Phillip, que consolida o nosso lar, sempre estavam ao meu lado me dando amor, força e tranquilidade: meus carinhos, respeito e minha declaração de amor.

Aos meus irmãos Bárbara, Carlos e Valéria que desde crianças acompanharam e compartilharam o sonho e a busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Gilberto Luiz Camanho, ilustre e modelo do melhor exemplo profissional, meu grande orientador e amigo, pela sua palavra alegre e agradável, seu conhecimento científico e altamente técnico, sua orientação segura e prática com seriedade, sensatez, responsável acadêmico e praticidade profissional insofismável, que desprende seu precioso tempo e de forma relevante contribuiu para a conclusão desta tese, sendo muito mais que um orientador: minha admiração, respeito e eterna gratidão.

Ao Dr. Marcelo de Azevedo Souza Munhoz pela grande colaboração e auxílio na execução dos experimentos.

Ao tecnólogo em saúde César Augusto Martins Pereira pela execução dos ensaios mecânicos.

Ao Dr. Carlos Augusto Luna Luchetta Filho pela dedicação e cuidados aos animais do experimento.

Ao Dr. Fernando Rogério Vilela Favero, Dr. Xavier Marie G. R. G. Stump pela análise das imagens de ressonância magnética.

Ao professor doutor José Eduardo Bueno Zappa e Francisco Pignataro Lima pela análise histológica das lâminas.

Aos colegas do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo pelo incentivo e ajuda.

Aos funcionários do Instituto de Ortopedia de Traumatologia pela colaboração e incentivo.

Ao Instituto de Patologia de Campinas pela realização dos exames histológicos.

À Faculdade Municipal de Ciências Médicas de Jundiaí pela colaboração na realização do ato cirúrgico dos coelhos.

Ao Hospital do Coração pela realização dos exames de Ressonância Magnética dos coelhos.

RESUMO

Pereira PP. Integração do tendão do músculo semitendíneo na reconstrução do ligamento cruzado anterior: Estudo biomecânico, histológico e ressonância magnética em coelhos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.130p.

O estudo analisa experimentalmente a integração tendinosa no túnel ósseo femoral na reconstrução do ligamento cruzado anterior do joelho esquerdo com o tendão do músculo semitendíneo autólogo, utilizando imagens de ressonância magnética, teste biomecânico e análise histológica em 15 coelhos da raça Nova Zelândia. Após os períodos de quatro, oito e doze semanas do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos ao exame de ressonância magnética para avaliar o túnel femoral dos joelhos. A seguir os animais foram eutanasiados e os joelhos foram submetidos a testes de tração em uma máquina de ensaios mecânicos Kratos para verificar a integração do enxerto nos túneis e a exame histológico do túnel femoral. A análise dos resultados demonstrou integração mecânica do tendão no túnel femoral a partir da 4ª semana em todos os animais estudados e observou-se na histologia e nas imagens da ressonância magnética alterações do enxerto e da área ao redor de forma heterogênea, sugerindo um processo de cicatrização do tendão–osso, porém não se pode afirmar que ocorria a integração até a 12 semanas.

Descritores: 1.Joelho/cirurgia 2.Ligamento cruzado anterior 3.Osseointegração 4.Espectroscopia de ressonância magnética 5.Histologia 6.Biomecânica 7.Procedimentos cirúrgicos reconstrutivos.

SUMMARY

Pereira PP. The incorporation of the semitendinous tendon autograft at the femoral femoral bone tunnel after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits – Biomechanical histology and magnetic resonance image analysis [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2006. 130p.

The purpose was to verify the incorporation (healing) of the graft of the semitendinous tendon into the femoral bone tunnel after an anterior cruciate ligament reconstruction, and verify the post operative evolution of the biomechanical histology and magnetic resonance image analysis of the graft into the femoral bone tunnel. Fifteen New Zealand white rabbits were submitted to an intra-articular anterior cruciate ligament reconstruction in the left knee, using semitendinous tendon autograft. The rabbits were submitted to an magnetic resonance image at 4, 8 and 12 weeks after surgery, after which they were euthanized. The left knee of each rabbit was disarticulated and the anterior cruciate ligament reconstruction was tested for the biomechanical properties and histological analysis of the femoral tunnel. Every rabbit knee showed incorporation of the tendon at the femoral tunnel as of the fourth week in all of the knees studied. After the fourth week signs of integration occurred in the histological analysis and heterogeneous alterations in the magnetic resonance image of the graft and the surrounding areas, which suggests a healing process. Despite the biomechanical incorporation of the graft in the femoral bone tunnel after the fourth week it was not possible to affirm that there occurred incorporation of the graft until the completion of 12 weeks in histological and magnetic resonance image analysis.

Descriptors: 1.knee/surgery 2.Anterior cruciate ligament 3.Incorporation 4.Magnetic resonance image 5.Histology 6.Biomechanical 7. Reconstruction surgery procedure.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está redigida de acordo com:

Terminologia Anatômica em Português conforme a TERMINOLOGIA ANATÔMICA INTERNACIONAL DA FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY - FCAT (COMISSÃO FEDERATIVA DE TERMINOLOGIA ANATÔMICA – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1. Ed. (Brasileira) São Paulo, Editora Manole Ltda 2001. 248p.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. GUIA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÕES, TESES E MONOGRAFIAS. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, 2ª ed. - São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação – SBD/FMUSP, 2005.

Utilizaram-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o GUIA PARA EXPRESSÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO, Segunda Edição Brasileira do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com LIST OF JOURNALS INDEXED IN INDEX MEDICUS (1992) e na LILACS - LITERATURA LATINO-AMERICANA E DO CARIBE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE (1995).

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Os ensaios biomecânicos foram realizados no laboratório de Biomecânica - LIM-41, no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na Faculdade de Medicina de Jundiaí.

Os exames de ressonância magnética foram realizados no Serviço de Diagnóstico por Imagens do Hospital do Coração - SP.

Os exames de histologia foram realizados no Instituto de Patologia de Campinas.

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVO.....	06
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	08
4 MATERIAL E MÉTODO.....	39
5 RESULTADO.....	57
6 DISCUSSÃO.....	78
7 CONCLUSÃO.....	98
8 ANEXOS.....	100
9 REFERÊNCIAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As lesões dos ligamentos cruzados são muito estudadas, e muitos artigos são sobre reconstrução do ligamento cruzado anterior com tendões. A função dos ligamentos cruzados foi descrita pela primeira vez em 1917 e 1920 por Hey Groves^{21,22} que também descreveu a técnica de reconstrução do ligamento cruzado anterior (LCA) utilizando o trato iliotibial intra-articular para reconstruir o LCA, e os tendões do semitendíneo e grácil para reconstruir o ligamento cruzado posterior.

As técnicas cirúrgicas e métodos de fixação do enxerto evoluíram, e paralelamente o conhecimento da biomecânica e biologia. Novos programas de fisioterapia foram desenvolvidos com protocolos mais acelerados, para que os pacientes operados de reconstrução do LCA possam retornar às atividades físicas mais precocemente, principalmente os atletas.

O enxerto tendinoso utilizado na substituição do LCA, passa por um processo de transformação de tendão para ligamento na porção intra-articular, que é chamado de ligamentização, e um processo de integração ao osso dentro dos túneis ósseos.

Após uma adequada cirurgia de reconstrução do LCA, o retorno às atividades físicas depende do método de fixação do enxerto, do processo de ligamentização e da integração do enxerto ao osso.

Durante um longo período, a reconstrução do LCA foi preferencialmente realizada com o terço central do ligamento patelar com um bloco de osso da patela e outro da tíbia. Nesse enxerto a integração é feita com o osso do bloco do enxerto com o osso do túnel femoral e tibial.

Mais recentemente, a reconstrução do LCA com tendões flexores vem ganhando maior espaço, especialmente com novos métodos de fixação do enxerto e utilizando enxerto de tendão de dois músculos flexores do joelho, o semitendíneo e o grácil, dobrados; portanto, quatro feixes, aumentando desta forma a resistência.

Marder et al.³⁴ em seu estudo mostra não haver diferenças significativas a longo prazo nos resultados entre os enxertos dos tendões flexores semitendíneo e grácil e o tendão patelar.

O estudo de meta análise de Freedman et al.¹⁶(2003) entre tendões flexores e tendão patelar verifica maior estabilidade no

grupo do tendão patelar; porém, o estudo de meta análise de Biau et al.⁸ (2006) defende que esta evidência é falha, e que a reconstrução com os tendões flexores apresenta menos morbidade.

Papageorgiou et al.⁴³ (2001) em estudo com cabras verificam as diferenças da integração dos dois enxertos. Mostram com seis semanas uma completa integração do bloco ósseo patelar no osso esponjoso femoral enquanto que o enxerto tendinoso no túnel tibial mostra na sexta semana neoformação óssea esparsa na periferia do túnel e áreas distintas de fibras de colágeno similar às fibras de Sharpey, sem demonstrar uma completa integração.

Causou especial interesse saber quando o enxerto tendinoso, já está integrado ao osso, isto é, não depende mais do sistema de fixação, e como verificar esta integração e utilizar estas informações de caráter experimental na prática médica, quanto ao retorno às atividades físicas.

Grana et al.¹⁹ mostram em coelhos que, após a realização da reconstrução do LCA com tendão do semitendíneo, a partir da terceira semana a integração do enxerto no túnel ósseo é mais resistente que o enxerto na porção articular. Este fato também

foi verificado por Pereira et al.⁴⁴ no túnel femoral, e na tíbia a partir da décima segunda semana.

Grana et al.¹⁹ descrevem que a fixação biológica do enxerto no túnel ósseo se dá por tecido conectivo que ancora o tendão no osso a partir da terceira semana, visualizam tecido de colágeno com aparência das fibras de Sharpey. Dando seguimento a esse estudo Blickenstaff et al.⁹ (1997) verificam que, com 12 semanas, os enxertos rompem na porção articular e mantêm a porção tendinosa intra-túnel intacta. Observam o osso trabecular com osteóide na junção da borda do túnel, tecido conectivo fibroso bem organizado e fibras de colágeno perpendiculares penetrando no osso.

Os estudos experimentais carecem de aplicabilidade clínica. Este estudo analisa o local da ruptura da reconstrução do LCA, isto é, se o enxerto foi arrancado do túnel femoral, do túnel tibial ou se rompeu na porção articular do enxerto. Procurou-se analisar o processo evolutivo de integração do enxerto no túnel ósseo femoral na histologia e compará-lo com as imagens de ressonância magnética.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a integração do tendão do músculo semitendíneo no túnel ósseo do fêmur de coelhos da raça Nova Zelândia, na reconstrução do LCA, confrontando as análises histológicas e ressonância magnética da interface do enxerto do túnel ósseo do fêmur.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Estudos experimentais com peças anatômicas são difíceis de serem realizados, pois as peças utilizadas devem ser conservadas para serem submetidas à metodologia proposta no momento oportuno.

Selin e Hirsch⁴⁹ (1966) verificam que peças anatômicas de cadáveres humanos, com idade entre 39 e 51 anos, não apresentam alteração significativa das propriedades mecânicas da cortical femoral, quando conservadas a -20°C , em relação às peças testadas logo após o exame necroscópico.

Viidik e Lewin⁵⁴ (1966), em estudo com coelhos, congelam a -20°C , joelhos com a articulação intacta por uma semana; depois os descongelam rapidamente com água a 37°C e realizam testes de ensaio mecânico. Os autores observam não haver variação na forma da curva carga / deformação e não haver diferença significativa em relação ao grupo controle.

Michellini³⁸ (1984) realiza trabalhos em cães para verificar as propriedades mecânicas do ligamento cruzado anterior e as do tendão patelar submetidos a várias formas de congelamento.

Verifica que essas propriedades nas peças, quando congeladas a -20 ° C, não sofrem alterações significativas.

A anatomofisiologia, a histologia e a biomecânica do joelho fascinam os autores desde o início da ortopedia como especialidade.

Sharpey e Ellis⁵⁰ (1856) descrevem as fibras perfurantes que cruzavam tecidos e as partes moles para o osso em suas inserções.

Forward e Cowan¹⁵ (1963) estudam, experimentalmente, oito técnicas de suturas tendão–osso em coelhos, e observam um aumento na força de resistência com três semanas no tipo tendão-tendão. No entanto, com três meses, essas suturas foram equivalentes entre tendão-osso e tendão-tendão. Concluem que a cicatrização do tendão-osso comporta-se como a de uma fratura sem desvio. Em uma evolução de quatro semanas observam deposição de osso novo ao redor do tendão, e fibras de colágeno prendendo diretamente no osso comparáveis às fibras de Sharpey. Após três meses observam a perda de delimitação do túnel e, sem evidência de calo, mas com osso maduro ao redor do tendão.

Whiston e Walmsley⁵⁷ (1960) em um modelo extra-articular em 18 coelhos, inserem o tendão peroneiro em túnel ósseo e mostram a degeneração do tendão no 5º dia. No 28º dia, mostram a proliferação de tecido conectivo e fibroblasto na parede do túnel ósseo e gradativamente invadindo a periferia do enxerto tendinoso. No 38º dia, apresenta-se uma íntima conexão entre a parede do túnel ósseo e as bordas do enxerto tendinoso.

Noyes et al.⁴¹ (1974) avaliam as características biomecânicas do LCA em macacos. Um total de 17 espécimes com 34 joelhos foram submetidos aos testes. As peças foram submetidas a dois tipos de tração em máquina universal de testes: padrão de deformação rápida e lenta. O LCA apresenta, significativamente, maior absorção de energia ao padrão de deformação rápida.

Kennedy et al.²⁸ (1980) estudam o comportamento do tendão semitendíneo na reconstrução intra-articular do ligamento cruzado anterior em 65 coelhos da raça nova Zelândia, adultos e do sexo feminino, sendo metade com enxerto livre, e metade com enxerto mantida sua inserção tibial. Na vigésima sexta semana após a implantação do enxerto, a porção tendinosa mostra-se severamente degenerada; no exame de cintilografia

nuclear apresenta sempre maior fluxo que o semitendíneo normal. Quanto maior o fluxo, maior era a degeneração, que biomecanicamente, era de 40% a 50% da força de tensão do tendão semitendíneo original, e somente de 15% a 20% da força do LCA normal. Não há diferença mecânica entre os tendões livres e aqueles em que suas inserções foram mantidas.

Clancy et al.¹³ (1981) estudam a reconstrução dos ligamentos cruzados anterior e posterior do joelho em macacos Rhesus, sob o ponto de vista histológico, micro-angiográfico e biomecânico. A reconstrução com tendão patelar foi realizada em 29 macacos adultos machos, sendo 19 do ligamento cruzado anterior e 10 do ligamento cruzado posterior. Na reconstrução do LCA foi utilizado o terço médio do ligamento patelar, preservando sua inserção distal e, na reconstrução do ligamento cruzado posterior, foi utilizado o terço médio do ligamento patelar livre. Concluem que tanto o enxerto com a inserção tibial preservada quanto o enxerto livre são eficientes. A periferia do túnel femoral com oito semanas mostra uma intensa atividade reparadora de fibroblastos e osteoblastos, com formação de tecido osteóide e fibroso junto ao enxerto.

Arnoczky et al.³ (1982) estudam, em 36 cães adultos, a revascularização do enxerto do terço medial do tendão patelar

na reconstrução do ligamento cruzado anterior, preservando a inserção distal do tendão patelar e passando “over the top” sem penetrar no túnel ósseo do côndilo femoral lateral. Concluem que houve um processo de necrose isquêmica, revascularização, proliferação e remodelação. A revascularização ocorre a partir dos tecidos sinoviais, e a manutenção da inserção óssea do enxerto não contribui para o processo de revascularização, funcionando como um enxerto livre no pós-operatório, tanto que, na segunda semana de pós-operatório, não há evidência de perfusão dos vasos sanguíneos.

Noyes et al.⁴² (1984) estudam as propriedades biomecânicas dos enxertos mais usados para reconstrução do LCA em adultos jovens. Concluem que o semitendíneo e o grácil suportam carga de tração de somente 70% e 49% do LCA, respectivamente; no entanto, comentam que esses valores caem no período pós-operatório devido à necrose ocorrida no enxerto.

Amiel et al.¹ (1984) realizam estudo em coelhos e comparam os tendões e os ligamentos quanto à morfologia e bioquímica. Descrevem a viabilidade do enxerto, sugerindo que os ligamentos são mais ativos metabolicamente que os tendões com base nos achados histológicos. Os determinantes analisados na viabilidade do enxerto foram: o aumento no

número do núcleo comparado com o controle; o aumento na porcentagem do nucléolo e do núcleo ativo metabolicamente e a presença da neovascularização.

Amiel et al.² (1986) (1986) descrevem o processo de “ligamentização” do enxerto. Essa conclusão foi baseada na observação do enxerto do ligamento patelar em 37 coelhos machos da raça Nova Zelândia, sob mudanças bioquímicas e estruturais que tornam o tecido do enxerto mais parecido com o do LCA normal. Notam que o enxerto, em sua nova posição, funcionou mais como um guia do que um LCA normal que dirige a mobilidade do joelho. Enfatizam também a importância da sólida ancoragem para ocorrer o processo de “ligamentização”.

Mcfarland et al.³⁶ (1986) mostram definida e significativa diminuição no limite de força do enxerto do ligamento patelar, num período acima de 16 semanas após a reconstrução do LCA em 16 cães, sendo esse enxerto 40% do enxerto controle. Levando em conta tal estudo e o tamanho do enxerto do tendão patelar em humano, acreditam que a força em seres vivos seria menor que a descrita em estudo “in vitro” por Noyes et al.⁴² em 1984, e que o cirurgião deveria considerar a força do enxerto e suas alterações histológicas após a implantação.

Por outro lado, determinam que o processo biológico envolvia vascularização, refletindo a inflamação causada pela morte celular. A reorganização do enxerto deixava o tecido significativamente com menos força e maior volume de água. No quarto mês, a resposta vascular diminui, mas a força ainda não está recuperada. A vascularização não se relaciona muito bem com a força de tensão, e sim com outros fatores como a morfologia, bioquímica e biomecânica do enxerto implantado. Os autores incertos sobre a ocorrência “ligamentização” do enxerto determinam que, com 16 semanas, o enxerto difere de um LCA normal.

Kurosaka et al.³¹ (1987) comparam, com estudo biomecânico, seis tipos diferentes de enxertos tendinosos empregados na reconstrução do ligamento cruzado anterior. Foram utilizados nove espécimes nesse trabalho. Observam que o local de fixação foi o mais frágil imediatamente após a cirurgia. A competência do enxerto, imediatamente após a cirurgia, depende da técnica de fixação usada; entretanto, após três ou quatro meses, no local de fixação, apresenta-se uma sólida ancoragem.

Arnoczky et al.⁴ (1988) estudam a evolução do crescimento ósseo nas próteses ligamentares e a fixação biológica destas em

cães adultos. Constatam que havia um crescimento ósseo trabecular de alguns enxertos; enquanto, em outros, um crescimento de tecido fibroso ao redor.

Holden et al.²³ (1988) estudam as propriedades mecânicas da fâscia lata na reconstrução do LCA nos joelhos do lado direito de 50 cabras. Em metade, o enxerto foi fixado com dois grampos lisos em cada extremidade do enxerto, sendo esse tracionado, fixado com um grampo e, após a fixação, dobrado sobre o grampo e fixo com outro grampo. No segundo grupo, foi usada a mesma técnica com reforço de duas fitas suturadas de polipropileno no tecido e fixadas com arruelas pontilhadas. Essas foram medidas mecanicamente com zero, duas, quatro e oito semanas.

Observam que no grupo em que o enxerto foi fixado com grampo, a força máxima foi maior com oito semanas do que na semana zero, e o local da falência mudava do local da fixação para a substância do enxerto; e no grupo com reforço, a falha ocorre no local do reforço na semana zero, enquanto nos ensaios tardios, todas as falhas, exceto em um caso, ocorrem na substância do enxerto.

Ballock et al.⁵ (1989) estudam a histologia da porção articular do enxerto e a biomecânica da reconstrução do ligamento cruzado anterior com o tendão patelar em 29 coelhos da raça Nova Zelândia, utilizando o terço medial do ligamento patelar. Os enxertos foram testados zero, seis, 30 e 52 semanas do pós-operatório. A frouxidão ântero-posterior do joelho foi duas vezes maior no joelho reconstruído em relação ao controle. Com 30 semanas, os enxertos atingem um platô no gráfico biomecânico; e com 52 semanas, os aspectos histológicos foram semelhantes ao ligamento cruzado anterior original.

Shoemaker et al.⁵¹ (1989) estudam a fixação biológica do enxerto tendinoso autógeno e xenógeno (bovino) no túnel ósseo em cães, com e sem aplicação de selante de fibrina. Usando o tendão tibial anterior e posterior, avaliam a histologia com cinco, nove e 28 dias. Estes enxertos estavam sob leve tensão e eram extra-articulares. Os enxertos autógenos estavam envolvidos por tecido conectivo na quarta semana, criando uma união fibrosa. Há vascularização de todos os enxertos autógenos no vigésimo oitavo dia. Não há diferença entre os enxertos com e sem selante de fibrina.

Berg⁶ (1992) descreve um caso de pseudartrose do bloco ósseo tibial na revisão da reconstrução do ligamento cruzado

anterior com aloenxerto. Refere que o processo ocorrente entre o túnel ósseo e o enxerto não tem sido bem estabelecido, e que o aloenxerto ósseo, especialmente cortical, é um dos melhores osteocondutores, levando a uma integração mais lenta do enxerto. Refere também que, se o bloco ósseo não estiver perfeitamente encaixado no túnel, este pode ser envolvido pelo líquido sinovial articular que contém várias proteinases conhecidas por inibir os mecanismos de cicatrização fibrinogênica. Cita também a influência da broca na necrose óssea, inibindo a formação óssea.

Rodeo et al.⁴⁷ (1993) estudam a integração tendão-osso em 20 cães adultos, com peso de 20 a 30 quilogramas, ao realizar o transplante tendinoso do músculo extensor longo dos dedos para um túnel na metáfise proximal tibial. Nos períodos de duas, quatro e oito semanas, todos os espécimes falharam no teste de tração do tendão do túnel ósseo. Foi notado aumento progressivo e significativo da força da interface tendão-osso entre a segunda e a décima segunda semana após o transplante. Na 12^a semana observam na interface tendão-osso conexões osso-colágeno. Da décima segunda à vigésima sexta semana, todos os espécimes falharam no teste de tração na garra ou ruptura na substância do tendão. O progressivo aumento na força foi correlacionado com o grau de crescimento ósseo,

mineralização e maturação do tecido de cicatrização notado histologicamente. Desta forma, é recomendada a proteção até a oitava semana.

Mcfarland³⁷ (1993) determina que o fator mais importante para o sucesso ou falência de qualquer enxerto é a adequada colocação do enxerto para evitar uma sobrecarga de tensão e também não manipular o processo biológico.

Rezende et al.⁴⁶ (1994) estudam experimentalmente as propriedades mecânicas do ligamento cruzado anterior e do tendão semitendíneo em joelhos de cadáveres com testes biomecânicos em laboratório. Foram efetuados 13 ensaios de tração em máquina universal de testes para cada grupo, assim divididos: ligamento cruzado anterior, semitendíneo simples e semitendíneo duplo, mantidos inseridos na tíbia. Concluem que o ligamento cruzado anterior era mais rígido e resistente que o semitendíneo simples e duplo.

Steinner et al.⁵² (1994) estudam, de forma comparativa, as propriedades biomecânicas de tensão dos tendões flexores livres (semitendíneo e grácil) e do ligamento patelar na reconstrução do ligamento cruzado anterior em 18 pares de joelhos de cadáveres humanos, com média de idade de 69.5

anos. Os testes mecânicos foram realizados com translação da tíbia, anteriormente com 1mm/seg., mantendo o joelho com 20° de flexão. Concluem que a reconstrução com duplo semitendíneo e duplo grácil fixados com parafuso e arruela para partes moles foi a que apresentou maior resistência, sendo esta superior ao ligamento cruzado anterior (103%), e ao enxerto do ligamento patelar fixo com parafuso de interferência e parafuso com arruela (84%). Contudo é importante lembrar que a idade média dos espécimes era elevada. Por outro lado, a rigidez foi menor que a metade da rigidez do ligamento cruzado anterior; enquanto a rigidez do enxerto do ligamento patelar foi próxima à do ligamento cruzado anterior, e que a falha ocorreu usualmente do lado tibial.

Grana et al.¹⁹ (1994) estudam a interface tendão-osso no túnel femoral de auto-enxerto do tendão do músculo do semitendíneo na reconstrução do ligamento cruzado anterior em joelhos de coelhos, quanto aos aspectos biomecânicos e histológicos. Em seus ensaios mecânicos, na segunda semana, os enxertos foram arrancados do túnel femoral; testados nas semanas seguintes, falharam na porção intra-articular.

A força máxima suportada pelo enxerto em função do tempo pós-operatório de uma reconstrução do ligamento cruzado

anterior com tendão semitendíneo comparando com o ligamento cruzado anterior normal indicou que aquela diminuiu na terceira e quarta semanas e depois aumentou na nona e décima segunda semanas. Tal déficit do tecido reflete a revascularização e proliferação celular que ocorrem após o procedimento cirúrgico e precede a integração do tendão ao túnel ósseo. A força de resistência máxima foi maior na terceira semana após a cirurgia, e diminuiu até a oitava semana; a rigidez, ao contrário, aumentou com o tempo.

A fixação biológica ocorrida no túnel ósseo se dá pelo tecido conectivo que ancora o tendão no túnel. As fibras de colágeno têm aparência de fibras de “Sharpey” e são vistas nas inserções indiretas do tendão, as quais começam a aparecer precocemente a partir da terceira semana, promovendo a fixação do tendão.

Blickenstaff et al.⁹ (1997) estudam as alterações histológicas e biomecânicas na reconstrução do ligamento cruzado anterior com o tendão do músculo semitendíneo em 12 coelhos da raça nova Zelândia, operados bilateralmente. Os testes biomecânicos foram realizados com 12, 26, 39 e 52 semanas; todos os enxertos falharam em suas porções intra-articulares, mantendo as partes intra-túneis intactas.

Histologicamente, com 12 semanas, observam o osso trabecular com osteóide na junção da borda do túnel, bem organizada de tecido conectivo fibroso e fibras perpendiculares penetrando no osso. Concluem que, após um ano, o enxerto ainda apresentava diferenças biomecânicas de resistência quando comparado com o ligamento cruzado anterior e com o tendão normal, apesar de não ocorrer a solda dos túneis ósseos.

Woo et al.⁵⁸ (1997) descrevem que o local, no qual o enxerto tendinoso é fixado no osso, representa a área mais fraca, mecanicamente, nos períodos iniciais.

Pinczewski et al.⁴⁵ (1997) publicam os achados histológicos da interface enxerto-osso em dois espécimes de pacientes que foram operados com reconstrução do LCA com enxerto autógeno dos isquiotibiais e cirurgia de revisão após traumática ruptura na porção intra-articular de seis a dez semanas após a cirurgia. A revisão foi realizada após 12 e 15 semanas. Ficou demonstrado que as fibras de colágeno são semelhantes às fibras de Sharpey, e as fibras de colágeno encontradas na interface tendão–osso ocorrem nas cabras com 12 semanas.

Scranton et al.⁴⁸ (1998) estudam a reconstrução do LCA

com quádruplo semitendíneo e gracilis fixos com parafuso de titânio não cortante em carneiros. Observam que nos cortes histológicos com seis semanas, após a retirada do parafuso, ocorrem vários estágios de reparo no túnel femoral, com transição da fase inflamatória para a fase reparativa com intensa atividade biológica, e proeminentes fibras de Sharpey ancorando a resposta fibroproliferativa ao osso. Na interface foram visualizados condrificação, neo-ossificação e atividade osteoblástica. O período de 12 semanas, após a retirada do parafuso de interferência, mostrou uma fixação não inflamatória, sem evidência de soltura e com atividade osteoblástica e fibras de Sharpey adjacentes ao parafuso. Concluem que com 12 semanas o processo de ligamentização e revascularização estão incompletos.

O conhecimento do processo de cicatrização trouxe maior entendimento de como promover a melhor fixação do enxerto ao osso. Tal fato pode ajudar também na identificação dos métodos para melhorar a cicatrização biológica dos enxertos tendinosos.

Goradia et al.¹⁸ (2000) reportam um estudo histológico e biomecânico em coelhos com enxerto de semitendíneo. A integração biológica com oito semanas mostrava na interface tendão-osso a aparência de fibras de Sharpey e com 12

semanas as fibras de Sharpey foram vistas circunferencialmente. De 24 a 52 semanas, o túnel estava bem definido e sem alterações, sendo a incorporação similar nos túneis femoral e tibial. O enxerto rompeu-se na porção intra-articular com 24 e 48 semanas. Concluem que a integração ocorria em 24 semanas.

Pereira et al.⁴⁴ (2000) reconstruíram o ligamento cruzado anterior em coelhos com tendão do semitendíneo e observam a integração biomecânica do túnel femoral após quatro semanas, e do túnel tibial de forma uniforme após 12 semanas.

Papageorgiou et al.⁴³ (2001), analisam a histologia e a biomecânica da integração do ligamento patelar no túnel ósseo, com bloco ósseo no túnel femoral e tendão no túnel ósseo tibial na reconstrução do LCA em 18 cabras. Em quatro cabras analisam histologia e em 13 cabras a biomecânica. Na terceira semana todos os enxertos foram arrancados da tíbia, e na sexta semana cinco enxertos foram arrancados da tíbia e dois romperam na porção articular enxerto. A evolução histológica mostra progressiva e completa integração do bloco ósseo no túnel femoral, mas somente integração parcial do tendão no túnel ósseo tibial.

Na terceira semana a interface do túnel femoral com bloco ósseo do enxerto mostra osso necrótico no bloco ósseo com uma espessa camada de tecido de granulação e uma pequena quantidade de tecido fibroso. A presença de fragmentos de neoformação óssea na periferia do túnel é contrastada com seis semanas de evolução, mostrando uma completa integração do bloco ósseo patelar no osso esponjoso femoral.

O túnel ósseo tibial, na terceira semana mostra uma camada de tecido de granulação altamente celular com vascularidade e pequena quantidade de novas fibras colágeno, sem evidência de neoformação óssea. Na sexta semana mostra aumento da organização das fibras de colágeno e esparsa neoformação óssea na periferia do túnel e áreas distintas de fibras de colágeno em ângulo reto do osso esponjoso para o enxerto similar às fibras de Sharpey, sem demonstrar uma completa integração.

Referem que a diferença na biomecânica da terceira para a sexta semana pode ser resultado do processo de remodelação do enxerto e maturação da interface no túnel ósseo.

Berg et al.⁷ (2001) em estudo de coelhos, realizam túneis femoral e tibial intra-articular paralelos ao LCA sem o violar, e

seguem a evolução dos túneis. Observam que a ossificação ocorria mais precocemente nos terços mais distais à articulação, tanto que com quatro semanas estes terços mais distais dos túneis femoral e tibial estavam totalmente preenchidos com neoformação óssea; e com 12 semanas o terço médio de cada túnel também estava preenchido, mas o terço articular estava menos preenchido, apenas 69%. O líquido sinovial, em especial, o que está sob processo inflamatório, contém enzimas proteolíticas, citocinas e inibidores de fator de crescimento que interferem no mecanismo de cicatrização.

Yamakado et al.⁵⁹ (2002) estudam em coelhos a inserção do extensor longo dos dedos extra-articular em um túnel a 90° em relação ao longo eixo da tíbia. Concluem que as forças de tensão aumentam o processo de cicatrização na junção tendão–osso, que as forças de compressão promovem a formação condróide e que as forças de cisalhamento têm pouco ou nenhum efeito na interface tendão–osso.

Weiller et al.⁵⁶ (2002) referem que o processo de cicatrização tendão–osso se dá por uma interface fibrosa quando a fixação é fora ou longe do túnel ósseo. Realizam estudo em 35 carneiros com fixação dentro do túnel, isto é, anatômica, efetuando a reconstrução do LCA com uma tira do tendão de

Aquiles autógeno e fixa com parafuso de interferência absorvível poly-(D,L-lactide). Observam o desenvolvimento parcial de uma interface fibrosa entre o enxerto e o túnel ósseo em contraste a todos outros estudos com fixação não anatômica. O estudo histológico sugere, fortemente, que o parafuso de interferência é benéfico para a integração tendão–osso, desenvolvendo um tipo direto de fixação.

Kobayashi et al.²⁹ (2005) estudam o comportamento das células hospedeiras e as do enxerto durante o processo de cicatrização do tendão autólogo transplantado para um túnel ósseo com proteínas fluorescentes. Concluem que as células hospedeiras mesenquimais contribuem muito mais que as células do enxerto tendinoso na cicatrização da interface e remodelação do enxerto. Este estudo claramente demonstra a sobrevivência e invasão das células hospedeiras no enxerto.

Wang et al.⁵⁵ (2005) testam ondas de choque na integração do tendão no túnel ósseo tibial da reconstrução do LCA em 36 coelhos da raça Nova Zelândia. Aplicam 500 impulsos de ondas de choque em 14 KV nos joelhos direitos e os joelhos esquerdos ficam como grupo controle. Vinte e quatro coelhos são estudados histomorfologicamente com uma, duas, quatro, oito, doze e vinte e quatro semanas, e 12 coelhos são estudados a biomecanicamente com doze e vinte quatro semanas.

Nos coelhos com ondas de choque aumenta significativamente o trabeculado ósseo ao redor do tendão no túnel ósseo, promovendo maior contato do tendão com túnel ósseo, aumentando a força de tensão da interface com vinte e quatro semanas. Apesar dos benefícios das ondas de choque, alertam que dois terços dos enxertos foram arrancados do túnel tibial com vinte e quatro semanas. Concluem que ondas de choque significativamente melhoram a cicatrização da interface tendão-osso e que o efeito é dependente do tempo de aplicação.

Hunt et al.²⁵ (2006) são os primeiros a descrever um estudo animal de um longo período de seguimento, dois anos, com fixação anatômica do tendão na reconstrução com parafuso absorvível em seia carneiros, e depois realizado exame de ressonância magnética e cortes histológicos axial ao túnel tibial e femoral. Em dois casos o enxerto dentro do túnel perde a estrutura de tendão e em dois casos mostra uma espessa camada óssea junto ao tendão.

No túnel tibial a zona de transição consiste de fibrocartilagem e cartilagem mineralizada que se mostra como uma linha azul entre a fibrocartilagem e o osso. Os parafusos absorvíveis foram absorvidos em todos os espécimes. Em 50% dos túneis tibiais estavam parcialmente visíveis, e nos outros

50% totalmente visíveis. Descrevem uma distinta zona de transição fibrocartilagem e cartilagem mineralizada envolta com osso maduro, e uma morfologia do enxerto solta e não estruturada.

Weiler et al.⁵⁶ relatam em outro estudo que a fixação à distância resulta em uma interface fibrosa. Concluem que a fixação do enxerto no túnel acelera a integração do enxerto e o preenchimento ósseo do túnel. Não comparam com a RM.

Técnicas Cirúrgicas

Diversas técnicas cirúrgicas foram propostas para a substituição do ligamento cruzado anterior baseadas nesses estudos.

Hey Groves^{21,22} (1917 e 1920) descreve a função do ligamento cruzado anterior e sua ruptura, e pela primeira vez, a técnica de reconstrução do ligamento cruzado anterior utilizando “o trato iliotibial” intra-articular. É também o primeiro a relatar a reconstrução do ligamento cruzado posterior, usando os tendões do músculo semitendíneo e gracilis.

Jones²⁷ (1963) descreve a técnica cirúrgica de

reconstrução do ligamento cruzado anterior intra-articular, usando o terço central do tendão patelar com bloco ósseo retirado da patela, passando-o por um túnel anterior ao intercôndilo e mantendo a inserção distal do tendão patelar na tíbia. Apresenta um seguimento de 11 pacientes com média de idade de 19 anos, por 121 semanas.

Cho¹² (1975) descreve a técnica de reconstrução do ligamento cruzado anterior com tendão do semitendíneo. O tendão do semitendíneo foi liberado de sua porção miotendinosa, mantido em sua inserção tibial, passado através de túneis tibial e femoral e depois suturado sob tensão no trato iliotibial.

Lipscomb et al.³² (1981) descrevem a técnica cirúrgica para reconstrução do ligamento cruzado anterior intra-articular com tendão do semitendíneo e grácil, mantidas suas inserções tibial juntamente com sua bainha sinovial, colocados em túneis tibial e femoral de oito mm de diâmetro e amarrados sob tensão moderada com 75° de flexão do joelho. Esta técnica foi utilizada em casos agudos ou crônicos de 342 pacientes. Aos joelhos que apresentaram instabilidade rotatória foram associadas técnicas extra-articulares. Depois de um seguimento médio de 22 meses do pós-operatório, registram 84% de bons resultados.

Zaricznyj⁶⁰ (1983) estuda uma modificação na técnica cirúrgica de reconstrução do ligamento cruzado anterior. Utiliza, em cinco pacientes, o tendão extensor do quinto dedo, e em 22 pacientes, o tendão semitendíneo livre, totalizando 27 casos com seguimento médio de 5,4 anos. Observa que os enxertos não afrouxam com o tempo se as estruturas de apoio do joelho forem preservadas ou reparadas cirurgicamente. Os resultados clínicos não estão relacionados com a origem do enxerto empregado, nem com a preservação de inserção óssea, segundo suas conclusões.

Mott³⁹ (1983) descreve uma técnica de reconstrução anatômica com semitendíneo duplo do ligamento cruzado anterior colocado com duplo túnel na tíbia, sendo um para a banda anteromedial e outro para a posteromedial e um túnel no fêmur. Refere-se à vantagem de ter uma fixação segura que permite imediata mobilidade articular.

Gomes e Marczyk^{17,33} (1984) apresentam a técnica de reconstrução do ligamento cruzado anterior com o tendão do músculo semitendíneo, liberando-o na porção miotendinosa, preservando sua fáscia para garantir o comprimento e liberando-o de sua inserção da tíbia. Ao ficar livre, dobrando sobre si, torna-se duplo.

Krackow et al.³⁰ (1986) descrevem um novo tipo de sutura para a ancoragem de tendões, ligamento ou estruturas capsulares. Um único ponto desse tipo, testado em laboratório, oferece resistência superior a quatro pontos simples em relação à resistência tecidual.

Marder et al.³⁴ (1991) estudam, prospectivamente, a reconstrução do LCA por via artroscópica em 80 pacientes com instabilidade anterior do joelho, de forma alternada com duplo semitendíneo e duplo grácil ou osso-ligamento patelar-osso fixados no fêmur e na tíbia com parafuso e arruela lisa. No acompanhamento de pelo menos 24 meses (24 a 40) de 72 pacientes, não foi notada diferença significativa em relação ao nível funcional, às queixas do paciente ou em relação à evolução objetiva com o KT 1000.

Cross et al.¹⁴ (1992) observam 225 casos que haviam sido submetidos à reconstrução do ligamento cruzado anterior, utilizando auto-enxerto do semitendíneo e grácil, a formação de uma banda fibrosa que parecia a regeneração dos músculos semitendíneo e grácil. Em quatro casos foram realizados: exame físico do joelho e musculatura, teste de força, eletroneuromiografia dos isquiotibiais durante a flexão do joelho contra resistência e ressonância magnética após seis meses de

coleta do enxerto, sugerindo a regeneração dos músculos semitendíneo e grácil.

Camanho e Olivi¹¹ (1994) descrevem uma técnica de reconstrução do LCA com enxerto do tendão do músculo semitendíneo dobrado de forma tripla e fixado com “endobotton” no fêmur. Esta técnica traz a vantagem de utilizar todo o tecido tendinoso intra-túneis e não desperdiçá-lo em fixação extra-túneis ósseos.

Freedman et al.¹⁶ (2003) fazem estudo de meta análise comparando pacientes operados de reconstrução do LCA com tendão patelar e tendões flexores. O grupo do tendão patelar foi de 1348 pacientes em 21 estudos e 628 pacientes do grupo de tendões flexores em 13 estudos. A escala de falha do tendão patelar foi significativamente menor (TP 1.9% versus TF 4.9%) e uma proporção significativamente maior de pacientes com diferença lado a lado de menos que 3mm no teste com artrômetro do que no grupo dos flexores (TP 79% versus TF 73.8%). Os autores concluem que a reconstrução com tendão patelar apresenta uma escala de falha significativamente menor, e resulta em melhor estabilidade estática e aumenta o índice de satisfação comparado com tendões flexores. Entretanto apresentam uma escala maior de dor anterior do joelho.

Biau et al.⁸ (2006) defendem que o trabalho de Freedman et al.¹⁶ que apresenta evidência maior de falência no grupo dos joelhos operados com tendões flexores é falha, e que a reconstrução com os tendões flexores apresenta menor morbidade.

Seguramente, muitos estudos estão sendo realizados de forma que esta breve revisão apenas procura situar historicamente a conduta na reconstrução do LCA.

Ressonância Magnética do Túnel Femoral

Ao lado das diferentes técnicas cirúrgicas há a necessidade de avaliar seus resultados. O exame físico é imprescindível, e os exames radiológicos auxiliam a visualização do posicionamento dos túneis e dos materiais de fixação do enxerto no fêmur e na tíbia, mas estes não conseguem mostrar o ligamento que é tecido de partes moles. A evolução tecnológica trouxe novos métodos de imagem e a ressonância magnética se destaca pela qualidade das imagens e a capacidade de mostrar todo o ligamento, assim como o enxerto da reconstrução ligamentar.

Howell et al.²⁴ (1991) em estudo prospectivo, referem que a alteração do sinal de um LCA lesado nas imagens obtidas na RM é resultado do aumento de água, representado edema e hemorragia, somente visto na imagem de RM.

Nesse estudo verificam que a alteração do sinal foi regionalizada, a porção proximal e intra-ósseo foram mantidas sem alterações do sinal, e em 6 meses e nas porções do 1/3 médio e distal do enxerto intra-articular houve um aumento do sinal, e este somente ocorreu após liberar a extensão completa do joelho. Os autores especulam sobre a possibilidade de “*impingment*” do enxerto.

O aumento de sinal na RM está relacionado com a concentração de água e no caso do enxerto segundo Mcfarland³⁶ este é um marcador de mudanças de força do enxerto. Concluem que um estudo animal seja requerido para correlacionar mudança de sinal na RM e sua correlação clínica.

Maywood et al.³⁵ (1993) verificam se as lesões das fibras do LCA eram parciais ou totais, e em T2 observam alteração do sinal. Determinam que as imagens ponderadas em T2 são úteis para determinar a integridade e diferenciar as lesões parciais e

totais do enxerto do LCA. Sugerem a utilização de aparelhos de 1,0 e 1,5 tesla.

Murakami et al.⁴⁰ (1999) estudam 108 joelhos de 75 pacientes no pós - operatório de reconstrução do LCA com tendão duplo do semitendíneo e, ou do gracilis autólogos no túnel tibial. Observam com um mês de evolução, baixo sinal do enxerto com áreas ao redor com alto sinal no túnel ósseo, alguns casos mostravam baixo sinal posteriormente e alto sinal anteriormente dentro do túnel ósseo. Entre oito e doze semanas, os 16 casos avaliados nesse período mostraram uma área em forma de duplo anel, um mais periférico e junto ao osso do túnel de sinal de baixa intensidade, e o outro mais próximo ao enxerto de sinal de alta intensidade. Com o decorrer do tempo o anel mais periférico de sinal de baixa intensidade aumentava gradativamente e todo o enxerto e o conteúdo do túnel tornavam-se de baixa intensidade após seis meses de cirurgia. Concluem que a maturação da interface tendão osso se completa de seis a 12 meses.

Jansson et al.²⁶ (2001) estudam dois grupos com sucesso no reparo da lesão do LCA com tendão patelar (n=10) e com enxerto do STG (n=10) autólogos. Foram feitas RM com 1.5 T nos planos sagital e oblíquo coronal em densidade de próton, ponderadas em T2, seqüências sagital STIR, e seqüências

simples e contraste ponderado em T1. A aparência do enxerto e tecidos ao redor foi evoluída. O enxerto do LCA mostrou-se homogêneo em todos os casos. A região peri-ligamentar nas imagens de ponderadas em T2 mostraram sinal de baixa intensidade com listras de sinal intermediário.

O próprio enxerto não mostrou aumento de sinal em nenhum dos grupos, mas suave para moderado aumento peri-ligamentar foi observado em dez casos. As imagens obtidas nas ponderações em T1 adicionam características anatômicas e morfológicas, e o uso do contraste gadolinium –DTPA confirmaram que o tecido periligamentar com sinal de alta intensidade era vascular e compatível com o tecido de granulação e ou colágeno imaturo. Estes tecidos periligamentares com aumento de contraste são tipicamente encontrados na RM, após o sucesso clínico da reconstrução do LCA. Concluem que a aparência do enxerto na RM é variável nas imagens de densidade de próton e ponderadas em T1.

Uchio et al.⁵³ (2003) estudam a integração biológica no túnel femoral de 64 pacientes com artrômetro KT 2000, segunda artroscopia e ressonância magnética nos períodos de 1, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses pós-operatório, e determinam o período de evolução em que o sinal da interface tendão-osso muda de alto

sinal para baixo sinal em T2. Os autores levantam a hipótese de que quando ocorre a mudança para baixo sinal é por haver depósito de osso trabecular ao longo do túnel.

O fato de áreas de sinal de alta intensidade mudarem para sinal de baixa intensidade indica que o tecido de granulação ao redor do enxerto amadureceram em fibras de colágeno parecidas com as fibras de Sharpey, as quais conectam o enxerto ao osso.

O sinal de alta intensidade que ocorre ao redor do enxerto logo após a reconstrução ligamentar deve significar que o enxerto do tendão do semitendíneo deve estar coberto com tecido de partes moles, inclusive líquido sinovial. Se o sinal de alta intensidade mudar para baixa intensidade, deve significar a ocorrência da fixação biológica.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Neste estudo foram utilizados 17 coelhos machos e adultos da raça Nova Zelândia. Foram avaliados por um médico veterinário para descartar qualquer doença prévia, sendo que dois coelhos foram usados para padronizar o experimento desde a técnica anestésica e cirúrgica até a ressonância magnética(RM), biomecânica e histologia. Os 15 coelhos foram divididos em três grupos, de acordo com o período de evolução pós-operatório, portanto cinco coelhos no grupo I que corresponde a quatro semanas, cinco coelhos no grupo II com oito semanas, e cinco coelhos no grupo III que corresponde a doze semanas.

Esses coelhos estão relacionados no quadro 1 de inclusão e identificação da utilização dos animais. A razão do grupo II iniciar com coelho de número 1, é que foi inicialmente programado serem feitos apenas dois grupos, um de oito semanas e outro de doze semanas, mas devido aos resultados biomecânicos, realizamos um novo grupo com quatro semanas e para manter a numeração seqüencial da ressonância magnética, mantivemos esta ordem.

Quadro 1 - Relação dos coelhos segundo o peso e forma que foram utilizados no experimento-destino. Os Coelhos do grupo I (11,12,13,14,15) são coelhos de 4 semanas, Coelhos II (1,2,3,4,5) são os coelhos que fazem parte do grupo II que corresponde á 8 semanas e os coelhos III (6,7,8,9,10) são coelhos de 12 semanas. Incluído e excluído: significa coelhos incluídos ou não no estudo da coluna correspondente.

Grupo	Coelho	Semanas	peso(Kg)	R M	Biomecânica	Histologia
I	11	4	3,1	Incluído	Excluído	Incluído
I	12	4	3,0	Excluído	Incluído	Excluído
I	13	4	2,9	Incluído	Excluído	Incluído
I	14	4	3,2	Incluído	Incluído	Excluído
I	15	4	3,2	Excluído	Incluído	Excluído
II	1	8	3,1	Excluído	Incluído	Excluído
II	2	8	2,9	Incluído	Incluído	Incluído
II	3	8	3,5	Incluído	Excluído	Incluído
II	4	8	3	Incluído	Excluído	Incluído
II	5	8	3,3	Incluído	Incluído	Excluído
III	6	12	2,9	Excluído	Excluído	Incluído
III	7	12	3,1	Incluído	Incluído	Incluído
III	8	12	2,8	Incluído	Excluído	Incluído
III	9	12	3,3	Incluído	Incluído	Incluído
III	10	12	3,3	Incluído	Incluído	Incluído

Todos os coelhos foram submetidos à anestesia para realização do procedimento cirúrgico e ao exame de ressonância magnética.

No procedimento cirúrgico foi coletado o tendão do músculo semitendíneo que foi inserido no local do LCA em túneis ósseos feitos no fêmur e na tíbia, como descreveremos a seguir.

Técnica Anestésica

Os coelhos foram anestesiados por um médico veterinário que fez a indução anestésica com acepromazina 1,0 % i.m. na dose de 2mg / kg de peso. Uma vez realizada a indução anestésica, já com o coelho sedado, foi puncionada a veia auricular lateral com “butterfly”. Nesta, foi instalado soro fisiológico por meio de um equipo, para manter a veia e a administração de drogas.

As drogas usadas para a anestesia geral endovenosa foram o cloridrato de tiletamina 125 mg e cloridrato de zolazepam 125 mg na proporção de 1/1 na dose de 10 mg / kg de peso¹⁰. No decorrer do procedimento cirúrgico foram complementados tais anestésicos enquanto havia a superficialização do plano anestésico cirúrgico. O sulfato de atropina foi usado conforme a necessidade em relação à frequência cardíaca do coelho, monitorada por estetoscópio.²⁰ Durante a anestesia, a ventilação foi mantida espontânea com fluxo adicional de oxigênio através de máscara.

Antibióticoterapia

A antibióticoterapia profilática foi realizada com cefalexina na dose de 30 mg / kg i.m. na indução anestésica e repetida seis horas após a primeira dose.

Foi realizada tricotomia no membro inferior de cada coelho e, após, lavados por 10 minutos com polivinilpolirolidona a 10% de iodo degermante, foram colocados campos estéreis, e pintados com álcool iodado. (Figura 1)

Figura 1. Membro inferior esquerdo após a tricotomia, assepsia, anti-sepsia e campos estéreis

No joelho esquerdo foi realizada a reconstrução do ligamento cruzado anterior com tendão do semitendíneo.

Técnica Cirúrgica

O ato cirúrgico constou de incisão de 3 a 4 cm parapatelar lateral do joelho, dissecado por planos e identificado o tendão do semitendíneo pela via medial sob musculatura adutora, seccionado na junção miotendinosa proximal, e em sua inserção tibial, tendo aproximadamente 3 cm de comprimento de tendão livre.(Figura 2)

Figura 2. Identificado tendão do músculo semitendíneo

As extremidades do tendão foram suturadas com três pontos de Krackow et al.³⁰ de cada lado, com “mono – nylon” 3-0, deixando aproximadamente 10 cm de fio duplo de cada lado, para facilitar a passagem pelos túneis e ancoragem futura. (Figura 3)

Figura 3. Tendão do músculo isolado com 3 pontos de krakow em cada extremidade.

Por meio de uma artrotomia lateral e luxando a patela medialmente, parte da bola de gordura foi ressecada para melhor visualização do ligamento cruzado anterior, sendo este ressecado em seguida. (Figura 4)

Figura 4. Joelho com artrotomia mostrando com LCA integro (A) e sem LCA. (B)

Com o uso de uma broca de 2.3 mm em perfurador, com velocidade controlável, foi realizado um túnel tibial com baixa velocidade de rotação, mantendo o joelho em hiperflexão, de lateral para medial e de proximal para distal, iniciando na

espinha tibial anterior, na inserção do ligamento cruzado anterior, de forma que a broca saísse na metáfise ântero-medial da tíbia. Na mesma direção, em sentido oposto, foi realizado outro túnel no côndilo lateral do fêmur, através da porção súpero-lateral do intercôndilo, na origem do LCA, saindo na metáfise distal ântero-lateral do fêmur.(Figuras 5 e 6)

Figura 5. Realização do túnel tibial

Figura 6. Realização do túnel femoral

As extremidades do fio de sutura foram passadas por dentro de uma agulha 40 x 12 *BD Precison Glide*[®], que foi usada

como um passador de sutura através dos túneis tibial e femoral. Desta forma, foi puxado o tendão para dentro dos respectivos túneis e suturando-os no periósteo femoral e tibial sob tensão.

A patela foi reduzida, e a artrotomia, tecido subcutâneo e pele suturados. O curativo compressivo com gaze, atadura crepe e esparadrapo foi realizado.

Após a recuperação anestésica e cirúrgica, foram colocados em gaiolas individuais e mantidos sob supervisão do médico veterinário.

Ressonância Magnética

Todos os coelhos selecionados foram sedados e anestesiados novamente conforme a técnica descrita anteriormente, para a realização do exame de ressonância magnética. Um suporte de madeira foi desenvolvido para o posicionamento e imobilização dos coelhos durante o exame, que foi realizado utilizando uma bobina de superfície em um aparelho de alto campo de 1,5 tesla, após a uma seqüência localizadora, novas seqüências de imagens no plano axial ao enxerto foram obtidas “fast spin echo” ponderadas em T1, T2. Foram adquiridos quatro cortes consecutivos nos planos sagital

e transversal à orientação do túnel femoral, com 3,0mm de espessura de corte e 0,0mm de espaçamento entre os cortes e campo de visão (FOV) de 10 x 10cm., selecionando-se o melhor corte para a avaliação.

Foi aplicado o contraste paramagnético gadolínio por via intra-venosa em cada coelho para uma nova seqüência de imagens ponderadas em T1 com supressão de gordura. Foram obtidas imagens do joelho operado, com cortes transversais e longitudinais à unidade “tendão-osso”, procurando determinar a morfologia, o sinal e o realce após injeção de contraste. Em cada imagem foi avaliado o enxerto, o circundado que corresponde à área ao redor do enxerto e a medular óssea adjacente. Os exames de ressonância magnética foram avaliados por dois radiologistas, sem um ver o laudo do outro, e após revisto por ambos.

Ao término do exame, os coelhos foram levados vivos ao Laboratório de Biomecânica LIM-41, onde foram eutanasiados.

Técnica de Eutanásia

A eutanásia foi realizada ministrando por via endovenosa em “bolus” 500mg de thiopental por quilograma de peso.

Nas respectivas semanas de evolução, e após a eutanásia, o membro inferior esquerdo de cada coelho foi desarticulado e acondicionado em sacos plásticos, retirado o ar e congelado a -20°C para a avaliação biomecânica e histológica.

No grupo I - cinco coelhos foram eutanasiados, completado um período de quatro semanas após a cirurgia. Destes dois foram designados para a histologia e três coelhos foram submetidos ao ensaio mecânico.

No grupo II - cinco coelhos foram eutanasiados depois um período de oito semanas após a cirurgia, três coelhos foram para a histologia e três coelhos foram submetidos ao ensaio mecânico.

No grupo III - cinco coelhos que foram eutanasiados após um período de 12 semanas da cirurgia. Os coelhos 7, 9 e 10 foram incluídos no ensaio mecânico e todos os coelhos foram submetidos ao estudo histológico.

No dia do ensaio mecânico, o membro inferior esquerdo de cada coelho foi descongelado, as peças imersas em soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,9%) a 37°C e em temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram dissecadas, ressecando-

se músculos, tendões, cápsula, ligamentos e meniscos, deixando-se apenas o fêmur, o ligamento reconstruído e a tíbia para a avaliação biomecânica. (Figura 7)

Figura 7. Fêmur, ligamento cruzado anterior reconstruído e tíbia, dissecados.

Biomecânica

A avaliação biomecânica foi realizada na máquina de ensaios mecânicos “KRATOS” modelo 5002 com célula de carga de 100 kgf. Foram usados dois dispositivos mecânicos (garras) para a fixação das peças anatômicas, de forma que o fêmur fosse fixado no dispositivo superior e a tíbia no dispositivo inferior. O dispositivo superior foi preso a uma junta universal, fixada esta a uma célula de carga, e a tíbia no dispositivo inferior, sendo este preso à máquina usando o torno da bancada ajustável, colocado a 125° , para que a tração do enxerto fosse ao longo do eixo do ligamento reconstruído. (Figura 8 e 9)

A velocidade de tração foi de 20mm /minuto. O sistema foi ajustado até o início da carga registrado no gráfico, para então se iniciar o teste de tração.

Figura 8. A e B - Máquina de ensaios mecânicos “ KRATOS ” modelo 5002.
C-Dispositivo para fixação das peças anatômicas à máquina de ensaios

Figura 9. Sequência seriada de fotos do ensaio mecânico

Um registrador gráfico, modelo SERVGOR 790 BBC GOERS METRAWATT em papel milimetrado, foi usado para o registro dos valores no experimento, obtendo o diagrama carga / deformação, para então avaliar o limite de ruptura, limite de elasticidade e o limite de rigidez da unidade túnel femoral-enxerto-túnel tibial. Quando a falha ocorria no túnel tibial ou no túnel femoral o ensaio mecânico era repetido, mantendo o fêmur ou a tíbia fixada no dispositivo superior e o enxerto tendinoso, fixado em uma garra apropriada para tendão.

Histologia

Para a avaliação histológica, as peças foram dissecadas imediatamente após a eutanásia, ressecando-se as partes moles, meniscos, músculos e tecido conectivo, deixando apenas o LCA reconstruído e o terço distal do fêmur, e fixadas com formalina a 10%.

As peças foram descalcificadas em uma primeira etapa, para após se efetuarem os cortes, utilizando um plano perpendicular ao enxerto em cortes seriados distando aproximadamente 0,5cm entre eles. Cada espécie forneceu três ou quatro sub-espécimes que foram numeradas seqüencialmente a partir do retirado mais próximo da cartilagem, como A, B, C, D

nesta ordem, e novamente descalcificados. As descalcificações foram efetuadas dentro de técnicas preconizadas, com a utilização do EDTA. Os sub-espécimes foram submetidos a processo de tratamento histológico clássico, com inclusão em parafina e realização de cortes no micrótomo com espessura de 5 a 6 micras. Os cortes foram corados pelas técnicas de hematoxilina - eosina e pelo tricômio de Masson.¹⁴ Foram realizados, em média, quatro cortes por sub-espécime, e sob microscopia óptica avaliados em zonas divididas em quadrantes. Após análise de todos os sub-espécimes foi padronizado para comparação com as imagens de RM o sub-espécime que melhor era visualizado na ressonância magnética, sendo na maioria o sub-espécime “B”, e foram analisados o enxerto, o circundado e o osso adjacente da mesma maneira que a avaliação da RM. A integração e a maturação foram avaliadas em ausente, leve, moderada e acentuada. As lâminas foram avaliadas por dois patologistas e a seguir revisadas por ambos (Figura 10).

Figura 10 - Cortes seriados axial ao túnel femoral

Analizamos histologicamente os coelhos de número 2, 7, 9 e 10 em que o enxerto estava presente no fêmur após o teste de tração e comparamos com os que não foram tracionados.

Análise Estatística

Para a análise dos dados enumerativos (atributos), realizou-se a distribuição de frequência, absoluta (n) e relativa (%), das características nominais (qualitativas).

As frequências da ocorrência de cada atributo (qualidade) foram apresentadas em tabelas de contingência de acordo com a região analisada; tendão (enxerto), interface e osso (medula) (Tabelas 1 e 2) e com o período de evolução pós-operatório; quatro, oito e 12 semanas (Tabelas de 1 a 6).

As frequências da ocorrência de tecido de granulação / edema ou de sangue extra-vascular na interface tendão-osso (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve, moderado + acentuado) do tecido ósseo na interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos (Tabela 7) e da ocorrência da vascularização (realce) na interface tendão-osso (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve,

moderado + acentuado) do tecido ósseo da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos (Tabela 8), também, foram apresentadas em tabelas de contingência.

As proporções (%) foram representadas em diagramas de empilhamento de atributos em colunas de 100% (Gráficos de 1 a 6).

Nas comparações das frequências das classes entre os grupos (amostras) utilizou-se o teste exato de Fisher para tabelas de contingência (Tabelas de 1 a 6).

Nas comparações da ocorrência de tecido de granulação / edema ou de sangue extra-vascular na interface tendão-osso (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve, moderado + acentuado) do tecido ósseo na interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos (Tabela 7) e da ocorrência da vascularização (realce) na interface tendão-osso (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve, moderado + acentuado) do tecido ósseo da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise

anatomopatológica) dos coelhos (Tabela 8) utilizou-se a prova de Qui-Quadrado com correção de continuidade de Yates.

Utilizou-se o arredondamento científico. Os valores das frequências (%) foram apresentados com uma casa após a vírgula nas tabelas de contingência e as estatísticas e os resultados dos testes com até duas casas após a vírgula ou até o primeiro número significativo.

Adotou-se o nível de confiança de 5% ($\alpha = 0,05$).

Adotaram-se testes bilaterais ou bicaudais ($H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$).

As diferenças comprovadas estatisticamente foram evidenciadas por asteriscos (*) nas tabelas.

Utilizou-se o programa estatístico StatSoft, Inc.® (2001) Statistica (data analysis software system), versão 6.0.

5 RESULTADO

5 RESULTADOS

Ressonância Magnética

A interface tendão–osso descrita na ressonância magnética como circundado (Anexo-I) mostrou um alto sinal nas seqüências de imagens ponderadas em T2 em todos os coelhos com quatro, oito e 12 semanas, o que significa presença de líquido ou edema. Nas imagens obtidas após contraste em T1 com supressão de gordura do circundado foi observado realce em todos os coelhos, exceto nos coelhos 8 e 9 que são coelhos do grupo com 12 semanas, e este realce representa vascularização da interface tendão osso. A presença de duplo anel que contrasta alto sinal ao redor do enxerto e baixo sinal no segundo anel, entre o primeiro anel e o osso circunjacente do túnel em T2, é visualizado em um coelho de oito semanas e um coelho de 12 semanas. O quadro 2 mostra os aspectos da ressonância magnética.

TÚNEL FEMORAL									
ASPECTOS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA									
Grupo / Coelho	Enxerto			Circundado = interface			Medular Adjacente		
	T1	T2	Realce	T1	T2	Realce	T1	T2	Realce
I 11	B	b	(+)	b h	a	(+)	b h	a	(+)
I 12	Nv	nv	nv	Nv	nv	nv	nv	nv	nv
I 13	B	b	(+)	b h	a	(+)	b h	a	(+)
I 14	B	b	(-)	B	a	(+)	b	a	(+)
I 15	Nv	nv	nv	Nv	nv	nv	nv	nv	nv
II 1	Nv	nv	nv	Nv	nv	Nv	nv	nv	nv
II 2	B	b	(+)	B	a	(+)	b	a	(+)
II 3	B	b	(-)	B	a	H	a	a	focos+
II 4	B	b	(+)	A	a h	(+)	a	a h	(+)
II 5	Nv	nv	nv	Nv	nv	Nv	b	a	(-)
III 6	B	b	(+)	A	a	(+)	a	a	(+)
III 7	B	b	(+)p	A	a	(+)p	a	a	(+)p
III 8	B	b	(-)	b	a	(-)	b	a	(-)
III 9	B	b	(-)	A	a	(-)	a	a	(-)
III 10	B	b	(+) perif.	B	a	(+)	b	a	(+)

Quadro 2. b = baixo, a = alto, h = heterogêneo, nv = não visualizado, p = provável, foco+ = pontos de hipersinal, perif = periferia, (+) = presença de realce, (-) = ausência de realce

Biomecânica

Na quarta semana (GRUPO I) –três joelhos foram submetidos à tração, ocorrendo: um enxerto rompeu-se na porção tendinosa intra-articular (coelho 12); dois enxertos foram arrancados dos túneis tibiais coelhos (coelhos 14,15). Montamos novamente o sistema para verificar qual seria o comportamento dos enxertos em relação ao túnel femoral e a falha ocorreu na porção tendinosa intra-articular dos dois enxertos. Nenhum enxerto falhou no fêmur.

Na oitava semana (GRUPO II) – três joelhos. Todos os enxertos autólogos do semitendíneo sob tração romperam em sua substância na porção intra-articular (coelhos 1,2,5), exceto em um joelho em que o enxerto do semitendíneo foi arrancado da tíbia. Nesse caso, repetimos a tração e o enxerto rompeu-se na porção intra-articular como no grupo I.

Na décima segunda semana (GRUPO III)-três joelhos. Nenhum enxerto foi arrancado da tíbia ou do fêmur; todos romperam na porção tendinosa intra-articular (coelho 7,9 e 10).

Histologia

O exame histológico (anexo II) revelou aspecto semelhante em todas as amostras. Salientamos, ainda, que não existe um caráter homogêneo no mesmo corte, isto é, em um quadrante existe aspectos histológicos que não são vistos em outros quadrantes do mesmo enxerto, independente do tempo de evolução. Encontramos áreas de integração do enxerto no tecido ósseo circunjacente, com infiltração de células ósseas no tecido fibroso peri-tendão e com matriz. Ao lado destas, no mesmo caso observamos áreas de presença de pequena interface entre o enxerto e o osso, com pequenos capilares, tecido conjuntivo neoformado e fibras de colágeno oblíquas do tipo de fibras de

Sharpey. Em raras áreas existiam ainda pequenos focos de infiltrado mononuclear. A interface tendão - osso histologicamente não é homogênea. Verificamos, ainda a progressão da celularidade e da neoformação de tecido ósseo, cartilagem e fibrose das lâminas dos coelhos da quarta semana para a décima segunda semana, mantendo a não homogeneidade nos quadrantes.

TABELA 1 Distribuição de freqüência, absoluta (n) e relativa (%), da análise topográfica da intensidade do sinal da ressonância magnética, (+) alta e (-) baixa, na ponderação t1, segundo a região analisada e o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas). Comparação pelo Teste Exato de Fisher ($\alpha=0,05$)

PERÍODO DE EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO (SEMANA)		RESSONÂNCIA MAGNÉTICA – PONDERAÇÃO T1					
		Tendão				Osso	
		(Enxerto)		Interface		(Medula)	
		n	%	N	%	N	%
4	(+)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	(-)	3	100,0	3	100,0	3	100,0
TOTAL		3	100,0	3	100,0	3	100,0
8	(+)	0	0,0	1	33,3	2	66,7
	(-)	3	100,0	2	66,7	1	33,3
TOTAL		3	100,0	3	100,0	3	100,0
12	(+)	0	0,0	3	60,0	3	60,0
	(-)	5	100,0	2	40,0	2	40,0
TOTAL		5	100,0	5	100,0	5	100,0

Tendão (Enxerto)

Teste Exato de Fisher	de	4« 8	4« 12	8« 12
(+)		0	0	0
(-)		3	3	5
		p=1,00	p=1,00	P=1,00

Interface

Teste Exato de Fisher	de	4« 8	4« 12	8« 12
------------------------------	-----------	-------------	--------------	--------------

(+)	0	1	0	3	1	3
(-)	3	2	3	2	2	2
	<i>p=1,00</i>		<i>p=0,20</i>		<i>P=1,00</i>	

Osso (Medula)

Teste Fisher	Exato de	4« 8		4« 12		8« 12	
	(+)	0	2	0	3	2	3
	(-)	3	1	3	2	1	2
		<i>p=1,00</i>		<i>p=0,20</i>		<i>P=1,00</i>	

4 Semanas

Teste Fisher	Exato de	Tendência« Interface	Tendência« Osso	Interface« Osso
(+)	0	0	0	0
(-)	3	3	3	3
	p=1,00		P=1,00	

8 Semanas

Teste Fisher	Exato de	Tendão« Inter face	Tendão« Osso	Interface« Osso
(+)	0	1	0	2
(-)	3	2	3	1
	p=1,00		p=0,40	
			P=0,40	

12 Semanas

<i>Teste Fisher</i>	<i>Exato de</i>	<i>Tendão« Inter face</i>	<i>Tendão« Osso</i>	<i>Interface« Osso</i>
(+)		03	03	33
(-)		52	52	22
		<i>p=0,17</i>	<i>p=0,17</i>	<i>P=1,00</i>

Gráfico 1. Intensidade do sinal da ressonância magnética, (+) alta e (-) baixa, na ponderação T1, segundo a região analisada e o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas)

TABELA 2 Distribuição de freqüência, absoluta (n) e relativa (%), da análise topográfica da intensidade do sinal da ressonância magnética, (+) alta e (-) baixa, na ponderação t2, segundo a região analisada e o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas). Comparação pelo Teste Exato de Fisher ($\alpha=0,05$)

PERÍODO DE EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO (SEMANA)		RESSONÂNCIA MAGNÉTICA – PONDERAÇÃO T2					
		Tendão		Interface		Osso	
		(Enxerto)				(Medula)	
		<i>n</i>	%	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%
4	(+)	0	0,0	3	100,0	3	100,0
	(-)	3	100,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL		3	100,0	3	100,0	3	100,0
8	(+)	0	0,0	3	100,0	3	100,0
	(-)	3	100,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL		3	100,0	3	100,0	3	100,0
12	(+)	0	0,0	5	100,0	5	100,0
	(-)	5	100,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL		5	100,0	5	100,0	5	100,0

Tendão (Enxerto)

Teste Exato de Fisher	de	4« 8		4« 12		8« 12	
(+)		0	0	0	0	0	0
(-)		3	3	3	5	3	5
		p=1,00		p=1,00		P=1,00	

Interface

Teste Exato de Fisher	de	4« 8		4« 12		8« 12	
(+)		3	3	3	5	3	5
(-)		0	0	0	0	0	0

			<i>p</i> =1,00		<i>p</i> =1,00		<i>P</i> =1,00	
Osso (Medula)								
Teste Fisher	Exato	de	4« 8		4« 12		8« 12	
	(+)		3	3	3	5	3	5
	(-)		0	0	0	0	0	0
			<i>p</i> =1,00		<i>p</i> =1,00		<i>P</i> =1,00	
4 Semanas								
Teste Fisher	Exato	de	Tendão« Inter face		Tendão« Osso		Interface« Osso	
	(+)		0	3	0	3	3	3
	(-)		3	0	3	0	0	0
			<i>p</i> =0,10		<i>p</i> =0,10		<i>P</i> =1,00	
8 Semanas								
Teste Fisher	Exato	de	Tendão« Inter face		Tendão« Osso		Interface« Osso	
	(+)		0	3	0	3	3	3
	(-)		3	0	3	0	0	0
			<i>p</i> =0,10		<i>p</i> =0,10		<i>P</i> =1,00	
12 Semanas								
Teste Fisher	Exato	de	Tendão« Inter face		Tendão« Osso		Interface« Osso	
	(+)		0	5	0	5	5	5
	(-)		5	0	5	0	0	0
			<i>p</i> =0,008*		<i>p</i> =0,008*		<i>P</i> =1,00

Gráfico 2 Intensidade do sinal da ressonância magnética, (+) alta e (-) baixa, na ponderação T2, segundo a região analisada e o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas)

TABELA 3 Distribuição de frequência, absoluta (n) e relativa (%), da ocorrência de tecido de granulação/edema ou de sangue extravascular na interface tendão-osso segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas). Comparação pelo Teste Exato de Fisher ($\alpha=0,05$)

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	PERÍODO DE EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO (SEMANA)					
	4		8		12	
	INTERFACE (T1/T2)					
	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%
Tecido de Granulação/ Edema	3	100,0	2	66,7	2	40,0
Sangue Extravascular	0	0,0	1	33,3	3	60,0
TOTAL	3	100,0	3	100,0	5	100,0

Teste Exato de Fisher	4« 8		4« 12		8« 12	
Tecido de Granulação/Edema	3	2	3	2	2	2
Sangue Extravascular	0	1	0	3	1	3
	p=1,00		p=0,20		P=1,00

Gráfico 3 Ocorrência de tecido de granulação/edema ou de sangue extravascular na interface tendão-osso segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas).

TABELA 4 Distribuição de frequência, absoluta (n) e relativa (%), da ocorrência de vascularização (realce) na interface tendão-osso segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas). Comparação das distribuições agrupadas pelo Teste Exato de Fisher ($\alpha=0,05$)

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	PERÍODO DE EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO (SEMANA)					
	4		8		12	
	VASCULARIZAÇÃ O (REALCE)					
	<i>n</i>	%	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%
Sem Vascularização	0	0,0	0	0,0	1	20,0
Com Vascularização	3	100,0	3	100,0	4	80,0
TOTAL	3	100,0	3	100,0	5	100,0

**Teste Exato de
Fisher**

4« 8

4« 12

8« 12

Sem
Vascularização

0

0

0

1

0

1

Com
Vascularização

3

3

3

4

3

4

p=1,00

p=1,00

P=1,00

Gráfico 4 Ocorrência de vascularização (realce) na interface tendão-osso segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas).

TABELA 5 Distribuição de freqüência, absoluta (n) e relativa (%), do grau de integração (ausente, leve, moderado e acentuado) da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas). Comparação das distribuições agrupadas pelo Teste Exato de Fisher ($\alpha=0,05$)

INTEGRAÇÃO	PERÍODO DE EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO (SEMANA)					
	4		8		12	
	n	%	N	%	n	%
Ausente	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Leve	1	50,0	0	0,0	0	0,0
Moderado	1	50,0	2	66,7	0	0,0
Acentuado	0	0,0	1	33,3	5	100,0
TOTAL	2	100,0	3	100,0	5	100,0

Teste Exato de Fisher	4« 8		4« 12		8« 12	
Ausente/Leve	1	0	1	0	0	0
Moderado/Acentuado	1	3	1	5	3	5
	p=0,40		p=0,28		P=1,00

Gráfico 5 Grau de integração (ausente, leve, moderado e acentuado) da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas).

TABELA 6

Distribuição de frequência, absoluta (n) e relativa (%), do grau de maturação (ausente, leve, moderado e acentuado) da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas). Comparação das distribuições agrupadas pelo Teste Exato de Fisher ($\alpha=0,05$)

MATURAÇÃO	PERÍODO DE EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIO (SEMANA)					
	4		8		12	
	n	%	N	%	N	%
Ausente	1	50,0	0	0,0	0	0,0
Leve	1	50,0	1	33,3	0	0,0
Moderado	0	0,0	1	33,3	0	0,0
Acentuado	0	0,0	1	33,3	5	100,0
TOTAL	2	100,0	3	100,0	5	100,0

Teste Exato de Fisher 4« 8

4« 12

8« 12

Ausente/Leve

2

1

2

0

1

0

Moderado/Acentuado

0

2

0

5

2

5

$p=0,40$

$p=0,048^*$

$P=0,38$

Gráfico 6 Grau de maturação (ausente, leve, moderado e acentuado) da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos segundo o período de evolução pós-operatório (4, 8 e 12 semanas).

TABELA 7 Distribuição de frequência, absoluta (n) e relativa (%), da ocorrência de tecido de granulação / edema ou de sangue extravascular na interface tendão-osso (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve, moderado + acentuado) da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos. Comparação pela prova de qui-quadrado com correção de continuidade de Yates ($\alpha=0,05$)

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DA INTERFACE (T1 / T2)						
MATURAÇÃO	Tecido de Granulação / Edema		Sangue		TOTAL	
			<i>Extravascular</i>			
	n	%	n	%	N	%
Ausente + Leve	3	30,0	0	0,0	3	30,0
Moderado + Acentuado	3	30,0	4	40,0	7	70,0
TOTAL	6	60,0	4	40,0	10	100,0

Prova de Qui-Quadrado

p=0,32

TABELA 8

Distribuição de frequência, absoluta (n) e relativa (%), da ocorrência de vascularização (realce) na interface tendão-osso (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve, moderado + acentuado) da interface tendão-osso na região do túnel ósseo do fêmur (análise anatomopatológica) dos coelhos. Comparação pela prova de qui-quadrado com correção de continuidade de Yates ($\alpha=0,05$)

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DA INTERFACE						
VASCULARIZAÇÃO (REALCE)						
MATURAÇÃO	Com Vascularização		Sem Vascularização		TOTAL	
	n	%	n	%	N	%
Ausente + Leve	3	30,0	0	0,0	3	30,0
Moderado + Acentuado	6	60,0	1	10,0	7	70,0
TOTAL	9	90,0	1	10,0	10	100,0

Prova de Qui-Quadrado

p=0,64

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Estudos da porção intra-articular do enxerto nas reconstruções ligamentares do joelho têm sido amplamente analisados; no entanto, em relação à integração do tendão nos túneis ósseos, pouco tem sido estudado^{1,2,10,11,12,19}. Um perfeito entendimento da biologia e morfologia envolvendo a interface enxerto-osso é necessário para um processo de reabilitação mais adequado pós-reconstrução ligamentar e retorno às praticas esportivas⁶.

O objetivo do nosso trabalho foi verificar a integração do tendão do músculo semitendíneo no túnel ósseo do fêmur, na reconstrução do LCA quanto à biomecânica, e verificar o que nas determinadas semanas de evolução ocorria na ressonância magnética e na histologia no túnel femoral. Esse tipo de estudo não é possível se realizar em seres humanos; escolhemos o coelho devido às facilidades em relação ao porte, à obtenção em granja e ao manuseio por um veterinário com experiência, e optamos pela raça da Nova Zelândia por ser de porte grande entre as várias raças de coelhos.

Vários autores realizam estudo em coelhos^{1,2,58} e outros realizam os estudos em outros animais como ratos, cães, cabras e macacos e apresentam resultados e conclusões semelhantes quanto ao estudo biomecânico e histológico. Quanto ao estudo com ressonância magnética, há muitos trabalhos do enxerto do ligamento cruzado anterior quanto à porção articular, mas muito pouco se fala sobre a porção do enxerto dentro do túnel ósseo.

Realizamos a reconstrução ligamentar com tendão do semitendíneo nos joelhos dos coelhos intra-articular para simular as reconstruções nos seres humanos^{11,12,14,17,32,33,39,52,60} na presença do líquido sinovial. Berg⁶ (1992) descreve um caso de pseudartrose do bloco ósseo tibial na revisão de reconstrução do LCA com aloenxerto, como provável ação deletéria do líquido sinovial na integração do enxerto, e Berg et al.⁷ realizam túneis no intercôndilo de ratos e não introduziram nenhum enxerto e confirmaram que na região do túnel mais próxima à articulação, o preenchimento com osso é mais demorado.

As peças anatômicas foram congeladas a -20°C imediatamente após a eutanásia dos coelhos, mantendo-se intacta a articulação do joelho até o dia do ensaio mecânico, quando foram colocadas em soro fisiológico a 37°C para descongelar. Os autores Selin e Hirsch⁴⁹, Michelini³⁸, Viidik e

Lewin⁵⁴ relatam que o congelamento e descongelamento de peças anatômicas desta forma não altera as propriedades mecânicas dos ossos e tendões.

A escolha do estudo da reconstrução do LCA com tendão do músculo semitendíneo foi determinada pela análise da literatura^{11,17,21,27,28,34,52}, e nos causou interesse um estudo de modelo animal para verificarmos o que ocorria na ressonância magnética, biomecânica e histologia da integração do enxerto no túnel femoral.

Realizamos a reconstrução intra-articular do LCA nos joelhos dos coelhos apenas com o tendão semitendíneo, colocando-o em dois túneis, um femoral e um tibial de 2,3mm de diâmetro compatíveis para que o enxerto se encaixasse de forma justa no túnel ósseo. De acordo com os estudos de vários autores que concluem que a irrigação não vem da inserção do tendão na tíbia e biomecanicamente não faz diferença^{3, 13, 28}. Desta forma usamos o enxerto livre sem manter a inserção deste na tíbia.

Iniciando pela análise biomecânica, não é o objetivo deste estudo avaliar o comportamento biomecânico do complexo fêmur–enxerto do ligamento cruzado anterior–tíbia quanto à

elasticidade, limites de resistência e rigidez, pois estes dados já foram publicados⁴⁴. Analisamos se o enxerto rompeu em sua porção articular ou arrancou do túnel da tíbia ou do túnel do fêmur, e adotamos que se o enxerto rompeu em sua porção articular, significa que a integração está mais resistente que o próprio enxerto, portanto, integrado.

A análise biomecânica quando se observa se a ruptura dos enxertos ocorre na sua substância, demonstra que a integração osteo-tendinosa é satisfatória para os parâmetros de resistência tendinosa estudados, e está associada à diminuição dos limites de resistência ocorrida na porção articular do enxerto.

O objetivo do trabalho foi analisar a porção femoral tendão-osso, mas alterações mecânicas também ocorrem na porção tendão-osso no túnel tibial e na porção articular. O estudo de Mcfarland et al.³⁶ (1986) mostram, em cães, que na reconstrução do LCA, ocorre uma definida e significativa diminuição da resistência no limite de força do enxerto. Baseados em tal estudo e levando em conta o tamanho do enxerto do ligamento patelar em humano, acreditaram que a força “in vivo” seria menor que a descrita em estudo “in vitro” por Noyes et al.⁴² em 1984, e que o cirurgião deveria considerar

a força do enxerto e suas alterações histológicas após a implantação.

O processo biológico envolve vascularização, a qual reflete inflamação causada pela morte celular e a reorganização do enxerto, que deixa o tecido significativamente com menos força e maior volume de água. No quarto mês, a resposta vascular diminui, mas ainda sem recuperação da força. Mcfarland et al.³⁷ (1993) alertam para evitar uma sobrecarga de tensão e não manipular o processo biológico.

Os nossos resultados foram semelhantes aos da literatura, como Grana et al.¹⁹, que relatam que, a partir da terceira semana, a falha ocorreu na porção intra - articular do enxerto.

Na quarta semana três coelhos foram submetidos à tração e em dois o enxerto foi arrancado da tíbia e um enxerto rompeu na porção articular. Nenhum foi arrancado do túnel femoral.

A ressonância magnética mostrou a ausência de edema e vascularização no enxerto na porção do túnel femoral, e presença de edema e vascularização na interface e na medular adjacente, padrão este mantido nos três coelhos. A histologia mostrou desorganização e edema das fibras de colágeno do

enxerto, proliferação de tecido fibroso com fibroblastos e tecido ósseo com osteoblastos nas regiões próximas à interface. As fibras tipo Sharpey⁵⁰, presente em outros estudos, eram evidentes de padrão não homogêneo em toda a circunferência do túnel.

O estudo de Grana et al.¹⁹, mostra que, com duas semanas, há tecido de granulação ao redor do enxerto fazendo a interface entre o enxerto e o osso metafisário. Isto mostra remodelação nas margens dos túneis ósseos com ampla junção de osteóide, preenchido com atividade osteoclástica e osteoblástica, sem fibras de colágeno lembrando as fibras de Sharpey. Na 3ª semana ocorre a maturação da interface entre o túnel ósseo e o enxerto, e aparecem na área de tecido de granulação as fibras de colágeno perpendicular entre o enxerto e o túnel ósseo lembrando as fibras de Sharpey. O nosso estudo foi realizado com período de tempo a partir da 4ª semana; portanto, estes períodos das 2ª e 3ª semanas não foram observados.

Nos nossos coelhos verificamos áreas onde o enxerto estava justaposto e em outras existiam lacunas e aparecia remodelagem óssea na interface, semelhante ao relato de Grana et al.¹⁹, que também referem fibras de Sharpey.

Rodeo et al.⁴⁷, em estudo com cães, mostram diminuição da vascularização em relação à 2ª semana, e ocasional continuidade das fibras de colágeno na interface do osso com tecido fibroso na 4ª semana, o que resulta no alto sinal nas imagens de RM obtidas em ponderações de T2 que significa edema conforme descrevem Jansson et al.²⁶, e o realce, que é presença de vascularização, são encontrados por alguns autores nesse período de tempo de quatro semanas e corresponde a interface tendão–osso que é preenchida com tecido de granulação. Com o tempo este tecido de granulação amadurecerá em tecido fibroso, que é o que encontramos nas lâminas dos coelhos com quatro semanas como descrevemos acima. Tal fato corrobora com os achados de Kobayashi et al.²⁹ que determinam pelo estudo deles que o processo de cicatrização da interface é muito mais pelas células mesenquimais hospedeiras do que pelas células do enxerto, demonstram a invasão de células hospedeiras no enxerto.

Na 8ª semana, em nenhum ensaio mecânico, houve o arrancamento do enxerto do túnel femoral, um ensaio arrancou o enxerto da tíbia e em dois ensaios o ponto de ruptura foi na porção articular do enxerto. As imagens da RM mostraram o enxerto sem edema, mas com focos de realce em dois dos exames, o que significa vascularização. Um exame foi

descartado, por não ter qualidades técnicas necessárias; no entanto nos coelhos com quatro semanas não se via o realce no enxerto que é visto na oitava semana. Em relação à interface, as imagens de RM mostraram edema e vascularização em dois coelhos: em um mostrou um sinal heterogêneo, e em outro não foi visualizado pela posição do corte na imagem. Na medular, houve a presença de edema nos cinco coelhos e vascularização em três coelhos. Em um coelho foi visto o sinal de duplo anel descrito por Murakami et al.⁴⁰.

Na histologia os cortes corados com hematoxilina–eosina mostraram neoformação ósseo-cartilaginosa exuberante, fibras de colágeno do enxerto direcionadas ao osso. Na medular, houve importante área com tecido fibrovascular jovem em substituição à medula com proliferação de fibroblastos e osteoblastos. A interface é distinta, os cortes corados com tricômio de Masson mostraram as fibras tipo Sharpey bem evidentes, e mais abundantes. O padrão não homogêneo nos quatro quadrantes foi mantido assim como na quarta semana e no estudo de Grana et al.¹⁹. A interface tendão-osso nesse período de evolução também se manteve distinta, e com marcante presença de fibroblastos. Rodeo et al.⁴⁷ também observam uma interface tendão-osso mais organizada e fibras de

colágeno ocasionais que nem sempre apareciam contínuas com a estrutura do colágeno do tendão.

O padrão não homogêneo pode ser explicado pelo estudo de Arnoczky et al.⁴ (1988) da integração de próteses ligamentares. Os autores observam crescimento de tecido fibroso ao redor do enxerto, enquanto em outros verificam o crescimento ósseo direto ao enxerto. Scranton et al.⁴⁸ (1998) mostram na reconstrução do LCA em carneiros com seis semanas vários estágios de integração, desde inflamação até proliferação de tecido cartilaginoso e ósseo, inclusive com fibras de Sharpey. Contudo, Weiler et al.⁵⁶(2002) referem que o processo de cicatrização tendão – osso se dá por uma interface fibrosa quando a fixação é fora ou longe do túnel ósseo, e realizam estudo com fixação dentro do túnel, observam o desenvolvimento apenas parcial de uma interface fibrosa entre o enxerto e o túnel ósseo.

Na 12ª semana nos ensaios mecânicos dos coelhos 7-9-10 houve falha de todos no enxerto, e as imagens de RM mostram o enxerto sem edema e vascularizado em três dos quatro coelhos, no coelho de número 9 os cortes nas imagens estavam inadequados. A interface mostrou com edema nos cinco coelhos e a vascularização em três coelhos. A medular mostrou edema

nos cinco coelhos, vascularização em três coelhos, e em um coelho mostrou o sinal do duplo anel de Murakami et al.⁴⁰. Já a histologia mostrou a interface com tecido fibrovascular e área com neoformação óssea em menor intensidade e pontes ósseas no enxerto. As margens da interface foram mal definidas, com presença de fibras de Sharpey em pequena quantidade, quadro muito semelhante ao encontrado no estudo de Grana et al.¹⁹. No estudo de Rodeo et al.⁴⁷, observam fibras de colágeno conectando o tendão no osso com luz polarizada, e referem que as fibras de colágeno são alinhadas ao longo da direção de tração em dada unidade tendão-músculo. Para melhor visualização dessas fibras de colágeno utilizamos cortes corados com tricômio de Massom.

O circundado é o que representaria na RM a interface tendão–osso. Este mostrou que já na quarta semana um alto sinal em T2 que se manteve alto em todos os coelhos da 8ª semana e da 12ª semanas, o que traduziria este alto sinal como aumento de líquido que poderia ser por líquido sinovial, pois a reconstrução ligamentar foi intra-articular; portanto, há comunicação com a articulação ou por edema do trauma cirúrgico e processo de cicatrização. Nas imagens obtidas após contraste em T1 com supressão de gordura, o circundado foi observado com realce em todos os coelhos, exceto nos coelhos

8 e 9 que são coelhos do grupo com 12 semanas. Este realce representou vascularização da interface tendão osso, que entendemos como tecido de granulação que progressivamente se tornará tecido fibroso ou ósseo. Usando um modelo de reconstrução intra-articular semelhante, Blickenstaff et al.⁹ e Grana et al.¹⁹ mostram que a interface tendão-osso é preenchida com tecido vascular e celular granulomatoso que amadurece em tecido fibroso que prende o tendão à interface e que mais tarde o enxerto é fixo biologicamente por tecido de colágeno lembrando fibras de Sharpey dentro de 12 semanas.

Segundo Uchio et al.⁵³, o sinal de alta intensidade que ocorre ao redor do enxerto logo após a reconstrução ligamentar deve significar que o enxerto do tendão do semitendíneo deve estar coberto com tecido de partes moles, inclusive líquido sinovial. Se o sinal de alta intensidade mudar para baixa intensidade, significa a ocorrência da fixação biológica. Acreditamos que essa alteração de sinal corresponda à maturação do tecido de fixação tendão-osso, e não à ocorrência da fixação. A partir da 4ª semana, a integração do tendão no túnel femoral já é mais resistente que no túnel tibial e na parte articular do enxerto, e já ocorre fibras de Sharpey e proliferação fibrosa, cartilaginosa e óssea. O nosso estudo avalia até 12 semanas, e não pudemos verificar essa mudança nesse período.

Murakami et al.⁴⁰ (1999) descrevem o duplo anel que ocorreu em 12 de um total de 16 pacientes com oito e 12 semanas de evolução pós operatório de reconstrução do LCA com tendão dos músculos semitendíneo e gracilis. Também observamos em dois coelhos: um coelho com 8 semanas e outro com 12 semanas. Murakami et al.⁴⁰ referem que estes anéis correspondem a diferentes estágios de cicatrização da interface tendão–osso. O anel mais periférico que é baixo sinal corresponde à formação óssea junto à medular e o anel justa enxerto corresponde a tecido de granulação que apresenta um alto sinal. Referem que gradativamente o anel periférico progride e por volta de seis meses todo o túnel está com sinal de baixa intensidade.

Não se encontraram estudos como este na literatura. Hunt et al.²⁵ (2005) relatam e estudam, mas não relacionam a RM com a histologia e biomecânica. Este estudo pode ser uma proposta inicial para o estabelecimento de um modelo experimental de avaliação de técnicas de reconstrução ligamentar. A aplicação de novas tecnologias para a integração do enxerto nos túneis, como a utilização de ondas de choque extra-corpóreas proposto por Wang et al.⁵⁵ (2005), também podem ser testadas com este modelo.

A seguir comentam-se os resultados.

Nas imagens de RM obtidas em T1 do enxerto, da interface e do osso medular adjacente, não se comprovam diferenças estatísticas com quatro, oito e doze semanas, como vimos na tabela 1 e gráfico 1.

Nas imagens de RM obtidas em T2 do enxerto, da interface e do osso medular adjacente, mostradas na tabela 2 e gráfico 2 não se comprovam diferenças estatísticas com quatro, oito e 12 semanas. Exceto com 12 semanas comprovaram-se diferenças de sinal entre o tendão e a interface ($p=0,008^*$) e entre o tendão e o osso ($p=0,008^*$), mostrado na tabela 2 e gráfico 2.

O gráfico 3 e tabela 3 mostram a interface nas imagens obtidas da RM em T1 e T2. Um baixo sinal em T1 e um alto sinal em T2 significam tecido de granulação e se for alto sinal nas duas ponderações significa haver sangue extra-vascular ou um halo hemorrágico. Estatisticamente os sinais da interface são semelhantes da quarta para a oitava semana e da oitava para a décima segunda semana e da quarta para a décima segunda semana. Não se comprovam diferenças estatísticas de ocorrência de imagens de tecido de granulação ou sangue extra-vascular.

A presença ou ausência de vascularização na interface é observada com o realce após administração do contraste gadolínico. No gráfico 4 e tabela 4 verificamos o realce na interface. Eles são semelhantes da quarta para a oitava e décima segunda semana, e da oitava para a décima segunda semana, portanto, não se comprovam diferenças estatística na vascularização da interface entre as semanas de estudo pela RM.

A integração foi graduada em ausente leve e moderada, e está demonstrada no gráfico 5 e tabela 5. Não se comprova diferenças estatística entre as semanas estudadas.

O gráfico 6 e tabela 6 demonstram a maturação que é graduada em ausente, leve, moderada e acentuada. A estatística demonstra semelhança da quarta para a oitava semana, semelhança da oitava para décima segunda semana, da quarta para a décima segunda semana o que comprovou diferença estatística da maturação da interface($p=0,048^*$).

No gráfico 7 e tabela 7 não se comprovaram diferenças de ocorrência de tecido de granulação / edema ou de sangue extravascular (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve, moderado + acentuado).

No gráfico 8 e tabela 8 não se comprovaram diferenças de vascularização (ressonância magnética) em relação ao grau de maturação (ausente + leve, moderado + acentuado)

Finalizando os pontos mais importantes verificados nos três períodos de quatro, oito e doze semanas após o procedimento cirúrgico de reconstrução do LCA com enxerto do tendão do músculo do semitendíneo, os aspectos de RM, biomecânicos, e de histologia serão a seguir relatados.

Observamos uma progressão da RM. O enxerto que se apresentava sem edema e sem vascularização com quatro semanas manteve-se sem edema, mas passou a apresentar focos de vascularização em sua periferia, e com 12 semanas o enxerto mantinha-se sem edema, mas com vascularização na maioria dos casos. Já a interface mostrou edema e vascularização desde o grupo de coelhos com quatro semanas, e se manteve até 12 semanas. Num coelho de oito semanas e em um coelho com 12 semanas observamos o sinal de duplo anel de Murakami et al.⁴⁰.

O estudo biomecânico mostrou que na 4ª e 8ª semanas a integração tendão osso no túnel do fêmur já era mais resistente que o enxerto e que a integração no túnel tibial. Na 12ª semana

a integração no fêmur e na tíbia era mais resistentes que o enxerto. Rodeo et al.⁴⁷ mostraram em estudo em cães que o enxerto extra-articular era arrancado do túnel tibial no teste biomecânico na 8ª semana.

O objetivo do trabalho foi analisar a porção femoral tendão-osso, mas alterações mecânicas também ocorrem na porção tendão-osso no túnel tibial e na porção articular.

Na histologia observamos na quarta semana nos nossos coelhos um edema na periferia do enxerto. A interface mostrou proliferação de tecido fibroso, cartilaginoso e ósseo e tecido de granulação. Houve presença de fibras de colágeno entre o osso neoformado e o enxerto tendinoso semelhantes às fibras de Sharpey e as margens de cada tecido (osso, interface e tendão) foram bem nítidas, mas os quadrantes não foram homogêneos.

Na oitava semana, a histologia mostrou a neoformação ósseo-cartilaginosa de forma exuberante, maior número fibras de colágeno do enxerto direcionadas ao osso da interface.

A vascularização estava presente na medular e houve importante área com tecido fibrovascular jovem em substituição à medula. Houve proliferação de fibroblastos e osteoblastos, e

nos cortes corados com tricômio de Massom, as fibras tipo Sharpey foram bem evidentes na área de transição tendão–osso, e mais abundantes. Rodeo et al.⁴⁷ também observam uma interface tendão-osso mais organizada e fibras de colágeno ocasionais o que nem sempre aparecia contínuo com a estrutura do colágeno do tendão.

No período de 12 semanas, a histologia mostrou a interface com tecido fibrovascular e área com neoformação óssea em menor intensidade, e pontes ósseas no enxerto e as margens da interface mal definidas, com presença de fibras de Sharpey, quadro muito semelhante ao encontrado no estudo de Grana et al.¹⁹.

Observamos uma progressão do processo cicatricial, já descrito por outros autores, com uma proliferação de tecido fibroso, cartilaginoso e ósseo que foi aumentando com o tempo a celularidade, a matriz e o amadurecimento do tecido ósseo e a formação de fibras de colágeno do osso neoformado da interface ao enxerto, que aumentaram em número.

Analizamos as lâminas dos joelhos que foram tracionados, estas mostraram o enxerto presente no túnel femoral, e não

diferenciavam histologicamente das lâminas dos joelhos que não foram tracionados.

O exame de ressonância magnética mostrou a ocorrência de edema e vascularização do enxerto, do circundado (interface) e do osso adjacente, porém não visualizamos qualquer sinal de integração do enxerto no osso até a 12ª semana. Novas pesquisas e período de tempo mais prolongado e associado a novas conquistas tecnológicas talvez no futuro tragam esta resposta.

A integração do enxerto tendinoso no osso quando fixo à distância segundo Weiler et al.⁵⁶ se dá por uma interface fibrosa, e essa interface não é um processo pontual. Trata-se de uma série de eventos histologicamente marcados por sangramento, formação de tecido de granulação e por último a integração óssea. Antes que isto ocorra histologicamente, sob tração mecânica, o tendão já está integrado. Boa parte das alterações histológicas são acompanhadas de alterações na RM. O hematoma pode ser visto com alto sinal em T1 e T2, o tecido de granulação pode ser identificado pelo baixo sinal em T1 e alto em T2. Não se sabe um sinal exato da integração que se mostre integrado, mas Murakami et al.⁴⁰ relata que quando ocorre o duplo anel, o avanço do baixo sinal do anel periférico para o

anel central seria a ocorrência da integração, após seis meses. No entanto, uma relação absoluta entre a imagem e as alterações histológicas não foi possível de ser comprovada até 12 semanas.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- Na análise da integração do tendão do músculo semitendíneo no túnel femoral feita por ressonância magnética houve progressão na vascularização a partir da 4ª semana até a 12ª semana.

- Na análise da integração do tendão do músculo semitendíneo no túnel femoral houve, sob o ponto de vista histológico, uma progressão da integração da 4ª semana até a 12ª semana.

8 ANEXOS

Anexo-I

Imagens de ressonância magnética

Coelho 2 (8 semanas)

- Túnel com imagem apresentando halo fino de baixo sinal em ambas as sequências circundado por pequena área de baixo sinal em T1, alto em T2 e realce na fase com contraste na medular.
- Enxerto com baixo sinal em T1 e em T2 com área focal de realce, circundado por tecido com baixo sinal em T1, alto em T2 e que sofre realce.

Coelho 3 (8 semanas)

- Enxerto mal definido em T1, com baixo sinal em T2, circundado por medular óssea com sinal heterogêneo, predominantemente alta em T1 e T2 com focos de realce.

Coelho 4 (8 semanas)

- Enxerto com baixo sinal em T1 e T2, sofrendo realce focal na fase com contraste, não há delimitação nítida do túnel.
- Ao redor do enxerto e na medular circunjacente ao túnel há sinal alto em T1, heterogêneo em T2 mais alto ao redor do enxerto e realce na fase com contraste.

Coelho 5 (8 semanas)

- Túnel femoral bastante alargado com conteúdo de baixo sinal em T1, alto em T2 e ausência de realce na fase com contraste, sugestivo de líquido.
- Enxerto não visibilizado.

Coelho 6 (12 semanas)

- Enxerto com baixo sinal em ambas as sequências, apresentando realce focal circundado por tecido com alto sinal em T1, alto em T2, que sofre realce na fase com contraste. Na sequência ponderada em T1 não há boa definição do tecido que envolve o enxerto com a medular. Não há margem de definição do túnel.

Coelho 7 (12 semanas) exame realizado sem saturação de gordura

- Enxerto com baixo sinal em ambas as seqüências circundado por tecido com alto sinal em T1, moderadamente elevado em T2 e provável realce na fase com contraste. Este realce não pode ser afirmado devido a não ter sido utilizada técnica com saturação de gordura.
- Não há boa definição do tecido que envolve o enxerto com a medular.
- Não há margem de definição do túnel.

Coelho 8 (12 semanas)

- Enxerto mal definido na sequência T1, plano de corte mais alto que as outras sequências, com baixo sinal em T2 e não sofrendo realce na fase com contraste circundado na sequência ponderada em T2 por tecido com alto sinal em T2 que não sofreu realce. A sequência T1 encontra-se no plano superior do túnel onde não é visibilizado o enxerto.

Coelho 9 (12 semanas)

- Difícil caracterização do túnel e do enxerto aparentemente com trajeto no mesmo plano que a imagem e não perpendicular como nos outros casos.

Coelho 10 (12 semanas)

- Enxerto bem identificado em ambas as seqüências com sinal baixo, apresentando realce periférico, circundado por tecido com baixo sinal em T1, alto em T2 que sofre realce na fase com contraste. A margem do túnel é bem definida não se encontrando alteração significativa da medular circunjacente.

Coelho 11 (4 semanas)

- Enxerto mal visibilizado com sinal discretamente elevado em ambas as seqüências sofrendo realce circundado por tecido heterogêneo com baixo sinal em T1, alto em T2 e que sofre realce na fase com contraste.

- Este tecido também é evidenciado de forma extensa na medular adjacente ao túnel. o túnel é pobremente definido.

Coelho 13 (4 semanas)

- Enxerto mal visibilizado com sinal discretamente elevado em ambas as sequências sofrendo realce circundado por tecido heterogêneo com baixo sinal em T1, alto em T2 e que sofre realce na fase com contraste.
- Este tecido também é evidenciado de forma extensa na medular adjacente ao túnel. O túnel é pobremente definido.

Coelho 14 (4 Semanas) Série pós-contraste sem saturação

- Enxerto bem identificado com baixo sinal em ambas as sequências não sofrendo realce na fase com contraste, envolto por tecido com baixo sinal em T1, alto em T2 que sofre realce na fase com contraste. O túnel é mal identificado.

Anexo-II

LÂMINAS DE HISTOLOGIA

Coelho 11 (4 semanas)

c11b panorâmico-Tm

c11b-q4 Tm

Tricômio de masson: desorganização e edema das fibras colágenas do enxerto, proliferação de tecido fibroso e com fibroblasto e ósseo com osteoblastos nas regiões próximas a interface, e presença marcante de fibras tipo *Sharpey*.

c11b q – 4, He: interface com importante neoformação ósseo cartilaginosa e maior densidade das fibras colágenas e com grande celularidade na interface. Tecido fibrovascular jovem em área profunda do enxerto.

Coelho 13 (4 semanas)

c13c pan 5x He

c13c q-2 20 x He

He: neoformação ósseo-cartilaginosa exuberante, fibras colágenas do enxerto direcionadas ao osso.

Na medular há importante área com tecido fibrovascular jovem em substituição a medula. Proliferação de fibroblastos e osteoblastos.

Tric: fibras Sharpey-like bem evidentes na área do enxerto.

COELHO-2 (8 semanas)

C2-1pan4x Tm enxerto com interface evidente constituída por neoformação Osteocartilaginosa e edema.

C2-1 interf pan 10x Tm enxerto com interface evidente com fibrose e importante neoformação osteocartilaginosa e fibras tipo sharpey.

COELHO-3 (8semanas)

C3 4X pan Tm

C3 10x Tm

C3 40x Tm

Tm: neoformação ósseo-cartilaginosa exuberante, fibras colágenas do enxerto direcionadas ao osso.

Na medular há importante área com tecido fibrovascular jovem em substituição a medula. Proliferação de fibroblastos e osteoblastos.

Tric: fibras *Sharpey-like* bem evidentes na área de transição tendão –osso, e não homogêneo nos 4 quadrantes

Coelho-4 (8semanas)

C4 10x Tm

C4 40x Tm

Interface com neoformação osteocondral sendo o osso mais periférica e a cartilagem entre o osso neoformado e o enxerto. Junção tendão osso já com algumas fibras de colágeno tipo Sharpey.

Coelho-6 (12 semanas)

C6 b - panoramico- He

C6c - Tm

Semelhante ao trabalho de grana (= trabalho de grana) mostra tecido conjuntivo mais denso, isto é, maior colagenização e com menor intensidade de edema e reação inflamatória do tecido conjuntivo na interface tendão – osso, sem definição de margens, com presença de neoformação óssea de forma não homogênea nos 4 quadrantes, mas presente nas 12 semanas (fio de nylon).

He: interface com neoformação ósseo-cartilaginosa leve. Enxerto hipocelular.

Tric: pequena quantidade de fibras *Sharpey-like*.

COELHO-7 (12 semanas)

c7b pan1.25 x Tm

c7b pan 1.25 x He

C7b:He: interface constituída por tecido fibrovascular e área com neoformação óssea em menor intensidade e pontes ósseas no enxerto. Enxerto com edema de fibras. Sem definição das

margens tendão–osso e estas são não homogêneas nos quadrantes.

Tric: fibras tipo *Sharpey* em grande quantidade.

C7b 40 x - Tm

C7b: He: área do enxerto pouco definida, interface com tecido fibro conjuntivo jovem. Neoformação ósseo-cartilaginosa exuberante.

Tric: fibras tipo *Sharpey* em moderada quantidade.

Coelho-8 (12 semanas)

C8a, panorâmica, 1,25 x - Tm

C8b, panorâmica, 1,25 x He

C8a- TRIC: fibras tipo *Sharpey* evidentes e maior proliferação fibro-óssea.

C8b He: interface com maturação e área de neoformação ósseo-cartilaginosa de intensidade moderada.

Enxerto com edema moderado e maior celularidade das fibras.

C8a – q 2 - Tm

C8a- q- 2 Tm: fibras tipo *Sharpey* evidentes e maior proliferação fibro-óssea.

Coelho 9 (12 semanas)

9 c9b panorâmica - He

Mantém a mesma descrição dos coelhos com 12 semanas, com áreas evidentes com presença da interface e fibras de *Sharpey* e

outras áreas sem proliferação tecidual, mantendo o padrão não homogêneo nos quadrantes.

C9b q-4 – 40 x - He

Neste quadrante há proliferação vascular, fibras de Sharpey, fibroblasto, e pouca matrix, mostrando um padrão não homogêneo nos quadrantes.

Coelho-10 (12 semanas)

C10b panorâmica 5 x He

c10b q-1 20 x He

He: interface com importante neoformação fibro-ósseo-cartilaginosa, áreas com tecido de granulação e inflamação crônica.

Tric: acentuada quantidade de fibras *Sharpey-like*.

Nítida visualização entre tendão e osso, com presença de tecido fibroso e proliferação óssea com áreas tendão justa posto ao osso, e outras áreas com lacunas.

He: interface com importante neoformação ósseo cartilaginosa e maior densidade das fibras colágenas e com grande celularidade na interface. Tecido fibrovascular jovem em área profunda do enxerto (aspecto encontrado nos casos C10B)

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronek J, Akeson W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res*. 1984;1:257-65.
2. Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH. The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res*. 1986; 4:162-72.
3. Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL. Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon. An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg Am*. 1982; 64:217-24.
4. Arnoczky SP, Torzilli PA, Warren RF, Allen AA. Biologic fixation of ligament prostheses and augmentations. An evaluation of bone ingrowth in the dog. *Am J Sports Med*. 1988;16:106-12.
5. Ballock RT, Woo SL, Lyon RM, Hollis JM, Akeson WH. Use of patellar tendon autograft for anterior cruciate

- ligament reconstruction in the rabbit: a long-term histologic and biomechanical study. *J Orthop Res*. 1989;7:474-85.
6. Berg EE. Tibial bone plug nonunion: a cause of anterior cruciate ligament reconstructive failure. *Arthroscopy*. 1992; 8:380-4.
 7. Berg EE, Pollard ME, Kang Q. Interarticular bone tunnel healing. *Arthroscopy*. 2001; 17:189-95.
 8. Biau DJ, Tournoux C, Katsahian S, Schranz PJ, Nizard RS. Bone-patellar tendon-bone autografts versus hamstring autografts for reconstruction of anterior cruciate ligament meta-analysis. *Br Med J*. 2006 1-7.
 9. Blickenstaff KR, Grana WA, Egle D. Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model. *Am J Sports Med*. 1997; 25:554-9.
 10. Booth NH, McDonald LE. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p. 210-2.

11. Camanho GL, Olivi R. O uso do tendão do músculo semitendíneo fixo com endobutton no tratamento das instabilidades anteriores do joelho. *Rev Bras Ortop.* 1994; 29:505-9
12. Cho K. Reconstruction of the anterior cruciate ligament by semitendinosus tenodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1975; 57:608-12.
13. Clancy WG Jr, Narechania RG, Rosenberg TD, Gmeiner JG, Wisnefske DD, Lange TA. Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys. *J Bone Joint Surg Am.* 1981; 63:1270-84.
14. Cross MJ, Roger G, Kujawa P, Anderson IF. Regeneration of the semitendinosus and gracilis tendons following their transection for repair of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med.* 1992; 20:221-3.
15. Forward AD, Cowan RJ. Tendon suture to bone. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1963; 45:807-23.

16. Freedman KB, D'Amato JM, Nedeff DD, Kaz A, Bach BR Jr. Arthroscopy Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Metaanalysis Comparing Patellar tendon and Hamstring tendon Autografts. *Am J Sports Med.* 2003; 31:2-11.
17. Gomes JLE, Marczyk LRS. Anterior cruciate ligament reconstruction with a loop or double thickness of semitendinosus tendon. *Am J Sports Med.* 1984; 12:199-203.
18. Goradia VK, Rochat MC, Grana WA, Rohrer MD, Prasad HS. Tendon-to-bone healing of a semitendinosus tendon autograft used for ACL reconstruction in a sheep model. *Am J Knee Surg.* 2000; 13:143-51.
19. Grana WA, Egle DM, Mahnken R, Goodhart CW. An analysis of autograft fixation after anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Am J Sports Med.* 1994; 22:344-51.
20. Hall LW, Clarke KW. *Anestesia veterinária.* 8a.ed. São Paulo: Manole; 1987. p.390.

21. Hey Groves EW. Operation for the repair of the crucial ligaments. *Lancet*. 1917; NOV 3.
22. Hey Groves EW. The crucial ligaments: their function, rupture, and the operative treatment of the same. *Br J Surg*. 1920; 7:505-15.
23. Holden JP, Grood ES, Butler DL, Noyes FR, Mendenhall HV, Van Kampen CL, Neidich RL. Biomechanics of fascia lata ligament replacements. Early postoperative changes in the goat. *J Orthop Res*. 1988; 6:639-47.
24. Howell SM, Berns GS, Farley TE. Signal intensity measurements of unimpinged and impinged anterior cruciate ligament grafts. *Radiology*. 1991;179:639-43.
25. Hunt P, Rehm O, Weiler A. Soft tissue graft interference fit fixation: observations on graft insertion site healing and tunnel remodeling 2 years after ACL reconstruction in sheep. *Knee Surg Sports Traumatol Arthroscopy*. 2006;May 19.

26. Jansson KA, Pertti T, Karjalainen PT, Harilainen A, Sandelin J, Soila K, Tallroth K, Aronen HJ. MRI of anterior cruciate ligament repair with patellar and hamstring tendon autografts. *Skeletal Radiol.* 2001; 30:8-14.
27. Jones KG. Reconstruction of the anterior cruciate ligament. A technique using the central one-third of the patellar ligament. *J Bone Joint Surg Am.* 1963; 45:925-32.
28. Kennedy JC, Roth JH, Mendenhall HV, Sanford JB. Intraarticular replacement in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *Am J Sports Med.* 1980; 8:1-8.
29. Kobayashi M, Watanabe N, Oshima Y, Kajikawa Y, Kawata M, Kubo T. The fate of host and graft cells in early healing of bone tunnel after tendon graft. *Am J Sports Med.* 2005; 33:1892-7.
30. Krackow KA, Thomas SC, Jones LC. A new stitch for ligament-tendon fixation. Brief note. *J Bone Joint Surg Am.* 1986; 68:764-6.

31. Kurosaka M, Yoshiya S, Andrish JT. A biomechanical comparison of different surgical techniques of graft fixation in anterior cruciate. ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 1987; 15: 225-9.
32. Lipscomb AB, Johnston RK, Snyder RB. The technique of cruciate ligament reconstruction. *J Sports Med.* 1981; 9:77-81.
33. Marczyck LR, Gomes JE. Semitendíneo duplo. In: Camanho GL. *Patologia do joelho*. São Paulo: Savier; 1996. p. 210-6.
34. Marder RA, Raskind JR, Carrol LM. Prospective evaluation of arthroscopically assisted anterior cruciate ligament reconstruction. Patellar tendon versus semitendinosus and gracilis tendons. *Am J Sports Med.* 1991; 19:478-84.
35. Maywood RM, Murphy BJ, Uribe JW, Hechtman KS. Evaluation of arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction using magnetic resonance imaging. *Am J Sports Med.* 1993; 21:523-7.

36. McFarland EG, Morrey BF, An KN, Wood MB. The relationship of vascularity and water content to tensile strength in a patellar tendon replacement of the anterior cruciate in dogs. *Am J Sports Med.* 1986; 14:436-48.
37. McFarland EG. The biology of anterior cruciate ligament reconstructions. *Orthopedics.* 1993; 16:403-10.
38. Michelini W. *Comparação das propriedades biomecânicas do ligamento cruzado anterior e da porção central do tendão patelar em cães. Efeitos do congelamento* [dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto;1984.
39. Mott HW. Semitendinosus anatomic reconstruction for cruciate ligament insufficiency. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;172:90-2.
40. Murakami Y, Sumen Y, Ochi M, Fujimoto E, Deie M, Ikuta Y. Appearance of anterior cruciate ligament autografts in their tibial bone tunnels on oblique axial MRI. *Magn Reson Imaging.* 1999;17:679-87.

41. Noyes FR, Delucas JL, Torvik PJ. Biomechanics of anterior cruciate ligament failure: an analysis of strain-rate sensitivity and mechanisms of failure in primates. *J Bone Joint Surg Am.* 1974; 56:236-53.
42. Noyes FR, Butler DL, Grood E S, Zernicke RF, Hefzy MS. Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions. *J Bone Joint Surg Am.* 1984; 66:344-52.
43. Papageorgiou CD, Ma CB, Abramowitch SD, Clineff TD, Woo SL. A Multidisciplinary study of the healing of an intraarticular anterior cruciate ligament graft in a goat model. *Am J Sports Med.* 2001; 29(5):620-6.
44. Pereira PP, Camanho GL, Munhoz MAS, Lucheta CAL. A integração do tendão do músculo semitendíneo como substituto do ligamento cruzado anterior - Estudo experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop.* 2000; 35:447-51.
45. Pinczewski LA, Clingeleffer AJ, Otto DD, Bonar SF, Corry IS. Integration of hamstring tendon graft with bone in reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Arthroscopy.* 1997; 13:641-3.

46. Rezende UM, Ando AY, Inada MT, Françolin PJ, Kokron AEV, Leivas TP, Hernandez AJ, Camanho GL. Viabilidade da utilização do tendão do semitendinoso como substituto do LCA do ponto de vista biomecânico. *Rev Bras Ortop.* 1994; 29:505-9.
47. Rodeo AS, Arnoczky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF. Tendon healing in na bone tunnel. *J Bone Joint Surg Am.* 1993; 75:1795-803.
48. Scranton PE Jr, Lanzer WL, Ferguson MS, Kirkman TR, Pflaster DS. Mechanisms of anterior cruciate ligament neovascularization and ligamentization. *Arthroscopy.* 1998; 14:702-16.
49. Selin ED, Hirsch C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop Scand.* 1966; 37:29-48.
50. Sharpey W, Ellis G, editors. *Elements of anatomy.* London: Walton and Moberly; 1856.
51. Shoemaker SC, Rechl H, Campbell P, Cram HB, Sanchez, M. Effects of fibrin sealant on incorporation of

- autograft and xenograft tendons within bone tunnels. *Am J Sports Med.* 1989; 17:318-24.
52. Steiner ME, Hecker AT, Brown CHJr, Hayes WC. Anterior cruciate ligament graft fixation comparison of hamstring and patellar tendon grafts. *Am J Sports Med.* 1994; 22:240-7.
53. Uchio Y, Ochi M, Adachi N, Kawasaki K, Kuriwaka M. Determination of time of biologic fixation after anterior cruciate ligament reconstruction with hamstring tendons. *Am J Sports Med.* 2003; 31:345-52.
54. Viidik A, Lewin T. Change in tensile strength characteristics and histology induced by different modes of postmortal storage. *Acta Orthop Scand.* 1966; 37:141-55, 1966
55. Wang CJ , Wang FS , Yang KD, Weng LH, Sun YC, Yang YJ. The effect of shock wave treatment at the tendon-bone interface - an histomorphological and biomechanical study in rabbits. *J Orthop Res.* 2005;23:274-280.

56. Weiler A, Hoffmann RF, Bail HJ, Rehm O, Sudkamp NP. Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy*. 2002; 18:124-35.
57. Whiston TB, Walmsley R. Some observations on the reaction of bone and tendon after tunneling of bone and insertion of tendon. *J Bone Joint Surg Br*. 1960; 42:377-386.
58. Woo S, Livesay GA, Runco TJ, Young EP. Structure and function of tendons and ligaments. In: Mow VC, Hayes WC, editors. *Basic orthopaedics biomechanics*. 2a. ed. Philadelphia: Lippincott; 1997. p. 209-51.
59. Yamakado K, Kitaoka K, Yamada H, Hashiba K, Nakamura R, Tomita K. The influence of mechanical stress on graft healing in a bone tunnel. *Arthroscopy*. 2002; 18:82-90.
60. Zaricznyj B. Reconstruction of the anterior cruciate ligament using free tendon graft. *Am J Sports Med*. 1983; 11:164-76.