

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALOIS FOLTRAN MÜLLER

Viabilidade dos fios de poliamida nacional e importado como alternativa para a técnica de TightRope modificada no tratamento de insuficiência do ligamento cruzado cranial espontâneo em cães

Pirassununga

2020

ALOIS FOLTRAN MÜLLER

Viabilidade dos fios de poliamida nacional e importado como alternativa para a técnica de TightRope modificada no tratamento de insuficiência do ligamento cruzado cranial espontâneo em cães

“Versão corrigida”

Dissertação apresentado à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal.

Área de concentração: Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M958v Müller, Alois Foltran
Viabilidade dos fios de poliamida nacional e importado como alternativa para a técnica de TightRope modificada no tratamento de insuficiência do ligam / Alois Foltran Müller ; orientador Silvio Henrique de Freitas. -- Pirassununga, 2020.
69 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Biomaterial. 2. Limite elástico. 3. Náilon.
4. Macro e micro análises. I. Freitas, Silvio Henrique de, orient. II. Título.

Título: Viabilidade dos fios de poliamida nacional e importado como alternativa para a técnica de TightRope modificada no tratamento de insuficiência do ligamento cruzado cranial espontâneo em cães.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para o cumprimento de uma etapa do programa de Mestrado em Biociência Animal.

Aprovado em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas (orientador)

Instituição: Faculdade de Zootecnia de Engenharia de Alimentos - FZEA/USP

Julgamento: _____

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo

Instituição: Faculdade de Zootecnia de Engenharia de Alimentos - FZEA/USP

Julgamento: _____

Prof. Dr. Luís Gustavo Gosuen Gonçalves Dias

Instituição: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP/Jaboticabal

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família que é, e sempre será, a razão de todas as minhas conquistas e que sempre estará ao meu lado.

Ao Professor Dr. Silvio Henrique de Freitas, por ser além de orientador, um grande amigo e parceiro em todos os momentos ao longo desses anos, por me possibilitar o ingresso no mundo científico e por ser um exemplo de conduta como médico veterinário cirurgião.

À Julia, minha companheira de vida, por estar presente em todos os momentos e por me estimular e inspirar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT/ZMV) e aos Professores Heidge Fukumasu e Ricardo De Francisco Strefezzi por cederem o espaço e por estarem sempre dispostos a me ajudar, em especial, agradeço também à Arina Rochetti pelo auxílio durante as pesquisas laboratoriais e pela paciência e disposição que nunca faltaram.

Ao Prof. Dr. Holmer Savastano Júnior, e aos colaboradores do Laboratório de Construções Rurais e Ambientais (CONSTRAMBI/ZEB), da FZEA/USP, por ceder o espaço e pelo auxílio na coleta de dados mecânicos dos fios de poliamida.

À Profa. Dra. Rachel Santos Bueno Carvalho pelo auxílio com as análises estatísticas e pela disposição de sempre ajudar.

Ao amigo e especialista de laboratório Rodrigo Vinicius Lourenço, pelo auxílio com as análises de microscopia e infravermelho.

Ao Prof. Antônio Carlos Shimano, do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), pelo auxílio nas análises dos dados biomecânicos dos fios de poliamida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (número de processo: 2018/02039-5) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Geral.....	11
2.2 Específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1 Aspectos morfológicos e funcionais do ligamento cruzado cranial	12
3.2 Opções para a correção da insuficiência do ligamento cruzado cranial	14
3.3 A poliamida como alternativa cirúrgica	16
4. JUSTIFICATIVA.....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Fio de poliamida (biomaterial)	21
5.2 Dispositivo para a acomodação do fio de poliamida	21
5.3 Esterilização dos fios de poliamida com uso de autoclave.....	21
5.4 Análise pela microscopia eletrônica de varredura da superfície dos fios de poliamida....	22
5.5 Ensaio mecânicos destrutivos dos fios de poliamida	22
5.6 Análise de citotoxicidade indireta dos fios de poliamida	25
5.7 Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	31
5.8 Análise estatística.....	32
6. RESULTADOS.....	34
6.1 Poliamida e dispositivo para esterilização	34
6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
6.3 Espectroscopia no infravermelho	40
6.4 Testes de citotoxicidade	43
6.5 Ensaio mecânicos.....	45
7. DISCUSSÃO	49
7.1 Poliamida.....	49
7.2 Dispositivo para a esterilização do fio em autoclave	50
7.3 Microscopia eletrônica de varredura	52
7.4 Espectroscopia no infravermelho	53
7.5 Citotoxicidade.....	55
7.6 Testes mecânicos destrutivos	56
7.7. O uso do fio de náilon como alternativa cirúrgica	57
8. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

MÜLLER, A. F. **Viabilidade dos fios de poliamida nacional e importado como alternativa para a técnica de TightRope modificada no tratamento de insuficiência do ligamento cruzado cranial espontâneo em cães.** 2020. 68p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

O ligamento cruzado cranial é um dos principais responsáveis pela estabilidade da articulação femorotibiopatelar. Quando rompido ou lacerado (insuficiente), ele proporciona instabilidade da tíbia em relação ao fêmur, levando à claudicação e, também, à doença articular degenerativa. A técnica de TightRope é um método de estabilização extracapsular que emprega fita ultrapolietileno resistente, com âncoras confeccionadas em titânio, que têm como objetivo anular o movimento de gaveta cranial e de rotação interna da tíbia. A fim de se verificar a viabilidade dos fios de poliamida (náilon) como alternativa à fita de ultrapolietileno, estes foram analisados por meio de ensaios mecânicos de tensão, citotoxicidade indireta, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pela espectroscopia no infravermelho (IV). Os fios testados foram acomodados em um dispositivo, desenvolvido para esta finalidade, e esterilizado em autoclave à 121°C por 15 minutos. Os resultados revelaram que o dispositivo de acomodação, se mostrou eficiente na manutenção do comprimento e diâmetro dos fios autoclavados. Por meio dos ensaios mecânicos de tensão foi possível obter o limite elástico dos fios e assim relacionar o seu diâmetro com o peso do cão com ILCCr. A espectroscopia no IV não indicou alteração molecular da poliamida e o teste de citotoxicidade indireta revelou que o fio de poliamida importado é citotóxico a linhagem celular testada e por isso seu uso *in vivo* não é indicado. Portanto, o fio de náilon de pesca nacional autoclavado é uma alternativa viável para o tratamento da ILCCr, de baixo custo, fácil aquisição e que pode ser utilizado para outros tipos de cirurgias articulares e em áreas da medicina veterinária que necessitem de fios mais resistentes.

Palavras-chave: Biomaterial. Limite elástico. Náilon. Macro e microanálise.

ABSTRACT

MÜLLER, A. F. **Viability of national and imported polyamide threads as an alternative to the modified TightRope technique for the treatment of spontaneous cranial cruciate ligament insufficiency in dogs.** 2020. 68p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

The cranial cruciate ligament is one of the main responsible for the femorotibiopatellar joint stability. When ruptured or lacerated (insufficient), it provides instability of the tibia relative to the femur, leading to lameness and also to degenerative joint disease. The TightRope is an extracapsular stabilization technique in which a resistant ultrapolyethylene tape, secured with endobuttons made of titanium, aims to prevent the cranial drawer movement and the tibial internal rotation. To check the polyamide (nylon) threads viability as an alternative to the ultrapolyethylene tape, these were analyzed employing mechanical stress tests, indirect cytotoxicity assessment, scanning electron microscopy (SEM), and by infrared spectroscopy (IR). The tested threads were accommodated in a device, developed for this purpose, and steam-sterilized at 120°C for 15 minutes. The results revealed that the accommodation device created was efficient in maintaining the length and diameter of the steam-sterilized threads. Through the mechanical stress tests, it was possible to obtain the threads elastic limits and thus to relate its diameter to the weight of the dog with cranial cruciate ligament insufficiency (CCLI). The IR spectroscopy did not show polyamide molecular alteration. The indirect cytotoxicity test revealed that the imported polyamide is cytotoxic to the cell line tested and, therefore, its use is not recommended *in vivo*, despite the favorable mechanical test results. Thus, the national steam-sterilized nylon fishing line is a viable alternative for the CCLI treatment, has low cost, easy acquisition, and can be used in other types of articular surgeries and in veterinary fields that require a more resistant suture.

Keywords: Biomaterial. Elastic Limit. Nylon. Macro and microanalysis.

1. INTRODUÇÃO

O ligamento cruzado cranial (LCCr) é um dos componentes intra-articulares que limita os movimentos da articulação femorotibiopatelar (FTP), restringe o deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur, a rotação interna da tíbia, bem como a hiperextensão articular (ARNOCZKY; MARSHALL, 1977).

A insuficiência do ligamento cruzado cranial (ILCCr) é causa comum da claudicação do membro pélvico dos cães (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009; CHRISTOPHER; BEETEM; COOK, 2013; MUIR, 2018). De forma geral, o exame físico/ortopédico tem como objetivo avaliar a claudicação, a qualidade do apoio, a atrofia muscular, a presença de movimento de gaveta (positivo ou cranial) pelo deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur, a rotação interna da tíbia, a sensibilidade à palpação da articulação, crepitação e espessamento da cápsula articular, bem como o teste de compressão tibial (CHIERICHETTI et al., 2001; MUZZI et al., 2003; ROMANO et al., 2006).

Atualmente, a instabilidade da articulação FTP pode ser tratada com o uso de técnicas intra e extracapsulares e, mais recentemente, com as osteotomias corretivas (JERRAM; WALKER, 2003; ROMANO et al., 2006). Nos Estados Unidos, estima-se que o gasto anual com esta afecção seja superior a 1,3 bilhões de dólares com tendência ao crescimento desde então (WILKE et al., 2005).

Um grande número de diferentes procedimentos cirúrgicos tem sido descrito para o tratamento da instabilidade articular em cães. No entanto, a opção mais adequada de tratamento ainda permanece controversa (MUIR, 2018).

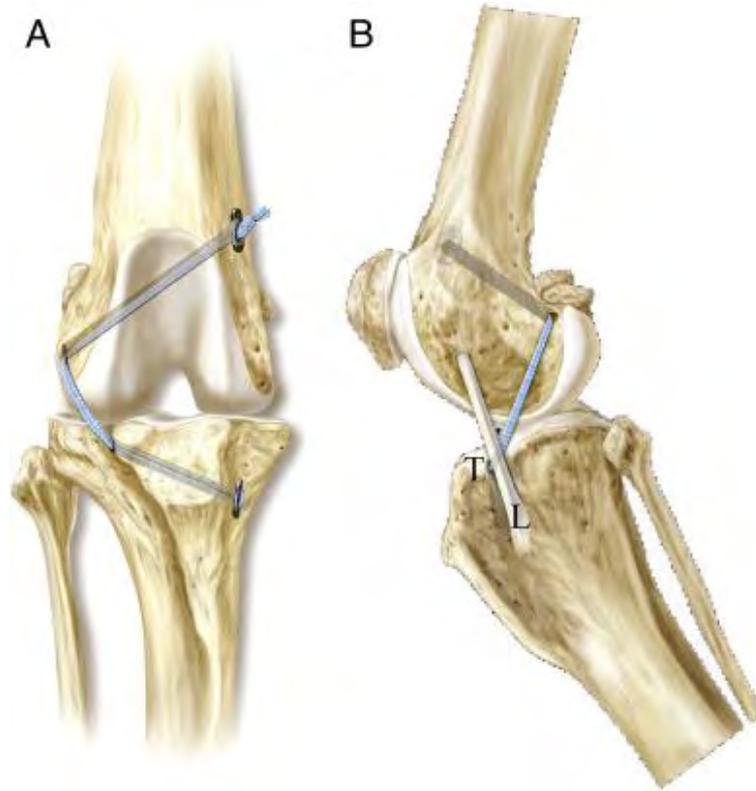
Independentemente do procedimento cirúrgico escolhido para o tratamento da ILCCr, o objetivo fundamental é estabilizar a articulação, promover o alívio da dor e, principalmente, prevenir ou mesmo retardar a progressão da doença articular degenerativa (DAD) (BARAÚNA JÚNIOR et al., 2007; BIASI et al., 2002).

O tratamento com o uso de técnicas extracapsulares requer instrumentos menos especializados para a sua aplicação, é mais acessível, e apresenta excelente custo-benefício (BARAÚNA JÚNIOR et al., 2007).

A técnica de TightRope (Figura 1) é um método de estabilização extracapsular minimamente invasivo, que emprega fita ultrapolietileno resistente,

com âncoras confeccionados em titânio, colocados em pontos isométricos ao nível do fêmur distal e da tíbia proximal, que anulam o movimento de gaveta cranial com menor risco de ocorrência de complicações (COOK et al., 2010).

Figura 1 - Técnica de TightRope. (A) Vista cranial; (B) Vista lateral



Fonte: Cook et al. Clinical comparison of a novel extracapsular stabilization procedure and tibial plateau leveling osteotomy for treatment of cranial cruciate ligament deficiency in dogs, 2010.

Quanto ao pleno retorno da função e a prevenção da doença articular degenerativa da articulação FTP com ILCCr, não há procedimento cirúrgico que seja totalmente satisfatório (BARAÚNA JÚNIOR et al., 2007). Sendo assim, propõe-se com este estudo analisar a viabilidade de fios de poliamida nacional (Araty® - superflex) e importado (Otoni® - Platinum) como alternativa para a técnica de TightRope modificada no tratamento de insuficiência do ligamento cruzado cranial espontâneo em cães.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a viabilidade de fios de poliamida nacional e importado como opção para a técnica de TightRope no tratamento da insuficiência do ligamento cruzado cranial espontâneo em cães.

2.2 Específicos

- Confeccionar um dispositivo de acomodação que mantém o comprimento inicial dos fios de poliamida nacional e importado na ocasião da esterilização por meio de autoclave;
- Analisar, por meio de ensaios mecânicos destrutivos de tensão, os fios de poliamida nacional e importado autoclavados e não autoclavados;
- Determinar o limite elástico dos fios de poliamida antes e após a esterilização por autoclave;
- Analisar, por meio de ensaio biológico, o efeito citotóxico dos fios de poliamida nacional e importado autoclavados e não autoclavados;
- Analisar, por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as superfícies transversas dos fios de poliamida nacional e importado autoclavado e não autoclavados;
- Analisar, por meio da técnica de infravermelho, a estrutura molecular dos fios de poliamida nacional e importado autoclavados e não autoclavado.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos morfológicos e funcionais do ligamento cruzado cranial

A estabilidade da articulação FTP está diretamente ligada à integridade do LCCr. Sua lesão, afecção ortopédica comum nos cães, pode ser uma ruptura completa com instabilidade nítida ou uma ruptura parcial com instabilidade em menor grau. Em ambos os casos, os animais não tratados exibem alterações articulares degenerativas dentro de poucas semanas e alterações graves dentro de poucos meses (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009).

O LCCr é dividido nas bandas craniomedial e caudolateral, que possuem diferentes pontos de inserção no platô tibial. Sua atuação primária é na limitação da translação cranial da tíbia em relação ao fêmur. A banda craniomedial está tensa durante todas as fases da flexão e da extensão; a banda caudolateral está tensa na extensão, mas torna-se relaxada na flexão (FOSSUM, 2014).

O comprimento do LCCr está relacionado positivamente com o peso corporal, sendo o comprimento médio de suas bordas cranial e caudal 13,5 e 18,7 mm, respectivamente (COMERFORD et al., 2005; DORLOT et al., 1980; VASSEUR et al., 1985; WINGFIELD et al., 2000;).

A banda craniomedial é menor, surge na região mais proximal do fêmur e se insere mais cranialmente na área do platô tibial, se comparada com a banda caudolateral. As fibras da banda caudolateral se originam da parte mais lateral e distal em sua área de fixação no côndilo lateral do fêmur, têm um trajeto reto e se inserem na região mais caudal do platô tibial (ARNOCZKY; MARSHALL, 1977).

Os ligamentos cruzados, cranial e caudal, juntos, fornecem importante restrição secundária contra a angulação varo e valgo. Eles se tornam forças primárias contra estas angulações caso ocorra a perda do suporte dos ligamentos colaterais do joelho (VASSEUR; ARNOCZKY, 1981).

Mecanorreceptores e terminações nervosas aferentes foram identificados nas camadas interfibras do LCCr. A inervação do ligamento serve como um mecanismo de feedback proprioceptivo, que previne a flexão ou a extensão excessiva da articulação do joelho. Esta ação protetora é atingida pela

estimulação ou pelo relaxamento dos grupos musculares que proporcionam suporte à articulação (FOSSUM, 2014).

A ruptura do LCCr ocorre predominantemente na região média desta estrutura. Alm, Ekström e Strömberg (1974) relataram 93,7% das rupturas no terço médio e Vasseur et al. (1985), 89,2%. Este fato pode estar relacionado ao que foi observado por Coetzee e Lubbe (1995) que relataram ser nessa região que os ligamentos cranial e caudal se cruzam durante os movimentos de flexão e extensão do membro e isto gera uma compressão excessiva neste local, diminuindo o suprimento sanguíneo e aumentando a tensão mecânica, predispondo à ruptura.

Há uma série de fatores não relacionados a doenças que afetam as propriedades biomecânicas dos ligamentos, incluindo idade, peso corporal, fenótipo, uso/desuso e se os animais foram castrados ou não (DUVAL et al. 1999; LAROS; TIPTON; COOPER, 1971; VASSEUR et al. 1985).

Vasseur et al. (1985), demonstraram consistentemente que ocorrem alterações degenerativas e declínio nas propriedades físicas (força) do ligamento em cães com mais de 5 anos de idade.

A gravidade da degeneração parece ser diretamente proporcional ao tamanho corporal, com animais acima de 15 kg mostrando maiores alterações (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009). Whitehair, Vasseur e Willits (1993), associaram fortemente a obesidade com a ruptura do ligamento cruzado cranial, em virtude da excessiva carga que o ligamento sofre durante a marcha.

O mecanismo exato de lesão ainda não é totalmente compreendido. Nos casos de ruptura traumática aguda, acredita-se que a lesão esteja relacionada às funções normais do ligamento: na maioria das vezes, o ligamento é lesionado quando o joelho é girado rapidamente com a articulação em 20 a 50 graus de flexão ou quando o joelho é hiperestendido (ARNOCZKY, 1988). Isso causa extrema rotação interna da tíbia com estresse no ligamento cruzado cranial. A hiperextensão ocorre mais frequentemente quando o cão pisa em um buraco ou depressão em marcha rápida.

Acredita-se que a causa de lesão mais comum seja um processo degenerativo progressivo que leva a uma ruptura parcial ou total do ligamento (HAYASHI, 2003).

A resistência do ligamento cruzado cranial vem sendo medida há anos por meio dos mais diversos aparelhos e das mais variadas formas (DORLOT et al., 1980; O'DONOGUE et al., 1966; RYAN; DROMPP, 1966).

Segundo Gupta, Brinker e Subramanian (1969), a força necessária para romper o LCCr deve ser de aproximadamente 4 vezes o peso corporal em Newtons, ou seja, para cães de 10 kg, por exemplo, a força necessária seria de, aproximadamente, 400 N.

Brendolan, Rezende e Pereira (2001), chegaram a um valor de 661 N para a falência total do LCCr em cães com peso médio de 11,8 kg, ou seja, neste estudo, a relação força máxima de ruptura em Newtons/peso do animal em Kg, seria de aproximadamente 60 N/kg, diferente de Gupta, Brinker e Subramanian (1969), que foi de 40N/kg e aproximadamente a metade do valor de encontrado por Dorlot et al. (1980) e Comeford et al. (2005) que chegaram a valores de aproximadamente 27 N/kg. Já Wingfieg et al. (2000) ao compararem a resistência do LCCr em cães da raça Rottweiler e Greyounds de corrida, chegaram a um valor de 48 N/kg para o primeiro e 55 N/kg para o segundo, indicando que pode existir uma variação entre as diferentes raças caninas.

O LCCr, assim como todos os tecidos moles conjuntivos colágenos, é considerado um material viscoelástico, que exhibe propriedades tanto viscosas quanto elásticas quando submetido à deformação e, portanto, possui comportamento mecânico tempo-dependente (SAMPLE, 2018).

Como os ligamentos são projetados para transferir carga de osso para osso em uma direção longitudinal, testes de tração uniaxial são usados para caracterizar as propriedades estruturais e materiais do ligamento usando as curvas força-deformação e tensão-deformação, respectivamente (SAMPLE, 2018).

3.2 Opções para a correção da insuficiência do ligamento cruzado cranial

Com o objetivo de restaurar a estabilidade anatômica das articulações, inúmeras técnicas cirúrgicas vêm sendo desenvolvidas desde o início da década de 1960 (MUIR, 2018). Embora as técnicas cirúrgicas variem, o objetivo principal da maioria dos procedimentos é eliminar a subluxação tibial cranial e limitar a

rotação interna da tíbia durante a movimentação da articulação (WARZEE, 2001).

As técnicas mais atuais, denominadas periarticulares, utilizam osteotomias corretivas com objetivo de obter estabilidade dinâmica do joelho pela alteração da geometria óssea (KIM et al., 2008). Dentre estas técnicas destacam-se o avanço da tuberosidade tibial (TTA) e a osteotomia de nivelamento do platô tibial (TPLO).

Apesar de serem atuais e muito utilizadas por cirurgiões veterinários, alguns estudos e relatos de casos vem associando o uso dos implantes metálicos, utilizados nas técnicas de TTA e TPLO, com a ocorrência de neoplasias ósseas, principalmente o osteossarcoma. Em um estudo retrospectivo de casos ocorridos entre 1983 e 2013, Burton et al. (2015), encontraram 16 ocorrências de neoplasias ósseas caninas associadas a implantes metálicos, sendo o osteossarcoma a neoplasia mais prevalente.

Selmic et al. (2014), analisando cães que foram submetidos à técnica de estabilização periarticular de nivelamento do platô tibial (TPLO), entre os anos de 1997 e 2011, encontraram 29 casos de osteossarcoma localizados na porção proximal da tíbia desses animais, sugerindo assim uma relação entre o uso do implante metálico e o desenvolvimento da neoplasia.

A associação entre o aparecimento do osteossarcoma e o implante metálico utilizado para o tratamento de RLCCr, estabilizado com a técnica do avanço da tuberosidade tibial (TTA), também foi relatada por Dunn et al. (2012), em que um cão da raça malamute do Alaska apresentou esta neoplasia óssea 20 meses após ser submetido ao procedimento cirúrgico.

A técnica TightRope é um método de estabilização extracapsular menos invasivo que as osteotomias proximais da tíbia utilizadas para estabilizar articulação FTP com ILCCr. Num estudo prospectivo (COOK et al., 2010) onde se comparou o resultado de 24 pacientes submetidos à TightRope, e 23 pacientes submetidos à TPLO, a TightRope mostrou-se menos invasiva, de menor dificuldade técnica relativa, e menos dispendiosa, comparativamente à TPLO. As taxas de complicações (12,5% TightRope, 17,4% TPLO), incluindo lesão meniscal secundária (8,3% TightRope, 8,4% TPLO) foram semelhantes entre as duas técnicas. Os autores concluíram que a TightRope pode ser executada com sucesso em pacientes de raças médias, grandes e gigantes, e

que o resultado aos 6 meses é comparável ao da TPLO, sendo tão bom ou melhor no que concerne a função do membro e progressão radiográfica de osteoartrite (COOK et al., 2010).

Vários materiais sintéticos, aloenxertos e autoenxertos foram testados em experimentos com animais, mas nenhum mostrou ser mecanicamente equivalente ao LCCr intacto. Um dos principais desafios ao usar enxertos na substituição do LCCr em cães é a falta de força que estes exibem ao longo do tempo (CURTIS; DELEE; DREZ, 1985; MCFARLAND et al., 1986; VASSEUR et al., 1985; YOSHIYA et al., 1986).

Nas técnicas extracapsulares, que utilizam suturas de estabilização, vários tipos de materiais têm sido utilizados. O uso de materiais de sutura absorvíveis foi relatado, mas estes tipos de sutura não fornecem restrição prolongada ao movimento anormal (KORVICK; JOHNSON; SCHAEFFER, 1994).

Materiais de sutura não-absorvíveis multifilamentares têm sido usados e fornecem restrição prolongada ao movimento anormal de gaveta, entretanto, o uso destes tipos de materiais tem sido associado com uma alta incidência de infecção pós-operatória e formação de fístulas (DEANGELIS; LAU, 1970; DULISCH, 1981; GAMBARDELLA; WALLACE; CASSIDY, 1981).

O método de fixação destas suturas ao osso, também vem sendo discutido ao longo dos anos. A utilização de ancoras ósseas em pontos isométricos é uma alternativa ao uso de cavilhas. Roca et al. (2020) concluíram que a fita ultrapolietileno resistente, ancoradas com parafusos ao fêmur de raças toy é uma alternativa viável às cavilhas de metal, normalmente utilizadas na técnica de TightRope.

Nwadike e Roe (1998), destacam ainda que a estabilização extracapsular da articulação do joelho em cães com ruptura do ligamento cruzado cranial requer o uso de um material forte com mínima aderência bacteriana e mínima deformação plástica.

3.3 A poliamida como alternativa cirúrgica

Vários tipos de materiais têm sido propostos para uso protético na estabilização da articulação do joelho canino utilizando as técnicas

extracapsulares (CHILDERS, 1966; COOK et al., 2010; KORVICK; JOHNSON; SCHAEFFER, 1994; LEWIS; MILTHORPE; BELLENGER, 1997).

Um material protético ideal deve possuir propriedades como: resistência, ser biologicamente inerte, mínima aderência bacteriana, poder ser esterilizado, de fácil manuseio, baixo custo, excelente segurança e compactação do nó e capacidade de suportar cargas cíclicas e de tração (BANWELL et al., 2005; NWADIKE; ROE, 1998).

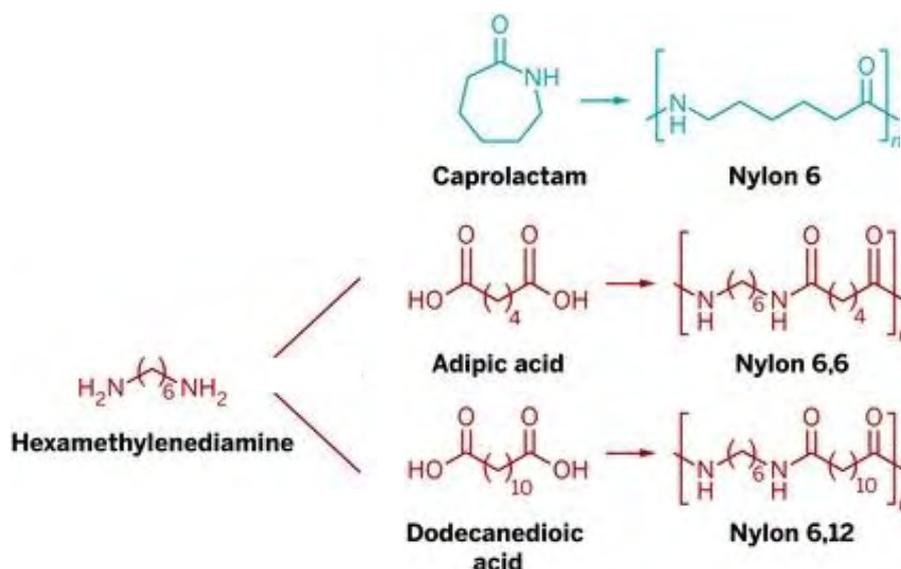
À medida que a estabilização extracapsular da articulação do joelho, com o uso de material sintético progrediu, vários fatores que afetam a técnica têm sido avaliados, incluindo o tipo de material a ser utilizado, os métodos de esterilização deste material, qual o melhor método de ancoragem para esses materiais, tipos de nós utilizados, local de inserção e posição do joelho no momento da estabilização (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009; COOK et al., 2010; DULISH, 1981; FLO, 1975; GAMBARDELLA; WALLACE; CASSIDY, 1981; HARPER et al., 2004; ROE; KUE; GEMMA, 2008).

Biomateriais como as poliamidas, possuem excelentes propriedades em termos de resistência mecânica, flexibilidade e tenacidade o que tornam esses polímeros especialmente interessantes como componentes de automóveis, aeronaves, dispositivos, componentes de engenharia e no setor médico (WINNACKER, 2017).

Fios de poliamida fabricados para a pesca, tem sido defendido ao longo dos anos para estabilização extracapsular da articulação do joelho canino (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009; BUDSBERG et al., 1988; CAPORN; ROE, 1996; ELKINS et al., 1991). Estes fios são um copolímero do náilon 6 e náilon 6,6, enquanto as chamadas “leader lines” são compostas por náilon 6,12 (CAPORN; ROE, 1996).

A família das poliamidas (Figura 2) é composta por diferentes polímeros identificados pelo número de grupos metil que existem nos dois lados dos átomos de nitrogênio (grupos amida) e têm suas propriedades influenciadas pelo número de unidades deste grupamento (SILVA; TOGNANA; SALGUEIRO, 2013).

Figura 2 - Principais grupos de poliamidas usados na fabricação das linhas de pesca.



Fonte: modificado de <https://cen.acs.org/articles/91/i7/Inside-Race-Replace-Nylon-12.html>

Supõe-se que os fios de náilon tenham resistência mecânica comparável às suturas não absorvíveis multifilamentares (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009; CAPORN; ROE, 1996; ELKINS et al., 1991) mas é menos provável que abriguem bactérias ou se tornem infectado (CAPORN; ROE, 1996; KORVICK; JOHNSON; SCHAEFFER, 1994). Além disso, a disponibilidade do fio de náilon cirúrgico de diâmetro superior a 0,40 mm no mercado nacional médico-hospitalar é bastante limitada (BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009; BUDSBERG et al., 1988; CAPORN; ROE, 1996; ELKINS et al., 1991; FIROUZI et al., 2014; KORVICK; JOHNSON; SCHAEFFER, 1994).

Sicard et al. (1999) demonstraram significativa diferença na força máxima de ruptura e deformação entre diferentes marcas de fio de poliamida utilizados para pesca, sugerindo que, além do tipo de material usado, a marca pode ser importante fator a se considerar nos procedimentos cirúrgicos ortopédicos em que se faz necessário o uso destes fios.

As propriedades mecânicas do fio de náilon monofilamentar e os efeitos dos métodos de esterilização comumente empregados neste material têm relevância clínica para os cirurgiões veterinários (CAPORN; ROE, 1996). Lewis, Milthorpe e Bellenger (1997) indicaram que a esterilização por óxido de etileno é preferível à esterilização a vapor e quando esta última é a escolhida, o fio não deve ser esterilizado mais de uma vez.

Os materiais poliméricos são sensíveis às altas temperaturas e ao ambiente, o que pode comprometer seu desempenho mecânico (ROE; KUE; GEMMA, 2008). Isso é corroborado por Sicard, Hayashi e Manley (2002), que verificaram que a linha de pesca esterilizada em autoclave apresenta significativo aumento na deformação máxima se comparada com o mesmo material não esterilizado ou esterilizado com óxido de etileno, sendo que os dois últimos grupos não apresentaram diferença significativa entre eles.

Um biomaterial ideal para ser utilizado na reparação de estruturas que suportam pouca deformação, como os ligamentos, tem que trabalhar dentro de sua fase elástica (fase de proporcionalidade), ou seja, quando submetido a força de tração, retorna à sua forma inicial (MORAES et al., 2003).

Lewis, Milthorpe e Bellenger (1997) chegaram a resultados que sugerem que o náilon monofilamentar é um material superior ao polipropileno ou ao poliéster multifilamentar revestido por polibutilato para a estabilização do LCCr baseados nas propriedades mecânicas superiores que este material possui.

4. JUSTIFICATIVA

Os fios de poliamida, que poderão ser utilizados na técnica de TightRope modificada, são de baixo custo e amplamente empregados como biomaterial na medicina veterinária. Eles apresentam características como mínima reação tecidual e boa resistência à tração que o credenciam a ser um bom substituto ao fio utilizado originalmente na técnica de TightRope. Assim, a determinação da viabilidade dos fios de poliamida nacional e importado como opção para a técnica de TightRope no tratamento de ILCCr espontâneo em cães, torna-se necessária, pois o uso empírico desses biomaterias, frequentemente empregados em procedimentos na rotina cirúrgico-ortopédica veterinária, podem comprometer ainda mais a articulação FTP do paciente, quando não utilizados de maneira correta. Além disso, a caracterização do fio de poliamida permite que este seja utilizado, não somente como substituto à técnica de TightRope mas também embasa cientificamente sua utilização em qualquer outro procedimento clínico/cirúrgico que se fizer necessário.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Fio de poliamida (biomaterial)

Os fios de poliamida, nacional (Araty® superflex, monofilamento poliamida, Brasil) e importado (Ottoni® Platinum XT, monofilamento poliamida, Japan) testados, possuíam diâmetro de 0,40, 0,60 e 0,80 mm, para os testes mecânicos e de espectroscopia no infravermelho, 0,40 mm na análise de microscopia eletrônica de varredura e 0,60 mm nos testes de citotoxicidade.

5.2 Dispositivo para a acomodação do fio de poliamida

Para que não sofressem redução de seu comprimento durante o processo de esterilização, os fios de poliamida, antes de serem embalados em grau cirúrgico, foram colocados em um dispositivo de acomodação, especialmente desenvolvido para este fim. Tal dispositivo possui uma haste tubular de aço inoxidável (500 mm de comprimento X 7 mm de diâmetro), conectada transversalmente a dois cilindros de poliamida (50 mm de comprimento X 16 mm de diâmetro) com dois parafusos cilíndricos de aço inoxidável utilizados para prender as pontas dos fios de poliamida. Além disso, dentro do furo central dos cilindros de poliamida existia um elemento elástico com a função de permitir a acomodação do fio de sutura durante o processo de esterilização, evitando-se assim sua ruptura. Para comprovar a eficácia do dispositivo em manter o comprimento dos fios de poliamida após serem esterilizados em autoclave, os mesmos foram submetidos a este processo sem o uso do dispositivo e então comparados com os fios de mesmo comprimento (10 cm) que não foram autoclavados.

5.3 Esterilização dos fios de poliamida com uso de autoclave

Os fios de poliamida nacional e importado utilizados neste estudo, após serem acomodados no dispositivo, foram embalados em papel grau cirúrgico (Cipamed®, Ribeirão Preto/SP, Brasil) e esterilizados em autoclave (Stermax®, modelo digital, 60 litros, horizontal, Curitiba/PR, Brasil) à 121°C por 15 minutos

de exposição. A esterilização foi realizada no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT/ZMV) da FZEA/USP, em Pirassununga – SP.

5.4 Análise pela microscopia eletrônica de varredura da superfície dos fios de poliamida

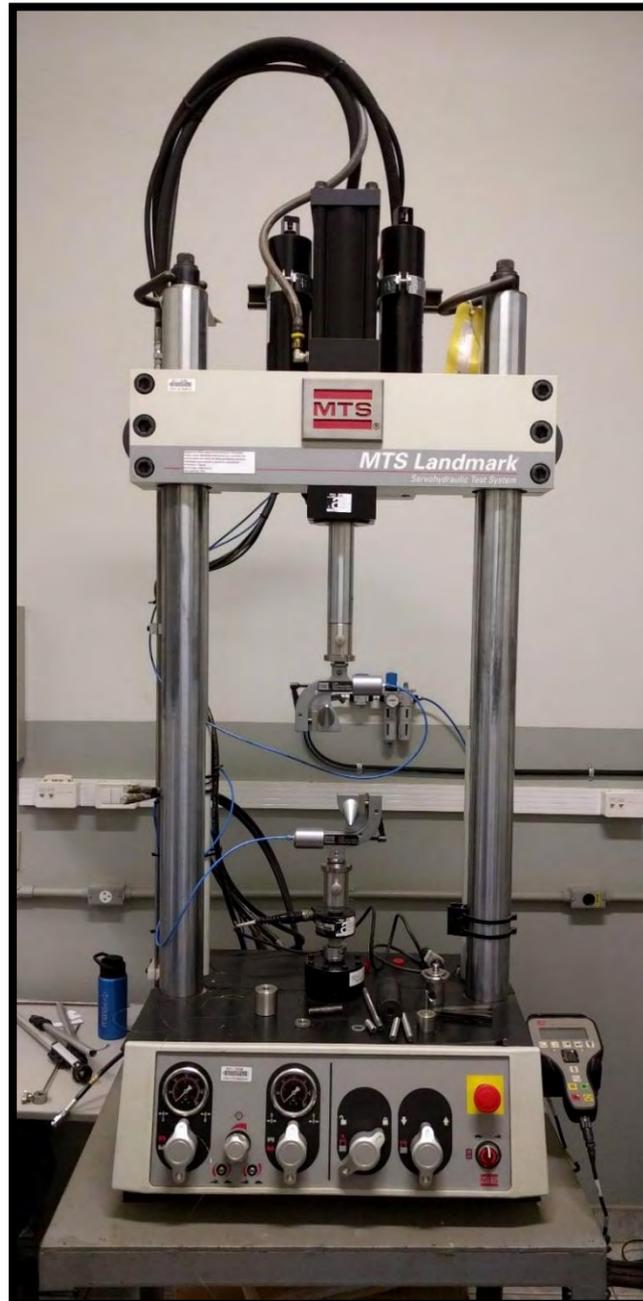
As superfícies transversas preparadas e polidas dos fios de poliamida nacional/importado autoclavados e não autoclavados de 0,40 mm de diâmetro foram fixadas em portas amostras com fita condutora de carbono, acomodadas em câmara de baixo vácuo e submetidas à análise de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), com detector – BSD (elétrons retroespalhados), sob tensão de aceleração de 15Kv (Hitachi®, TM3000, Japão). A superfície longitudinal dos fios também foi examinada a fim de se identificar qualquer tipo de irregularidade que pudesse evidenciar mudanças físicas durante o processo de esterilização por autoclave. Com os cortes transversais também foi possível obter o diâmetro exato do fio antes e após a esterilização em autoclave com a utilização ou não da haste de acomodação. As análises foram realizadas nas dependências da FZEA/USP por meio do plano de gestão de uso (MEV-EMU) desta mesma unidade.

5.5 Ensaios mecânicos destrutivos dos fios de poliamida

Os testes mecânicos dos fios de poliamida nacional/importado autoclavados (n=6) não autoclavados (n=6) foram realizados em máquina servo-hidráulica com capacidade de 15 kN, para ensaios de tração, flexão, compressão monotônicos ou cíclicos, modelo 370.02, fabricante MTS (Figura 3), com sistema de refrigeração modelo SAT.005AR, marca Refrisat, dotada de células de cargas de 200N para o fio de 0,40 mm de diâmetro e 1000N para os fio de 0,60 e 0,80 mm de diâmetro, com deslocamento de 4 mm/segundo ou 240 mm/minuto, até falência total dos biomateriais, ou seja, rupturas. Para isso, as extremidades dos fios (com aproximadamente 15 cm de comprimento) foram fixadas, por meio de garras hidráulicas próprias para esta função (Figura 4), com pressão de 3 bar para os fios de 0,40 e 0,60 mm e de 4 bar para o fio de 0,80 mm de diâmetro, afim de se evitar, ao mesmo tempo, o escorregamento e o esmagamento dos

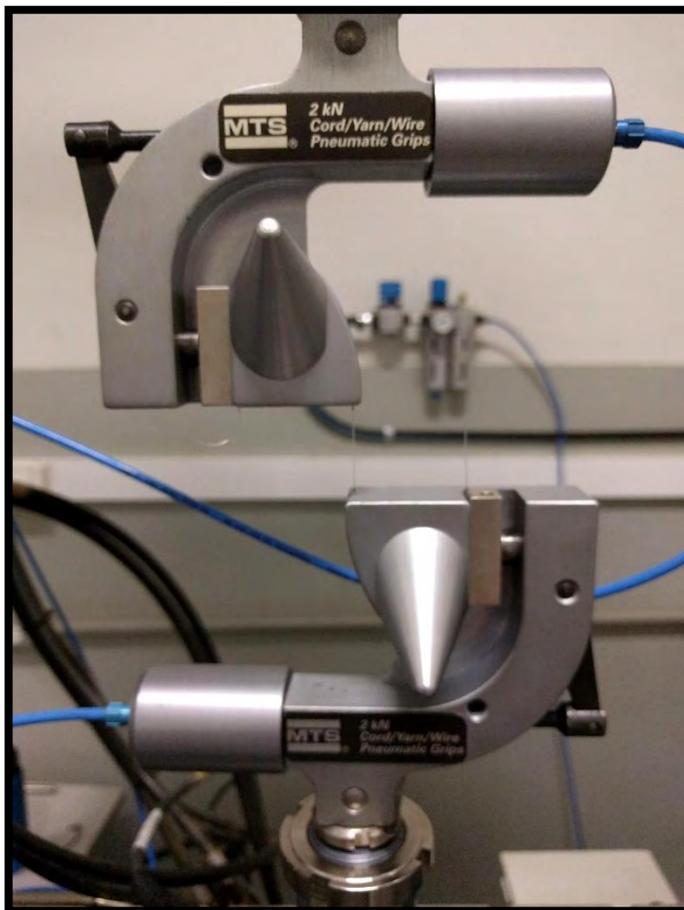
mesmos, sendo que os fios permaneceram a uma distância inicial (vão livre) de 30 mm (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13904, 2003).

Figura 3 - Máquina servo-hidráulica da marca MTS utilizada nos ensaios mecânicos destrutivos (falência) dos fios de poliamida nacional e importado.



Fonte: Própria autoria

Figura 4 - Garra utilizada no ensaio mecânico destrutivo dos fio de poliamida nacional e importado.



Fonte: Própria autoria

A máquina foi acoplada ao computador por meio de sistema de aquisição de dados (MTS FlexTest® Controller Software, USA) permitindo gravação em tempo real das variáveis força (N) e deslocamento (mm) (FRANÇA et al., 2008; ROMANO et al., 2006; SARDENBERG et al., 2003).

A partir dos dados obtidos para cada um dos fios testados, procedeu-se média aritmética desses valores gerando um único gráfico médio para cada um dos fios testados. A análise da região mais retilínea deste gráfico, ou seja, a fase de proporcionalidade do fio, que retorna ao seu formato inicial após ser submetido a determinada força será, portanto, a região que compreende a fase elástica.

Os ensaios foram realizados em condições controladas de temperatura (aproximadamente 25°C) no Laboratório de Construções Rurais e Ambiente (CONSTRAMBI/ZEB) da FZEA/USP, em Pirassununga – SP.

5.6 Análise de citotoxicidade indireta dos fios de poliamida

O ensaio de citotoxicidade indireta foi realizado em triplicata, nos fios de poliamida nacional/importado autoclavados e não autoclavados com 0,60 mm de diâmetro e em uma amostra de fio cirúrgico de náilon “0” (Shalon®, Goiânia/GO, Brasil) com aproximadamente 0,35 mm de diâmetro, como forma de comparação. Para os fios de 0,60 mm de diâmetro e 0,35 mm de diâmetro (fio cirúrgico) utilizou-se a concentração de 6 cm²/mL e 3 cm²/mL, respectivamente, e para o polietileno, usado como controle negativo, utilizou-se a concentração de 0,1 g/mL, sendo o meio diluente DMEN-F12 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 10993 - 5, 2009). Com os valores obtidos, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células, sendo considerados com potencial citotóxico, materiais com valores inferiores a 70%. O preparo das amostras foi realizado no Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT/ZMV) da FZEA/USP, em Pirassununga – SP.

Linhagem e cultivo celular

Foram utilizadas células da linhagem L929 compostas por fibroblastos de camundongo (FIROUZE et al., 2014) cultivadas em meio de cultivo DMEN F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina).

Para preparar o meio de cultivo, foram utilizados 17,8 ml do meio DMEN F-12, 2 mL (10%) de soro fetal bovino e 0,2 mL (1%) de solução antibiótica, totalizando 20 mL do meio.

Foram separados 10 mL de meio completo em um tubo Falcon® de 15mL e o criotubo, contendo a linhagem de células L929, foi descongelado à temperatura ambiente, até que restasse apenas uma pequena quantidade de

gelo no fundo do mesmo. A suspensão de células foi transferida para o tubo com o meio preparado anteriormente, identificado e levado à centrifuga a 2000 rpm por cinco minutos. Após este procedimento, o meio foi desprezado e as células ficaram aderidas ao fundo do Falcon®.

Os 10 mL de meio restantes foram adicionados ao Falcon® que foi então homogeneizado e o conteúdo total foi realocado para uma garrafa de 75 cm², homogeneizado e levado à estufa (Panasonic® CO₂ incubator, MCO-18ACL, North America) à 37° C e 5% de CO₂, por pelo menos 12 horas.

Plaqueamento celular

Antes de iniciar o procedimento de plaqueamento celular, as soluções de PBS (Tampão fosfato-salino ou “Phosphate Buffered Saline”) e de tripsina foram retiradas da refrigeração e descongeladas em banho maria, à 37°C.

Foram preparados 50 mL de meio de cultivo sendo 5 mL de soro fetal bovino (10%), 500 µL (1%) de solução de antibiótico (100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e 44,5 mL do meio DMEN F-12. A solução foi levada ao banho maria à 37°C por, aproximadamente, 10 minutos.

A garrafa de cultivo, anteriormente preparada, foi retirada da estufa e o meio constante desprezado. Foram adicionados 4 mL de PBS (descongelado anteriormente) à mesma, homogeneizado e o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido para garantir a retirada de todo o meio anteriormente presente.

A fim de desprender as células em cultivo do fundo da garrafa, foram adicionados 2 mL de tripsina à mesma, que foi então homogeneizada e levada à estufa (37°C e 5% de CO₂) por, aproximadamente, 10 minutos. Após o descolamento das células, foram adicionados 10 mL de meio completo (preparado anteriormente) à garrafa com a finalidade de inativar a tripsina (que pode ser tóxica às células se em contato por muito tempo). Todo o conteúdo foi então transferido para um Falcon® de 15 mL.

Contagem celular em Câmara de Neubauer

O conteúdo de 10µL do Falcon® (anteriormente preparado) foi transferido para um microtubo e acrescentou-se 10 µL de azul de tripan (Invitrogen®, Califórnia, USA). Esta solução foi homogeneizada e 10 µL foram transferidos para a câmara de Neubauer. Foram contados o número total de células presentes nos quatro quadrantes externos da câmara (superior e inferior esquerdos e superior e inferior direitos) e a concentração de células da amostra foi calculada seguindo a fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ células totais}}{\text{n}^\circ \text{ quadrantes}} \times \text{diluição} \times 10^4 = \text{células/mL}$$

Em uma placa de cultivo com 96 poços de fundo chato (Global Plast, China), todos os poços das laterais foram preenchidos com 100 µL de água esterilizada (autoclavada) para evitar o ressecamento da mesma durante o período de incubação. A segunda coluna da placa, que não contém água, foi preenchida apenas com meio, o restante da placa (da 3ª à 11ª coluna) foi preenchida com meio + células, utilizando a diluição de 5×10^3 células a cada 100 µL e a placa foi levada à estufa (37°C e 5% de CO₂) por 24 horas.

Contato células/amostra

As amostras sob análise (fios de poliamida) foram cortadas, com tamanho aproximado de 10 mm de comprimento, para que assim ficassem totalmente submersas pelo meio diluente (DMEN F-12), respeitando a concentração determinada para cada amostra, assim como para o controle negativo (polietileno) que foi cortado em pequenos blocos de 2 mm x 2 mm x 2 mm (Figura 5). Antes de entrar em contato com o meio, as amostras permaneceram por cerca de 10 minutos sob luz ultravioleta, dentro da câmara de fluxo contínuo, para eliminar possíveis contaminantes. Estas foram então transferidas para tubos Falcon® de 15 mL, cada qual com seu respectivo meio diluente e levadas à estufa por 24 horas à 37°C e 5% de CO₂.

Figura 5 - Amostras submersas em meio diluente para obtenção do extrato



Fonte: Própria autoria

A placa de cultivo, anteriormente colocada na estufa, foi analisada sob microscópio invertido de fase (Axio Vert A1, Zeiss, USA) a fim de se verificar a integridade das células (Figura 6).

Figura 6 - Confirmação da integridade celular sob microscopia invertida de fase



Fonte: Própria autoria

Após comprovada a viabilidade celular, o meio presente na placa de cultivo foi retirado e adicionou-se 100 µL dos extratos preparados anteriormente, em cada poço correspondente, como descrito a seguir:

- 2ª coluna: somente meio de cultivo
- 3ª coluna: meio de cultivo + células
- 4ª coluna: Polietileno (controle negativo)
- 5ª coluna: fio nacional autoclavado
- 6ª coluna: fio nacional não autoclavado
- 7ª coluna: fio importado autoclavado
- 8ª coluna: fio importado não autoclavado
- 9ª coluna: fio cirúrgico (monofilamento náilon preto)
- 10ª coluna: Dimetilsulfóxido (controle positivo)
- 11ª coluna: meio de cultivo + células

A placa de cultivo foi então colocada em estufa (37°C e 5% de CO₂), por 24 horas.

Ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

O sal tetrazolium é um substrato de cor amarelada, que é reduzida por células metabolicamente ativas, produzindo cristais de Formazan insolúveis (coloração azul/violeta) no interior das células. Estes cristais são liberados pelo rompimento das membranas celulares e dissolvidos para a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro/leitor de Elisa.

A diluição de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) utilizada foi de 5mg por mL de meio DMEM F-12 (o mesmo utilizado no cultivo celular) em quantidade suficiente para preencher todas as três placas utilizadas na análise dos fios. Após o preparado da solução a mesma foi filtrada e mantida ao abrigo da luz.

Foram pipetados 10 µL da solução de MTT em todos os poços, inclusive o branco (coluna somente com o meio de cultivo). A placa foi então homogeneizada e incubada em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas.

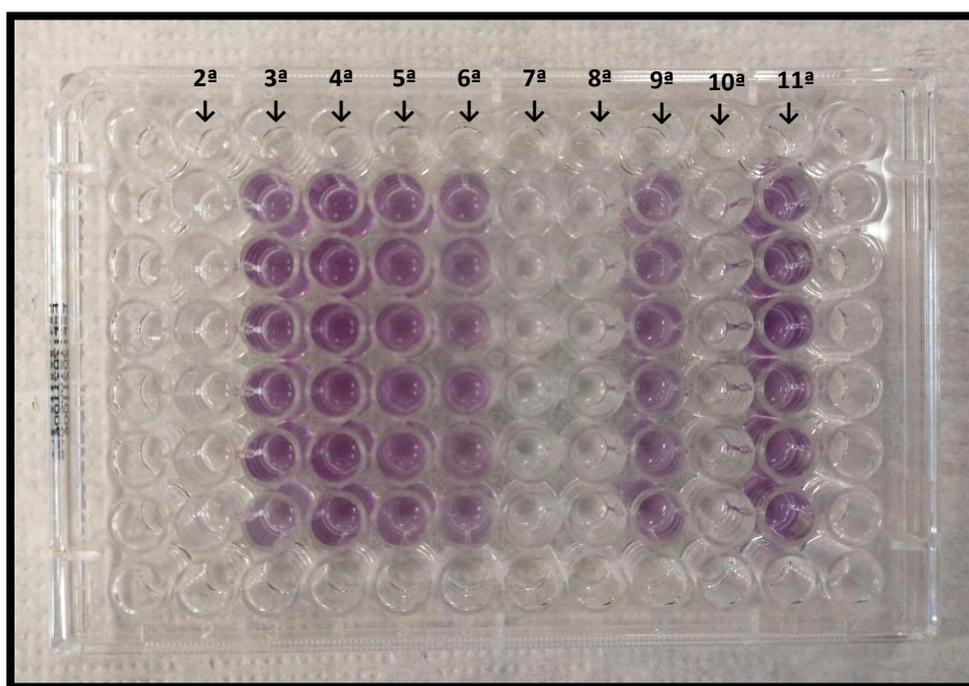
Após este período, o meio foi retirado da placa invertendo-se a mesma sobre um pedaço de papel (toalha ou higiênico). Este processo foi repetido por três vezes para assegurar que todo o meio fosse retirado.

A cada poço foi adicionado 100 μ L de álcool isopropílico + 0,04 molar de ácido clorídrico (HCl). A placa então foi homogeneizada até que todos os cristais de Formazan (metabolizados pela atividade celular) se dissolvam.

Leitura em espectrofotômetro

A placa (Figura 7) foi então analisada em espectrofotômetro (FLUOstar OPTIMA, bmg labtec, Alemanha) para a obtenção dos dados de densidade óptica utilizando absorvância em 570 nm. A análise da absorvância foi realizada no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD/ZMV) da FZEA/USP, em Pirassununga – SP.

Figura 7 - Placa de cultivo pronta para ser lida em espectrofotômetro. As colunas indicam os lugares correspondentes de cada amostra analisada, como citado anteriormente.



Fonte: Própria autoria

Cálculo da viabilidade celular

Após a leitura no espectrofotômetro dos valores obtidos de densidade óptica à 570 nm, as médias das triplicatas e conseqüentemente a porcentagem

da viabilidade celular de cada amostra foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade [\%]} = 100 \times \text{DO}_{\text{amostra}} / \text{DO}_{\text{controle}}$$

Onde: $\text{DO}_{\text{amostra}}$ = média da densidade óptica de cada amostra analisada

$\text{DO}_{\text{controle}}$ = média da densidade óptica do controle (meio + células)

5.7 Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os fios de poliamida nacional/importado autoclavados (n=1) e não autoclavados (n=1) de 0,40, 0,60 e 0,80 mm de diâmetro foram expostos a feixe de luz infravermelha, na região espectral de 4500 a 550 cm^{-1} , 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} para determinar quais frequências atravessam e quais frequências são absorvidas pelas amostras (PerkinElmer, SpectrumOne, USA). Antes de iniciar a análise a base da máquina que contém o cristal para a análise no infravermelho foi limpa com álcool 70% e papel para evitar interferências nos dados coletados. Essa análise, permite identificar e avaliar se a estrutura da molécula de poliamida presente no fio sofre, ou não, modificações na ocasião da esterilização por autoclave (LEITE; PRADO, 2012). As análises foram realizadas nas dependências da FZEA/USP através do plano de gestão de uso (MEV-EMU) desta unidade.

Figura 8 - Amostra de poliamida pronta para ser analisada por espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada (ATR).



Fonte: Própria autoria

5.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística empregando-se o software Statistical Analysis System (SAS 9.4, SAS Institute, USA). Para todas as análises foram realizadas o teste de pressuposição (teste de homogeneidade de variância e teste de normalidade dos resíduos). Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste F e pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

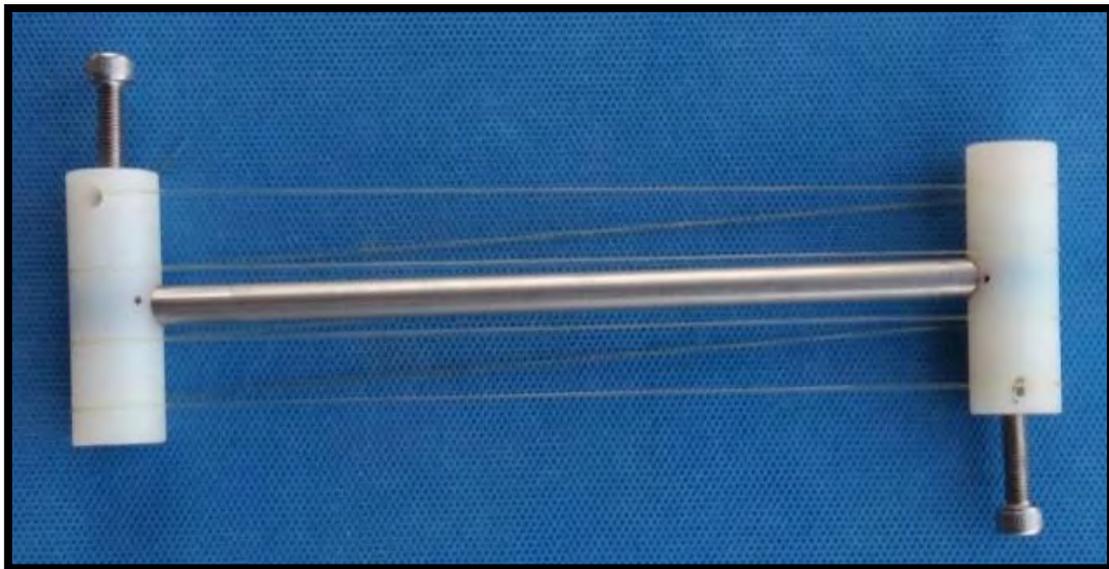
Quando os pressupostos da análise de variância não foram atendidos, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn foram aplicados, considerando o nível de significância de 5%.

6. RESULTADOS

6.1 Poliamida e dispositivo para esterilização

O dispositivo de acomodação, desenvolvido exclusivamente para este fim, pronto para ser embalado em papel grau cirúrgico e levado à autoclave, está representado na figura 9, a seguir.

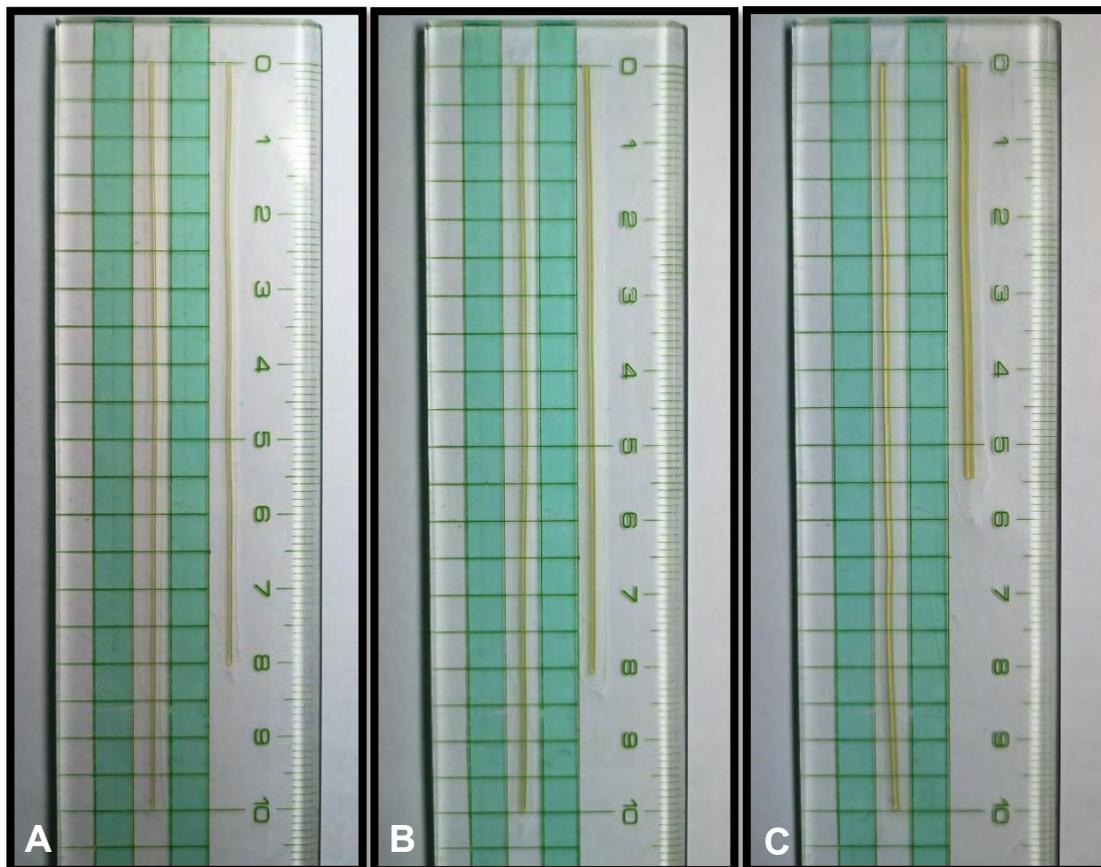
Figura 9 - Fio de poliamida acomodado sobre o dispositivo, pronto para ser embalado em papel grau cirúrgico e levado à autoclave.



Fonte: Própria autoria

Os resultados obtidos, sem o uso do dispositivo de acomodação, são representados nas figuras 10 e 11, a seguir.

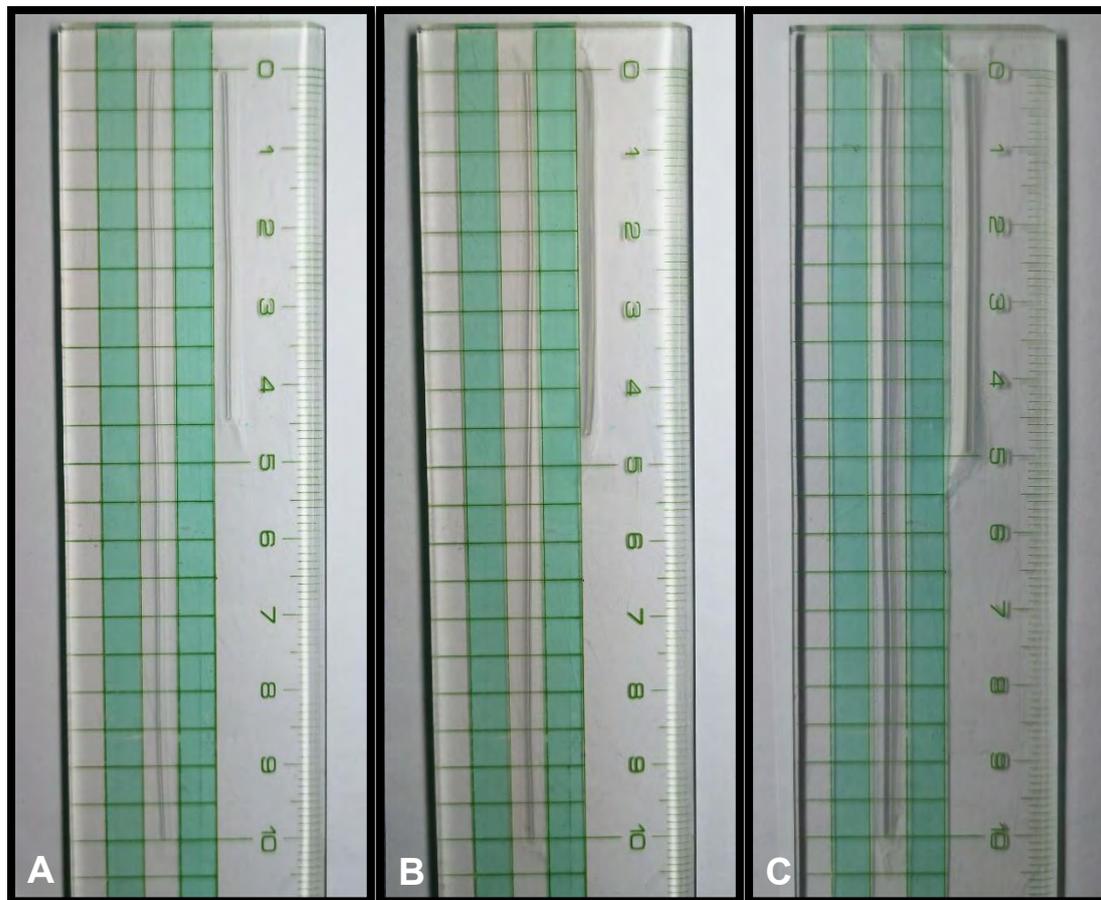
Figura 10 - Fio nacional (A) de 0,40 mm de diâmetro, (B) 0,60 mm de diâmetro e (C) 0,80 mm de diâmetro, com 10 cm de comprimento, não autoclavados (esquerda) e após o processo de autoclavagem sem o dispositivo (direita).



Fonte: Própria autoria

Nota-se uma redução do comprimento, na ordem de 20% para os fios nacionais de 0,40 mm de diâmetro e 0,60 mm de diâmetro e 45% para o fio de 0,80 mm de diâmetro.

Figura 11 - Fio importado (A) de 0,40 mm diâmetro, (B) 0,60 mm de diâmetro e (C) 0,80 mm de diâmetro, com 10 cm de comprimento, não autoclavados (esquerda) e após o processo de autoclavagem sem o dispositivo (direita).

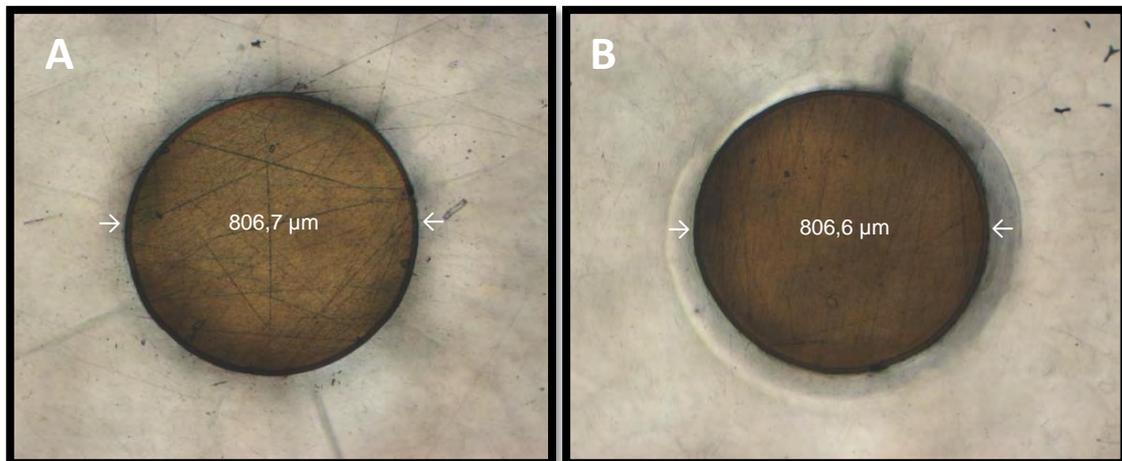


Fonte: Própria autoria

A redução de comprimento também pode ser observada nos fios importados autoclavados sem o dispositivo, sendo na ordem de 55% para os fios de 0,40 mm de diâmetro e 0,60 mm de diâmetro e de 50% para o fio de 0,80 mm de diâmetro.

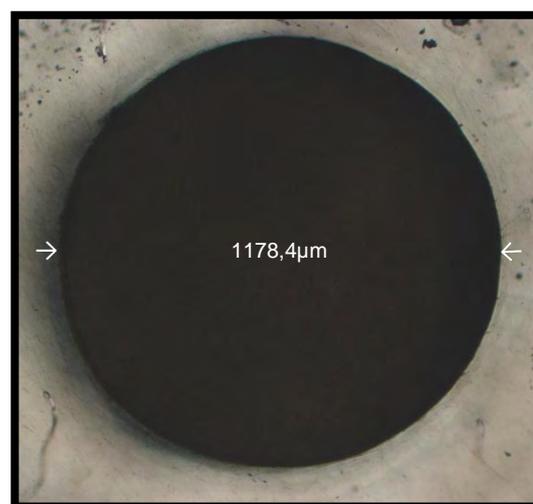
A secção transversal do fio de poliamida nacional de 0,80 mm de diâmetro também foi analisada sob microscopia óptica direta (Zeiss, Axio-Imager A2M, Germany). Os resultados obtidos antes e após a esterilização em autoclave com e sem o dispositivo são demonstrados, a seguir, nas figuras 12 e 13.

Figura 12 - Secções transversais dos fios de poliamida nacional de 0,80 mm de diâmetro. (A) autoclavado com o dispositivo e (B) não autoclavado. Os valores indicados no centro das figuras são referentes ao diâmetro do fio em micrômetros. Aumento de 50x.



Fonte: Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas.

Figura 13 - Secção transversal do fio de poliamida nacional de 0,80mm de diâmetro autoclavado sem o dispositivo de acomodação. Aumento de 50x.



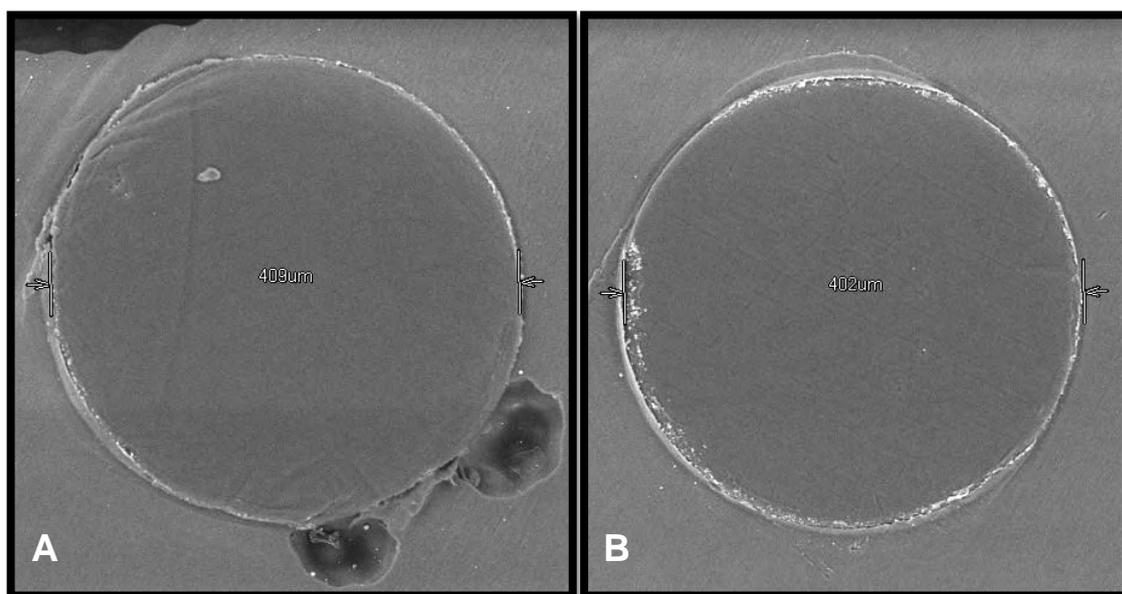
Fonte: Prof. Dr. Silvio Henrique de Freitas.

Os resultados demonstram a manutenção do diâmetro do fio nacional quando este é autoclavado com o dispositivo de acomodação e comparado com o fio nacional não autoclavado. Quando o dispositivo não é utilizado, grande aumento de diâmetro (aproximadamente 46%) é observado, resultado este muito próximo a porcentagem de redução de comprimento demonstrado na figura 10C.

6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

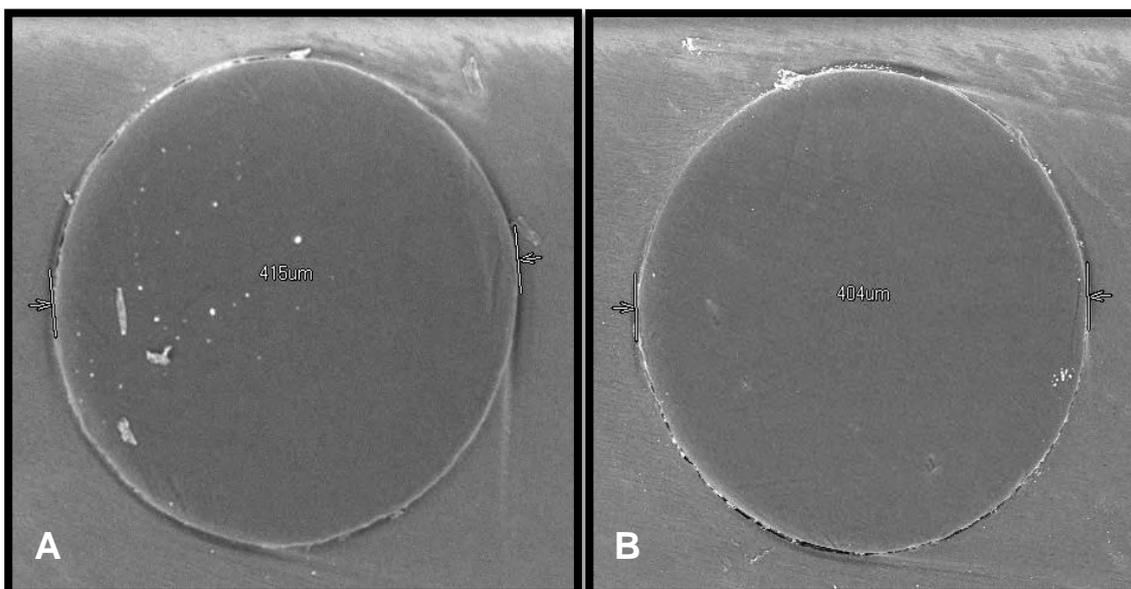
Os resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura das seções transversais dos fios de poliamida são apresentados a seguir.

Figura 14 - Seções transversais dos fios de poliamida importado com 0,40 mm de diâmetro. (A) autoclavado com o dispositivo e, em (B) fios de poliamida importado com 0,40 mm de diâmetro, não autoclavado. Os valores indicados no centro das figuras são referentes ao diâmetro do fio em micrometros. Aumento de 250x.



Fonte: Própria autoria

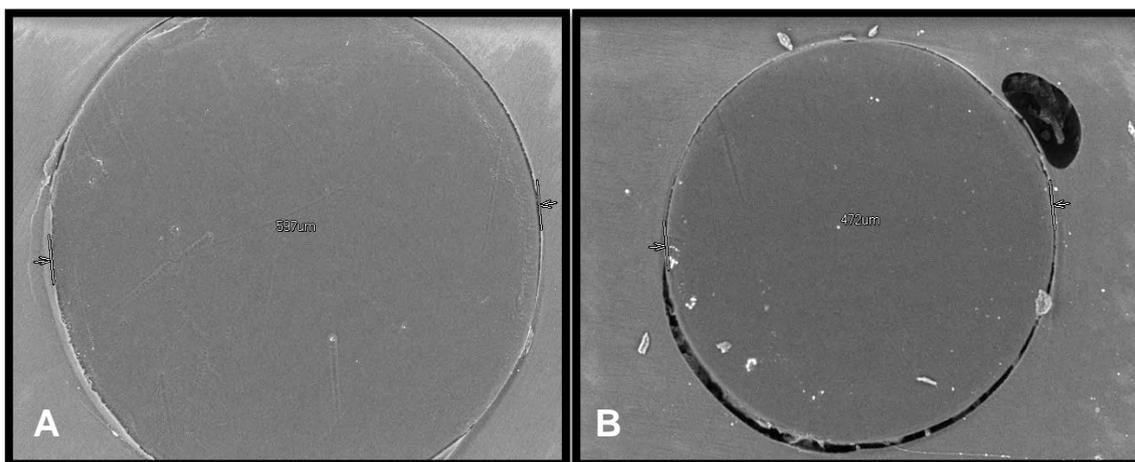
Figura 15 - Seções transversais dos fios de poliamida nacional com 0,40 mm de diâmetro. (A) autoclavado com o dispositivo e (B) não autoclavado. Os valores indicados no centro das figuras são referentes ao diâmetro do fio em micrômetros. Aumento de 250x.



Fonte: Própria autoria

Os fios de poliamida importado e nacional, que foram esterilizados em autoclave sem o dispositivo de acomodação, apresentaram aumento do diâmetro como demonstrado na figura 16, a seguir.

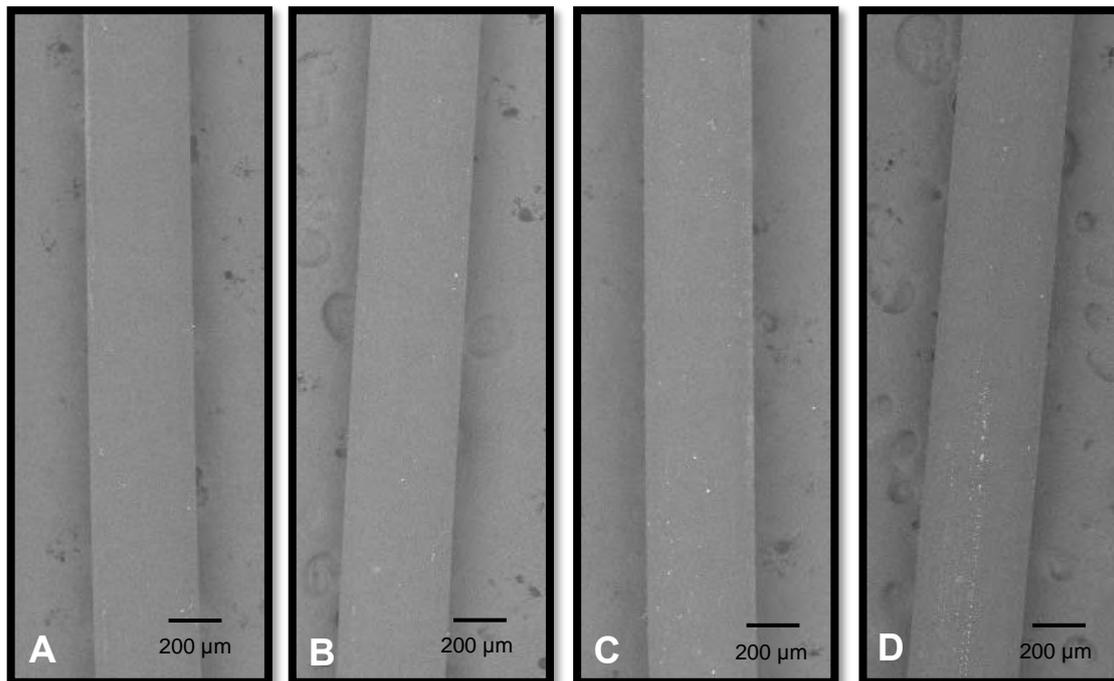
Figura 16 - Seções transversais dos fios de poliamida com 0,40 mm de diâmetro. (A) fio importado autoclavado sem o dispositivo e em (B) fio nacional autoclavado sem o dispositivo. Os valores indicados no centro das figuras são referentes ao diâmetro do fio em micrômetros. Aumento de 250x.



Fonte: Própria autoria

Os resultados referentes a análise da superfície longitudinal externa dos fios de poliamida nacional e importado, autoclavados com o dispositivo e não autoclavados, submetidos a microscopia eletrônica de varredura, são apresentados a seguir.

Figura 17 - Secções longitudinais dos fios de poliamida importado e nacional com 0,40 mm de diâmetro. (A) importado não autoclavado, (B) importado autoclavado com o dispositivo, (C) nacional não autoclavado e (D) nacional autoclavado com o dispositivo. Aumento de 250x.



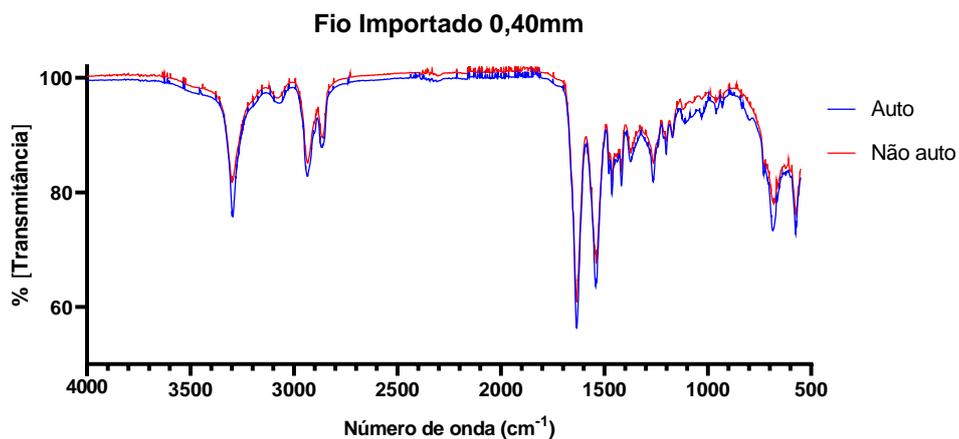
Fonte: Própria autoria

Sob esta análise podemos notar que não houve alteração (deformação) na conformação física dos fios ao longo do eixo longitudinal dos mesmos, após o processo de esterilização.

6.3 Espectroscopia no infravermelho

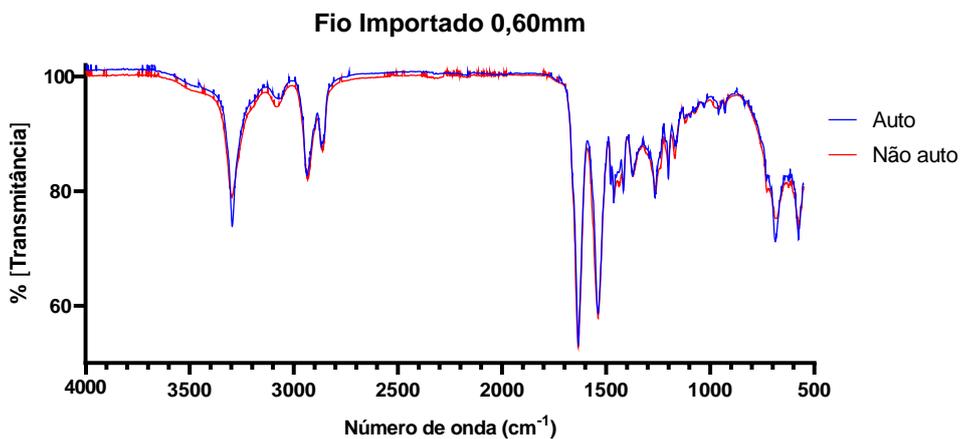
Os resultados obtidos na espectroscopia são apresentados, a seguir, em seis gráficos contendo as análises dos fios autoclavados e não autoclavados juntos (nacional e importado) a fim de demonstrar de forma mais evidente a diferença dentro destes grupos.

Gráfico 1 - Fio de poliamida importado com 0,40 mm de diâmetro, autoclavado e não autoclavado submetidos à espectroscopia.



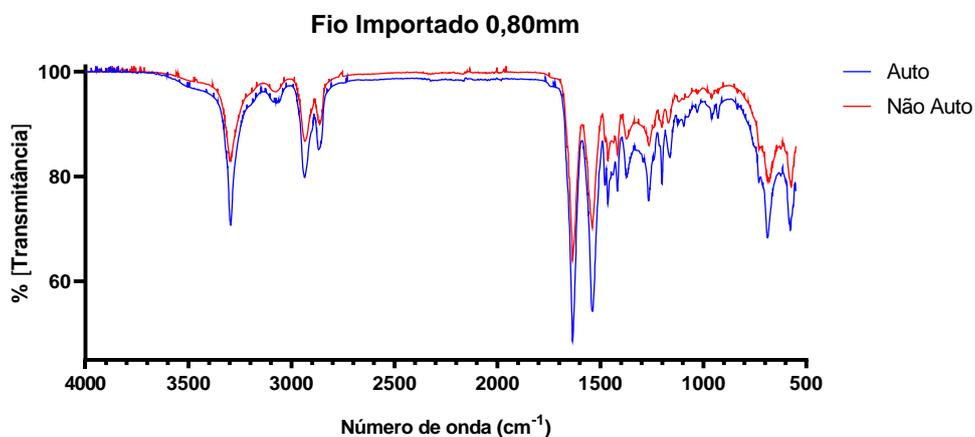
Fonte: Própria autoria

Gráfico 2 - Fio de poliamida importado com 0,60 mm de diâmetro, autoclavado e não autoclavado submetidos à espectroscopia.



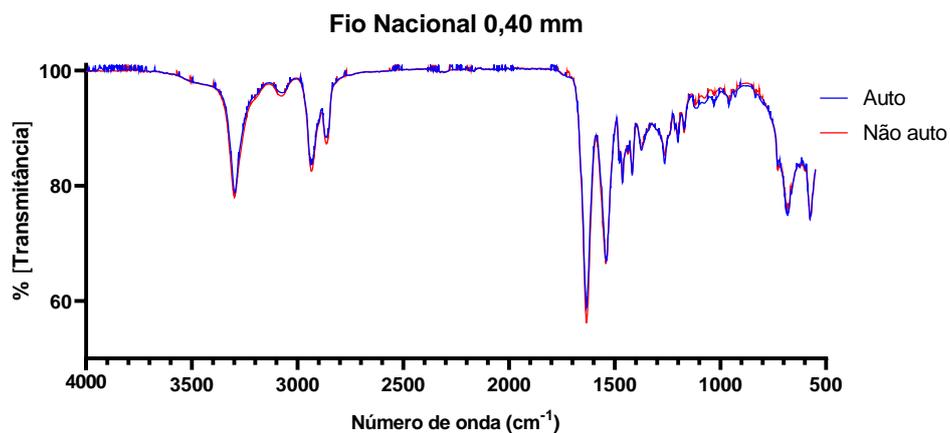
Fonte: Própria autoria

Gráfico 3 - Fio de poliamida importado com 0,80 mm de diâmetro, autoclavado e não autoclavado submetidos à espectroscopia.



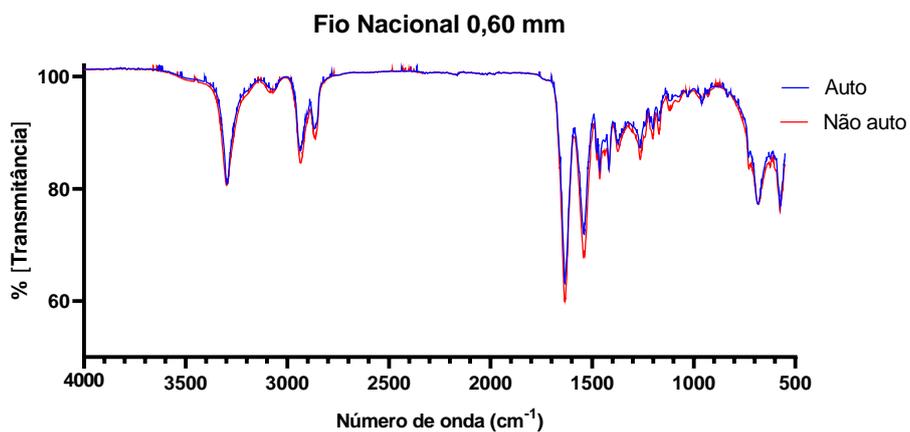
Fonte: Própria autoria

Gráfico 4 - Fio de poliamida nacional com 0,40 mm de diâmetro, autoclavado e não autoclavado submetidos à espectroscopia.



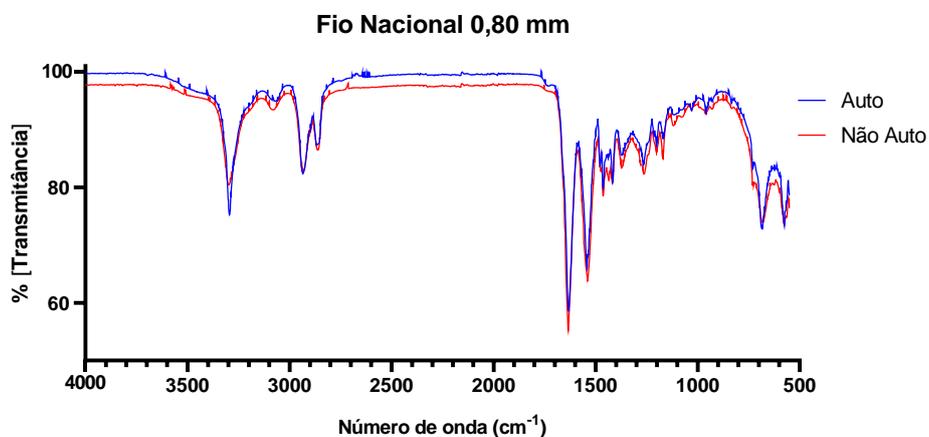
Fonte: Própria autoria

Gráfico 5 - Fio de poliamida nacional com 0,60 mm de diâmetro, autoclavado e não autoclavado submetidos à espectroscopia.



Fonte: Própria autoria

Gráfico 6 - Fio de poliamida nacional com 0,80 mm de diâmetro, autoclavado e não autoclavado submetidos à espectroscopia.



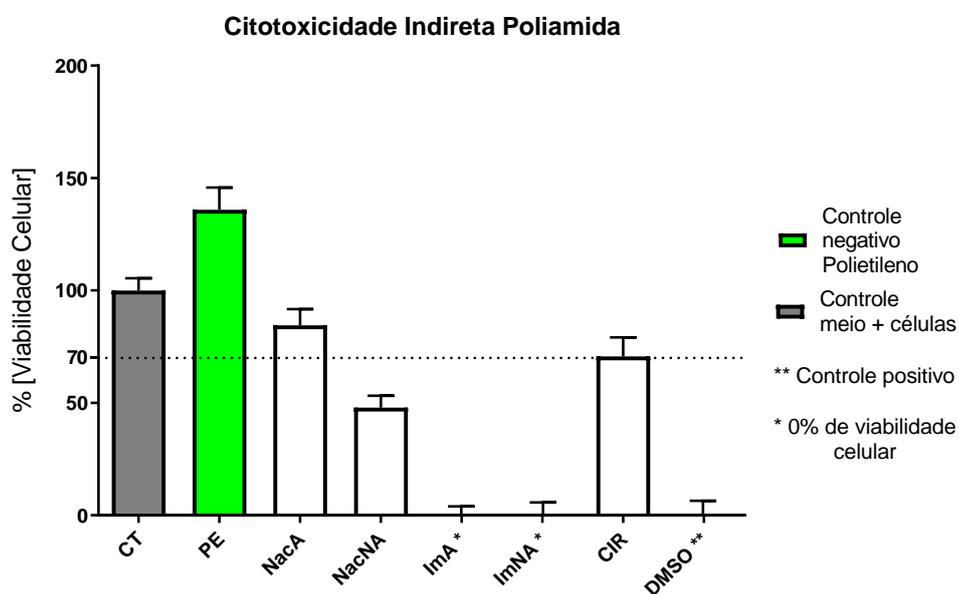
Fonte: Própria autoria

Por meio da análise dos gráficos e pela comparação dentro dos grupos (autoclavado x não autoclavado), podemos notar que não houve alteração nos principais “picos” que representam as moléculas constituintes da poliamida (náilon). Alterações mais evidentes nos valores de transmitância ocorreram nos fios de maior diâmetro (gráficos 3 e 6) porém, como observado nos gráficos, os “picos” permaneceram com seus valores nas regiões de número de onda correspondentes as moléculas características do náilon.

6.4 Testes de citotoxicidade

Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade indireta, para cada fio analisado, assim como o controle positivo (DMSO) e negativo (polietileno), calculados a partir das médias dos valores de absorbância, estão demonstrados na figura a seguir.

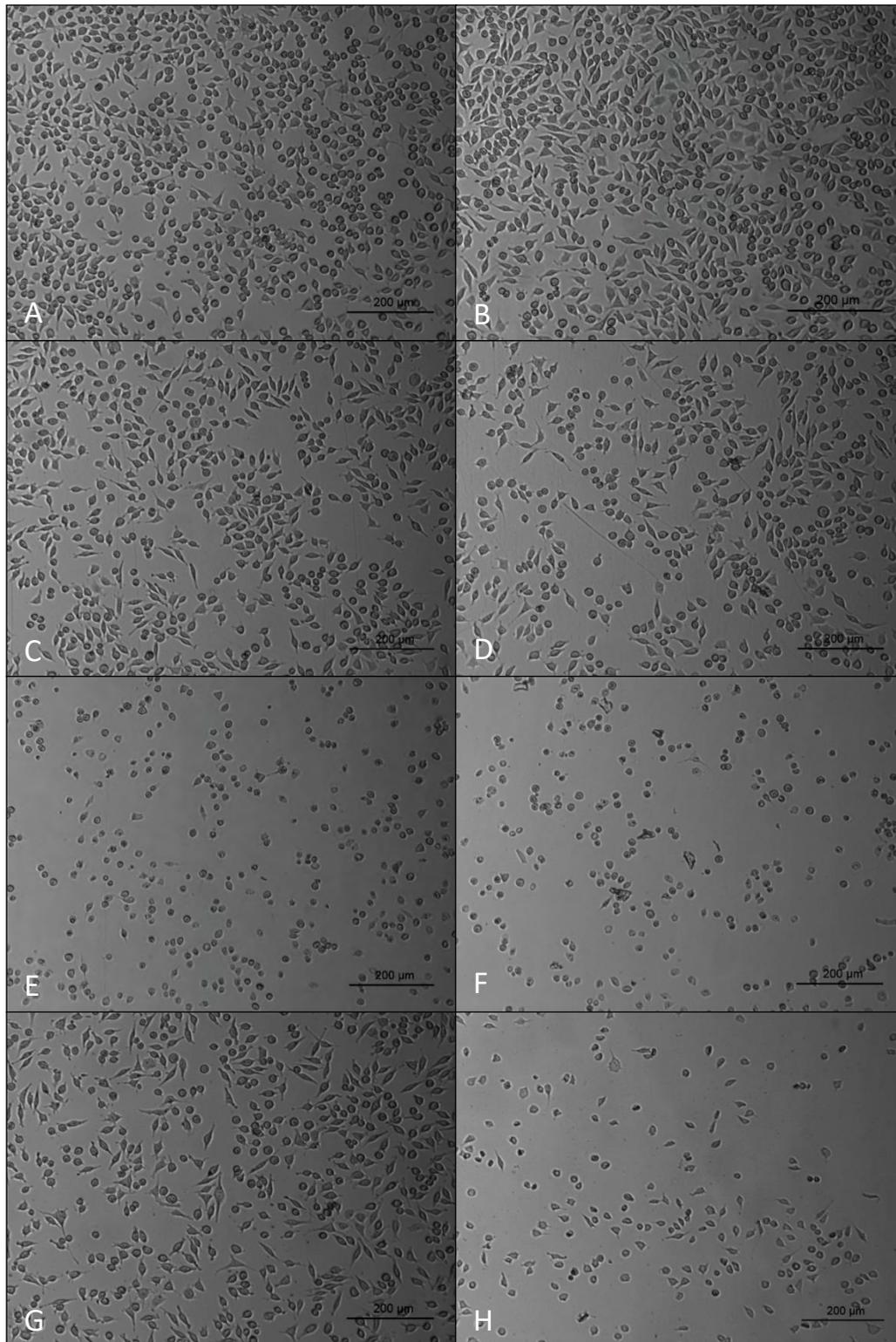
Figura 18 - Valores de viabilidade celular e erro padrão, obtidos pela análise de citotoxicidade indireta dos fios de poliamida. (CT) Controle; (PE) Polietileno; (NacA) Fio Nacional Autoclavado; (NacNA) Fio Nacional Não Autoclavado; (ImA) Fio Importado Autoclavado; (ImNA) Fio Importado Não Autoclavado; (CIR) Fio Cirúrgico; (DMSO) Dimetilsulfóxido.



Fonte: Própria autoria

A figura a seguir demonstra o crescimento e adesão celular à placa, da linhagem de células utilizadas para o teste de citotoxicidade indireta após 24 horas de contato com os diferentes grupos de extratos testados e imediatamente antes da adição da solução de MTT.

Figura 19 - Crescimento celular de fibroblastos de camundongo L929 utilizados nos testes de citotoxicidade indireta 24 horas após a exposição aos extratos testados. (A) Controle meio + células; (B) Controle negativo Polietileno; (C) Fio nacional autoclavado; (D) Fio nacional não autoclavado; (E) Fio importado autoclavado; (F) Fio importado não autoclavado; (G) Fio cirúrgico; (H) Controle positivo Dimetilsulfóxido - DMSO.



Fonte: Própria autoria (Axio Vert A1, Zeiss, USA)

Podemos notar que, nas figuras 19E, 19F e 19H, não há praticamente adesão de células à placa, diferentemente do que ocorre nas demais figuras (Figuras 19A, 19B, 19C, 19D e 19H). A adesão à placa indica crescimento celular, e é evidenciado pelas projeções citoplasmáticas que dão às células o formato mais alongado característico.

A análise estatística revelou que não houve diferença na comparação entre o grupo controle (CT) com o polietileno (PE), com o fio nacional autoclavado (NacA), com o fio nacional não autoclavado (NacNA) e com o fio cirúrgico (CIR). Já quando o grupo controle (CT) foi comparado com os outros fios testados, importado autoclavado (ImA), importado não autoclavado (ImNA) e o com o controle positivo (DMSO) houve diferença estatística.

Assim, pelos resultados apresentados, podemos considerar que os fios de poliamida importados, tanto os autoclavados como os não autoclavados, foram citotóxicos à linhagem de células testada. Já para o fio nacional, o processo de esterilização por calor úmido (autoclavagem), aumentou a porcentagem média de viabilidade celular deste quando comparado ao mesmo fio não esterilizado em autoclave, porém sem diferença estatística. O fio cirúrgico foi adicionado ao teste para melhor base comparativa e apresentou viabilidade celular média próxima de 70%.

6.5 Ensaios mecânicos

Os resultados obtidos nos ensaios mecânicos destrutivos sob tensão, dos fios de poliamida autoclavados e não autoclavados, nacional e importado que representam a força máxima de ruptura, são apresentados na tabela 1, a seguir.

Tabela 1 – Médias e desvio padrão (\pm DP) da deformação máxima e força máxima de ruptura dos grupos importado autoclavado (ImAuto), importado não autoclavado (Im), nacional autoclavado (NacAuto) e nacional não autoclavado (Nac)

0,40 mm	ImAuto	Im	NacAuto	Nac
Deformação máx. (mm)	45.73 \pm 2.36 ^b	34.27 \pm 3.26 ^c	58.96 \pm 2.38 ^a	47.14 \pm 1.10 ^b
Força máx. ruptura (N)	91.86 \pm 3.06 ^a	88.28 \pm 6.45 ^a	90.22 \pm 1.81 ^a	90.90 \pm 1.96 ^a

0,60 mm	ImAuto	Im	NacAuto	Nac
Deformação máx. (mm)	65.64 \pm 5.32 ^b	53.44 \pm 1.35 ^c	71.54 \pm 2.74 ^a	55.25 \pm 6.66 ^c
Força máx. ruptura (N)	206.43 \pm 8.65 ^b	226.01 \pm 2.39 ^a	191.68 \pm 1.04 ^c	183.73 \pm 12.99 ^c

0,80 mm	ImAuto	Im	NacAuto	Nac
Deformação máx. (mm)	41.06 \pm 2.55 ^c	39.77 \pm 2.35 ^c	81.99 \pm 5.49 ^a	63.38 \pm 0.91 ^b
Força máx. ruptura (N)	250.53 \pm 25.31 ^b	282.31 \pm 27.66 ^a	250.27 \pm 11.02 ^b	271.81 \pm 2.03 ^{ab}

^{abc} Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > .05$)

Fonte: Própria autoria.

Para o fio nacional, não houve diferença estatística, quando comparamos sua força máxima de ruptura, antes e depois do processo de autoclavagem. Já em relação a deformação podemos notar que, em todos os diâmetros testados, o aumento foi estatisticamente significativo após o processo de esterilização por calor úmido, ou seja, com o uso de autoclave.

Para a força máxima de ruptura do fio importado, apenas o de 0,40 mm de diâmetro não apresentou diferença estatisticamente significativa, antes e após a autoclavagem. Já para os outros diâmetros testados (0,60 e 0,80 mm), os fios apresentaram redução significativa neste quesito, após o processo de esterilização. Em relação a deformação, apenas o fio importado de 0,80 mm não apresentou diferença estatisticamente significativa, sendo que os fios de 0,40 e 0,60 mm apresentaram aumento da deformação após a autoclavagem.

Os resultados obtidos para deformação e força máxima de ruptura, dentro do limite de elasticidade, ou seja, a força máxima a qual os fios podem ser submetidos antes de iniciarem uma deformação plástica irreversível, são apresentados na tabela 2, a seguir.

Tabela 2 – Médias e desvio padrão (\pm DP) da deformação máxima e da força máxima dentro do limite elástico dos grupos importado autoclavado (ImAuto), importado não autoclavado (Im), nacional autoclavado (NacAuto) e nacional não autoclavado (Nac)

0,40 mm	ImAuto	Im	NacAuto	Nac
Deformação máx. (mm)	28.57 \pm 1.20 ^b	24.42 \pm 0.47 ^c	32.13 \pm 0.73 ^a	27.85 \pm 1.31 ^b
Limite elástico (N)	55.91 \pm 0.90 ^a	53.92 \pm 1.94 ^b	51.36 \pm 5.08 ^c	55.34 \pm 1.92 ^{ab}

0,60 mm	ImAuto	Im	NacAuto	Nac
Deformação máx. (mm)	38.07 \pm 0.70 ^b	30.34 \pm 0.85 ^c	44.27 \pm 0.77 ^a	38.28 \pm 0.64 ^b
Limite elástico (N)	119.02 \pm 3.44 ^b	131.60 \pm 1.59 ^a	118.35 \pm 1.25 ^b	121.60 \pm 7.82 ^b

0,80 mm	ImAuto	Im	NacAuto	Nac
Deformação máx. (mm)	30.83 \pm 1.58 ^c	29.76 \pm 0.70 ^c	47.86 \pm 1.72 ^a	32.69 \pm 0.53 ^b
Limite elástico (N)	150.83 \pm 16.62 ^b	174.45 \pm 15.68 ^a	145.52 \pm 3.29 ^b	156.12 \pm 4.11 ^b

^{abcd} Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > .05$)

Fonte: Própria autoria

O limite elástico para os grupos nacional autoclavado (NacAuto) e nacional não autoclavado (Nac) apresentou diferença estatisticamente relevante somente para o fio de 0,40 mm de diâmetro. Já para a deformação máxima, houve aumento significativo após o processo de esterilização em todos os diâmetros dos fios nacionais testados.

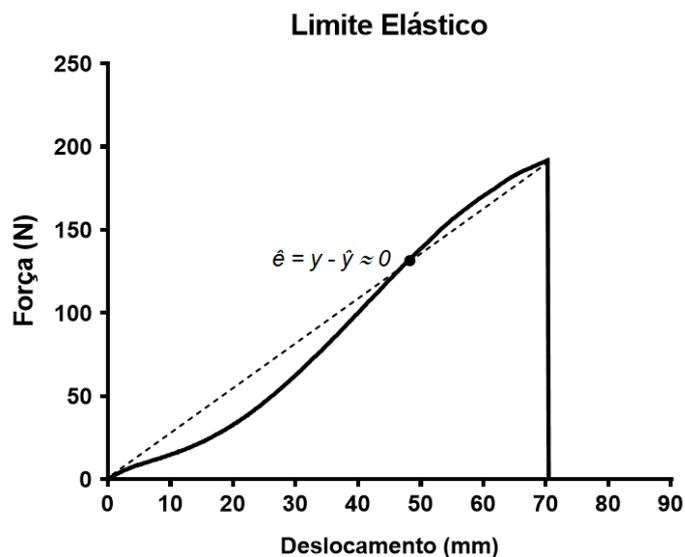
Quando a mesma comparação é feita para o limite elástico nos fios importados, todos os diâmetros de fio testados apresentaram diferença estatisticamente relevante após o processo de esterilização, sendo que somente o fio de 0,80 mm não apresentou diferença estatística para os valores de deformação máxima. De maneira geral, o processo de autoclavagem promoveu aumento na deformação dos fios testados.

A fase elástica foi calculada considerando, inicialmente, um comportamento linear do fio de poliamida até sua ruptura (linha tracejada – Gráfico 7). A partir dos resultados observados, foi possível obter a função estimada $\hat{y} = a + b \cdot x + \hat{\epsilon}$, considerando o intercepto $a=0$. O limite elástico (início da deformação plástica) foi então estabelecido como sendo o momento em que o valor estimado (\hat{y}) coincide com o valor observado (y), ou seja, quando $y = \hat{y} = b \cdot x + \hat{\epsilon}$, representado no gráfico pelo ponto de intersecção ($\hat{\epsilon}$) das linhas tracejadas e contínua. Nas análises foram utilizadas as informações de

deslocamento (x) e força (y) quando o valor estimado foi o mais próximo do valor observado, ou seja, onde $\hat{e} = y - \hat{y} \approx 0$.

O gráfico a seguir demonstra, de maneira geral, como foi calculada a fase elástica para cada um dos grupos de fios testados.

Gráfico 7 - Curva média genérica para cada um dos grupos de fio testados demonstrando como foi calculado o limite elástico dos fios de poliamida. A linha tracejada representa o comportamento linear da poliamida (teórico) e a linha inteira os valores observados.



Fonte: Própria autoria

7. DISCUSSÃO

7.1 Poliamida

A poliamida foi o biomaterial escolhido neste estudo por ser amplamente utilizado na medicina veterinária, não só na reconstrução ligamentar extracapsular, mas também como fio de sutura. Sua aplicação cirúrgica, assim como sua análise mecânica, já foi descrita por diversos autores, sendo a linha de pesca monofilamentar conhecida por demonstrar excelente resistência à tração com mínima deformação plástica (BUTLER et al., 1983; HULSE et al., 1983; NWADIKE; ROE, 1998).

Ao contrário dos fios de pesca de náilon, que são monofilamentares, os materiais multifilamentares são considerados, há muitos anos, como indutores de uma taxa mais alta de "reações de sutura", em grande parte devido à alta área superficial para irritação e aderência bacteriana (BURGUESS et al., 2010).

Rahal et al. (1997), em um estudo com ratos comparando a reação tecidual provocada pelo fio de náilon cirúrgico, linha de pesca autoclavada e linha de pesca esterilizada com formalina observaram discreta reação tissular em todos os fios testados, sendo que os dois últimos grupos apresentaram maior reação. Além disso, a mesma autora ainda cita o fato de o processo de autoclavagem ocasionar uma possível redução da resistência da sutura. Isto corrobora o que foi apresentado no presente estudo, evidenciando a importância de se avaliar os fios, não só por sua capacidade de resistência à tração, mas também por sua citotoxicidade, comparando-os a um fio de náilon cirúrgico tradicional.

Para que seja possível utilizar o fio de poliamida em procedimentos cirúrgicos, o mesmo deve ser esterilizado. Vários métodos estão disponíveis atualmente, porém a esterilização por autoclave é o método mais barato, acessível e um dos mais utilizados. Além disso, a maneira como o fio é esterilizado tem grande influência sobre as propriedades físico-químicas, principalmente sobre os polímeros e vem sendo discutida ao longo dos anos. (CAPORN; ROE, 1996; GATINEAU et al., 2010; IGNA et al., 2014; SICARD et al., 1999; SICARD HAYASHI; MANLEY, 2002; TONKS; LEWIS; POZZI, 2011)

Existem dois tipos principais de linhas de pesca comercializadas no Brasil, os fios de náilon para pesca “convencionais” e as chamadas “leader lines”, que podem ser de poliamida, mas a forma mais disponível comercialmente no mercado nacional é composta por fluorcarbono. Apesar de alguns autores apontarem melhores resultados com as chamadas “leader lines” de poliamida (CAPORN; ROE, 1996) optou-se no presente estudo, pela análise comparativa dos fios de pesca “convencionais” justamente por estes apresentarem maior disponibilidade comercial.

7.2 Dispositivo para a esterilização do fio em autoclave

Os resultados obtidos, utilizando o dispositivo criado para a esterilização por autoclave, indicam que o mesmo foi eficiente para manter o diâmetro do fio, ao mesmo tempo em que reduziu os efeitos causados pelo aumento da temperatura na estrutura das moléculas de poliamida, na força máxima de ruptura e na deformação máxima dos fios testados quando comparados com os fios não autoclavados. Na ausência do dispositivo, os fios encurtam e conseqüentemente aumentam seu diâmetro, o que reflete em um ganho excessivo de elasticidade, que é prejudicial para a função estabilizadora, pretendida em cirurgias articulares.

Sicard, Hayashi e Manley (2002), ao testarem 5 marcas diferentes de fio de pesca esterilizados em autoclave, encontraram resultados que indicam um significativo aumento na deformação quando estes foram comparados com os fios não esterilizados. Estes resultados podem estar relacionados à ausência de um dispositivo para a acomodação do fio durante o processo de autoclavagem, o que ocasiona maior encurtamento dos mesmos, levando ao aumento da deformação. Estes mesmos autores não encontraram diferenças estatisticamente significantes para a força máxima de ruptura.

Já os resultados obtidos por Caporn e Roe (1996), quando testaram os fios de pesca convencionais e as chamadas “leader lines”, demonstraram que os fios de pesca foram significativamente afetados tanto pela esterilização em autoclave, quanto pela esterilização por óxido de etileno, o que pode estar relacionado ao fato de que o segundo procedimento também eleva a temperatura do material até cerca de 55°C, podendo assim afetar a molécula de poliamida.

Neste mesmo estudo foi observado também uma redução na força máxima de ruptura dos fios de pesca convencionais, assim como um aumento na deformação e no diâmetro final após o processo de autoclavagem, o que não ocorreu em nosso estudo devido ao uso do dispositivo, que obteve êxito em manter o diâmetro inicial do fio. Caporn e Roe (1996), analisando os fios “leader lines” antes e após a esterilização, não encontraram diferença estatística em relação à força máxima de ruptura deste material. Isso indica que os fios “leader line” podem ter uma resposta melhor quando submetidos ao processo de autoclavagem, sendo que este fato pode estar relacionado a sua composição polimérica, diferente do fio de pesca convencional.

Já Lewis, Milthorpe e Bellenger (1997) demonstraram uma significativa redução da força dos fios “leader lines” após o processo de esterilização por autoclave, indicando assim que, apesar de não realizado em nosso estudo, o uso do dispositivo para esta classe de fios também pode obter resultados interessantes no que se refere à manutenção do diâmetro inicial e na redução dos efeitos sobre a resistência final destes. De um modo geral a recomendação é para que se minimize o número de ciclos de esterilização, particularmente quando esta é por vapor (TINGA; KIM, 2018).

Na ausência do dispositivo para esterilização, o aumento do diâmetro do fio e sua conseqüente redução do comprimento, pode estar relacionado com a absorção de água durante o processo de esterilização por autoclave, uma vez que, segundo Silva, Tognana e Salgueiro (2013), polímeros como as poliamidas, podem absorver água de um ambiente úmido e a quantidade de absorção pode variar de acordo com a composição e hidrofobicidade do polímero. Essa variação pode ser explicada pois, apesar de serem fios de pesca convencionais de poliamida, a redução no comprimento foi diferente entre as marcas avaliadas, o que evidencia a importância de considerarmos o fabricante como um diferencial nas análises.

O desenvolvimento do dispositivo de acomodação do fio resultou em um pedido de depósito de patente de invenção junto o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, sob o título “Conjunto e suporte para a ancoragem de fio de sutura”, processo nº BR 10 2020 0099140.

A esterilização por autoclave foi escolhida neste estudo por ser amplamente difundida, de baixo custo e, principalmente, por ser de fácil acesso

ao clínico/cirurgião que dela necessite, o que não ocorre por exemplo, com as técnicas de esterilização por óxido de etileno, radiação ionizante com raios gama e plasma de peróxido de hidrogênio, embora essas também sejam opções eficientes para a esterilização de fios de poliamida.

7.3 Microscopia eletrônica de varredura

Os cortes transversais dos fios de poliamida autoclavados e não autoclavados analisados por microscopia eletrônica de varredura, foram feitos para comprovar a eficiência do dispositivo em manter o diâmetro do fio após o processo de esterilização, uma vez que a medida realizada durante esta análise é mais precisa. Os resultados obtidos após o processo de autoclavagem no fio nacional de 0,40 mm demonstram aumento de apenas 11 μm quando comparado com o mesmo fio não esterilizado. Diferença ainda menor foi observada na análise do fio de poliamida importado de 0,40 mm de diâmetro, onde houve um aumento de 7 μm , quando comparado com o mesmo fio não esterilizado. Esta diferença pode variar, uma vez que os pontos de medição são colocados de forma manual por um operador, através de um software específico para esta função, sendo, porém, mais precisas que as análises por microscopia óptica. Para evidenciar essa diferença, a comparação foi feita também com os fios autoclavados sem o dispositivo, o que provocou um expressivo aumento do diâmetro, tanto do fio importado quanto do fio nacional, sendo que no primeiro o aumento foi de 195 μm e, no segundo, de 68 μm , valores estes que representam um aumento de 48,5% e 16,8%, respectivamente, sendo que esta diferença reforça a tese de que existe uma variação entre as marcas testadas, podendo ser explicada por uma maior hidrofobicidade na composição polimérica de uma em relação a outra.

Como forma de atestar a eficiência do dispositivo na redução dos efeitos provocados pelo efeito do calor úmido do processo de autoclavagem sobre os fios, também foram obtidas as análises das superfícies longitudinais. Nesse processo não foram observadas modificações morfológicas/conformacionais nesta superfície ao longo dos fios, o que poderia representar pontos de falha e conseqüente menor resistência destes quando submetidos à tração, propriedade importante quando falamos de fios com função estabilizadora.

Não foram realizados os testes com os fios nacional e importado das espessuras 0,60 e 0,80 mm pois acreditava-se que, por serem fios dos mesmos fabricantes, essas proporções de aumento no diâmetro seriam as mesmas que para o fio de 0,40 mm. Isto ocorreu para os fios importados e para os fios nacionais de 0,40 e 0,60 mm de diâmetro, porém, a redução no comprimento do fio nacional de 0,80 mm autoclavado sem o dispositivo, sugere que este aumento pode não ser proporcional, fato este corroborado pela análise do corte transversal deste fio sob microscopia óptica.

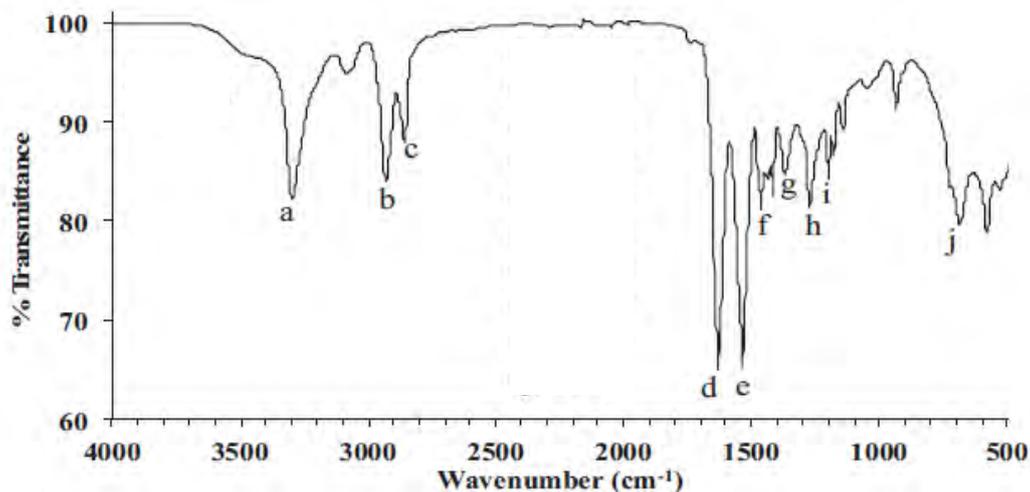
7.4 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR) foi utilizada para identificação e caracterização do composto polimérico, ou seja, o fio de náilon. Basicamente o que se mede nesta análise, é a fração da energia transmitida ou absorvida em relação à incidente em determinado comprimento de onda ou número de onda (EVORA et al., 2002).

Materiais poliméricos, como o náilon, possuem bandas de absorção conhecidas que vibram de acordo com uma frequência, dependendo da massa e da força de ligação entre eles. Essa frequência pode ser convertida em número de onda (cm^{-1}) que é representado em um gráfico (Transmitância x Número de onda) (LEITE; PRADO, 2012; TABELA..., 2020). A determinação destas frequências nos permitiu afirmar que o processo de autoclavagem não alterou a estrutura molecular do polímero presente nas amostras, quando os comparamos antes e após a esterilização.

Como forma de ilustrar, e assim comparar, com a curva característica do fio de náilon, estão representados, na figura a seguir, os valores de transmitância e número de onda deste material, segundo Jung et al., 2018.

Figura 20 - Valor obtidos para espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR) para o náilon. As letras representam os valores de número de onda (cm^{-1}) característicos para este material. (a) 3298; (b) 2932; (c) 2858; (d) 1634; (e) 1538; (f) 1464; (g) 1372; (h) 1274; (i) 1199; (j) 687.



Fonte: Adaptado de JUNG, M. R. et al., 2018

As moléculas característica do náilon, que estão indicadas no gráfico anterior como picos com letras associadas, representam respectivamente:

- (a) grupo N — H associado em amidas ($3320 - 3070 \text{ cm}^{-1}$)
- (b) grupo C — H alifáticos primário e secundários ($2960 - 2850 \text{ cm}^{-1}$)
- (c) grupo C — H alifáticos primário e secundários ($2960 - 2850 \text{ cm}^{-1}$)
- (d) grupo C = O de amidas ($1700 - 1630 \text{ cm}^{-1}$)
- (e) grupo N — H de amidas secundárias - dobramento ($1580 - 1495 \text{ cm}^{-1}$)
- (f) grupo CH_2 deformação angular ($1470 - 1430 \text{ cm}^{-1}$)
- (g) grupo CH_3 deformação angular ($1390 - 1370 \text{ cm}^{-1}$)
- (h) grupo C — N alifáticos ($1280 - 1180 \text{ cm}^{-1}$)
- (i) grupo C — N alifáticos ($1280 - 1180 \text{ cm}^{-1}$)
- (j) grupos N — H e C = O deformações angulares ($\sim 680 \text{ cm}^{-1}$)

Outro fato a ser observado é a formação de um pequeno pico na região de 720 cm^{-1} , que representa o movimento de “rocking” associado com 4 ou mais grupos CH_2 em uma cadeia aberta, característico de polímeros como o náilon.

Pequenas mudanças podem ocorrer dentro de uma mesma faixa de banda de absorção característica de uma molécula pois os números que as

representam podem variar e não são números exatos de comprimento de onda, assim como verificado por Jung et al. (2018). O surgimento de um pico no gráfico, que não estava presente anteriormente, poderia caracterizar a presença de uma nova molécula e, conseqüentemente, representar uma mudança estrutural da poliamida, o que não ocorreu no presente estudo.

7.5 Citotoxicidade

A linha de células L929 de fibroblastos de camundongo é uma das linhagens mais utilizadas para estes tipos de teste (FIROUZE, et al., 2014; HO et al., 2013; MASSON; NASCIMENTO; LOMBELLO, 2014; MILDNER, 2015; ROGERO et al., 2003) e está de acordo com os protocolos descritos para isso na ISO 10993-5 (2009). Além disso, como observado por Trentani et al. (2009), o contato direto deste tipo de célula (fibroblasto) com os implantes ortopédicos, reproduz de maneira mais fidedigna o ambiente em que estes materiais estarão inseridos quando de sua aplicação clínica.

Existem dois tipos de teste de citotoxicidade *in vitro*, o direto e o indireto. No primeiro, como o próprio nome diz, o contato célula/material é direto, e, apesar de ser uma possibilidade, ele não foi feito neste estudo pois os fios de náilon flutuam quando em colocados no meio de cultivo, desta maneira, as células que estão crescendo no fundo da placa não entram em contato direto com este material, podendo assim prejudicar a análise citotóxica. Já o segundo pode ser realizado de duas formas; o material testado pode ser separado por uma barreira de difusão (ágar) ou um extrato do material é produzido por meio de um solvente (normalmente o meio de cultivo) que é então colocado em contato com as células. No presente estudo, optou-se pelo contato indireto através de extratos não diluídos (100%) uma vez que o náilon testado não poderá ser aplicado de outra maneira que não na forma de fio.

A diminuição no número de células vivas resulta em uma diminuição da atividade metabólica da amostra e este decréscimo está diretamente ligado à quantidade de cristais de Formazan azul/violeta formados. Qualquer diminuição nos valores de viabilidade celular maior que 30%, ou seja, quando esta porcentagem fica abaixo de 70%, segundo a ISO 10993-5 (2009), o material testado possui potencial citotóxico.

Foram testados apenas os fios com diâmetro de 0,60mm pois como os outros tamanhos estudados (0,40 mm e 0,80 mm) são do mesmo fabricante e possuem exatamente as mesmas especificações, com exceção do diâmetro, julgou-se não ser necessário repetir os testes de citotoxicidade nestes outros fios.

O fio de náilon cirúrgico “zero”, que corresponde a um diâmetro aproximado de 0,35 mm, foi adicionado ao teste como forma de se comparar os fios testados com um fio já bastante difundido nacionalmente para a aplicação cirúrgica dentro da medicina, tanto humana quanto veterinária. O fato deste não possuir o diâmetro aproximado de 0,60 mm, para uma melhor comparação com os fios testados, se deve à dificuldade de obtenção de um fio cirúrgico mais espesso, uma vez que um fio de 0,60 mm corresponde ao tamanho aproximado do fio “3” ou “4”, de uso não comum dentro da medicina veterinária.

Os resultados obtidos revelaram que os únicos fios que não possuem potencial citotóxico, segundo a ISO 10993-5 (2009), ou seja, com viabilidade celular média maior ou superior a 70%, foram os fios de pesca nacional autoclavado e o fio cirúrgico “zero”. Todos os outros fios testados apresentaram a média de viabilidade celular abaixo dos 70%. Os fios importados (Ottoni® - Platinum XT) tanto autoclavado como não autoclavado, apresentaram alta citotoxicidade, com valores de viabilidade celular comparáveis ao controle positivo (Dimetilsulfóxido), ou seja, zero. Outro fato importante a ser destacado é a necessidade de testes de citotoxicidade específico para cada marca, principalmente nos fios de pesca não desenvolvidos para aplicação cirúrgica, porém com utilização bastante difundida principalmente dentro da medicina veterinária.

7.6 Testes mecânicos destrutivos

Testes mecânicos destrutivos vêm sendo realizados ao longo dos anos a fim de se verificar as propriedades físicas dos fios de poliamida com potencial uso veterinário e também a influência dos métodos de esterilização sobre eles (ANDERSON et al., 1998; BANWELL et al., 2005; BURGESS et al., 2010; CAPORN; ROE, 1996; GATINEAU et al., 2010; IGNA et al., 2014; LEWIS MILTHORPE; BELLENGER, 1997; NWADIKE; ROE, 1998; ODA; MATERA,

2009; SICARD et al., 1999; SICARD; HAYASHI; MANLEY, 2002; VIANNA; ROE, 2006).

A tração uniaxial e em sentidos opostos de cada fio, apesar de não reproduzir exatamente o sentido das forças que são aplicadas *in vivo*, é um teste inicial válido para a determinação da força (N) e da deformação (mm) dos fios analisados. A partir destas informações, foi possível obter um gráfico dos valores máximos de ruptura (falência), deformação máxima e, conseqüentemente, as regiões da curva que compreendem os limites elásticos e plásticos dos fios de poliamida.

Alguns autores utilizam uma pré-carga inicial de tração no fio testado com a finalidade de retirar qualquer tipo de “folga” que possa existir entre o fio e a máquina, normalmente isso ocorre em estudos que também testam a resistência do nó (GATINEAU et al., 2010; LEWIS; MILTHORPE; BELLENGER, 1997; MORAES et al., 2003; SICARD et al., 1999; SICARD; HAYASHI; MANLEY, 2002). Já em outros estudos, essa pré-carga inicial não foi utilizada, mesmo por alguns autores que também estavam testando a força do nó (ANDERSON et al., 1998; IGNA et al., 2014; PEYCKE et al., 2002). No presente estudo, como a garra utilizada nos testes era específica para fios/filamentos e não houve a confecção de nós, a pré-carga não foi empregada. Optou-se também, pela utilização de velocidade de deslocamento da garra, de 240mm/min, por ser a maior velocidade possível permitida pela máquina de testes, e também, devido à proximidade ao valor utilizado por Sicard et al. (1999) e Lewis, Milthorpe e Bellenger (1997), que foi de 300mm/min.

Alguns estudos sugerem que o náilon leader line é superior ao náilon de pesca (CAPORN; ROE, 1996; NWADIKE; ROE, 1998), porém no nosso estudo resolvemos utilizar o náilon de pesca por ser mais facilmente encontrado no mercado nacional e por ainda não haver um embasamento científico sólido que associe seu diâmetro com o peso do cão com insuficiência do ligamento cruzado cranial.

7.7. O uso do fio de náilon como alternativa cirúrgica

Segundo Rose et al. (2012), o material de sutura ortopédica ideal deve ter características mecânicas que tolerem o ambiente onde ele será utilizado e não

deve sofrer alongamento excessivo que ultrapasse a carga mínima fisiológica estimada, por isso a determinação da força máxima de ruptura, assim como o limite máximo que o fio de náilon suporta, sem iniciar a deformação plástica, ou seja, seu limite elástico, é tão importante. Isto corrobora o que foi dito por Burgess et al. (2010) que observaram que cães submetidos a correção de ruptura do ligamento cruzado cranial onde houve algum tipo de complicação e/ou falha do implante, o material utilizado estava frequentemente rompido, o que sugere que a força máxima que este material suporta foi excedida.

Assim, considerando-se os dados obtidos por outros autores em relação a força máxima necessária para a ruptura completa do ligamento cruzado cranial canino, de aproximadamente 50 N por kg (BRENDOLAN; REZENDE; PEREIRA, 2001; COMEFORD et al., 2005; DORLOT et al., 1980; GUPTA; BRINKER; SUBRAMANIAN, 1969; WINGFIELD et al., 2000), que este, em condições fisiológicas, não é submetido a forças que ultrapassam 25% desse valor (BUTLER et al., 1983; JOHNSON et al., 1989) e considerando que o fio de poliamida não deve ser submetido a forças que ultrapassem seu limite elástico (BURGESS et al., 2010), determinado no presente estudo, foi possível relacionar o diâmetro do fio ao peso do cão, como demonstrado na tabela 3, a seguir.

Tabela 3 – Diâmetro do fio de poliamida nacional autoclavado simples ou duplo (2x) e sua relação com o peso vivo do paciente candidato a reconstrução extracapsular devido a insuficiência do ligamento cruzado cranial.

Diâmetro do fio	Peso do paciente em kg	
0,40 mm	até 5 kg	
0,40 mm (x2)	até 10 kg	
0,60 mm	até 11 kg	
0,60 mm (x2)	até 23 kg	
0,80 mm	até 14 kg	
0,80 mm (x2)	até 28 kg	

Fonte: Própria autoria.

Para a determinação destes valores foi considerado que o fio perde cerca de 40% de sua força devido ao nó (GATINEAU et al., 2010; SARDENBERG et al., 2003; SICARD; HAYASHI; MANLEY, 2002; TRAIL; POWELL; NOBLE, 1989). Em relação a este fator, vários tipos de nó vêm sendo testado ao longo dos anos

com resultados diversos, porém alguns estudos sugerem que o fio, quando seguro com o sistema *crimp-clamp*, com anilhas de aço, é superior ao nó feito sem o uso desse sistema (ANDERSON et al., 1998; BANWELL et al., 2005; GATINEAU et al., 2010; MOORES et al., 2006; SICARD; HAYASHI; MANLEY, 2002; VIANNA; ROE, 2006). No presente estudo, a opção pelo cálculo utilizando nó, em detrimento ao sistema *crimp-clamp*, se fez pelo fato de o primeiro não necessitar de nenhum material adicional para sua confecção, já no caso do segundo, seriam necessários a anilha de aço e um alicate específico para a colocação do sistema.

A importância de se estabelecer uma relação entre o peso do cão e o diâmetro do fio de poliamida também pode ser destacada pelo fato de que muitos cirurgiões veterinários, que utilizam a estabilização extra articular em seus pacientes, o fazem de maneira empírica ou simplesmente utilizam o fio de maior calibre disponível. Estes fios de maior diâmetro, segundo alguns autores (BURGESS et al., 2010; CAPORN; ROE, 1996), podem apresentar maior dificuldade para serem apertados manualmente e assim, acabam deixando um maior espaço entre as laçadas o que pode ocasionar alongamento secundário indesejado, levando ao posterior movimento de gaveta excessivo, mesmo que não estejam rompidos.

Quando dois fios são utilizados em conjunto, afim de se aumentar a segurança da estabilização articular, muitos cirurgiões o fazem de maneira independente, com nós separados para cada fio. No entanto, Wallace et al. (2008) sugere que o uso de um fio único e contínuo, nestes casos, é superior a inevitável variação de tensão a que fios amarrados individualmente são submetidos, o que pode levar à falha precoce do conjunto. Dycus et al. (2013) obtiveram resultados que indicam, no caso da necessidade de duplicar o fio, que o uso do nó *self-locking* é uma alternativa ao uso de nós individuais quadrados, tradicionalmente utilizado.

Outro ponto relevante e que deve ser destacado é que cada paciente tem seu temperamento e, assim como sugerido por Rose et al. (2010), além do peso, a atividade pós-operatória do paciente também é um importante fator a ser considerado quanto a escolha do fio a ser utilizado. Burgess et al. (2010) ainda cita que alguns pontos de estresse como bordas afiadas ao redor de túneis

ósseos, regiões de deformação em nós e locais de torção bruscas nos fios podem criar pontos de menor resistência e ocasionar a ruptura do material.

O ligamento cruzado cranial não é a única estrutura responsável por estabilizar a articulação do joelho canino. Na sua ausência, a própria capsular articular, além dos meniscos e outros ligamentos também auxiliam nesta função (BUTLER et al., 1983; LOPEZ et al., 2003; POZZI; KIM, 2018). Assim, a estabilização extra articular, proporcionada pelo fio até sua possível ruptura, é necessária somente até que uma fibrose periarticular se estabeleça e promova uma estabilidade duradoura da articulação do joelho (ANDERSON et al., 1998; BANWELL et al., 2005; BRINKER; PIERMATTEI; FLO, 2009).

Além do potencial do fio de náilon para a estabilização da insuficiência do ligamento cruzado cranial canino, a comprovação de sua viabilidade também o credencia para uso em outros fins, como em suturas que demandam maior resistência à tração ou como substitutos ligamentares nos mais diversos tipos de estabilizações articulares (luxações de cotovelo, luxações coxofemorais, luxações de ombro, entre outras).

Inúmeros fatores devem ser considerados para que haja sucesso no pós-operatório imediato e tardio de cães submetidos a cirurgia de correção de insuficiência do ligamento cruzado cranial. O comportamento mecânico do fio *in vivo* e qual sua relação com o nó a que é submetido são alguns exemplos que não foram incluídos neste estudo, mas que devem ser levados em consideração.

8. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um dispositivo, que mantém o diâmetro do fio de poliamida depois da esterilização por autoclave, pode representar uma opção à esterilização por outros métodos, reduzir custos e, portanto, permitir a utilização de fios de maior calibre de forma mais acessível.

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste estudo, o fio nacional autoclavado com o dispositivo, é o mais indicado para a estabilização extracapsular do joelho canino.

Assim, podemos concluir que a inclusão do fio de náilon de pesca nacional autoclavado na rotina cirúrgico/ortopédica, representa uma alternativa viável, de baixo custo, fácil aquisição e que pode ser utilizado em outras áreas da medicina veterinária que necessitem de fios mais resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALM, A.; EKSTRÖM, H.; STRÖMBERG, B. Tensile strength of the anterior cruciate ligament in the dog. **Acta Chirurgica Scandinavica Supplementum**, v. 445, p. 1523, 1974.
- ANDERSON, C. C. et al. Biomechanical evaluation of a crimp clamp system for loop fixation of monofilament nylon leader material used for stabilization of the canine stifle joint. **Veterinary Surgery**, v. 27, p. 533 - 539, 1998.
- ARNOCZKY, S. P. The cruciate ligaments: the enigma of the canine stifle. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, p. 71, 1988.
- ARNOCZKY, S. P.; MARSHALL, J. L. The cruciate ligaments of the canine stifle: an anatomical and functional analysis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 1807 - 1814, 1977.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13904. **Fios para sutura cirúrgica**. Rio de Janeiro, 2003.
- BANWELL, M.N. et al. In vitro evaluation of the 18 and 36 kg securos cranial cruciate ligament repair system. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 283 - 288, 2005.
- BARAÚNA JÚNIOR, D. et al. Técnica de interligação extracapsular fêmoro-fabelo-tibial na ruptura do ligamento cruzado cranial em cães: achados clínicos e radiográficos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 769 - 776, 2007.
- BIASI, F. et al. Avaliação clínica e radiográfica da reconstrução do ligamento cruzado cranial em cães com uso de aloenxerto de ligamento patelar congelado. **Ars Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 100 - 106, 2002.
- BRINKER, W. O.; PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais**. 4 ed. São Paulo: Manole, 2009.
- BRENDOLAN, A. P.; REZENDE, C. M. F.; PEREIRA, M. M. Propriedades biomecânicas da fásia lata e do ligamento cruzado cranial de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, 2001.
- BUDSBERG, S. C. et al. Force plate analyses before and after stabilisation of canine stifles for cruciate injury. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 1522 - 1524, 1988.
- BURGESS, R. et al. In vitro biomechanical evaluation and comparison of fiberwire, fibertape, orthofiber, and nylon leader line for potential use during extra-articular stabilization of canine cruciate deficient stifles. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 208 - 215, 2010.

BURTON, A.G. et al. Implant-associated neoplasia in dogs: 16 cases (1983-2013). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 7, p. 778 - 785, 2015.

BUTLER, D.L. et al. Biomechanics of cranial cruciate ligament reconstruction in the dog: II. Mechanical properties. **Veterinary Surgery**, v. 12, p. 113 - 118, 1983.

CAPORN, T. M.; ROE, S. C. Biomechanical evaluation of the suitability of monofilament nylon fishing and leader line for extra-articular stabilisation of canine cruciate-deficient stifle. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 9, p. 126 - 133, 1996.

CHIERICHETTI, A.L. et al. Ruptura de ligamento cruzado cranial. Estudo comparativo da técnica extracapsular com enxerto autógeno de fáscia lata com e sem artrotomia exploratória. **Clínica Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 34 - 42, 2001.

CHILDERS, H.E. New methods for cruciate ligament repair: II. Repair by suture technique. **Modern veterinary practice**, v. 47, p. 59 - 60, 1966.

CHRISTOPHER, S. A.; BEETEM, J.; COOK, J. L. Comparison of long-term outcomes associated with three surgical techniques for treatment of cranial cruciate ligament disease in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 42, p. 329 - 334, 2013.

COETZEE, G. L.; LUBBE, A. M. A prospective study comparing two fascial reconstruction techniques to stabilise the cranial cruciate deficient stifle in the dog. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 8, p. 82 - 90, 1995.

COMERFORD, E. et al. Metabolism and composition of the canine anterior cruciate ligament relate to difference in knee joint mechanics and predisposition to ligament rupture. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, p. 61 - 66, 2005.

COOK, J.L. et al. Clinical comparison of a novel extracapsular stabilization procedure and tibial plateau leveling osteotomy for treatment of cranial cruciate ligament deficiency in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 315 - 323, 2010.

CURTIS, R. J.; DELEE, J. C.; DREZ, D. J. Reconstruction of the anterior cruciate ligament with freeze-dried fascia lata allografts in dogs. **American Journal of Sports Medicine**, v. 13, p. 408 - 414, 1985.

DEANGELIS, M.; LAU, R. E. A lateral retinacular imbrication technique for the surgical correction of anterior cruciate ligament rupture in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, p. 79 - 84, 1970.

DORLOT, J. M. et al. Load elongation behavior of the canine anterior cruciate ligament. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 102, p. 190 - 193, 1980.

DULISCH, M. L. Suture reaction following extra-articular stifle stabilisation in the dog - Part I: A retrospective study of 161 stifles. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 17, p. 569 - 571, 1981.

DUNN, A.L. et al. Osteosarcoma at the site of titanium orthopaedic implants in a dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 90, n. 1 - 2, p. 39 - 43, 2012.

DUVAL, J. M. et al. Breed, sex and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 811 - 814, 1999.

DYCUS, D. L. et al. In-vitro comparison of 3 knotting techniques for lateral fabellotibial suture stabilization. **Canadian Veterinary Journal**, v. 54, p. 353 - 358, 2013.

ELKINS, A. D. et al. A retrospective study evaluating the degree of degenerative joint disease in the stifle joint of dogs following surgical repair of anterior cruciate ligament rupture. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 533 - 540, 1991.

EVORA, M. C. et al. Comparação de técnicas FTIR de transmissão, reflexão e fotoacústica na análise de poliamida-6, reciclada e irradiada. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 1, p. 60 - 68, 2002.

FIROUZI, D. et al. A new technique to improve the mechanical and biological performance of ultra-high molecular weight polyethylene using a nylon coating. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 32, p. 198 - 209, 2014.

FLO, G.L. Modification of the lateral retinacular imbrication technique for stabilizing cruciate ligament injuries. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 11, 570 - 573, 1975.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

FRANÇA, L. C. M. et al. Estudo biomecânico comparativo da resistência às forças de compressão entre os parafusos pediculares poliaxiais e monoaxiais. **Coluna/Columna**, v. 7, n. 2, p.133 - 138, 2008.

GAMBARDELLA, P. C.; WALLACE, L. J.; CASSIDY, F. Lateral suture technique for management of anterior cruciate ligament rupture in dogs: A retrospective study. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 17, p. 33 - 38, 1981.

GATINEAU, M. et al. Mechanical evaluation of hydrogen peroxide gas plasma sterilization of nylon lines used for extra articular stabilization of the canine stifle joint. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 48 - 53, 2010.

GUPTA, B. N.; BRINKER, W. O.; SUBRAMANIAN, K. N. Breaking strength of the cruciate ligaments in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 10, p. 1586 - 1588, 1969.

HARPER, T. A. et al. An in vitro study to determine the effectiveness of a patellar ligament/fascia lata graft and new tibial suture anchor points for extracapsular stabilization of the cranial cruciate ligament-deficient stifle in the dog. **Veterinary Surgery**, v. 33, p. 531 - 541, 2004.

HAYASHI, K. et al. Histologic changes in ruptured canine cranial cruciate ligament. **Veterinary Surgery**, v. 32, p. 269 - 277, 2003.

HO, C. H. et al. Long-term active antimicrobial coatings for surgical sutures based on silver nanoparticles and hyperbranched polylysine. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, v. 24, p. 1589 - 1600, 2013.

HULSE, D. A. et al. Biomechanics of cranial cruciate ligament reconstruction in the dog I. In vitro laxity testing. **Veterinary Surgery**, v. 12, p. 109 - 112, 1983.

IGNA, C. et al. In Vitro Mechanical Testing of Monofilament Nylon Fishing Line, for the Extracapsular Stabilisation of Canine Stifle Joint. **Bulletin UASVM Veterinary Medicine**, v. 71, p. 124 - 129, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993 -5: 2009. **Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity**. Geneva, 2009.

JERRAM, R. M.; WALKER, A. M. Cranial cruciate ligament injury in the dog: pathophysiology, diagnosis and treatment. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 51, p. 149 - 158, 2003.

JOHNSON, S. G. et al. System behavior of commonly used cranial cruciate ligament reconstruction autografts. **Veterinary Surgery**, v. 18, n. 6, p. 459 - 465, 1989.

JUNG, M. R. et al. Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 127, p. 704 - 716, 2018.

KIM, S. E. et al. Tibial osteotomies for cranial cruciate ligament insufficiency in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 37, 111 - 125, 2008.

KORVICK D. L.; JOHNSON A. L.; SCHAEFFER D. J. Surgeons' preferences in treating cranial cruciate ligament ruptures in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 1318 - 1324, 1994.

LAROS, G. S.; TIPTON, C. M.; COOPER, R. R. Influence of physical activity on the ligament insertions in the knees of dogs. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 53, p. 275 - 285, 1971.

LEITE, D. O.; PRADO, R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 2, p. 2504(1) - 2504(9), 2012.

LEWIS, D. D.; MILTHORPE, B. K.; BELLENGER, C. R. Mechanical comparison of materials used for extracapsular stabilisation of the stifle joint in dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 12, p. 890 - 896, 1997.

LOPEZ, M. J. et al. A comparison of joint stability between anterior cruciate intact and deficient knees: a new canine model of anterior cruciate ligament disruption. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, p. 224 - 230, 2003.

MASSON, A. O.; NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Análise comparativa de diferentes métodos de citotoxicidade *in vitro*. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB**, 2014.

MCFARLAND, E. G. et al. The relationship of vascularity and water content to tensile strength in a patellar tendon replacement of the anterior cruciate in dogs. **American Journal of Sports Medicine**, v. 14, p. 436 - 448, 1986.

MILDNER, M. D. **Análise da citotoxicidade de compósitos restauradores para técnica direta e indireta: estudo *in vitro***. Tese de mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia. Porto Alegre, 2015.

MOORES, A. P. et al. Mechanical evaluation of two crimp clamp systems for extracapsular stabilization of the cranial cruciate ligament-deficient canine stifle. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 470 - 475, 2006.

MORAES, J. R. E. et al. Propriedades mecânicas de três fios de sutura no reparo do tendão do músculo flexor profundo do dedo de cães. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 443 - 451, 2003.

MUIR, P. **Advances in the Canine Cranial Cruciate Ligament**, 2 ed. ACVS Foundation, Hoboken: Wiley Blackwell, 2018.

MUZZI, L. A. P. et al. Ruptura do ligamento cruzado cranial em cães: fisiopatologia e diagnóstico. **Clínica Veterinária**, v. 46, n.1, p. 32 - 42, 2003.

NWADIKE, B.S.; ROE, S.C. Mechanical comparison of suture material and knot type used for fabello-tibial sutures. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, n. 11, p. 47 - 52, 1998.

ODA, S. G.; MATERA, J. M. Tratamento de ruptura do ligamento cruzado cranial por sutura fabelo-tibial lateral: revisão. **Revista acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v. 7, n. 3, p. 319 - 329, 2009.

O'DONOGHUE, D. H. et al. Repair of the anterior cruciate ligament in dogs. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 48-A, p. 503 - 519, 1966.

- PEYCKE, L. E. et al. Mechanical comparison of six loop fixation methods with monofilament nylon leader line. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 15, p. 210 - 214, 2002.
- POZZI, A.; KIM, S. E. Biomechanics of the normal and cranial cruciate ligament-deficient stifle. In: **Advances in the Canine Cranial Cruciate Ligament**, 2 ed. Edited by Peter Muir. ACVS Foundation, p.39 - 44, 2018.
- RAHAL, S. C. et al. Estudo comparativo das reações teciduais produzidas pela "linha de pesca" (poliamida) e fio de náilon cirúrgico. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 89 - 93, 1997.
- ROCA, R. Y. et al. Ex vivo mechanical properties of a 2.5-mm bone anchor for treatment of cranial cruciate ligament rupture in toy breed dogs. **Veterinary Surgery**, v. 49, p. 736 - 740, 2020.
- ROE, S. C.; KUE, J.; GEMMA, J. Isometry of potential suture attachment sites for the cranial cruciate ligament deficient canine stifle. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 21, p. 215 - 220, 2008
- ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 317 - 320, 2003.
- ROMANO, L. et al. Análise biomecânica do joelho íntegro e com ruptura do ligamento cruzado cranial quanto o grau de deslocamento cranial e rigidez articular em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 46 - 50, 2006.
- ROSE, N. D. et al. Mechanical testing of orthopedic suture material used for extra-articular stabilization of canine cruciate ligament-deficient stifles. **Veterinary Surgery**, v. 41, p. 266 - 272, 2012.
- RYAN, J. R.; DROMPP, B. W. Evaluation of tensile strength of reconstructions of the anterior cruciate ligament using the patellar tendon in dogs: a preliminary report. **Southern Medical Journal**, v. 59, n. 2, p. 129 - 134, 1966.
- SAMPLE, S. J. Biomechanics of the cruciate ligaments. In: **Advances in the Canine Cranial Cruciate Ligament**, 2 ed. Edited by Peter Muir. ACVS Foundation, p. 13 - 20, 2018.
- SARDENBERG, T. et al. Avaliação das propriedades mecânicas e dimensões de fios de sutura utilizados em cirurgias ortopédicas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 88 - 94, 2003.
- SELMIC, L. E. et al. Osteosarcoma following tibial plateau leveling osteotomy in dogs: 29 cases (1997 - 2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 9, p. 1053 - 1059, 2014.
- SICARD, G. K. et al. Comparison of fishing line for repair of the cruciate deficient stifle. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 12, p. 138 - 141, 1999.

SICARD, G. K.; HAYASHI, K.; MANLEY P. A. Evaluation of 5 types of fishing material, 2 sterilization methods, and a crimp-clamp system for extra-articular stabilization of the canine stifle joint. **Veterinary surgery**, v. 31, p. 78 - 84, 2002.

SILVA, L.; TOGNANA, S.; SALGUEIRO, W. Study of the water absorption and its influence on the Young's modulus in a commercial polyamide. **Polymer Testing**, v. 32, p. 158 - 164, 2013.

TABELA de valores de absorção no infravermelho para compostos orgânicos. Disponível em:

<https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/340273/mod_resource/content/1/TABELA%20DE%20VALORES%20DE%20ABSOR%C3%87%C3%83O%20NO%20INFRVERMELHO.pdf> Acesso em: 01 mar. 2020.

TINGA, S.; KIM, S. E. Extracapsular Stabilization. In: **Advances in the Canine Cranial Cruciate Ligament**, 2 ed. Edited by Peter Muir. ACVS Foundation, p. 189 - 199, 2018.

TONKS, C. A; LEWIS, D. D.; POZZI, A. A review of extra-articular prosthetic stabilization of the cranial cruciate ligament-deficient stifle. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, n. 3, p. 167 - 177, 2011.

TRAIL, I. A.; POWELL E. S.; NOBLE J. An evaluation of suture materials used in tendon surgery. **Journal of Hand Surgery**, v. 14b, n. 4, p. 422 - 427, 1989.

TRENTANI, L. et al. Evaluation of the TiMo₁₂Zr₆Fe₂ alloy for orthopaedic implants: in vitro biocompatibility study by using primary human fibroblasts and osteoblasts. **Biomaterials**, v. 23, p. 2863 - 2869, 2002.

VASSEUR, P. B.; ARNOCZKY, S. P. Collateral ligaments of the canine stifle joint: Anatomic and functional analysis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 1133 - 1137, 1981.

VASSEUR, P. B. et al. Correlative biomechanical and histologic study of the cranial cruciate ligament in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 1842 - 1854, 1985.

VIANNA, M. L.; ROE, S. C. Mechanical comparison of two knots and two crimp systems for securing nylon line used for extra-articular stabilization of the canine stifle. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 567 - 572, 2006.

WALLACE, A. M. et al. A biomechanical comparison of six different double loop configurations for use in the lateral fabela suture technique. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 21, p. 391 - 399, 2008.

WARZEE, C. C. et al. Effect of tibial plateau leveling on cranial and caudal tibial thrusts in canine cranial cruciate-deficient stifles: an in vitro experimental study. **Veterinary Surgery**, v. 30, p. 278 - 286, 2001.

WHITEHAIR, J. G.; VASSEUR, P. B.; WILLITS, N. H. Epidemiology of cranial cruciate ligament rupture in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 7, p. 1016 - 1019, 1993.

WILKE, V. L. et al. Estimate of the annual economic impact of treatment of CCL injury in dogs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 10, p. 1604 - 1607, 2005.

WINNACKER, M. Polyamides and their functionalization: recent concepts for their applications as biomaterials. **Biomaterials Science**, p. 1 - 6, 2017.

WINGFIELD, C. et al. Cranial cruciate stability in the Rottweiler and Racing Greyhound: an in vitro study. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p. 193 - 197, 2000.

YOSHIYA, S. et al. Augmentation of anterior cruciate ligament reconstruction in dogs with prostheses of different stiffnesses. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 4, p. 475 - 485, 1986.