



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Alexandre Zuccon

Análise do ligamento redondo na instabilidade não traumática do
quadril: estudo experimental em coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em Bases Gerais
da Cirurgia

Orientadora: Dra. Daniele Cristina Cataneo
Coorientador: Dr. Hamilton da Rosa Pereira

Botucatu
2018

ALEXANDRE ZUCCON

Análise do ligamento redondo na instabilidade não traumática do quadril: estudo experimental em coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em Bases
Gerais da Cirurgia

Orientadora: Dra. Daniele Cristina Cataneo

Coorientador: Dr. Hamilton da Rosa Pereira

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Zuccon, Alexandre.

Análise do ligamento redondo na instabilidade
não-traumática do quadril : estudo experimental em coelhos
/ Alexandre Zucon. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Daniele Cristina Cataneo
Coorientador: Hamilton da Rosa Pereira
Capes: 40102114

1. Colágeno. 2. Luxação do quadril. 3. Ligamentos
redondos. 4. Modelos animais em pesquisa. 5. Coelho.

Palavras-chave: Coelhos; Colágeno; Ligamentos Redondos;
Luxação do Quadril; Modelos Animais.

Alexandre Zuccon

**ANÁLISE DO LIGAMENTO REDONDO NA INSTABILIDADE NÃO
TRAUMÁTICA DO QUADRIL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Daniele Cristina Cataneo - Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Mauro dos Santos Volpi (Titular)

Dr. Mauro Cesar Moraes Filho (Titular)

Dr. Carlos Alberto do Santos (Titular)

Dr. Alexandre Francisco de Lourenço (Titular)

Dr. Miguel Akkari (Suplente)

Dra. Mônica Paschoal Nogueira (Suplente)

Dr. Reinaldo dos Santos Volpi (Suplente)

Botucatu, 22 de fevereiro de 2018, às 9h

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Vitório e Selma**,
por todos os ensinamentos durante minha vida
e principalmente pelo caráter e ética irretocáveis.
São exemplos que sempre seguirei.*

*À minha esposa **Stella**,
pelo amor e suporte que sempre me proporcionou.
Sem ela não conseguiria enfrentar esse desafio.*

*Às minhas filhas **Vitória e Catarina**,
são minhas verdadeiras fontes de inspiração.*

*Aos meus irmãos **Rodrigo e Gustavo**,
pela amizade e força que eternamente compartilharemos.*

AGRADECIMENTOS

À professora adjunta doutora do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FMB – Unesp **Daniele Cristina Cataneo**, pela oportunidade em realizar essa tese e pelas importantes orientações durante a confecção da mesma.

Ao professor assistente doutor do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da FMB – Unesp **Hamilton da Rosa Pereira**, por todos os ensinamentos ortopédicos e pelas relevantes contribuições realizadas para essa tese.

Aos professores doutores **Sérgio Luis Felisbino** e **Luis Antonio Justulin Júnior**, por todo auxílio e orientações relevantes durante a realização da tese.

Aos doutores **Francesco Camara Blumetti**, **Marcos Ferreira Minicucci** e **Laís Helena Navarro e Lima**, pelas contribuições durante o exame de qualificação desta tese.

Ao técnico do Laboratório de Cirurgia Experimental da Unesp **Luiz Carlos Bardella** por todo empenho, auxílio e cuidados com os animais durante toda a fase experimental do projeto.

Ao médico veterinário da Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPEX da Unesp **Diego Generoso**, por suas contribuições durante a fase experimental da tese.

À assistente administrativo da seção de pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia da FMB - UNESP Sra. **Márcia Fonseca Piagentini Cruz**, por todo o auxílio técnico-administrativo durante a confecção desta tese.

Agradecimentos

Aos Doutores **Alice Rosa Ramos** (superintendente técnica da Associação de Assistência à Criança Deficiente – AACD), **Solange Aoki** (gerente médica de reabilitação da AACD), **Marcelo Sartori** (diretor médico da AACD), **Marcelo de Jesus Justino Ares** (fisiatra da AACD) e **Daniela Lins Neves** (gerente médica do hospital da AACD), pela oportunidade a mim cedida de cursar todo o programa de pós-graduação em meio às minhas atividades assistenciais.

À bibliotecária **Camila Gomes da Rocha Agostini** por todo o auxílio técnico na elaboração da tese.

RESUMO

ZUCCON, A. **Análise do ligamento redondo na instabilidade não traumática do quadril. Estudo experimental em coelhos.** 2018. 107 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

Introdução: A luxação do quadril em uma criança pode interferir com a função dessa articulação, causando dor, limitação de movimento, entre outras consequências. Na redução aberta da articulação, diversas estruturas anatômicas são abordadas como o ligamento redondo (LR) que, tradicionalmente, é ressecado. Porém, existe controvérsia a respeito de sua importância funcional. **Objetivo:** Comparar através de análise biomecânica, bioquímica e histológica o LR de quadris instáveis (luxados e subluxados) com o ligamento de quadris normais. **Métodos:** Estudo experimental com coelhos esqueleticamente imaturos, utilizando um modelo para luxação do quadril. Oitenta e oito coelhos foram submetidos à fixação do joelho de uma das patas traseiras em extensão, o que leva à instabilidade do quadril ipsilateral, devido ao desequilíbrio muscular e à alteração em posicionamento no membro. Dezenove coelhos morreram, 28 foram excluídos por não evoluírem com a luxação e 5 foram excluídos pela impossibilidade de identificação do LR. Dos 36 coelhos que compuseram a amostra, estratificamos as análises em quantitativas: biomecânica (12 coelhos), zimografia (8 coelhos), histologia (14 coelhos) e qualitativa: imuno-histoquímica (2 coelhos). Realizamos análise estatística para comparação entre o lado luxado e o controle de cada coelho quanto às análises quantitativas. **Resultados:** No ensaio biomecânico, a média da força máxima do ligamento redondo no lado luxado foi de $43,25 \pm 16,25\text{N}$ e $46,62 \pm 15,56\text{N}$ para o lado normal ($p=0,594$) e a média da deformação máxima foi de $3,94 \pm 1,88\text{mm}$ para o lado luxado e $4,55 \pm 1,19\text{mm}$ para o normal ($p = 0,328$). Histologicamente foi quantificada a celularidade, mostrando em média, para o ligamento do lado luxado, $6,83 \pm 3,47$ células por campo e $3,87 \pm 2,13$ para o lado normal ($p<0,001$), além de $74,3 \pm 10,5\%$ de ocupação por colágeno no lado luxado e $84,5 \pm 9,5\%$ no lado normal ($p<0,001$). Na zimografia, a quantidade de metaloproteinase 2 (MMP-2) em forma ativa foi $481,8 \pm 228\text{UA}$, em média, para o lado luxado e de $294,4 \pm 78\text{UA}$ para o lado normal ($p=0,068$). **Conclusão:** Embora tenham ocorrido alterações significativas no LR dos quadris instáveis do ponto de vista histológico e com diferença importante na zimografia, esta sem significância estatística, isso não foi observado no ensaio biomecânico, no qual não houve diferença estatística entre os lados.

Palavras-chave: Colágeno; Luxação do Quadril; Ligamentos Redondos; Modelos Animais; Coelhos.

ABSTRACT

ZUCCON, A. **Analysis of the round ligament in non-traumatic hip instability. experimental study in rabbits.** 2018. 107 f. Thesis (Master) – Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

Background: In the open reduction, used in the treatment of the hip dislocation in children, several structures are approached, such as the round ligament (RL) that has traditionally been resected. However, there is controversy regarding its possible maintenance as well as its functional importance. The aim of this study was to compare the RL properties of stable and unstable hips. **Methods:** Experimental study with young rabbits using a model for congenital hip dislocation. Eighty-eight rabbits underwent fixation of the knee of one hind leg in extension, which leads to ipsilateral hip instability. Nineteen rabbits died and 28 were excluded because they did not develop dislocation. Five additional rabbits also excluded because they did not present the RL. Thirty-six rabbits composed the sample that was stratified for quantitative analysis: biomechanical (12 rabbits), zymography (8 rabbits), histology (14 rabbits) and qualitative: immunohistochemistry (2 rabbits). We performed statistical analysis for comparison between the unstable side and the control of each rabbit. **Results:** Biomechanical assay showed the mean maximal strength of the RL on the unstable side was $43.25 \pm 16,25\text{N}$ and $46.62 \pm 15,56\text{N}$ for the control side ($p = 0.594$) and the mean maximum deformation was $3.94 \pm 1,88\text{mm}$ for the unstable side and $4.55 \pm 1,19\text{mm}$ for the control ($p = 0.328$). Histologically, there was an increase in cellularity on the unstable side showing, on average, $6.83 \pm 3,47$ cells per field and $3.87 \pm 2,13$ for the control side ($p < 0.001$), in addition to $74.3 \pm 10,5\%$ of collagen occupancy on the unstable side and $84,5 \pm 9,5\%$ on the control side ($p < 0.001$). In zymography, the amount of metalloproteinase 2 (MMP-2) was $481.8 \pm 228\text{UA}$, on average, for the unstable side and $294.4 \pm 78\text{UA}$ for the control side ($p = 0.068$). **Conclusions:** Although there were significant changes in the RL of the unstable hips from the histological analysis and there were an important difference in zymography without statistical significance, that was not observed in the biomechanical test

Keyword: Collagen; Hip Dislocation; Round Ligaments; Models, Animal; Rabbits.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu. Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação. Manual de apresentação de trabalho científico: tese, dissertação e monografia. Elaborado por Enilze de Souza Nogueira Volpato, Rosemary Cristina da Silva e Luciana Pizzani. Botucatu: Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação; 2014.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AEP	Amiotrofia espinhal progressiva
CA	Cavidade acetabular
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CF	Cabeça do fêmur
CL	Colágeno
DAB	Diaminobenzidina
DDQ	Displasia do desenvolvimento do quadril
DFTN	Defeitos de fechamento do tubo neural
Dmáx	Deformação máxima
FB	Fibroblastos
Fcl	Fibras de colágeno
Fel	Fibras de elastina
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
Fmáx	Força máxima
IC	Intervalo de confiança
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
LR	Ligamento redondo
LT	Ligamento transverso
M0	Momento zero
M1	Momento um
M2	Momento dois
Macro	Macroscópica
Máx	Máximo
Micro	Microscópica
Min	Mínimo
MMPs	Metaloproteinases
PC	Paralisia cerebral
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TC	Tecido conjuntivo
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta

TIMP Inibidor tecidual de metaloproteinase
UNESP Universidade Estadual Paulista

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
=	Igual
±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
UA	Unidade arbitrária
X	Média
σ=	Desvio padrão

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados referentes aos 11 coelhos com medidas dos ligamentos em milímetros (mm), utilizados para o cálculo amostral..... 49
- Tabela 2** - Comparação entre lados Controle e Luxado para porcentagem de migração da cabeça do fêmur, visto nas radiografias. Lembrando que foi utilizado como valor mínimo de 50% de migração no lado Luxado para inclusão do coelho na amostra..... 61
- Tabela 3** - Comparação entre os lados Controle e Luxado para comprimento do ligamento redondo em milímetros (mm)..... 62
- Tabela 4** - Compara força máxima em Newtons (F_{máx}) entre os lados luxado e controle..... 64
- Tabela 5** - Compara deformação máxima em milímetros (D_{máx}) entre os lados luxado e controle..... 64
- Tabela 6** - Comparação da celularidade entre os lados Controle ou Normal e Luxado através dos parâmetros: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo (Min), valor máximo (Max), número de campos microscópicos avaliados (N) e intervalo de confiança (IC)..... 66
- Tabela 7** - Comparação da quantidade de colágeno entre os lados Controle e Luxado através dos seguintes parâmetros: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo (Min), valor máximo (Máx), número de campos microscópicos avaliados (N) e intervalo de confiança (IC)..... 67
- Tabela 8** - Valores arbitrários em densitometria para as formas intermediária e ativa da MMP-2, ponderadas por mil e demonstrando as seguintes variáveis: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo (Min), valor máximo (Máx), número de coelhos (N) e intervalo de confiança (IC)..... 69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Lado Controle ($F_{m\acute{a}x}$ X $D_{m\acute{a}x}$).....	63
Gráfico 2 -	Lado Luxado ($F_{m\acute{a}x}$ X $D_{m\acute{a}x}$).....	63
Gráfico 3 -	Comparação das médias para $F_{m\acute{a}x}$ (N) entre os lados Luxado e Controle ou Normal.....	65
Gráfico 4 -	Comparação das médias para $D_{m\acute{a}x}$ (mm) entre os lados Luxado e Controle ou Normal.....	65
Gráfico 5 -	Demonstração gráfica dos valores evidenciados na tabela 6, mostrando a diferença na celularidade entre os lados Controle ou Normal e Luxado.....	67
Gráfico 6 -	Demonstração gráfica dos valores evidenciados na tabela 7, mostrando a representação gráfica da área ocupada por colágeno em porcentagem, nos lados Normal ou Controle e Luxado.....	68
Gráfico 7 -	Demonstração dos valores citados na tabela 8, comparando os lados Normal ou Controle e Luxado, tanto para forma intermediária quanto para forma ativa da MMP-2.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Desenho esquemático do fêmur proximal em rotação externa, sua relação com o acetábulo e mostrando o ligamento redondo em seu interior..... 27
- Figura 2 -** Representação esquemática da evolução da lesão às fibras colágenas quando submetidas a forças de tensão excessivas..... 30
- Figura 3 -** Desenho esquemático da produção de colágeno e suas ligações cruzadas (*cross links*)..... 31
- Figura 4 -** Estabilização do joelho em extensão completa de coelho da amostra. Realizado sob anestesia, com antissepsia e de forma percutânea, utilizando 1 fio de Kirschner de 1,5mm e com auxílio de intensificador de imagem..... 41
- Figura 5 -** Intensificador de imagem demonstrando a posição do fio de Kirschner estabilizando o joelho em completa extensão..... 42
- Figura 6 -** A) Imagem radiográfica demonstrando luxação do quadril esquerdo (seta branca) após 6 semanas da estabilização do joelho ipsilateral. B) Luxação do quadril esquerdo (seta branca tracejada). C) Luxação do quadril esquerdo (seta azul)..... 44
- Figura 7 -** A) Imagem radiográfica de quadril do lado direito apresentando 33% de subluxação, sendo excluído do estudo. A linha H passa pelas cartilagens trirradiadas dos quadris (similar à linha de Hilgenheiner traçada no rx de bacia de crianças), a linha B é traçada perpendicularmente à linha H e no rebordo acetabular (similar à linha de Perkins), a Linha C determina o limite medial da cabeça do fêmur e a linha A determina o limite lateral da mesma. A porcentagem de migração é identificada a partir do cálculo: distância AB/AC x 100 = % de migração da cabeça do fêmur (similar ao realizado e descrito por Reimers). B) Imagem radiográfica mostrando quadril com 75% de migração lateral do lado esquerdo (seta branca tracejada) e cobertura acetabular completa no quadril direito (lado normal). C) Imagem radiográfica mostrando quadril direito com 70% de migração lateral (seta azul) 46

- e cobertura completa do lado esquerdo (lado normal).....
- Figura 8** - Imagem radiográfica do membro traseiro esquerdo demonstrando fratura de fêmur e não ocorrência da luxação do quadril. Coelho excluído do estudo..... 47
- Figura 9** - Quadril luxado do coelho 03, mostrando cápsula espessada (seta azul), displasia acetabular (seta branca tracejada) e cabeça do fêmur sem o ligamento redondo, sendo possível visualizar apenas a fôvea (seta branca)..... 48
- Figura 10** - Mensuração do ligamento redondo (seta branca), através de paquímetro eletrônico, desde sua origem acetabular (seta preta tracejada) até sua inserção na região foveolar da cabeça do fêmur (seta preta contínua). Nota-se ainda que pequena ressecção na região acetabular (seta tracejada preta) foi necessária para melhor posicionamento do paquímetro..... 50
- Figura 11** - Fluxograma da composição da amostra..... 51
- Figura 12** - Peças já preparadas para o ensaio biomecânico, após dissecção mostrando a hemipelve com acetábulo, o fêmur e apenas o LR entre o fêmur e o acetábulo. São lados Controles (C), isto é, sem luxação..... 52
- Figura 13** - A) foto de quadril luxado sendo preparado para o ensaio mecânico, notando em detalhe a cabeça femoral (seta azul) fora da cavidade acetabular e o ligamento redondo evidente, mais espessado e maior em comprimento (seta branca). B) foto do quadril contralateral (controle) do mesmo coelho. Nota-se a cabeça do fêmur (seta preta pontilhada) bem centrada no acetábulo (seta branca)..... 53
- Figura 14** - Foto da máquina de teste biomecânico. Hemipelve na parte móvel (seta azul) e o fêmur fixado na região fixa da máquina (seta branca)..... 53
- Figura 15** - Fotomicrografias representativas de cortes de ligamento submetidos à coloração por Hematoxilina e Eosina dos grupos normal ou Controle (a) e Luxado (c). Estas imagens foram 55

utilizadas para a detecção automática da percentagem de área ocupada pelos núcleos celulares corados por hematoxilina nos grupos Controle (b) e Luxado (d).....

- Figura 16** - Imagem representativa da quantificação automática da fração volumétrica ocupada pelo colágeno nos ligamentos dos diferentes grupos experimentais. As imagens a (Controle) e b (Luxado) representam cortes histológicos de ligamentos corados por Picrosirius. Em c e d observa-se a quantificação automática das fibras de colágeno detectadas pela histoquímica de Picrosirius..... 56
- Figura 17** - Fotomicrografias de ligamentos dos grupos Controle (A e B) e Luxado (C e D) corados pro H.E. Observar o maior número de células no grupo Luxado. As figuras E e F, G e H (grupos Controle e Luxado, respectivamente) representam reações imunohistoquímicas para detecção de vimentina. Barra de escalas: A, C, E e G: 100µm; B, D, F e H: 5µm..... 57
- Figura 18** - Representação da atividade gelatinolítica da MMP-2 determinada por gel de zimografia nos ligamentos dos grupos controle e luxado. As bandas claras no gel demonstram a atividade das formas intermediária e ativa da MMP-2. Não foi detectada atividade da MMP-9..... 70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1	Anatomia e embriologia do quadril e do ligamento redondo.....	26
2.2	Composição dos ligamentos.....	28
2.3	Biomecânica e lesão ligamentar.....	29
2.4	Resposta à lesão tecidual e metabolismo do colágeno.....	30
2.5	A instabilidade não traumática do quadril na criança (subluxação e luxação).....	32
2.6	A correção cirúrgica da instabilidade do quadril e a importância do ligamento redondo.....	34
3	OBJETIVO.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	Animais de experimentação.....	40
4.2	Ambiente de experimentação.....	40
4.3	Protocolo experimental.....	40
4.3.1	Momento 0 (M0): Modelo de experimentação.....	40
4.3.1.1	Preparo e técnica cirúrgica.....	42
4.3.1.2	Pós-operatório.....	43
4.3.2	Momento 1 (M1): identificando os quadris luxados (6 semanas após M0).....	43
4.3.2.1	Definição da amostra.....	47
4.3.2.2	Cálculo amostral.....	48
4.3.3	Momento 2 (M2): Estratificação e análises da amostra	50
4.3.3.1	Grupo A (análise biomecânica).....	52
4.3.3.2	Grupo B (análise histológica): 14 coelhos que foram submetidos tanto à avaliação de celularidade (B1) quanto do colágeno (B2).....	54
4.3.3.2.1	Morfologia e morfometria (preparo dos ligamentos para análise histológica).....	54
4.3.3.2.2	Determinação da celularidade (B1): 14 coelhos.....	54

4.3.3.2.3	Quantificação das fibras de colágeno (B2): 14 coelhos.....	14	55
4.3.3.3	Grupo C (imunohistoquímica): 2 coelhos.....	56	56
4.3.3.4	Grupo D (análise bioquímica por zimografia): composto por 8 coelhos.....	58	58
4.3.3.4.1	Extração, quantificação de proteínas totais e realização da técnica de zimografia.....	58	58
4.4	Análise estatística.....	58	58
4.4.1	Teste de Wilcoxon.....	58	58
4.4.2	Teste t-Student Pareado.....	59	59
5	RESULTADOS.....		61
5.1	Comparação da porcentagem de migração da cabeça do fêmur entre o lado normal (controle) e lado luxado nos coelhos incluídos na amostra.....	61	61
5.2	Comparação do comprimento do ligamento redondo entre o lado normal (controle) e o lado luxado nos coelhos que participaram das análises histológicas imuno-histoquímica e bioquímica.....	61	61
5.3	Análise biomecânica.....	62	62
5.4	Análise histológica.....	66	66
5.4.1	Celularidade.....	66	66
5.4.2	Quantificação do colágeno.....	67	67
5.5	Análise bioquímica (zimografia).....	68	68
6	DISCUSSÃO.....		72
6.1	Modelo experimental.....	75	75
6.2	Mecanismos de avaliação.....	77	77
6.2.1	Teste biomecânico.....	77	77
6.2.2	Histologia (celularidade e colágeno) e imuno-histoquímica (vimentina).....	79	79
6.2.3	Zimografia.....	80	80
6.3	Resultados.....	80	80
6.4	Limitações do estudo.....	86	86
7	CONCLUSÃO.....		89
	REFERÊNCIAS.....		91

APÊNDICES.....	101
ANEXOS.....	106

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A instabilidade (subluxação ou luxação) não traumática do quadril em uma criança pode estar relacionada a diversas condições patológicas como a displasia do desenvolvimento do quadril (DDQ), paralisia cerebral (PC), defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN), artrogripose, entre outras. As características da instabilidade em cada diagnóstico citado anteriormente são específicas, além de muito diferentes entre si e, desta forma, o tratamento deve ser individualizado.

A luxação do quadril pode gerar consequências muitas vezes devastadoras à função dessa articulação. Dor, degeneração articular, alterações na marcha, limitação de movimento, discrepância de comprimento entre os membros inferiores e obliquidade pélvica estão entre os principais problemas ocasionados pela instabilidade **(Herring, 2008)**.

O tratamento tem como objetivo principal restituir a relação harmônica e congruente entre a cabeça do fêmur e o acetábulo, para que a função do quadril seja restabelecida, evitando, dessa forma, as complicações possíveis já mencionadas **(Herring, 2008)**.

Existem formas conservadoras de tratamento da instabilidade nos casos de DDQ, especialmente em crianças com menos de 6 meses de vida, havendo boas chances de atingir resultado satisfatório. Quando o tratamento é iniciado mais tardiamente, ou mesmo quando houve falha nos métodos incruentos de redução do quadril, em geral, é indicado tratamento cirúrgico. Este, por sua vez, pode variar desde abordagens em partes moles como os tendões (adutores e psoas), até a redução cruenta da articulação, associado inclusive a osteotomias, dependendo do caso e da idade do paciente **(Weinstein et al., 2003 a,b)**.

Nas outras condições associadas à instabilidade do quadril, por exemplo, na PC, o tratamento também pode apresentar variações dependendo da gravidade e da idade da criança **(Brunner e Baumann, 1994)**.

Quando é optado pelo tratamento cirúrgico da luxação do quadril através da redução cruenta, a abertura capsular é realizada, permitindo a exploração articular para retirada dos obstáculos para a recolocação da cabeça do fêmur em sua posição mais anatômica e funcional, em contato congruente com o acetábulo. A própria cápsula articular, labrum acetabular invertido, pulvinar espessado, ligamento redondo (LR), ligamento transverso (LT) e tendão do psoas são os referidos obstáculos à redução mais frequentemente mencionados na literatura **(Weinstein et al., 2003 a,b)**.

O LR, geralmente, encontra-se espessado e já que é entendido como um fator que dificulta a correção do quadril luxado, tradicionalmente, é seccionado e retirado de seu local de

origem. **Eberhardt et al. (2015)**, em estudo artroscópico sobre a correção cirúrgica da luxação do quadril na criança, referem que o LR é o segundo maior obstáculo à redução da cabeça do fêmur no acetábulo, ficando atrás apenas da constrição da cápsula articular e portanto, sugerem a ressecção do LR.

Wenger et al. (2008) e **Bache et al. (2008)** foram os primeiros a relatar resultados cirúrgicos utilizando o LR na cirurgia para correção da DDQ através de redução aberta, por via medial. Nesses estudos, os autores salientam a possível contribuição para estabilidade dos quadris após a cirurgia, ao manter os ligamentos redondos suturando-os, ao invés de ressecá-los.

Há controvérsias sobre a função e importância do LR. **Sarban et al. (2007)** estudaram as características morfológicas de ligamentos redondos em casos de DDQ e identificaram mecanorreceptores demonstrando, desta maneira, possível relevância quanto à propriocepção e estabilidade da articulação. Foram feitas ainda considerações sobre as possíveis alterações histológicas que o ligamento pode sofrer em decorrência da instabilidade do quadril, o que poderia alterar de maneira significativa o ligamento e sua função em quadros de luxação, quando comparados aos casos de subluxação.

Já **Muratli et al. (2004)** não identificaram mecanorreceptores ao analisarem o ligamento redondo e a cápsula articular de pacientes com DDQ submetidos ao tratamento cirúrgico, contestando por sua vez, a possível função biomecânica ligamentar.

Dodds et al. (2008) e **Li et al. (2015)** citam em seus estudos que os ligamentos de quadris que apresentam instabilidade estão sujeitos a maiores forças cronicamente e isso causa uma série de alterações na morfologia do LR, que se torna achatado, distendido e redundante.

Apesar do LR ser uma estrutura já investigada em outros estudos, principalmente em casos de DDQ, não foram encontradas investigações mais completas, envolvendo não somente as alterações morfológicas, mas também as biomecânicas. Também não foi possível encontrar na literatura pertinente estudos que comparassem o LR normal com o ligamento num quadril subluxado ou luxado.

Permanecem questões referentes à estrutura e função do LR, principalmente quando se trata de um quadril luxado. Nesses casos, seria particularmente interessante saber se sua estrutura e função biomecânica sofrem alterações relevantes, que poderiam comprometer seu uso na correção cirúrgica da luxação do quadril.

Portanto, a seguinte hipótese foi formulada nesse estudo: devem existir alterações histológicas e bioquímicas relevantes nos ligamentos redondos de quadris instáveis (subluxados

ou luxados) quando comparados com ligamentos de quadris normais. E essas alterações devem interferir com a resistência biomecânica desses ligamentos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anatomia e embriologia do quadril e do ligamento redondo

O quadril é uma articulação diartrodial (móvel e com membrana e líquido sinoviais), do tipo triaxial ou esferoide, denominada de enartrose, é capaz de realizar movimentos em torno de três eixos permitindo, dessa forma, flexão-extensão, adução-abdução e rotações axiais (**Gore et al., 1979**).

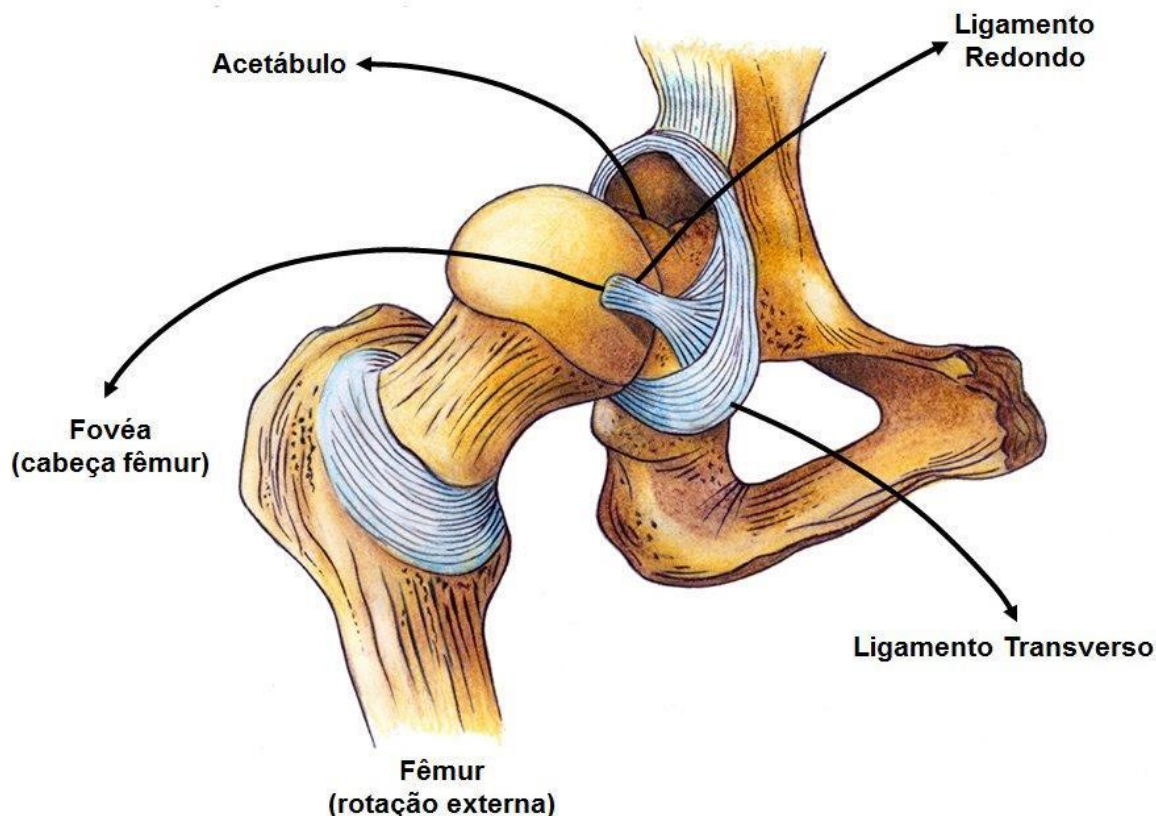
Os tecidos que compõem a articulação do quadril, cabeça do fêmur (CF) e cavidade acetabular (CA) têm a mesma origem embriológica, a partir de células mesenquimatosas primitivas. O crescimento e desenvolvimento normal dessa articulação depende de um equilíbrio do crescimento das cartilagens acetabular e trirradiada. Além disso, a CF deve estar bem localizada de maneira harmônica e centrada na CA (**Weinstein, 2005**).

Estudos experimentais e achados clínicos em seres humanos com luxações de quadris não tratadas sugerem que o principal fator que proporciona a forma côncava do acetábulo é a presença da CF no seu interior (**Weinstein, 2005**).

Além da CF e do acetábulo, fazem parte da articulação as placas fisárias (responsáveis pelo crescimento), a cartilagem hialina que reveste a cabeça femoral e o acetábulo, o labrum (estrutura que fica na margem da CA), o ligamento redondo (estrutura que conecta o fêmur ao acetábulo), o ligamento transverso (localizado na porção mais inferior do acetábulo) e a cápsula articular (que reveste a articulação), além do líquido sinovial (que nutre a cartilagem hialina e mantém uma tensão hidrostática entre o fêmur e acetábulo) (**Weinstein, 2005**).

O LR encontra-se no interior da articulação do quadril atravessando-a da fossa acetabular para a fôvea da cabeça femoral, em seu aspecto mais medial, ligeiramente posterior e inferiormente ao centro. É constituído por um banda achatada de fibras colágenas bem orientadas (principalmente colágenos tipos 1 e 3), medindo cerca de 30 a 35 mm de comprimento no adulto e é composto por 3 feixes (posterior, anterior e médio) (**Ponseti, 1978; Demange et al., 2007**).

O LR e sua relação com a cabeça do fêmur, assim como sua origem acetabular, podem ser vistos na figura 1.



Fonte: material elaborado pelo autor

Figura 1 - Desenho esquemático do fêmur proximal em rotação externa, sua relação com o acetábulo e mostrando o ligamento redondo em seu interior

Os elementos da articulação do quadril se formam através de tecido mesodérmico primitivo a partir de um processo histológico e mecânico de diferenciação. À medida que o quadril se desenvolve, as forças entre a cabeça do fêmur e o acetábulo são essenciais para a formação adequada da articulação (**Strayer Jr, 1943**).

O LR pode ser identificado a partir da oitava semana de desenvolvimento embrionário e seus vasos são originados a partir de vasos acetabulares que, por sua vez, são ramos da artéria obturatória. A contribuição para a vascularização da CF é controversa, porém pode ter alguma importância durante o desenvolvimento do quadril (**Brewster, 1991**).

Brewster (1991) notou ainda em seu estudo sobre o desenvolvimento do LR em fetos e natimortos que à medida que os fetos se desenvolvem o ligamento se torna cada vez menos celular e vascularizado e é possível identificar quantidade maior de fibras colágenas.

Trueta (1957) estudou a vascularização da CF durante seu desenvolvimento desde a fase fetal até a maturidade esquelética e notou pouca importância dos vasos do ligamento redondo na irrigação da epífise do fêmur proximal, limitando-se à região periférica da fôvea.

Ainda do ponto de vista embriológico, acreditou-se que o LR fosse originado de estrutura extra-articular, como um remanescente de algum grupo muscular na região dos adutores, porém em estudos clássicos como o de Strayer, foi definido que o ligamento, na verdade, surge e se desenvolve “*in situ*” como estrutura intra-articular (**Strayer Jr, 1943**).

Walker (1980), em estudo por dissecação de 140 fetos humanos entre 12 semanas e o termo, mensurou os ligamentos redondos e avaliou a mobilidade dos quadris. Notou que o LR participa da estabilidade da articulação, sendo o principal responsável por evitar o movimento da CF na direção posterior e superior.

2.2 Composição dos ligamentos

Os ligamentos, assim como os tendões, são constituídos por tecido conjuntivo denso modelado que têm como origem embrionária o mesoderma. Existem diversas funções atribuídas ao tecido conjuntivo (TC), entre elas estão suporte e estabilidade (no caso do tecido conjuntivo denso). O principal componente do TC é a substância intercelular que é composta por fibras, substância fundamental amorfa e líquido tecidual. São encontradas três tipos de fibras: colágenas, reticulares e elásticas. A substância fundamental amorfa é uma matriz onde ficam as fibras e as células e também é através dela que o líquido tecidual se difunde. Existem variadas células do TC: fibroblastos (FB), macrófagos, plasmócitos, mastócitos, pericitos, adipócitos e leucócitos (**Gartner e Hiatt, 1993**).

Nos ligamentos e tendões há um tecido conjuntivo denso modelado que é composto por arranjos paralelos de fibras de colágeno (Fcl), além de fibras de elastina (Fel) e a matriz intersticial (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas). O componente celular é quase que exclusivamente formado por FB, responsáveis pela síntese de colágeno (CL), de fibras elásticas e reticulares e pela substância fundamental amorfa (**Gartner e Hiatt, 1993**). A matriz extracelular dos ligamentos é composta por água (60%), proteoglicanos, elastina, CL e glicoproteínas (40%). O CL tipo I corresponde a aproximadamente 90% e o tipo III a 10% do CL existente nos ligamentos.

O CL confere força mecânica tecidual, enquanto a elastina e os proteoglicanos estão mais associados à resiliência. Três cadeias paralelas de polipeptídeos (cadeias alfa) formam uma tripla hélice que é comum a todos os 28 tipos de colágenos já descritos. A sequência basal de peptídeos que forma as hélices são repetições de glicina – prolina – hidroxiprolina. As moléculas de CL são interligadas pelos *cross links* formando as fibrilas e um conjunto de fibrilas, por sua vez, formam as Fcl (**Robbins, 1994**).

Dentre as funções do CL podem ser destacadas a estabilidade térmica, a força mecânica e a habilidade em interação com outras biomoléculas. A orientação e organização das fibras de CL têm relação com sua resistência mecânica. Outros fatores associados com sua força são o tamanho das moléculas e a quantidade de *cross links* entre as fibrilas (**Robbins, 1994; Buehler, 2006; Shoulders e Raines, 2009**).

A conformação do CL nos ligamentos também é importante para sua função, destacando-se, desta forma, os *crimps* que correspondem à organização das fibras de CL em forma de onda, conferindo capacidade de absorção da energia do impacto a qual o tecido é submetido (**Woo et al., 2000**).

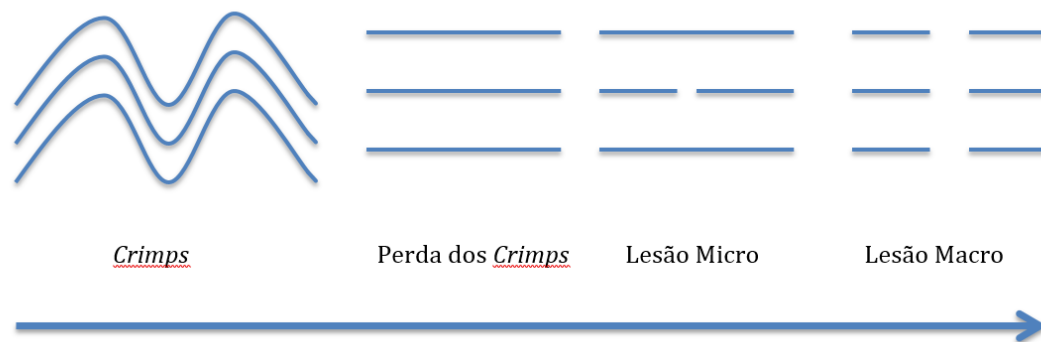
2.3 Biomecânica e lesão ligamentar

As Fcl estão alinhadas paralelamente em toda a extensão dos ligamentos e essa configuração confere sua resistência tênsil, além de proporcionar transmissão de força e evitar movimento articular excessivo sob carga. Alguns fatores influenciam suas funções biomecânicas e viscoelásticas, como a própria organização das Fcl, as fibras elásticas, os proteoglicanos, a quantidade de água, o tempo (envelhecimento dos tecidos) e a interação entre eles (**Woo et al., 1997**).

Provenzano e Vanderby (2006) ao analisarem a morfologia e organização das fibrilas de colágeno em ligamentos de mamíferos por microscopia eletrônica, não conseguiram notar as terminações das fibrilas, logo sugeriram que estas deveriam ocupar toda extensão tecidual e seriam responsáveis pela força do tecido.

Além de fornecer resistência mecânica aos tecidos, as moléculas de colágeno também estão envolvidas na adesão e diferenciação celular e por meio de proteínas de adesão, como a fibronectina, podem transmitir informações às células sobre alterações físicas ou químicas que ocorrem no meio extracelular (**Pimentel et al., 2007**).

A função de transmitir carga é realizada pelos ligamentos com mínima deformação e perda energética. Quando as Fcl são submetidas a forças menores (até 4% de tensão), elas funcionam com adequada elasticidade, porém sob forças excessivas pode ocorrer o desenrolamento dos *crimps*, seguido de perda dos mesmos, e se a tensão ainda é mantida, ocorrem microlesões que podem evoluir para lesões macroscópicas das fibras, como pode ser visto na figura 2 (**Rees et al., 2009**).



Fonte: material elaborado pelo autor

Figura 2 - Representação esquemática da evolução da lesão às fibras colágenas quando submetidas a forças de tensão excessivas

Quando o ligamento é lesionado de forma completa, diversas alterações estruturais podem se tornar permanentes como: alteração na composição das proteoglicanas, alteração na relação entre os tipos de colágeno em sua composição, falha na maturação dos *cross links*, formação de fibrilas de colágeno de menor diâmetro, conexões celulares alteradas, maior vascularidade e inervação alterada (Frank, 2004).

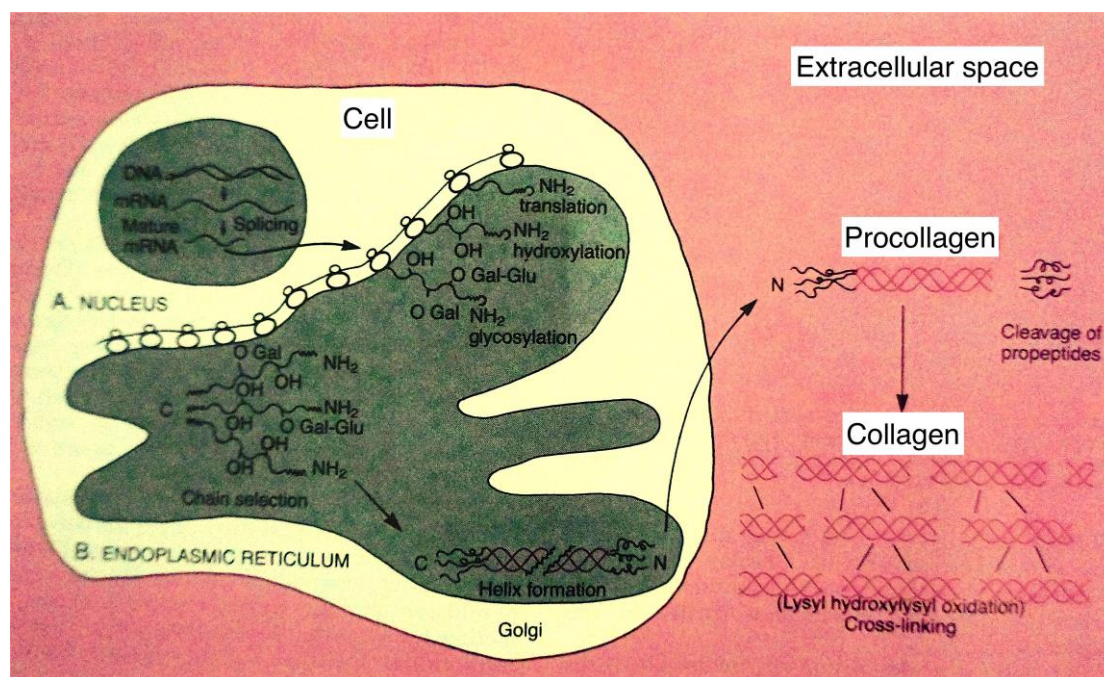
2.4 Resposta à lesão tecidual e metabolismo do colágeno

Após uma lesão no ligamento ocorre resposta tecidual através de 3 fases: sendo a primeira hemorrágica e inflamatória, a segunda proliferativa celular e de matriz e, por final, a fase de remodelação e maturação. Esse é um fenômeno complexo que envolve diversos processos, entre eles estão a migração e proliferação de células do tecido conjuntivo, síntese de proteínas da matriz extracelular (entre elas, o colágeno) e remodelação de TC (Robbins, 1994; Frank, 2004).

Sabe-se que quanto maior a lesão, isto é, maior distanciamento entre as extremidades do ligamento lesionado, maior será o quadro inflamatório e permanecerá maior alteração estrutural final. Isso pode influenciar as propriedades biomecânicas do ligamento de forma definitiva (Frank, 2004).

A produção do CL ocorre através de síntese das cadeias alfa nos ribossomos e estas são submetidas a diversas modificações enzimáticas, principalmente a hidroxilação de prolina na posição alfa, o que é relevante para promover altas concentrações de hidroxiprolina na molécula de colágeno. Essa hidroxilação é de suma importância, já que é responsável por

manter as 3 cadeias alfa unidas. Nesse estágio, as moléculas de pró-colágeno, já excretadas da célula para o espaço extracelular, são unidas pelas pró-colágeno peptidases, formando assim as fibrilas. Uma modificação enzimática ainda ocorre nessa fase, a lisina hidroxilisina oxidação, sendo a mesma crítica para a formação das ligações cruzadas ou *cross links*, que é uma característica dos colágenos, essencial para sua força tecidual (Figura 3).



Fonte: Adaptado de Robbins SL, 1994.

Figura 3 - Desenho esquemático da produção de colágeno e suas ligações cruzadas (cross links)

A síntese de CL, após uma lesão tecidual, ocorre através dos FB, estimulada por diversos fatores, incluindo fatores de crescimento (PDGF, FGF, TGF- β) e citocinas (IL-1, IL-4) que são secretados pelos próprios FB e por leucócitos. Além da produção de CL propriamente mencionada, a formação da rede de CL no tecido também depende da sua degradação (Robbins, 1994).

As metaloproteinases (MMPs) são responsáveis pela degradação do CL e são dependentes de íons zinco para sua atividade. Entre as MMPs estão as collagenases, gelatinases e as estromelinas que atuam não somente nos colágenos, mas também nos proteoglicanos, laminina e fibronectina. A regulação da atividade das MMPs, por sua vez, ocorre através dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Robbins, 1994; de Mello et al., 2009).

A degradação do colágeno se inicia extracelularmente, num primeiro momento, pelas metaloproteinases 1 e 8 (MMP-1 e MMP-8) e subsequentemente, por gelatinases, que são as metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9). A MMP-2 é, em especial, ativa no metabolismo de uma gama de tipos de colágenos, incluindo os fibrilares (**de Mello et al., 2009**).

O balanço entre a nova produção e degradação do colágeno lesionado é de suma importância no ligamento após algum grau de lesão tecidual. Esse complexo processo determinará a estrutura ligamentar final e, conseqüentemente, suas propriedades biomecânicas (**Robbins, 1994; Reynolds, 1996**).

2.5 A Instabilidade não traumática do quadril na criança (subluxação e luxação)

Na subluxação e luxação do quadril, ocorre perda da relação harmônica entre CF e CA, com lateralização da primeira em relação ao acetábulo, isso pode ocorrer na população pediátrica devido a causas variadas e leva a alterações progressivas nessa articulação, podendo ainda prejudicar sua função de maneira significativa (**Weinstein, 2005**).

Certamente, uma das principais causas de luxação do quadril nas crianças é a DDQ. Com uma incidência média mundial de 1 a 1,5 caso para cada 1000 nascidos vivos, a DDQ é um conjunto de alterações anatômicas que ocorre gradualmente, sendo que algumas delas podem ser reversíveis num momento precoce. Com a progressão dessas alterações, como a hipertrofia dos ligamentos transversos e redondo, a hipertrofia e formação do limbus, eversão do labrum, a cúpula acetabular tornando-se cada vez mais rasa, ocorre a luxação do quadril. A relação entre a cabeça femoral e a cavidade acetabular fica alterada. Alguns fatores etiológicos estão relacionados com a DDQ, sendo eles: hormonais e genéticos. Existem ainda algumas condições associadas a DDQ: torcicolo congênito (15-20% dos casos), metatarso aduto (1,5-10% dos casos) e o oligoamnio (**Herring, 2008; Guarniero, 2010**).

Quando não diagnosticada e não tratada, a luxação do quadril pode trazer sérias conseqüências para o funcionamento dessa articulação à medida que a criança envelhece, tornando-se um adolescente e mais tarde, um adulto com o quadril luxado. Existe limitação de amplitude de movimento, contratura articular (mais frequentemente em flexão), discrepância de comprimento entre os membros inferiores, alteração funcional da musculatura glútea (insuficiência de glúteo médio), além de dores limitantes. Portanto, o diagnóstico precoce é essencial para o sucesso no tratamento dessa patologia (**Weinstein et al., 2003b; Herring, 2008; Guarniero, 2010**).

O tratamento da DDQ, quando iniciado precocemente com uso do suspensório de Pavlik, tem alta taxa de sucesso (**Mubarak et al., 1981; Mubarak e Bialik, 2003**).

O diagnóstico e tratamento tardio da DDQ, isto é, após a idade da marcha, é mais comum nos países em desenvolvimento e se torna mais complexo e propenso a falhas e complicações, tais como relaxação e osteonecrose da cabeça femoral (**Milani et al., 1995; Guarniero, 2010**).

Doenças neuromusculares como a Paralisia Cerebral (PC) e os DFTN também podem cursar com luxação de quadril e, nesses casos, a etiologia é diferente da citada anteriormente para a DDQ. As alterações neurológicas causam desequilíbrio muscular que associado muitas vezes a alterações, principalmente no fêmur proximal como anteversão excessiva e coxa valga, propiciam um ambiente de instabilidade na relação entre cabeça femoral e acetábulo. Nesses casos, o tratamento é ainda mais complexo e as relaxações são mais frequentes (**Wilkinson e Sedwick, 1988; Buckley et al., 1991; Brunner e Baumann, 1994; Heeg et al., 1998**).

Nas paralisias que caracteristicamente são flácidas, isto é, com tônus muscular diminuído e fraqueza muscular relevante como nos DFTN, aproximadamente metade dos pacientes experimentam algum grau de instabilidade de quadril, durante os dez primeiros anos de vida (**Menelaus, 1998**).

A Amiotrofia Espinhal Progressiva (AEP) é uma doença de origem genética com degeneração das células do corno anterior da medula e prevalência de um a cada vinte mil nascidos vivos. Assim como outras doenças que cursam com paralisia flácida, também podem apresentar instabilidade nos quadris e da mesma forma o tratamento cirúrgico é controverso no meio ortopédico, já que a ocorrência de relaxação é frequente nesses casos. (**Zenios et al., 2005**).

A correção cirúrgica da luxação do quadril é controversa nos DFTN assim como na AEP e em outras patologias que cursam com paralisia flácida nos membros inferiores e o tratamento conservador não é utilizado por não ser uma opção eficaz, além de não ter sido comprovada sua segurança. Alguns autores julgam importante a correção cirúrgica nesses casos, para melhora funcional ou mesmo para melhora em posicionamento e equilíbrio da pelve. (**Heeg et al., 1998**). Já outros autores não indicam a correção cirúrgica, pela alta taxa de insucesso em manter a cabeça femoral centrada no fundo acetabular, e salientam os riscos de complicações como a rigidez articular, além da própria relaxação, questionando assim, a melhora funcional na marcha (**Feiwell et al., 1978; Drummond et al., 1980; Gabrieli et al., 2003; Zenios et al., 2005**).

Na PC, as crianças que apresentam comprometimento motor mais acentuado e com pouco ou nenhum potencial para marcha têm mais chance de evoluírem com instabilidade ao nível do quadril. Os fatores associados, como mencionado anteriormente, são o desequilíbrio muscular, além da anatomia do fêmur proximal, que por não ser estimulado por descarga de peso e deambulação, mantém anteversão femoral e o ângulo cervicodiafisário aumentados e assim, progressivamente, ocorre a lateralização da cabeça femoral em relação ao acetábulo (Scrutton, 1989; Flynn e Miller, 2002).

A luxação do quadril não tratada, nos pacientes com PC, pode trazer conseqüências ainda mais trágicas para a vida dessas crianças, que passam a apresentar limitação no movimento articular e contraturas, principalmente limitação da abdução, aumentando a dificuldade para higiene perineal, além de aumentar a dificuldade em posicionamento, causar dor, obliquidade pélvica e estar relacionada com surgimento ou evolução de escoliose. (Senaran et al., 2006) Alguns estudos mostram que pacientes com PC e luxação do quadril não tratada, na fase adulta, frequentemente têm dor (Cooperman et al., 1987; Senaran et al., 2006).

Existem ainda as luxações teratológicas que são entidade separada. Esses quadris já estão luxados antes do nascimento, têm características intrínsecas como limitação no movimento articular e não são redutíveis ao exame físico. Esses casos estão associados a síndromes neuromusculares que causam paralisia da musculatura e/ou neurológica como, por exemplo, as síndromes artrogripóticas (Herring, 2008).

2.6 A correção cirúrgica da instabilidade do quadril e a importância do ligamento redondo

O tratamento cirúrgico da luxação do quadril deve ser individualizado para cada caso, de acordo com a patologia de base e com as alterações anatômicas encontradas. Sendo assim, é muito diferente o tratamento de um quadril luxado em uma criança com PC de outro com DDQ, apesar de haver o mesmo objetivo final, ou seja, a centração da CF dentro da CA.

Diversas etapas do tratamento cirúrgico são realizadas classicamente, como a capsuloplastia, ressecção do LR, do pulvinar e por vezes do LT. Frequentemente é realizada a tenotomia de adutores e psoas. Além disso, pode ser necessário procedimento ósseo como osteotomia do fêmur e da pelve (Salter, 1961; Mubarak et al., 1992; Bertol et al., 2004).

A técnica cirúrgica utilizada é um dos fatores relacionados à possibilidade de falha ou complicações, sendo cada detalhe anatômico já citado nesse texto, importante para o sucesso no tratamento.

Nos últimos anos, o estudo e interesse pelo ligamento redondo do quadril em cirurgias ortopédicas, tanto na criança quanto no adulto, tem aumentado entre os cirurgiões ortopédicos (**Wenger et al., 2007; Simpson et al., 2011; Philippon et al., 2012; Bali et al., 2017**).

Wenger et al. (2007) e (2008) analisaram as propriedades biomecânicas do LR em estudo com quadris de porcos e notaram uma semelhança com o ligamento cruzado anterior (LCA). Esses autores utilizaram um modelo experimental da luxação do quadril não traumática no suíno, através de estabilização da articulação do joelho do animal esqueleticamente imaturo, provocando, possivelmente, desequilíbrio das forças atuantes no quadril e simulando posição de apresentação pélvica, que sabidamente é um fator de risco para a luxação dessa articulação.

Outros autores obtiveram sucesso utilizando um modelo experimental para a luxação do quadril, de forma similar, porém em coelhos (**Michelsson e Langenskiöld, 1972; Greenhill, 1995**).

Subsequentemente, **Wenger et al. (2008)** estudaram a manutenção do LR na redução cirúrgica aberta da luxação, em crianças com DDQ, notando que não houve falha na redução e também não houve reluxação no período mínimo de 1 ano de pós-operatório. Na série de casos desses autores, foi utilizado sutura do LR no fundo acetabular e o procedimento foi realizado através de via medial. Foi salientada a importância de atingir o ponto mais isométrico possível para reconstrução do ligamento, a fim de proporcionar melhor restituição de suas funções, assim como é realizado nas reconstruções de outros ligamentos, como o LCA no joelho. Nota-se a mudança em um dos passos cirúrgicos tradicionais na correção da luxação do quadril: a manutenção do LR em detrimento da ressecção do mesmo, com objetivo de aumentar a estabilidade do quadril, evitando assim a reluxação.

Na cirurgia de quadril no adulto, de maneira similar ao exposto anteriormente, existe também interesse crescente no estudo, manutenção e tratamento das lesões do LR, pois este parece exercer papel importante na função articular, já que apresenta receptores proprioceptivos, além de sua função biomecânica, relacionada à estabilidade do quadril (**Philippon et al., 2012**).

Na década de 2010 foram publicados alguns estudos a respeito do LR enfatizando as controvérsias a respeito de suas características e função. Também foi citado o maior interesse em manter esse ligamento íntegro nos diversos procedimentos cirúrgicos no quadril humano devido à sua importância como estabilizador articular e também por sua possível participação

na propriocepção e nocicepção da articulação (**Martin et al., 2012; Martin et al., 2014; O'Donnell et al., 2014; Dehao et al., 2015**).

Assim como em outros ligamentos, os colágenos tipos 1 e 3 são os principais componentes do LR. O CL é o principal responsável pela resistência tênsil ligamentar e parece haver relevância na proporção existente entre os tipos de colágeno para que suas propriedades estejam mantidas (**Frank, 2004**).

Alguns estudos mostram que o LR, em casos de luxação do quadril, tem suas propriedades alteradas, apesar de não excluírem sua importância (**Michaels e Matles, 1970; Ippolito et al., 1980**).

Existe ainda controvérsia sobre o uso do LR na cirurgia para redução aberta de quadris luxados em crianças. Também não há consenso sobre as propriedades biomecânicas e histológicas de ligamentos redondos de quadris luxados. Alguns autores acreditam que os ligamentos sofrem alterações relevantes em sua estrutura histológica, porém outros não acreditam nessa possibilidade (**Ippolito et al., 1980; Hosalkar et al., 2011**).

OBJETIVO

3 OBJETIVO

Comparar as propriedades histológicas, bioquímicas e biomecânicas do ligamento redondo de quadris luxados ou subluxados, com quadris não luxados de coelhos esqueleticamente imaturos, através de um modelo experimental de luxação não traumática de quadril.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado em reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) realizada em 25/04/2013, com protocolo: 1012/2013.

4.1 Animais de experimentação

O protocolo experimental foi realizado conforme o “Guia de procedimentos e utilização de animais de laboratório”, publicado pelo U.S. National Institute of Health e aprovado pelo “Comitê de Ética no Uso de Animais” (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP -Universidade Estadual Paulista.

Foram utilizados 88 coelhos esqueleticamente imaturos, da raça Norfolk, com aproximadamente 35 dias de vida, peso inicialmente aproximado de 600 a 800g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

4.2 Ambiente de experimentação

Os coelhos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, onde permaneceram durante todo o período experimental, em sala fechada, à temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, controlada por ar condicionado, umidade de $60 \pm 5\%$ e período claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, recebendo ração comercial padrão (Purina, Brasil) e água “ad libitum” durante o período do experimento e, diariamente, as gaiolas foram lavadas.

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Momento 0 (M0): modelo de experimentação

Para o estudo do LR em quadris luxados, foi utilizado um modelo experimental da luxação de quadril em esqueleto imaturo de coelhos, já descrito em literatura (Greenhill et al., 1995). Esse modelo consiste na estabilização de um dos membros traseiros do animal (esqueleticamente imaturo) com o joelho em extensão. Após algumas semanas (6 semanas no presente estudo) foi

notada displasia e instabilidade no quadril do membro ipsilateral, já o membro contra-lateral permaneceu sem alteração e pôde servir como lado controle.

Os coelhos foram submetidos, após ato anestésico e antissepsia, à estabilização em extensão do joelho de um dos membros traseiros, escolhido aleatoriamente, através de passagem percutânea de 1 fio de Kirchner de 1,5mm, auxiliado por intensificador de imagem (figuras 4 e 5).



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 4 - Estabilização do joelho em extensão completa de coelho da amostra. Realizado sob anestesia, com antissepsia e de forma percutânea, utilizando 1 fio de Kirschner de 1,5mm e com auxílio de intensificador de imagem



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 5 - Intensificador de imagem demonstrando a posição do fio de Kirschner estabilizando o joelho em completa extensão

4.3.1.1 Preparo e técnica cirúrgica

Os animais foram submetidos à anestesia, através de infusão de ketamina na dose de 30mg/kg intramuscular, xilazina 5mg/kg intramuscular e acepromazina 5mg/kg também intramuscular, seguindo protocolo do laboratório de cirurgia experimental da Unesp, baseado nas recomendações do Institutional Animal Care and Use Committee, além de serem tricotomizados e pesados. Foi realizado preparo do membro a ser operado com antissepsia local e realizado antibioticoprofilaxia com infusão de enrofloxacino 10mg/kg, via subcutânea, no ato anestésico e, após 24h foi realizada uma nova infusão. Foi realizada a perfuração da pele e dos tecidos moles em região distal da coxa de cerca de 1cm, na face lateral, próximo ao joelho, como mostrado na figura 4. Foi introduzido de 1 fio de Kirschner de 1,5mm com perfurador esterilizado à bateria, atravessando a articulação do joelho em extensão completa, com auxílio de intensificador de imagem para confirmar a posição adequada do fio, como mostrado na figura 5. Foi realizado, subsequentemente, o corte do fio próximo ao fêmur e suturada a pele

com fio nylon 4,0mm, deixando o fio de Kirschner coberto por tecidos moles, em plano profundo, adjacente ao fêmur.

4.3.1.2 Pós-operatório

Após recuperação anestésica, os coelhos foram encaminhados para gaiolas individuais, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, onde permaneceram durante todo o período experimental, nas condições já mencionadas no item 4.2 (ambiente de experimentação).

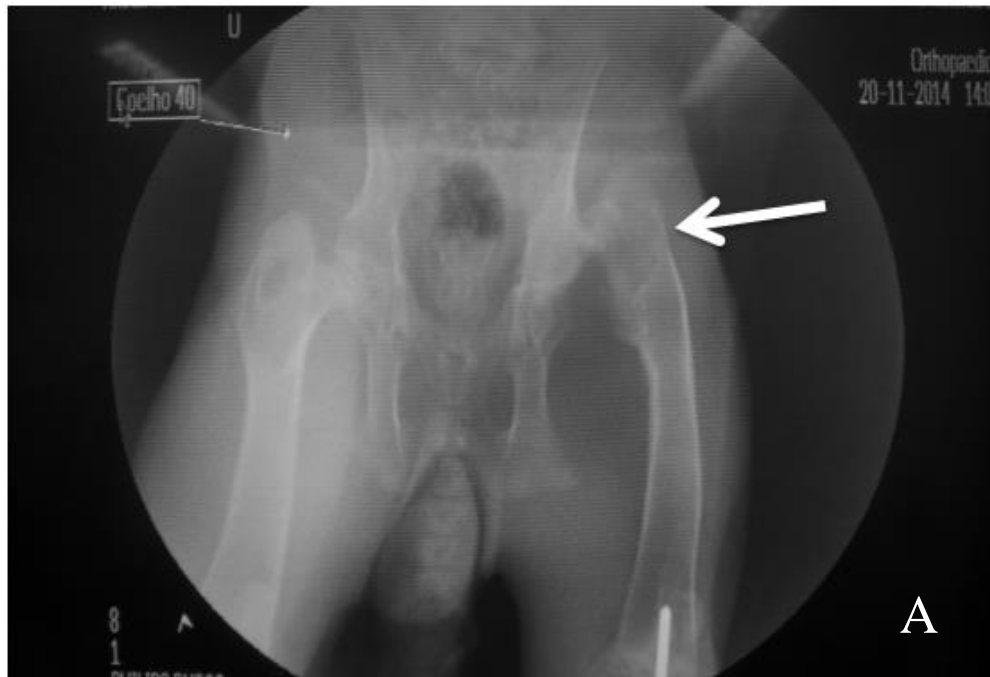
A analgesia foi realizada através de infusão de tramadol 5mg/kg, via subcutânea, no ato cirúrgico e nos 3 dias subsequentes, a cada 12 horas.

4.3.2 Momento 1 (M1): Identificando os quadris luxados (6 semanas após M0)

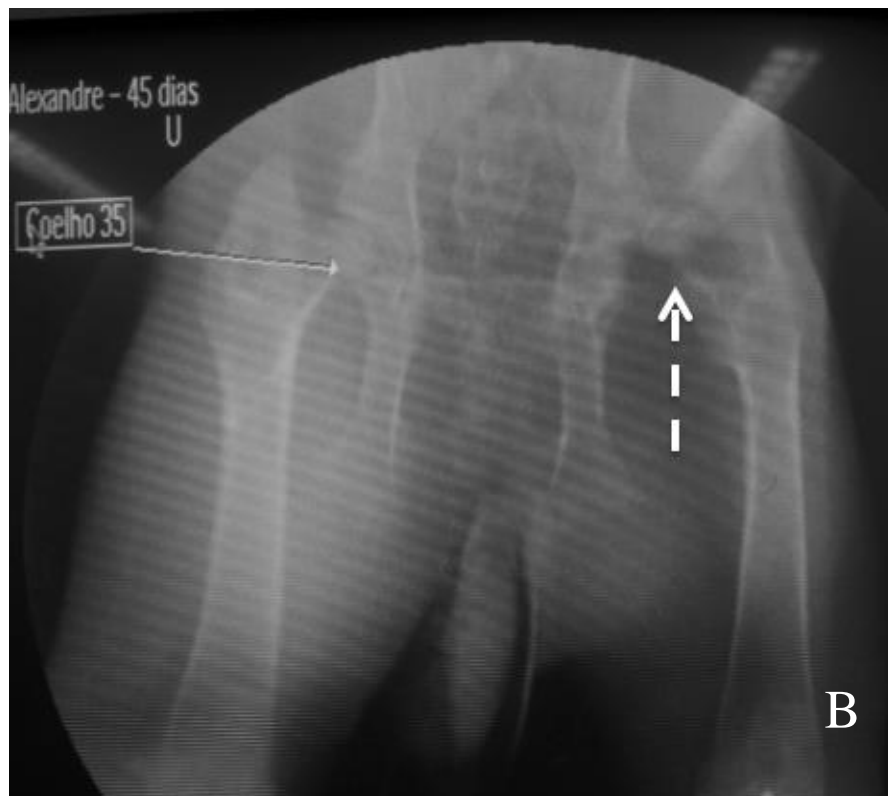
Os coelhos foram submetidos à eutanásia segundo protocolo do laboratório de cirurgia experimental da Unesp, seguindo recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, através de infusão de tiopental sódico 2,5%, por via intravenosa, rapidamente, em bolus, de 3 a 5 ml, por animal. Após atingir plano anestésico profundo, foi injetado cloreto de potássio, via intravenosa, 5ml por animal.

Foi realizado um estudo radiográfico dos quadris após 6 semanas do M0 e identificados os quadris subluxados ou luxados. Foram incluídos no estudo apenas os quadris que apresentaram 50% ou mais de migração lateral da cabeça do fêmur em relação ao rebordo acetabular (subluxação maior ou igual a 50%), visto na radiografia de bacia de frente, como pode ser exemplificado nas figuras 6 (A, B e C) e 7 (A, B e C). Para a mensuração da porcentagem de migração da cabeça do fêmur, foi utilizado um método amplamente conhecido em literatura, através da marcação da linha de Hilgenreiner (entre as cartilagens trirradiadas), da linha de Perkins (perpendicular à primeira e no rebordo lateral acetabular) e outras 2 linhas paralelas entre si, determinando os limites medial e lateral da CF (**Reimers, 1980**). Assim, pôde ser determinado quanto da CF estava lateral ao acetábulo. A mensuração pode ser verificada na figura 7A.

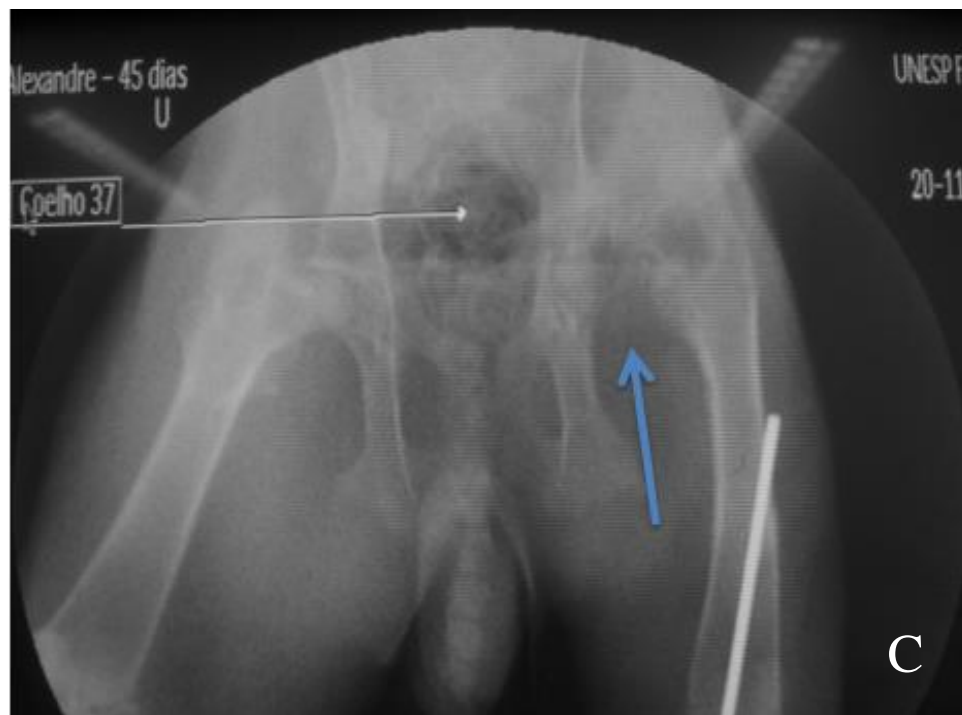
Os coelhos que não apresentaram subluxação de pelo menos 50% ou luxação do quadril foram excluídos do estudo. Nos coelhos que foram incluídos na amostra, foi realizada a comparação das médias de migração da CF entre o lado luxado e controle, como pode ser visto mais adiante, nos resultados.



Fonte: arquivo pessoal do autor

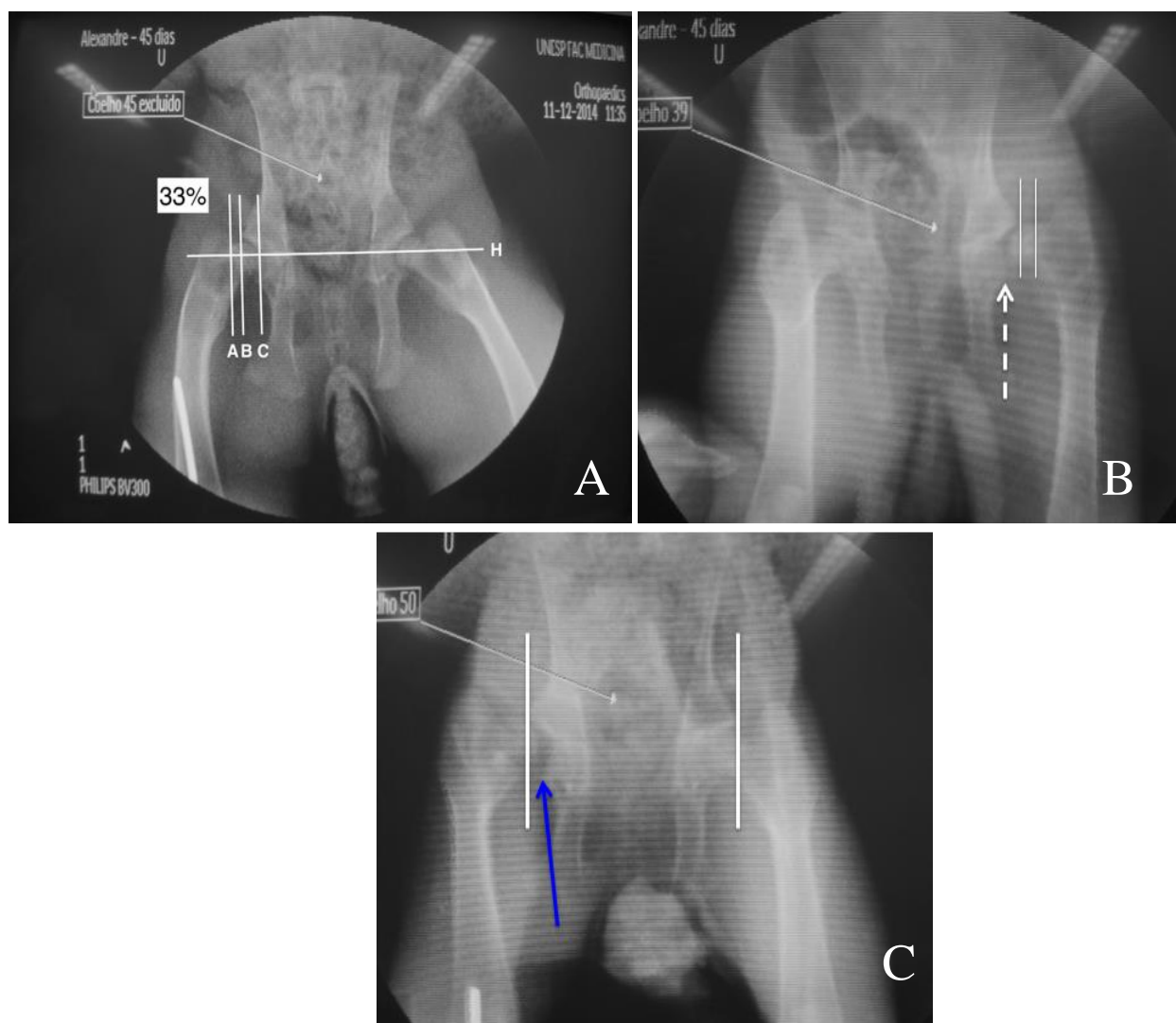


Fonte: arquivo pessoal do autor



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 6 - A) Imagem radiográfica demonstrando luxação do quadril esquerdo (seta branca) após 6 semanas da estabilização do joelho ipsilateral. B) Luxação do quadril esquerdo (seta branca tracejada). C) Luxação do quadril esquerdo (seta azul)



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 7 - A) Imagem radiográfica de quadril do lado direito apresentando 33% de subluxação, sendo excluído do estudo. A linha H passa pelas cartilagens trirradiadas dos quadris (similar à linha de Hilgenheiner traçada no rx de bacia de crianças), a linha B é traçada perpendicularmente à linha H e no rebordo acetabular (similar à linha de Perkins), a Linha C determina o limite medial da cabeça do fêmur e a linha A determina o limite lateral da mesma. A porcentagem de migração é identificada a partir do cálculo: $\text{distância AB/AC} \times 100 = \% \text{ de migração da cabeça do fêmur}$ (similar ao realizado e descrito por Reimers, 1980). B) Imagem radiográfica mostrando quadril com 75% de migração lateral do lado esquerdo (seta branca tracejada) e cobertura acetabular completa no quadril direito (lado normal). C) Imagem radiográfica mostrando quadril direito com 70% de migração lateral (seta azul) e cobertura completa do lado esquerdo (lado normal)

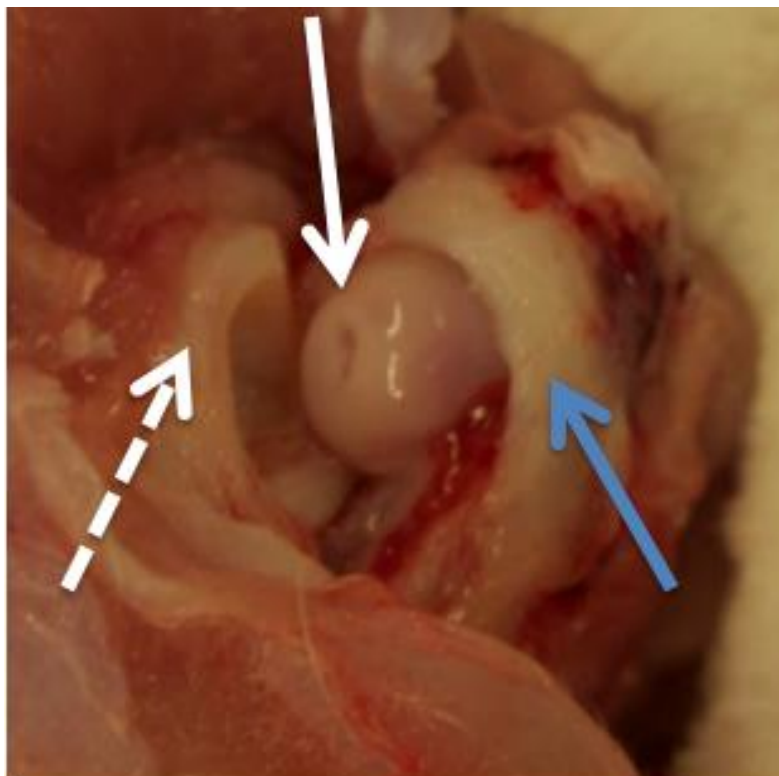
4.3.2.1 Definição da amostra

Dos 88 coelhos que inicialmente foram submetidos à estabilização de um dos joelhos, 19 morreram, 28 não apresentaram subluxação de pelo menos 50% ou apresentaram algum tipo de complicação e em 5 coelhos, não foram identificados os ligamentos redondos. Os coelhos que sofreram subluxação de pelo menos 50% ou luxação do quadril no membro submetido à estabilização (M0) foram preparados para as avaliações, de acordo com o cálculo amostral demonstrado no item 4.3.2.2. Os coelhos que não sofreram subluxação do quadril de pelo menos 50% ou tiveram algum tipo de complicação associada, foram descartados do trabalho (figuras 7A e 8). Em cinco coelhos não foi possível identificar os ligamentos redondos nos quadris luxados. Os mesmos também foram excluídos do estudo, já que não foi possível analisar os ligamentos (figura 9).



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 8 - Imagem radiográfica do membro traseiro esquerdo demonstrando fratura de fêmur e não ocorrência da luxação do quadril. Coelho excluído do estudo



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 9 - Quadril luxado do coelho 03, mostrando cápsula espessada (seta azul), displasia acetabular (seta branca tracejada) e cabeça do fêmur sem o ligamento redondo, sendo possível visualizar apenas a fôvea (seta branca)

Foi possível identificar complicações em 13 dos 28 coelhos que foram excluídos por não apresentar subluxação igual ou superior a 50%. A complicação mais frequente foi a perda da fixação, relacionada à migração do fio de Kirchner, visto em 8 coelhos. As demais complicações foram em ordem de frequência: fratura de fêmur em 4 coelhos e piartrite em 1 caso.

A identificação dos coelhos, seu status, complicações e testes realizados estão demonstrados no item apêndices.

4.3.2.2 Cálculo amostral

Para realizarmos o cálculo amostral neste estudo experimental foi necessário utilizar alguma variável, disponibilizada através da mensuração do comprimento ligamentar dos primeiros coelhos que seriam preparados para análise histológica e bioquímica. O comprimento

ligamentar foi utilizado também como defecho após coleta dos outros ligamentos disponíveis para essa mensuração, como pode ser visualizado no item 5.2 e tabela 3 dos resultados.

Dessa forma, foi possível comparar o comprimento dos ligamentos entre os lados luxado e normal, a partir desse grupo piloto. Essa quantidade amostral foi definida com base no Teorema do Limite Central e da Lei dos Grandes Números, sendo que, esse tamanho amostral garante que análises estatísticas sejam fidedignas.

Para análise das estatísticas descritivas mais usuais (média, mediana, desvio padrão), ou seja, comparativa de situação pareada, foi utilizado o teste T-Student Pareado. Com base nas estatísticas descritivas desse grupo piloto, utilizando as medidas de 11 coelhos (os primeiros a serem submetidos à avaliação histológica), foram obtidos os seguintes valores dos comprimentos ligamentares: Luxado ($\bar{x} = 7,51$; $\sigma = 1,06$), Controle ($\bar{x} = 4,29$; $\sigma = 0,72$). Assim, adotando um erro estatístico (alfa) de 5,0% e um poder estatístico de 80%, temos que a amostragem deve ser de 35 coelhos para as análises a serem realizadas (zimografia / biomecânica / celularidade / colágeno, sendo as 2 últimas dentro do grupo da avaliação histológica). Isto é, pelo menos 8 coelhos para cada análise acima descrita.

Os dados podem ser vistos na tabela 1 e a mensuração do ligamento pode ser visualizada na figura 10.

Tabela 1 - Dados referentes aos 11 coelhos com medidas dos ligamentos em milímetros (mm), utilizados para o cálculo amostral

Comprimento (mm)	Luxado	Controle
Coelho 23	6,55	3,55
Coelho 24	7,09	4,8
Coelho 17	7,89	3,36
Coelho 19	8,45	4,03
Coelho 22	5,65	4,04
Coelho 27	8,11	5,67
Coelho 29	7,39	5,56
Coelho 30	6,99	3,73
Coelho 31	9,76	4,02
Coelho 26	8,12	3,92
Coelho 25	6,6	4,57
Média	7,51	4,29
Mediana	7,39	4,03
Desvio padrão	1,06	0,72



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 10 - Mensuração do ligamento redondo (seta branca), através de paquímetro eletrônico, desde sua origem acetabular (seta preta tracejada) até sua inserção na região foveolar da cabeça do fêmur (seta preta contínua). Nota-se ainda que pequena ressecção na região acetabular (seta tracejada preta) foi necessária para melhor posicionamento do paquímetro

O comprimento dos demais ligamentos que foram submetidos às análises histológicas e bioquímicas foi ainda comparado entre os lados (luxado x controle), isto é, também utilizado como um dos desfechos.

4.3.3 Momento 2 (M2): estratificação e análises da amostra

Os quadris foram dissecados de maneira que a única conexão remanescente entre o fêmur e o acetábulo fosse o ligamento redondo e foram divididos em 4 grupos (A, B, C, D), de acordo com as análises realizadas. Dentro de cada grupo, ainda subdividimos a amostra de acordo com o quadril avaliado, isto é, luxado ou controle.

A composição e estratificação da amostra é mostrada no fluxograma 1 e a distribuição dos coelhos entre as análises utilizadas foi realizada através de randomização em grupo.

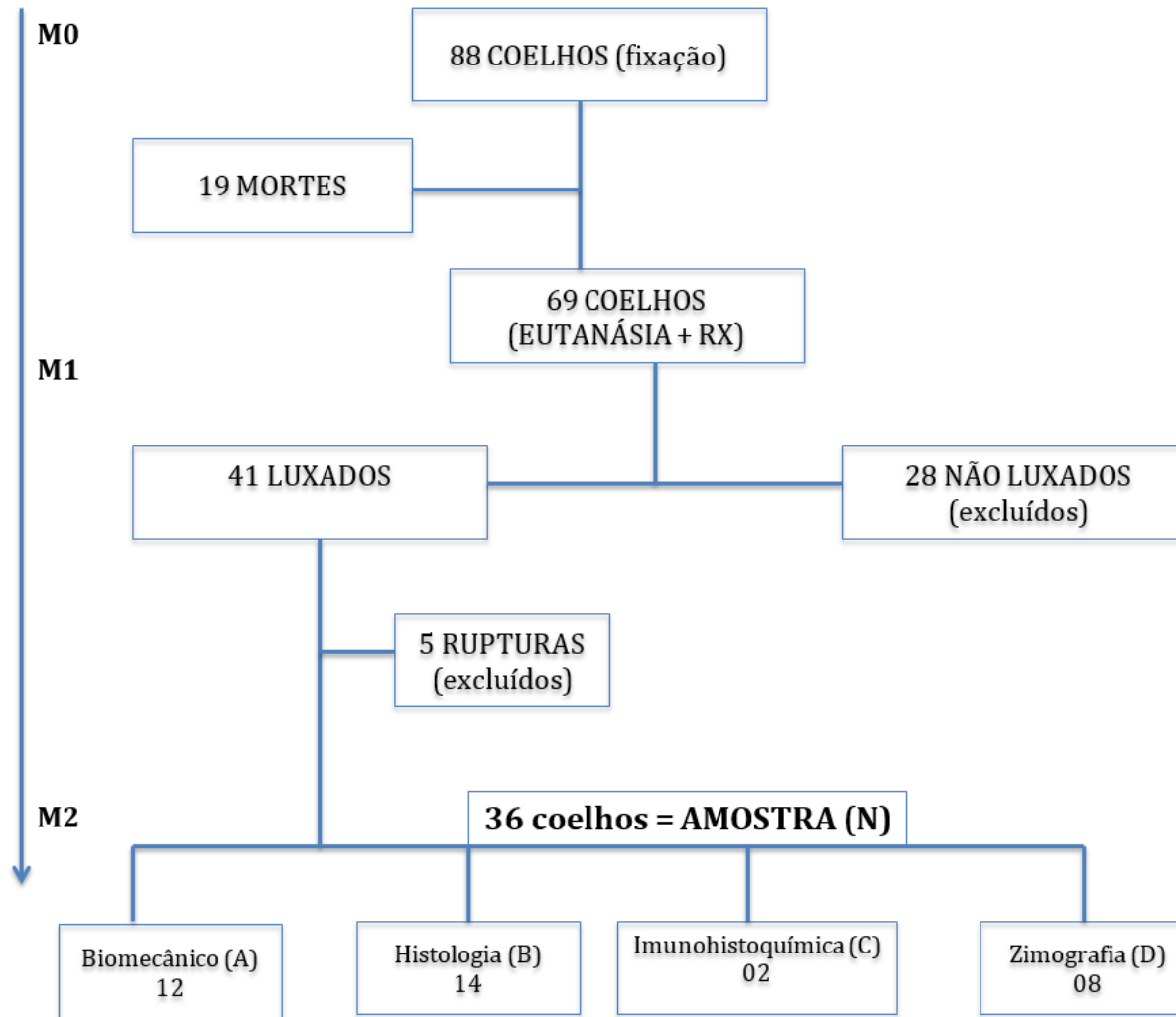


Figura 11 - Fluxograma da composição da amostra

4.3.3.1 Grupo A (análise biomecânica)

Inicialmente composto por 12 coelhos, porém houve exclusão de 1 coelho durante esse teste, restando 11.

Os quadris luxados (L) e os não luxados ou controles (C) foram submetidos a um ensaio biomecânico, imediatamente após a liberação de todas as estruturas moles (tendões, músculos, ligamentos e cápsula articular) que conectam a articulação (cabeça femoral ao acetábulo), mantendo a hemipelve, acetábulo, LR e fêmur (Figuras 12 e 13). O ensaio foi realizado em máquina universal de ensaios tipo eletromecânica (EMIC, DL 10000) em ambiente com temperatura controlada e estável (20°C). A precisão do sistema é de +/- (0,018 + F3700)KN, conforme especificações da norma NBR6674 (ABNT, 1981). Realizamos a fixação do fêmur na estrutura fixa e da hemipelve na parte móvel da máquina, através de uma junta do tipo universal, para permitir a acomodação da peça durante o ensaio. (figura 14).

No decorrer do preparo para a realização do teste biomecânico, houve disparo inadvertido da máquina para o teste, não sendo possível a coleta dos dados de um dos coelhos. Logo, esse coelho foi excluído do estudo, restando 11 coelhos para o ensaio biomecânico.

Os gráficos dos testes dos 11 coelhos são gerados no software acoplado à máquina e mostrados a seguir, nos resultados.

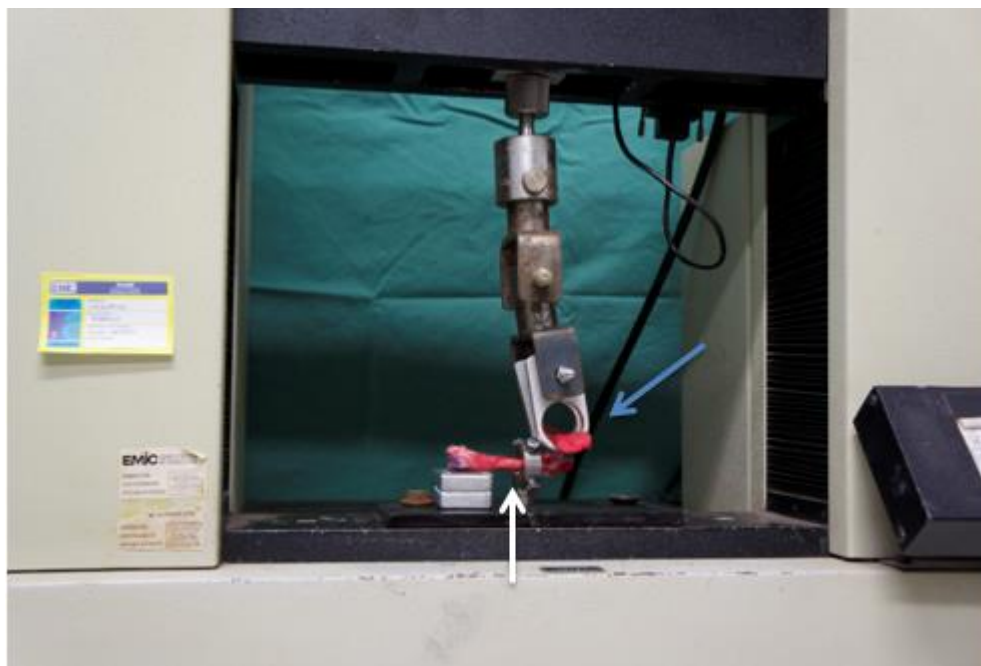


Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 12 - Peças já preparadas para o ensaio biomecânico, após dissecação mostrando a hemipelve com acetábulo, o fêmur e apenas o LR entre o fêmur e o acetábulo. São lados Controles (C), isto é, sem luxação



Figura 13 - A) foto de quadril luxado sendo preparado para o ensaio mecânico, notando em detalhe a cabeça femoral (seta azul) fora da cavidade acetabular e o ligamento redondo evidente, mais espessado e maior em comprimento (seta branca). B) foto do quadril contralateral (controle) do mesmo coelho. Nota-se a cabeça do fêmur (seta preta pontilhada) bem centrada no acetábulo (seta branca)



Fonte: arquivo pessoal do autor

Figura 14 - Foto da máquina de teste biomecânico. Hemipelve na parte móvel (seta azul) e o fêmur fixado na região fixa da máquina (seta branca)

4.3.3.2 Grupo B (análise histológica): 14 coelhos que foram submetidos tanto à avaliação de celularidade (B1) quanto do colágeno (B2)

Os ligamentos redondos dos quadris luxados (L) e não luxados ou controles (C) foram retirados e analisados histologicamente, quanto às fibras colágenas e à celularidade, ambos com medidas quantitativas.

4.3.3.2.1 Morfologia e morfometria (preparo dos ligamentos para análise histológica)

As amostras de ligamentos dos animais dos diferentes grupos experimentais (n = 14/grupo = luxado x controle) foram fixadas em metacarn (solução contendo 60% metanol, 20% ácido acético e 10% clorofórmio) por 3 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes em paraplast de 6µm foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

Cortes em parafina foram corados pela hematoxilina-eosina, para se obter uma análise geral da estrutura dos ligamentos. Cortes foram corados por Picrosirius para detecção automática das fibras de colágeno. As análises foram realizadas em 70 campos microscópicos (5 campos por animal de 14 animais/grupo = luxado x controle) em microscópio Leica™ DMLB 80 (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) acoplado à câmera digital e software de análise de imagem (Leica™ DC300FX).

4.3.3.2.2 Determinação da celularidade (B1): 14 coelhos

Para a determinação da celularidade nos ligamentos dos diferentes grupos experimentais foram utilizados 70 campos microscópicos (5 campos/animal de 14 animais diferentes). A celularidade foi determinada pela detecção automática da área ocupada pelos núcleos celulares (corados em azul) em relação à área total do campo microscópico (em porcentagem) no aumento de 400X (Figura 15).

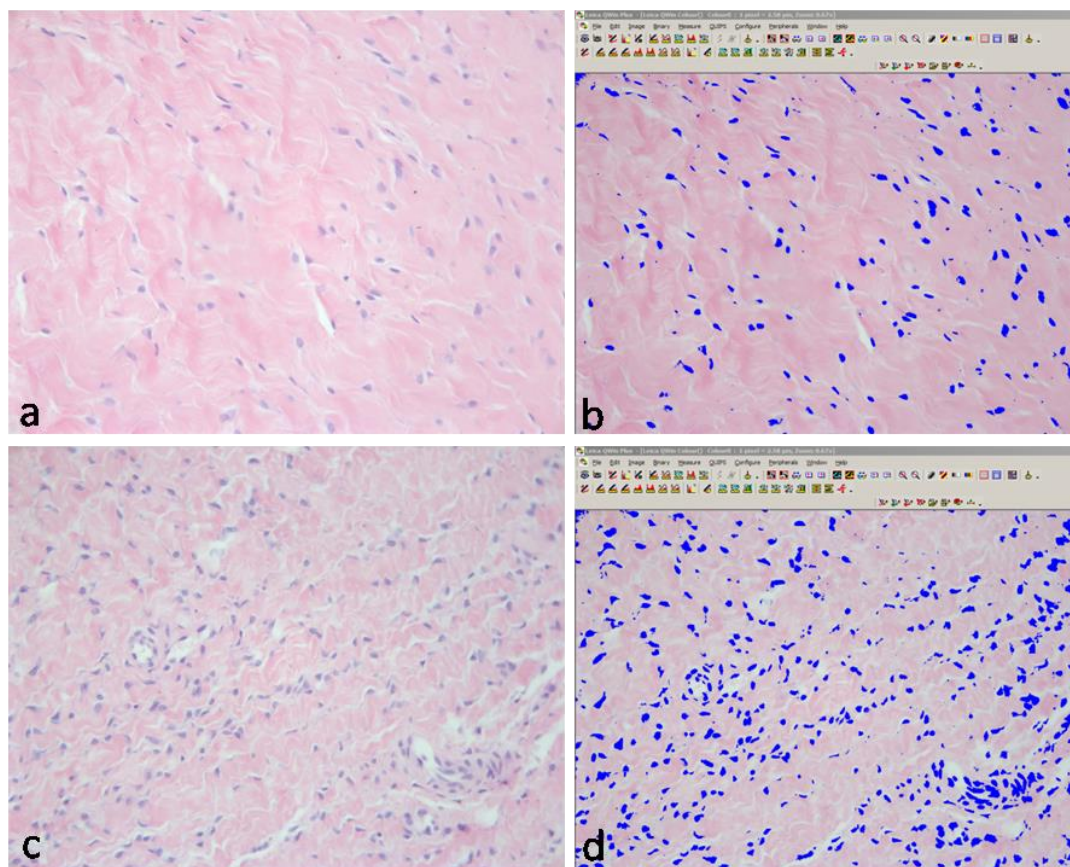


Figura 15 - Fotomicrografias representativas de cortes de ligamento submetidos à coloração por Hematoxilina e Eosina dos grupos normal ou Controle (a) e Luxado (c). Estas imagens foram utilizadas para a detecção automática da porcentagem de área ocupada pelos núcleos celulares corados por hematoxilina nos grupos Controle (b) e Luxado (d)

4.3.3.2.3 Quantificação das fibras de colágeno (B2): 14 coelhos

A quantidade de colágeno total nos ligamentos dos diferentes grupos experimentais foi determinada pela técnica de Picosirius. Foram capturados 5 campos aleatórios de cada animal, sendo 14 animais/grupo (controle x luxado), totalizando 70 medidas/grupo com a objetiva de 40X. A área ocupada pelo colágeno (em vermelho) foi detectada automaticamente pelo software Leica™ QWin versão 3.0, e expressa em porcentagem (%) (Figura 16).

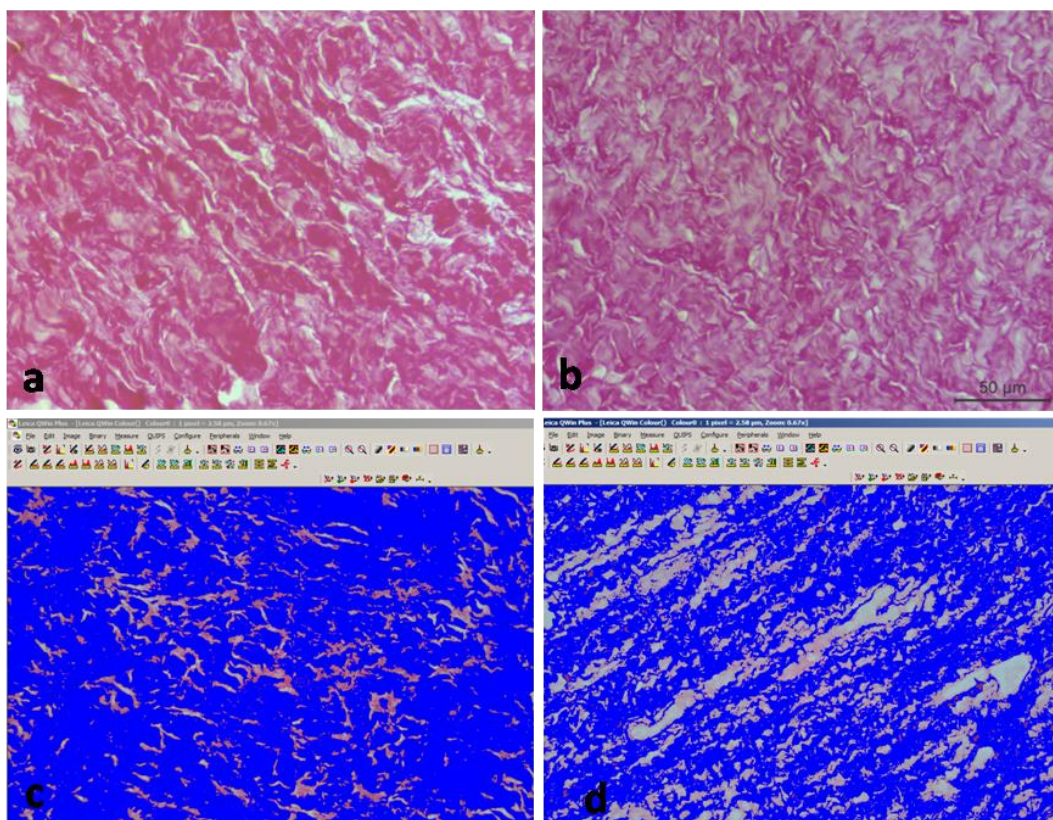


Figura 16 - Imagem representativa da quantificação automática da fração volumétrica ocupada pelo colágeno nos ligamentos dos diferentes grupos experimentais. As imagens a (Controle) e b (Luxado) representam cortes histológicos de ligamentos corados por Picrosirius. Em c e d observa-se a quantificação automática das fibras de colágeno detectadas pela histoquímica de Picrosirius

4.3.3.3 Grupo C (imunohistoquímica): 2 coelhos

Com relação à especificidade celular, avaliou-se por imunohistoquímica (análise qualitativa) as células encontradas nas lâminas, através da vimentina (abcam, ab92547, Reino Unido), um marcador de células de origem mesenquimal, para denotar indiretamente os fibroblastos. Logo, as células encontradas seriam equivalentes aos fibroblastos, com reconhecida relação com a produção de colágeno (figura 17). Essa análise foi realizada em 2 coelhos, já que se trata de avaliação qualitativa para identificar apenas o tipo celular.

Cortes em Paraplast coletados em lâminas silanizadas (submetidos ao protocolo de recuperação antigênica por tratamento com tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 em micro-ondas) foram mergulhados em solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio diluído em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e embebidos em solução contendo 5% de leite em pó desnatado para o bloqueio das

interações proteína-proteína inespecíficas. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo primário contra vimentina (abcam, ab92547, Reino Unido), um marcador de células de origem mesenquimal. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. A marcação foi revelada pela diaminobenzidina (DAB) e os cortes foram contracolorados pela hematoxilina. Os resultados foram analisados ao microscópio e fotodocumentados.

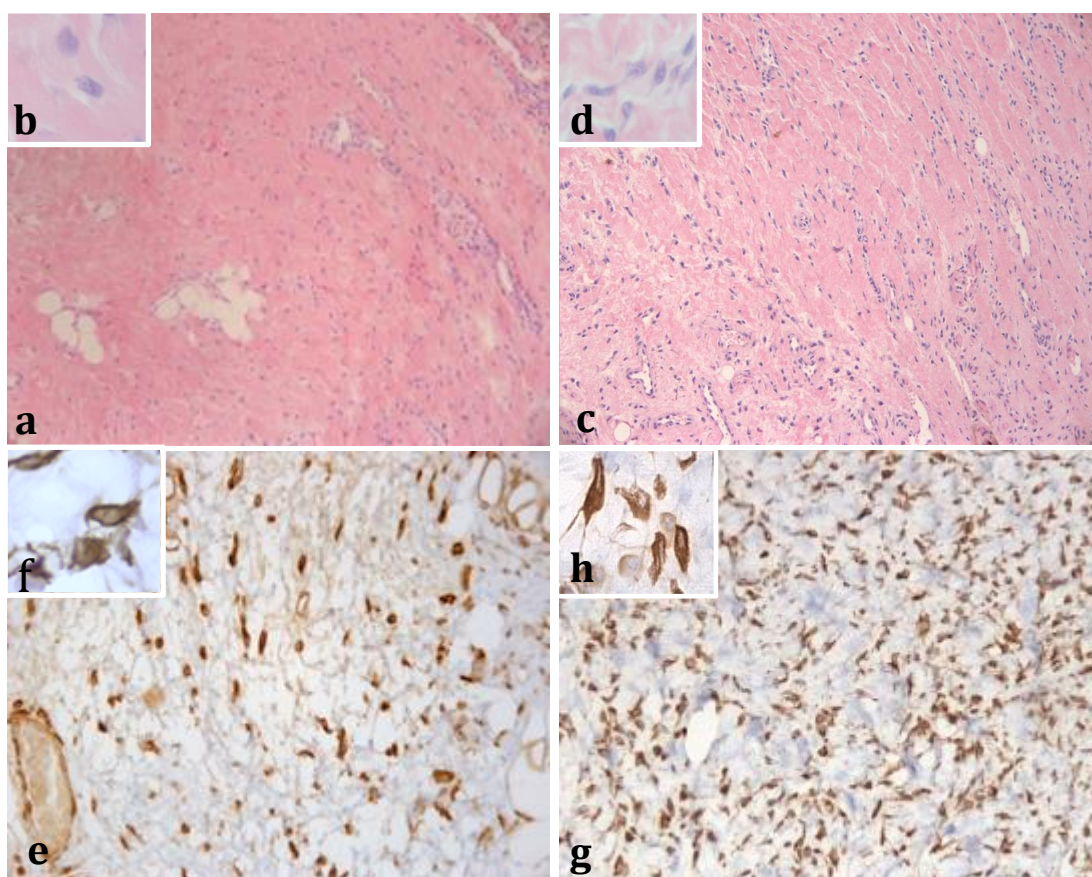


Figura 17 - Fotomicrografias de ligamentos dos grupos Controle (A e B) e Luxado (C e D) corados pro H.E. Observar o maior número de células no grupo Luxado. As figuras E e F, G e H (grupos Controle e Luxado, respectivamente) representam reações imunohistoquímicas para detecção de vimentina. Barra de escalas: A, C, E e G: 100 μ m; B, D, F e H: 5 μ m

4.3.3.4 Grupo D (análise bioquímica por zimografia): composto por 8 coelhos

Os ligamentos redondos dos quadris luxados (L) e não luxados ou controle (C) foram retirados e analisados através de zimografia para quantificação das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9).

4.3.3.4.1 Extração, quantificação de proteínas totais e realização da técnica de zimografia

A atividade gelatinolítica da MMP-2 presente nos ligamentos de coelhos dos diferentes grupos experimentais foi analisada por zimografia em gel de poliacrilamida contendo gelatina (Justulin et al., 2010).

Para a extração das enzimas, uma proporção de 30 mg de tecido para cada 0,1 ml de uma solução de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5, contendo 0,25% de Triton X-100 e 10 mM CaCl₂ foi triturada em um homogeneizador do tipo Polítron por três ciclos de 5 segundos cada um. O homogeneizado foi incubado por 2 horas a 4°C para aumentar a eficiência da extração. Após esse período, o homogeneizado foi centrifugado a 2.000 RPM por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o conteúdo de proteínas quantificado pelo método de Bradford. Amostras da extração (30µg de proteínas) foram submetidas à eletroforese, sob condições não redutoras, em gel de poliacrilamida a 8% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Depois da eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS, seguindo-se por duas lavagens de 5 minutos em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 5 mM CaCl₂. Posteriormente, os géis foram incubados 12 horas na mesma solução a 37°C. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Análises semiquantitativas por densitometria das bandas foram realizadas utilizando-se o software Image J.

4.4 Análise estatística

4.4.1 Teste de Wilcoxon

O Teste de Wilcoxon é um teste não paramétrico utilizado para verificar se a luxação alterou ou não significativamente os ligamentos. Esse teste não paramétrico é utilizado quando pode-se determinar tanto a magnitude quanto a direção dos dados (como neste estudo) e pretende-se comparar as variáveis duas a duas, já que existe no mesmo coelho o quadril luxado

e o controle, isto é, o quadril não-luxado. Esse teste estatístico foi realizado na análise biomecânica.

O nível de significância utilizado foi de 0,05 (5%) e os intervalos de confiança foram construídos com 95% de confiança estatística.

4.4.2 Teste t-Student Pareado

Para o teste estatístico das análises histológicas (celularidade e quantificação do colágeno) e bioquímica (zimografia), os dados foram submetidos ao teste t-Student Pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (5%). As análises estatísticas foram realizadas no programa Prisma (versão 5; GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA). Para comparação da porcentagem de migração lateral da cabeça do fêmur nos quadris luxados e controles e para comparação do comprimento dos ligamentos redondos entre os lados, também foram utilizados o teste t-Student Pareado.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Comparação da porcentagem de migração da cabeça do fêmur entre o lado normal (controle) e lado luxado nos coelhos incluídos na amostra

A média de migração da cabeça do fêmur em relação ao rebordo acetabular no lado controle foi de 1,44% enquanto a média no lado luxado foi de 75,19%, mostrando diferença significativa entre os lados avaliados, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre lados Controle e Luxado para porcentagem de migração da cabeça do fêmur, visto nas radiografias. Lembrando que foi utilizado como valor mínimo de 50% de migração no lado Luxado para inclusão do coelho na amostra

Porcentagem	Controle	Luxado
Média	1,44%	75,19%
Mediana	0%	72,50%
Desvio padrão	3,85	16,6
CV	267%	22%
Min	0%	50%
Max	15%	100%
N	36	36
IC	1,26	5,42
P-valor	<0,001	

5.2 Comparação do comprimento do ligamento redondo entre o lado normal (controle) e o lado luxado nos coelhos que participaram das análises histológicas, imuno-histoquímica e bioquímica

A média do comprimento do LR no lado luxado foi significativamente maior do que a média no lado controle, como pode ser visto na tabela 3. Foram utilizados 46 ligamentos nessa comparação (23 coelhos). Apenas os dados do comprimento ligamentar do coelho 72 não foram verificados, portanto dos 24 coelhos, foram utilizados 23 nessa comparação, através do teste t-Student Pareado.

Tabela 3 - Comparação entre os lados Controle e Luxado para comprimento do ligamento redondo em milímetros (mm)

Comprimento	Normal	Luxado
Média	4,08	7,80
Mediana	3,92	7,89
Desvio Padrão	0,62	1,17
CV	15%	15%
Min	3,29	5,65
Max	5,67	10,48
N	23	23
IC	0,25	0,48
P-valor	<0,001	

5.3 Análise biomecânica

Não houve diferença significativa entre os lados (luxado x controle) tanto na força máxima dos ligamentos redondos antes da ruptura, como na deformação máxima dos mesmos.

Os gráficos 1 e 2 mostram a representação do ensaio biomecânico (força x deformação) agrupados pelos lados controle e luxado, respectivamente.

Gráfico 1 - Lado Controle (Fmáx X Dmáx)

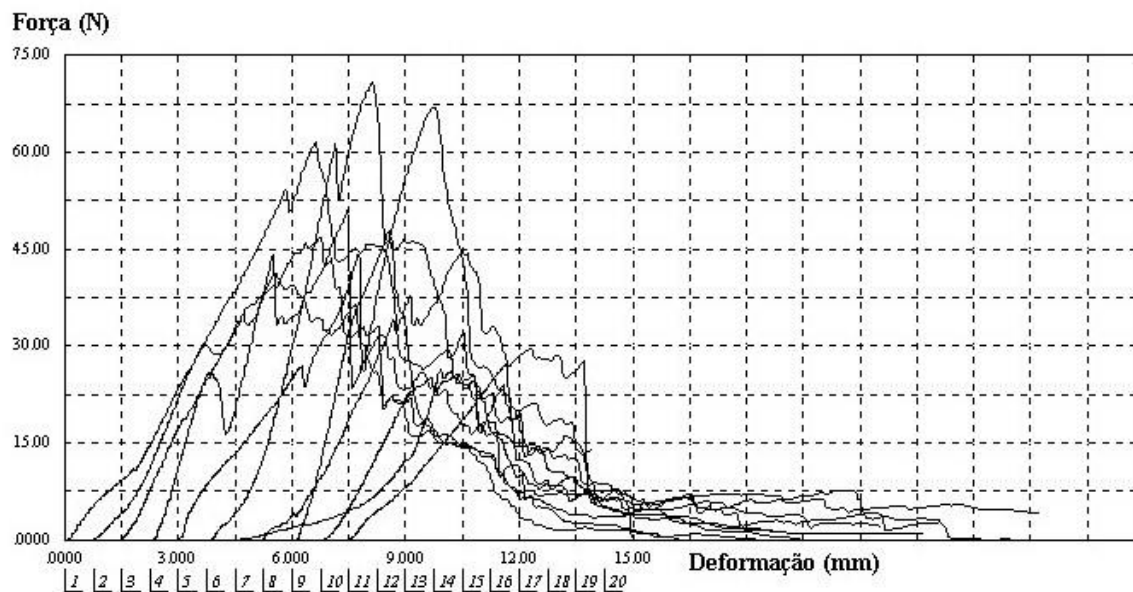
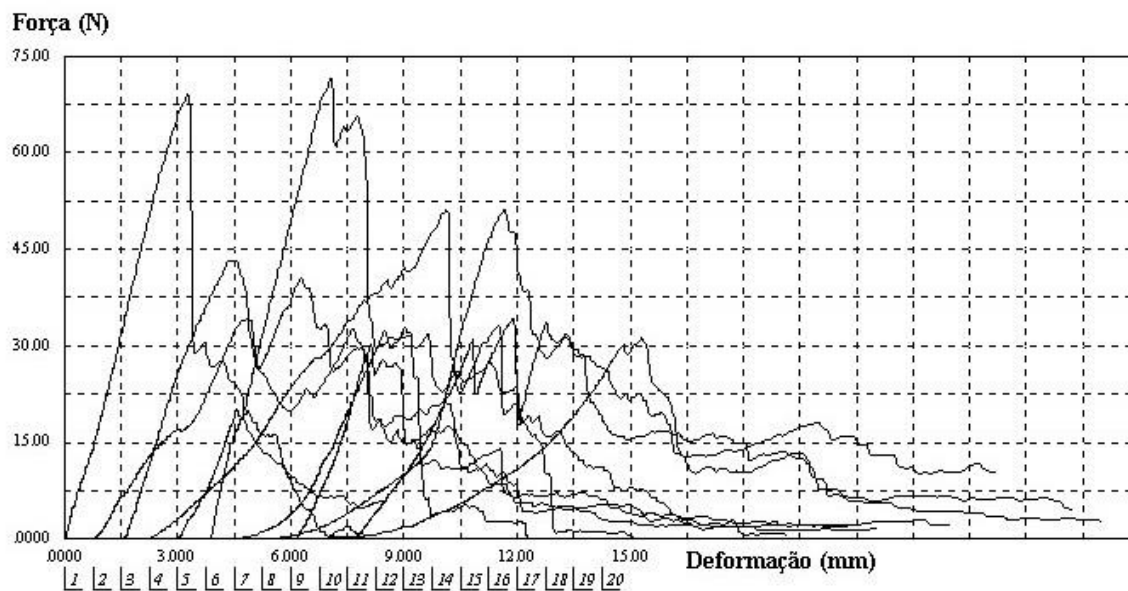


Gráfico 2 - Lado Luxado (Fmáx X Dmáx)



A tabela 4 mostra a comparação dos valores entre o lado luxado e o controle, com relação à força máxima dos ligamentos antes da ruptura, assim como média, mediana, desvio padrão, quartis, intervalo de confiança e o valor de p, que no caso, não foi significativo estatisticamente, segundo teste pareado de Wilcoxon.

Tabela 4 - Compara força máxima em Newtons ($F_{m\acute{a}x}$) entre os lados luxado e controle

Força	Controle	Luxado
Média	46,62	43,25
Mediana	46,85	40,6
Desvio Padrão	15,56	16,25
Q1	35,48	32,16
Q3	56,36	51,16
N	11	11
IC	9,19	9,6
P-valor	0,594	

A tabela 5 mostra a comparação dos valores entre o lado luxado e o controle, com relação à deformação máxima dos ligamentos antes da ruptura, assim como as médias, medianas, desvio padrão, quartis, intervalo de confiança e o valor de p, que também não foi significativo estatisticamente, segundo teste pareado de Wilcoxon.

Tabela 5 - Compara deformação máxima em milímetros ($D_{m\acute{a}x}$) entre os lados luxado e controle

Deformação	Controle	Luxado
Média	4,558	3,943
Mediana	4,574	3,712
Desvio Padrão	1,194	1,888
Q1	4,033	2,872
Q3	4,960	4,906
N	11	11
IC	0,706	1,116
P-valor	0,328	

Estatística descritiva das médias de força máxima e deformação máxima também podem ser visualizados nos gráficos 3 e 4, respectivamente.

Gráfico 3 - Comparação das médias para $F_{máx}$ (N) entre os lados Luxado e Controle ou Normal

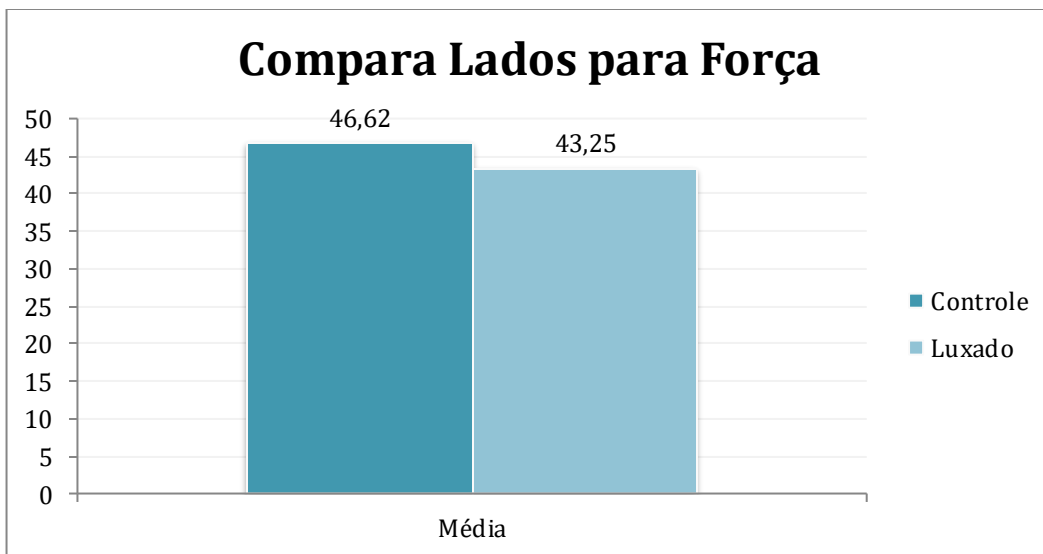
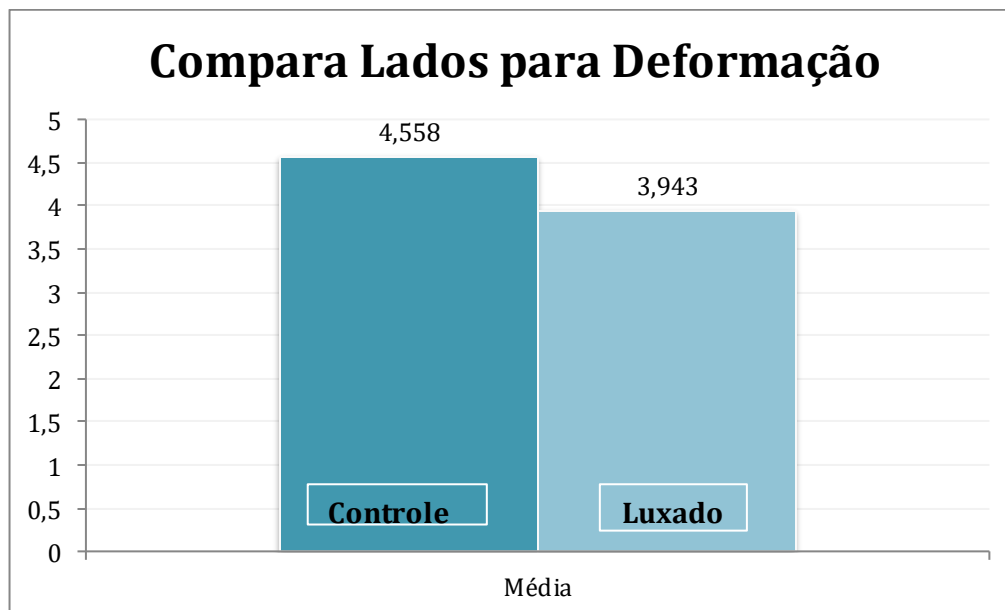


Gráfico 4 - Comparação das médias para $D_{máx}$ (mm) entre os lados Luxado e Controle ou Normal



5.4 Análise histológica

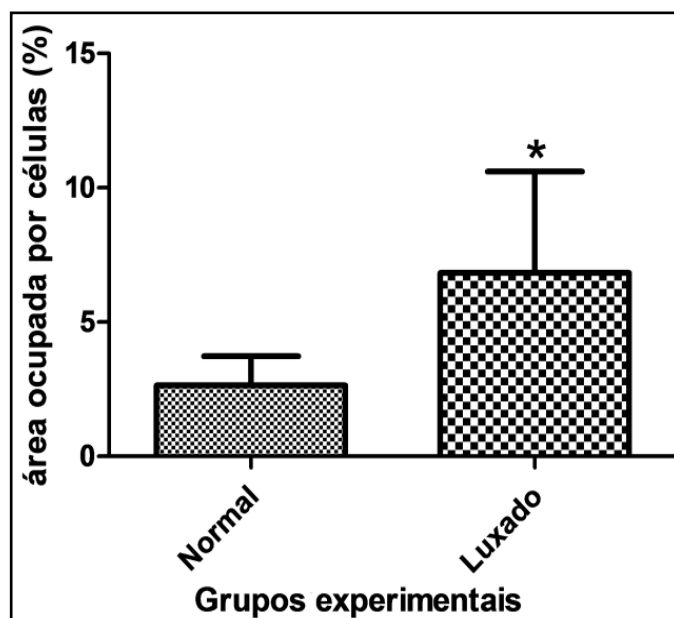
5.4.1 Celularidade

A quantidade de ocupação de células por campo analisado foi significativamente maior nos ligamentos do grupo luxado, como pode ser visto na tabela 6. Deve-se ainda lembrar que pela análise qualitativa (Imuno-histoquímica), essas células correspondem a fibroblastos.

Tabela 6 - Comparação da celularidade entre os lados Controle ou Normal e Luxado através dos parâmetros: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo (Min), valor máximo (Max), número de campos microscópicos avaliados (N) e intervalo de confiança (IC)

Celularidade	Controle	Luxado
Média	3,87%	6,83%
Mediana	3,46%	6,27%
Desvio Padrão	2,13	3,47
CV	55%	51%
Min	1,36%	1,51%
Max	11,05%	15,32%
N	70	70
IC	0,50	0,81
P-valor	<0,001	

Gráfico 5 - Demonstração gráfica dos valores evidenciados na tabela 6, mostrando a diferença na celularidade entre os lados Controle ou Normal e Luxado



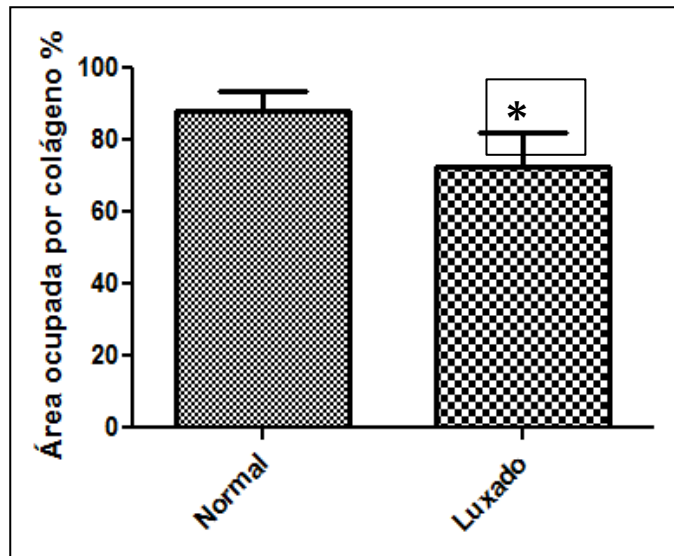
5.4.2 Quantificação do colágeno

A quantidade de fibras colágenas foi estatisticamente maior no lado controle quando comparado ao lado luxado, como pode ser visualizado na tabela 7 e gráfico 6.

Tabela 7 - Comparação da quantidade de colágeno entre os lados Controle e Luxado através dos seguintes parâmetros: média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo (Min), valor máximo (Máx), número de campos microscópicos avaliados (N) e intervalo de confiança (IC)

Colágeno	Controle	Luxado
Média	84,5%	74,3%
Mediana	86,9%	75,3%
Desvio Padrão	9,5%	10,5%
CV	11%	14%
Min	55,0%	51,7%
Max	96,3%	96,4%
N	70	70
IC	2,2	2,5
P-valor	<i><0,001</i>	

Gráfico 6 - Demonstração gráfica dos valores evidenciados na tabela 7, mostrando a representação gráfica da área ocupada por colágeno em porcentagem, nos lados Normal ou Controle e Luxado



5.5 Análise bioquímica (zimografia)

Pela Zimografia foi possível avaliar a quantidade de metaloproteinase (MMP) – 2 em suas formas intermediária e ativa (tabela 8, gráfico 7 e figura 18). Na forma ativa da MMP – 2, houve diferença importante, porém sem atingir significancia estatística. O LR do lado luxado conteve maior quantidade da MMP-2 do que o LR do lado controle. A MMP – 9 não foi quantificável pelo método utilizado (Figura 18).

Tabela 8 - Valores arbitrários em densitometria para as formas intermediária e ativa da MMP-2, ponderadas por mil e demonstrando as seguintes variáveis: média, desvio padrão, coeficiente de variação (CV), valor mínimo (Min), valor máximo (Máx), número de coelhos (N) e intervalo de confiança (IC)

Zimografia (por mil)		Média	Desvio Padrão	CV	Min	Max	N	IC	P-valor
Forma intermediária	Controle	6.453	873	14%	5.155	8.069	8	605	0,979
	Luxado	6.472	1.900	29%	3.102	9.088	8	1.316	
Forma ativa	Controle	294,4	78	26%	254	484	8	53,8	0,068
	Luxado	481,8	228	47%	247	872	8	158,3	

Gráfico 7 - Demonstração dos valores citados na tabela 8, comparando os lados Normal ou Controle e Luxado, tanto para forma intermediária quanto para forma ativa da MMP-2

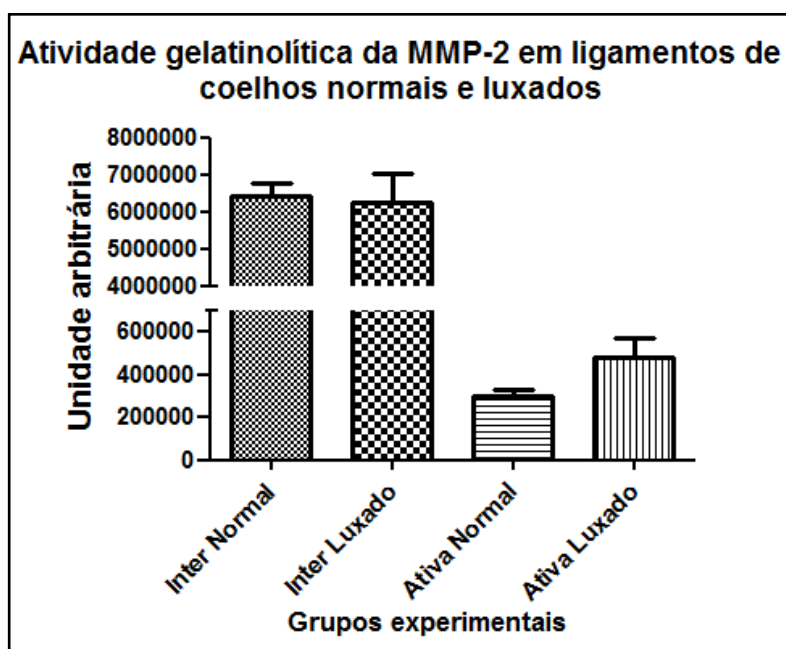
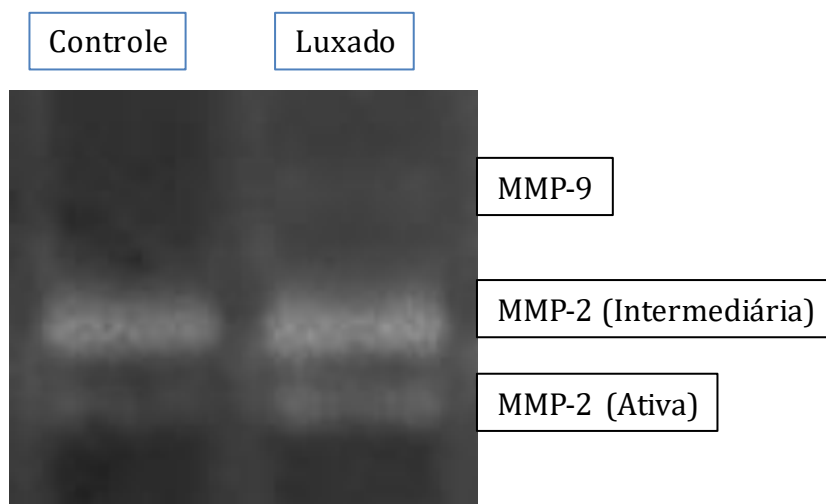


Figura 18 - Representação da atividade gelatinolítica da MMP-2 determinada por gel de zimografia nos ligamentos dos grupos controle e luxado. As bandas claras no gel demonstram a atividade das formas intermediária e ativa da MMP-2. Não foi detectada atividade da MMP-9



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O LR é estudado desde o século 19 e sempre foi motivo de controvérsias tanto a respeito de sua estrutura, quanto de sua funcionalidade para a articulação (**O'Donnell et al., 2014**). A função do LR para o quadril, ainda hoje, é motivo de discussão, não existindo uma definição clara a esse respeito. Alguns autores acreditam que seja importante para auxiliar na estabilidade articular, já que em casos de ruptura traumática, podem surgir sintomas de instabilidade e dor (**Rao et al., 2001**).

Demange et al. (2007) realizaram um estudo biomecânico com 8 peças de cadáveres testando a amplitude de movimento articular dos quadris, antes e após lesão do ligamento redondo e chegaram à conclusão que após a lesão ligamentar, houve aumento da amplitude de movimento de adução desses quadris e que, hipoteticamente, essa alteração poderia gerar instabilidade progressiva no quadril *in vivo*.

Existem alguns estudos experimentais sobre a função do LR na estabilidade do quadril e podemos destacar o de **Smith et al. (1963)**, no qual fizeram comparação, em quadris de cães submetidos à ressecção do ligamento redondo isoladamente, com outros 2 grupos. Um deles submetido à ressecção apenas capsular e o outro de ambos (LR + cápsula articular). Os autores notaram maior ocorrência de luxação dos quadris submetidos à ressecção associada e desta forma, destacaram a possível importância do ligamento redondo na estabilidade articular.

Wenger et al. (2007) testaram, em estudo experimental com porcos, a resistência do LR à força máxima de tensão até sua falha e concluíram que o comportamento biomecânico desse ligamento é similar ao de outros como, por exemplo, o ligamento cruzado anterior do joelho que, por sua importância na estabilidade articular já amplamente reconhecida, frequentemente é reconstruído quando está lesionado. Salientaram, assim, a importante contribuição do LR como estabilizador do quadril e ainda foram além, discutindo a respeito da manutenção do ligamento em cirurgias para redução aberta de quadris com displasia, em crianças.

Wenger et al. (2008) publicaram uma série de casos envolvendo 21 pacientes com luxação de quadril, associada não somente à DDQ, mas também à PC, mielomeningocele e deficiência congênita do fêmur. Realizaram redução aberta da luxação e utilizaram sutura do ligamento redondo para aumentar a estabilidade dos quadris. Nessa série, com seguimento de 1 ano, relataram não ter ocorrido casos de recidiva da luxação e consideraram o procedimento seguro, apesar de reconhecerem a necessidade de maior tempo de acompanhamento.

Enfatizaram ainda a importância do ligamento como estabilizador do quadril humano, ainda que existam controvérsias sobre o tema.

Bache et al. (2008) relataram bons resultados em 97% dos 109 quadris de crianças com displasia do desenvolvimento, submetidas à redução cruenta associada à sutura do LR no ligamento transversal, através de via medial. Acreditaram que a sutura do ligamento redondo acrescentou estabilidade à articulação.

Mais recentemente, **Youssef (2017)** encontrou 97,5% de bons e excelentes resultados utilizando técnica de redução cruenta de quadris com DDQ por via medial e associado à ressecção parcial e sutura do LR em 40 quadris de 32 crianças, com média de idade de 12 meses na ocasião da cirurgia. Salientou que não houveram casos de re-luxação e o autor acredita que a sutura do LR foi um fator importante para os bons resultados obtidos, apesar de reconhecer que seu estudo não é suficiente para recomendar esse procedimento de maneira geral.

Os ligamentos são formados por componente celular e pela matriz extracelular. O tipo celular predominante é o fibroblasto, que se localiza entre as fibras de colágeno. Os fibroblastos são os principais responsáveis pela produção de colágeno e sabe-se que eles respondem às mudanças biomecânicas de carga a que os tecidos estão submetidos. O principal componente estrutural dos ligamentos é o colágeno, tipos 1 e 3. As fibras de colágeno são responsáveis pela força mecânica estrutural do tecido (**Goh et al., 2003**).

A degradação do colágeno é realizada através de uma família de endopeptidases zinco dependentes, denominadas de metaloproteinasas (MMPs), primeiramente pelas colagenases (MMP-1 e MMP-8) e subsequentemente pelas gelatinases (MMP-2 e MMP-9). O controle da atividade das metaloproteinasas é realizado pelos inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs) (**de Malheiro et al., 2009**).

Tendo em vista as possíveis alterações na força que os ligamentos redondos de quadris luxados e ou subluxados devem estar submetidos e, conseqüentemente, as mudanças estruturais nesses ligamentos, foi identificada a importância da realização desse estudo, com foco tanto nas propriedades biomecânicas, quanto histológicas e bioquímicas dos ligamentos.

Como já mencionado nesse texto, alguns estudos têm sugerido uma mudança em um dos passos da correção cirúrgica do quadril luxado na criança: a manutenção do ligamento redondo. Porém, até o momento, não há evidências que o LR num quadril instável mantenha suas propriedades de maneira similar ao ligamento de um quadril normal e através deste estudo foi possível um melhor conhecimento dessas alterações.

Bland e Ashhurst (2001) citaram a importância da composição, do arranjo e das propriedades bioquímicas adequados dos componentes colágenos para que a função do tecido

em questão seja normal. Alterações bioquímicas ou na composição e arranjo do colágeno podem levar a uma função anormal do ligamento.

Pelo modelo utilizado, a possibilidade de comparação das propriedades ligamentares com o lado normal, foi um fator importante. Como salientado pelos estudos de **Goh et al. (2003)** e **de Malheiro et al. (2009)**, os fibroblastos, principais responsáveis pela produção de colágeno nos ligamentos e seu metabolismo associado às metaloproteínases, estão sujeitos a mudanças de acordo com a carga mecânica que lhes são aplicados. Isso pode alterar a resistência ligamentar e seu uso na prática clínica.

Alguns estudos mostram que as forças sobre os ligamentos estão aumentadas quando outras estruturas estabilizadoras da articulação em questão estão insuficientes ou danificadas.

Haines et al. (1994), em estudo com joelhos humanos de cadáveres e **Shelburne et al. (2004)**, numa investigação com modelo de joelho humano computacional 3D, comprovaram um aumento de força e amplitude de movimento sobre o ligamento colateral medial em joelhos com lesão do ligamento cruzado anterior. De maneira análoga, quando avaliamos casos de luxação de quadril, os mecanismos de estabilização da articulação, tanto ósseos quanto de tecidos moles, estão obviamente alterados e isso pode aumentar as forças atuantes no LR e assim alterar suas propriedades.

Dodds et al. (2008), em estudo experimental com luxação de quadril em porcos jovens, salientaram alterações morfológicas relevantes em ligamentos redondos de quadris subluxados devido ao estresse mecânico a que estão submetidos cronicamente.

Existem casos descritos de ausência do LR em quadris submetidos à redução aberta em crianças com DDQ, como o de **Li et al. (2015)**. Nesse estudo, os autores identificaram como fator de risco para a ausência do ligamento, a gravidade da luxação, isto é, nos quadris com luxação mais grave, foi mais prevalente a ausência do ligamento. A possível causa para a ausência do ligamento, levantada pelos autores, foi a ruptura do mesmo no curso da luxação do quadril e, desta forma, sem o fator mecânico estabilizador ligamentar, esses quadris evoluiriam com luxações mais altas e graves.

Chamberlain et al. (2009), em estudo experimental com lesão do ligamento colateral medial de ratos, citaram as alterações histológicas que ocorrem nos ligamentos em cicatrização e consideraram que após lesão ligamentar completa, as propriedades mecânicas dessa estrutura nunca mais são restituídas completamente.

No presente estudo foi possível avaliar não somente as alterações morfológicas, mas também as bioquímicas e biomecânicas a que os ligamentos redondos de quadris subluxados ou mesmo luxados estariam submetidos. Desta forma, através de uma análise mais completa,

isto é, estrutural, metabólica, histológica e funcional do ligamento redondo de um quadril instável (subluxado ou luxado), esse estudo pode contribuir com o melhor entendimento a respeito das possíveis alterações do ligamento, num ambiente de instabilidade.

6.1 Modelo experimental

O modelo experimental escolhido para estudo da luxação não traumática do quadril no esqueleto imaturo já foi desenvolvido e estudado na literatura.

Michelsson e Langenskiöld (1972) publicaram os resultados com experimento em coelhos, no qual imobilizaram joelhos de membros traseiros em extensão e notaram alterações morfológicas nos quadris do membro ipsilateral. Alterações estas que se assemelhavam muito com as que ocorrem em crianças com quadris displásicos. Dividiram essas alterações em luxação, subluxação e alterações displásicas. Como causa principal da luxação ocorrida, apontaram como a tensão dos isquiotibiais, imposta pelo posicionamento do joelho em extensão e quadris permanecendo em flexão, de maneira similar ao que ocorre em fetos que se apresentam em posição pélvica intraútero. Essa força excessiva dos isquiotibiais sobre a cápsula articular e ligamento redondo, progressivamente, levaria à subluxação e luxação dos quadris. Quanto mais jovens os coelhos foram submetidos à imobilização, mais frequente foi a luxação dos quadris, tendo sido utilizados coelhos a partir de 1 a 2 semanas de vida. Notaram ainda que quanto mais tempo foi mantida a imobilização, mais alterações na morfologia do quadril foram presenciadas, principalmente após 3 semanas de imobilização.

No presente estudo, foram utilizados coelhos a partir de 35 dias de vida por se tratar de norma do biotério central, já que essa é a idade mínima de desmame dos animais. Certamente, se usados animais mais jovens a taxa de luxação dos quadris teria sido maior e, conseqüentemente, seria necessária uma menor amostragem para atingir a segurança estatística nos testes utilizados.

Quanto ao período de imobilização dos joelhos em extensão, a partir de 3 semanas, os trabalhos mostram alterações morfológicas significativas nos quadris. Logo, foi julgado como suficiente o período de 6 semanas utilizado nesse estudo.

Greenhill et al. (1995) também utilizaram coelhos de 14 a 21 dias de vida, submetidos à estabilização em extensão do joelho direito, do membro posterior, através de transfixação articular com fio de Kirschner, obtendo sucesso com o modelo experimental na gênese de alterações típicas de displasia acetabular, nos quadris do mesmo lado. Os autores realizaram análises dos quadris com intervalos semanais entre 1 e 8 semanas e notaram alterações

significativas, atribuindo a causa da displasia à tensão dos isquiotibiais que estaria relacionada ao joelho em extensão, de maneira análoga ao que ocorre na DDQ e também em quadris luxados associados à PC.

Existem outros estudos experimentais na literatura utilizando outros animais para estudo da luxação do quadril. A maioria deles usa modelo experimental muito similar ao presente trabalho e confirmaram sucesso com esse método.

Dodds et al. (2008) realizaram estudo com porcos, de 4 a 6 semanas de vida, estabilizando, com pino transarticular, um dos joelhos em extensão de maneira similar a este estudo e notaram instabilidade do quadril ipsilateral, após 12 e 18 semanas de evolução. Relataram que o modelo utilizado ocasiona alterações similares às evidenciadas em quadris humanos de crianças com displasia do desenvolvimento.

Salter (1966) em artigo publicado sobre a DDQ em seus diversos aspectos, descreve um experimento realizado por seu grupo no Canadá, no qual utilizaram porcos recém-nascidos, submetidos à imobilização por 6 semanas, através de bandagens em uma das patas traseiras, mantendo o joelho em extensão e puderam notar o desenvolvimento de alterações morfológicas associadas à displasia do mesmo lado no quadril.

A opção pelo modelo experimental ser realizado em coelhos, deveu-se à facilidade no manejo com o animal, de pequeno porte, facilidade com o cuidado e experiência com o mesmo no biotério e laboratório experimental. Além disso, já foi considerado como modelo adequado para estudo da luxação e displasia de quadril em outros estudos, como já citado anteriormente.

As alterações macroscópicas evidenciadas após a dissecação dos quadris na preparação das peças para os testes realizados foram muito similares ao que se observa na prática clínica. Displasia acetabular, espessamento capsular e ligamentar, além da própria subluxação ou luxação foram evidenciados nesse modelo utilizado. Além disso, também foram muito evidentes as alterações radiográficas que ocorreram de modo muito parecido com quadris instáveis de crianças com displasia de quadril.

A perda de amostragem ocorrida (morte de 19 coelhos = 21,5%) foi considerada aceitável, quando comparamos com outros estudos experimentais envolvendo coelhos que exibiram taxas similares, variando de 9 a 22% (**Garcia Filho et al., 2012**).

6.2 Mecanismos de avaliação

6.2.1 Teste biomecânico

O ensaio de tração é largamente utilizado na indústria para controle de qualidade na especificação dos materiais. A força aplicada é uniaxial e se realiza simultaneamente ao registro do alongamento sofrido pelo material testado. O material deve ser mantido em sua posição por amarras ou garras, que devem garantir o perfeito alinhamento axial na aplicação da carga e não permitir qualquer escorregamento do material a ser testado (**Branco, 1985**).

O uso do teste biomecânico, através do ensaio de tração já é utilizado na medicina há muito tempo e tem o principal objetivo de recriar as forças a que o material ou tecido está sujeito *in vivo*. Em última análise, o objetivo final com esse tipo de teste seria avaliar a função do tecido (**Woo et al., 2000**).

A carga, utilizada no ensaio, pode ser aplicada de maneira lenta e contínua, como foi realizado no nosso estudo, ou também pode ser aplicada de maneira cíclica.

Rodeo et al. (1993) e **Garcia Filho et al. (2012)** salientaram em seus estudos experimentais que testes biomecânicos com cargas dinâmicas cíclicas poderiam simular, de modo mais fiel, as cargas fisiológicas, porém também observaram que a maioria das análises experimentais utiliza cargas contínuas, quase estáticas, como foi realizado no presente estudo. Ainda a respeito das cargas cíclicas, deve ser lembrado que essa possibilidade de teste está melhor estabelecida em outros ligamentos, como o cruzado anterior nos joelhos, nos quais as cargas, funções e propriedades já são mais conhecidas.

A máquina para ensaios experimentais utilizada no laboratório de cirurgia experimental da Unesp (máquina universal de ensaios tipo eletromecânica EMIC, DL 10000) foi considerada adequada para o tipo de análise realizada e sofre manutenções periódicas, além de ser certificada e seguir as normas da ABNT.

Todos os ensaios foram filmados e foi tomado um cuidado especial para atestar a aplicação da carga de maneira uniaxial, sem escorregamento das peças fixadas à máquina de teste. Desta forma, apesar da não utilização de cargas cíclicas, os resultados, com o ensaio biomecânico de tração realizado, foram julgados como confiáveis por seguirem as recomendações técnicas. Em apenas 1 dos doze coelhos, o teste não foi considerado adequado, pois o disparo da máquina foi provocado acidentalmente e, portanto, esse animal foi excluído do estudo.

Woo et al. (2000) demonstraram, em publicação extensa sobre lesão, cicatrização e propriedades biomecânicas dos ligamentos e tendões, as características avaliadas em testes de tração. Salientaram que a principal função dos ligamentos é transmitir cargas de tensão e que os testes de tração dos ligamentos mostram uma curva não linear (carga – deformação) e que essa característica é importante para auxiliar os ligamentos a garantir movimento harmônico articular, em circunstâncias normais, e a restringir movimentos excessivos sob ação de forças elevadas. Observaram ainda que os cuidados com o preparo do tecido também são importantes, como por exemplo o modo de congelar ou a irradiação do tecido, fatores que poderiam influenciar no teste.

No presente estudo, o teste biomecânico foi realizado imediatamente após a ressecção da peça, logo não houve influência de congelamento ou outras formas de preparo.

Resende et al. (2008) realizaram estudo das propriedades mecânicas dos ligamentos cruzados de 9 joelhos de cães e fizeram considerações importantes a respeito da metodologia do teste em si. Acrescentaram que a manutenção das inserções ósseas no teste com ligamentos é de extrema importância, assim como a fixação das peças na máquina de ensaio. Outra consideração importante esteve relacionada à velocidade e tipo de carga aplicada, que para simular a lesão *in vivo* seria interessante que o modelo de aplicação da carga fosse similar ao que ocorre em condições naturais.

Os mecanismos de lesão ligamentar nos ligamentos cruzados dos joelhos são amplamente conhecidos, o que não ocorre no caso do LR. Quando estudamos as alterações do LR na instabilidade do quadril na criança, mais incertezas ainda são encontradas a respeito do mecanismo de lesão, logo a velocidade e tipo de carga aplicada não deve ter influenciado no teste biomecânico utilizado nesse estudo. Os ligamentos foram mantidos com suas inserções ósseas, tanto na CF quanto na CA e a fixação das peças na máquina de ensaios foi considerada extremamente estável.

As propriedades mecânicas do tecido podem ser mensuradas através do teste de tração até sua falha, gerando gráfico carga x deformação e possibilitando, desta forma, analisar carga máxima, deformação máxima, rigidez e energia (**Branco, 1985; Woo et al., 2000**).

No presente estudo, a análise biomecânica foi realizada através do teste de tração, por meio de gráficos carga x deformação gerados, sendo avaliados: força máxima e deformação máxima na falha ligamentar, que são características relevantes na avaliação biomecânica e além disso, foram os dados disponibilizados na máquina de ensaio utilizada.

Outras análises como curva *stress x strain* também são muito valiosas na mensuração das propriedades mecânicas teciduais, porém seria necessária uma tecnologia mais avançada em tal análise, a micrometria tecidual a laser, que não estava disponível.

6.2.2 Histologia (celularidade e colágeno) e imuno-histoquímica (vimentina)

A quantidade de células no tecido foi utilizada como parâmetro de avaliação histológica, por sua relação com possível presença de quadro inflamatório no ligamento, o que poderia influenciar na sua integridade e qualidade estrutural.

Provenzano et al. (2005) avaliaram as alterações histológicas, em estudo envolvendo 32 ratos submetidos à lesão do ligamento colateral medial, através de diversos parâmetros, entre eles, estava a quantificação celular. Salientaram que a fragilidade ligamentar está relacionada não somente à lesão de fibras colágenas, mas também às alterações inflamatórias associadas e ao dano celular.

Desta forma, foi julgada importante a quantificação celular nos ligamentos, comparando o lado normal com o luxado ou subluxado, pois assim ficou evidente o aumento de células no lado luxado e com a possibilidade de identificar o tipo celular correspondente, que no caso foi o fibroblasto, pôde-se comparar a atividade histológica ocorrida em ambos ligamentos.

A imuno-histoquímica, realizada através do teste com a vimentina, proteína da classe dos filamentos intermediários e expressa por células de origem mesenquimal, foi um teste qualitativo utilizado com o objetivo de identificar a possível correspondência das células encontradas no tecido ligamentar com os fibroblastos. Essa correspondência foi confirmada através dos 2 coelhos utilizados para o teste.

A vimentina é um reconhecido marcador de célula mesenquimal, já que o citoplasma dos fibroblastos é rico em filamentos de vimentina e tem sido utilizada para essa finalidade, com resultados confiáveis na literatura (**Gartner e Hiatt, 1993**).

A importância de identificação do tipo celular, encontrado em número elevado nos ligamentos, é relevante já que se o aumento celular fosse através de células inflamatórias, muito provavelmente, acarretaria um maior enfraquecimento do tecido ligamentar.

A quantificação do colágeno foi realizada pela análise histológica após preparo das lâminas e com técnica histoquímica específica, isto é, o picrossirius. Essa substância se liga às moléculas de colágeno e se dispõe de forma paralela às fibras de colágeno, o que aumenta sua birrefringência à microscopia, sendo assim específica para colágeno.

Junqueira et al. (1979) salientaram a importância e eficácia desse método (picrossirius) que é utilizado com frequência em estudos histológicos para identificação do colágeno fibrilar.

6.2.3 Zimografia

As metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases zincodpendentes. Elas participam de diversos processos fisiológicos e patológicos, estando relacionadas com a função e estrutura dos tecidos, por atuarem principalmente na degradação de componentes proteicos da matriz extracelular, dentre estes está o colágeno.

Inicialmente, estão atuantes a MMP-1 e MMP-8 que são colagenases. Subsequentemente, as MMPs 2 e 9, que são gelatinases, passam a ter maior relevância. Essas MMPs têm especial importância na degradação do colágeno do tipo fibrilar, como os tipos 1 e 3 que são os principais componentes dos ligamentos (**de Mello et al., 2009**).

A zimografia é citada por diversos autores como um dos métodos mais completos de análise realizada para identificar e quantificar a atividade enzimática das MMPs e por isso foi utilizada no presente estudo (**Justulin et al., 2010; Kupai et al., 2010**).

6.3 Resultados

A manutenção do LR na cirurgia para correção da luxação do quadril na criança está sendo levada em consideração por alguns autores, no intuito de diminuir as complicações, principalmente a recidiva da luxação. Porém, o referido ligamento pode apresentar alteração morfológica e funcional em casos de instabilidade no quadril, logo, nesses casos, é necessário conhecer melhor as suas propriedades.

Por motivos éticos não é possível a comparação do LR entre um quadril luxado e o normal em seres humanos, logo a possibilidade dessa comparação de maneira experimental é de grande valia. Da forma como foi realizado o presente estudo, não foi possível encontrar similares na literatura.

A composição dos grupos (luxado x controle) para todas as análises foi considerada adequada, já que foi realizado um grupo piloto com a variável comprimento ligamentar para calcular a amostra necessária nos testes estatísticos.

A diferença entre os grupos luxado e controle com relação à migração lateral da cabeça do fêmur, mostrado no item 4.3.2 (momento M1) dos métodos e no item 5.1 dos resultados, foi

evidente. A média de migração no grupo luxado foi de 75,19% e de 1,44% no grupo controle, com $p < 0,001$. Logo, a amostra na composição de seus grupos foi considerada homogênea.

O motivo da escolha do valor de corte em 50% de migração da CF para determinação da amostragem e não a de qualquer valor de migração esteve relacionado a quadros mais evidentes de subluxação e que na prática clínica teriam mais chances de serem submetidos a tratamento cirúrgico.

Para avaliação completa do ligamento foram testadas não somente as propriedades morfológicas e bioquímicas, mas também as propriedades funcionais. Esse fator é relevante, pois trouxe informações a respeito das alterações microscópicas e estruturais dos ligamentos. Além disso, foi possível analisar metabolicamente os ligamentos através dos testes bioquímicos. E por último, os testes biomecânicos trouxeram informações importantes acerca de sua função.

Provenzano et al. (2005) publicaram seus resultados relacionados à análise biomecânica em ratos submetidos a lesões no ligamento colateral medial de joelhos, grau 2 (lesão parcial). Identificaram que quanto mais jovem, mais rápida a recuperação do rato, relacionado à resistência biomecânica e compararam com outros trabalhos publicados, porém estes, com lesão completa ligamentar. Saliaram que a recuperação de lesões não completas seriam melhores, com menos sequela cicatricial ligamentar e portanto, mantendo mais próximas do normal as propriedades biomecânicas do ligamento. Os autores afirmaram ainda, através da análise da expressão do gene de colágeno, que a produção de colágeno tipo 1 foi maior do que a do colágeno tipo 3 e isso esteve relacionado a menor alteração estrutural nos ligamentos. Além disso, não notaram infiltrado inflamatório com polimorfonucleares, neutrófilos e outras células inflamatórias o que possibilitou a maior atuação dos fibroblastos produzindo colágeno e menores alterações cicatriciais, consequentemente mantendo as propriedades ligamentares.

Nos ligamentos redondos do presente estudo, foram identificadas alterações morfológicas relevantes, tanto no comprimento ligamentar (média de 7,8mm no lado luxado X 4,08mm em média no lado controle, com $p < 0,001$), quanto nas características histológicas, ao compararmos o lado luxado com o controle. Porém, não foi possível identificar macroscopicamente uma lesão ligamentar parcial ou completa nos espécimes utilizados para análise.

O comportamento do LR, nesse estudo, parece ter sido similar ao verificado em lesões parciais, com pouca ou nenhuma alteração inflamatória, como demonstrado por **Provenzano**

et al. (2002) e Provenzano et al. (2005). Provavelmente ocorreram alterações de maneira mais lenta e gradual e isso possibilitou uma maior integridade biomecânica dos ligamentos avaliados.

Com relação às alterações histológicas, foi notado aumento de celularidade nos ligamentos do lado luxado, em comparação com o lado controle. A média de ocupação celular por campo microscópico no grupo luxado foi de 6,83% e no lado controle foi de 3,87%, com $p < 0,001$.

É importante enfatizar que o aumento do número de células nos ligamentos do lado luxado se deu às custas de fibroblastos. Como os fibroblastos estão relacionados com a síntese de colágeno, nota-se que há alteração histológica ligamentar relevante. Além disso, a própria diferença da ocupação de colágeno nos ligamentos, entre os lados luxado e controle, é mais um fator a ser considerado. O lado luxado apresentou, de maneira significativa, menos colágeno do que o lado controle (média de 84,5% para o lado controle e de 74,3% para o lado luxado, com $p < 0,001$).

Levando-se em consideração as alterações histológicas comprovadas nos ligamentos do lado luxado, provavelmente, os ligamentos estão submetidos a forças aumentadas num ambiente de instabilidade articular.

Nota-se ainda um estímulo orgânico, através do aumento do número celular, com objetivo de maior produção de colágeno, já que este último pode estar sendo lesionado lenta e progressivamente.

É importante salientar que foi evidenciada a ausência do LR no lado luxado, em 5 animais. Esse fato pode estar relacionado com uma lesão maior de fibras colágenas e consequente enfraquecimento ligamentar. Se for analisado ainda que 41 coelhos evoluíram com a instabilidade do quadril, pode-se levar em consideração que 12,2% desses quadris não apresentaram o ligamento. Esse fato é importante, pois pode significar que esses ligamentos romperam no decorrer do experimento.

Existem relatos em publicações, como a de **Li et al. (2015)**, que identificaram a ausência do LR em 18,67% dos 150 quadris operados em crianças com DDQ. Os autores identificaram a gravidade da luxação como um fator de risco para a ruptura do ligamento.

Em estudo extenso sobre a redução aberta de quadris com displasia do desenvolvimento, **Scaglietti e Calandriello (1962)** já haviam notado a ausência do LR em diversos quadris. Discutiram sobre as possibilidades causais para essa constatação e dentre elas citaram, a ausência congênita ou a ruptura do LR durante ou após a ocorrência da luxação do quadril.

Walker (1980) estudou as características do LR em 140 fetos humanos e não encontrou ausência do ligamento, mesmo nos quadris considerados displásicos e luxados. Porém, sua amostra era essencialmente de quadris normais, apenas 3 quadris estavam luxados. O autor cita a possível importância do ligamento na estabilidade da articulação.

Ao avaliar os estudos sobre a ausência e morfologia do ligamento redondo, é notado que em quadris locados, dificilmente não existe o LR, logo, o mesmo deve exercer função relevante na estabilidade dessa articulação.

Nos quadris que não apresentaram o ligamento, é difícil estabelecer se a lesão acentuou a instabilidade da articulação ou mesmo se a permanência do quadril luxado, exercendo possivelmente maior força sobre o ligamento, foi o fator determinante para sua ruptura. Porém, deve sempre ser levado em consideração a possibilidade da ausência do LR em quadris luxados, como já foi previamente demonstrado nos trabalhos de **Scaglietti e Calandriello (1962)**, além de **Li et al. (2015)** e também no presente estudo, já que todos os cinco quadris que não apresentaram o LR estavam com 100% de migração da CF, isto é, completamente luxados.

Outro fator que deve estar relacionado com as mudanças ligamentares histológicas notadas é a sua atividade tecidual. Esta foi mensurada, nesse estudo, através da zimografia, quantificando as MMPs, que apresentaram alterações importantes, apesar de não ter sido estabelecida a significância estatística (maior quantidade da forma ativa da MMP-2 no lado luxado, $p = 0,068$). Esse fenômeno pode ser entendido como aumento na atividade tecidual bioquímica no LR, já que as MMPs estão relacionadas com o metabolismo do colágeno. Logo, maior quantidade de fibroblastos e maior quantidade de MMPs no tecido indicam maior atividade metabólica tecidual, mais produção e degradação de fibras colágenas, com objetivo de remodelar e restituir a anatomia ligamentar. Sabe-se que o acúmulo e formação da rede de colágeno estão não só relacionados à síntese, mas também à degradação do colágeno (**Robbins, 1994**).

Fato importante a ser levado em consideração foi a não detecção da MMP-9 na zimografia. Sabe-se que a MMP-2 tem sua produção e ativação relacionada às células mesenquimais como o fibroblasto e a síntese e ativação da MMP-9 está mais associada aos polimorfonucleares e macrófagos, que são células relacionadas à fase aguda inflamatória (**Reynolds, 1996**). Como houve aumento na quantidade de fibroblasto no lado luxado, a MMP-2 foi identificada em maior valor. Já a MMP-9 não foi evidenciada, pois não ocorreu quadro inflamatório agudo evidenciado na análise histológica. Esse é mais um fato que comprova as alterações mais crônicas e menos cicatriciais nos ligamentos redondos dos quadris instáveis, nesse modelo utilizado.

Na avaliação biomecânica, não houve mudança no comportamento mecânico, isto é, a resistência tênsil mensurada pela força máxima e a deformação máxima foram similares em ambos os grupos, apesar de ser um pouco menor a $F_{m\acute{a}x}$, na média, no grupo luxado ($F_{m\acute{a}x} = 46,62$ no lado controle X $F_{m\acute{a}x} = 43,25$ no lado luxado, $p = 0,594$). Um dos fatores que pode explicar esse fenômeno é o fato de não haver lesão completa do LR nos casos de luxação do quadril avaliados, e talvez nem mesmo lesão parcial. Sabe-se que o ligamento de um quadril luxado, provavelmente, fica submetido a forças diferentes e talvez maiores do que num quadril normal e isso deve alterar a estrutura morfológica ligamentar.

A resistência do ligamento está relacionada com a sua integridade estrutural, ou seja, se as fibras de colágeno estiverem mais íntegras, a relação entre os tipos de colágeno estiver mantida, os *cross links* íntegros, os crimps também inalterados e a quantidade de colágeno estiver mantida, entre outras características importantes (Woo et al., 1997 e Woo et al., 2000).

Como não ocorreu uma lesão ligamentar, propriamente dita, a função biomecânica dos ligamentos redondos permaneceu sem alteração quando comparada ao lado controle, no que diz respeito à força máxima.

Essa constatação é de suma importância, pois nos fornece informações seguras sobre a integridade funcional desse ligamento, mesmo num ambiente de instabilidade articular, como o da luxação ou subluxação do quadril.

Outra propriedade biomecânica importante avaliada foi a deformação máxima ($D_{m\acute{a}x}$) do ligamento antes da ruptura. Não houve alteração significativa entre os grupos luxado e controle, em valores absolutos. A média de $D_{m\acute{a}x}$ no grupo controle foi de 4,558 mm e no grupo luxado foi de 3,943, com $p = 0,328$. Porém, se uma avaliação proporcional fosse realizada, provavelmente seria encontrada uma alteração significativa, pois a média de comprimento do ligamento no lado luxado submetido a essa mensuração foi de 7,80mm e no lado controle foi de 4,08. Percentualmente, o ligamento no lado luxado aumentou seu comprimento em 50,5% antes da ruptura, enquanto que no lado controle houve mais do que 100% de aumento em seu tamanho.

Esta avaliação não foi realizada nos ligamentos que foram submetidos ao ensaio biomecânico pelo receio de interferência no teste, já que para mensuração adequada dos ligamentos, em alguns casos foi necessário pequena ressecção óssea de parte acetabular (figura 10) e isso poderia enfraquecer o ligamento no teste mecânico.

A deformação do ligamento se relaciona com suas propriedades viscoelásticas. Se um ligamento tem muita alteração estrutural e cicatricial, isso pode alterar sua capacidade de deformação e absorção de energia antes da ruptura.

Na análise do ensaio de tração, nota-se que os valores do eixo horizontal dos gráficos (onde está localizada a deformação) são menores no lado luxado (gráfico 2 do item 5.3 em resultados), conseqüentemente a inclinação inicial do gráfico, nesse lado, é mais vertical, isto é, permitindo menor complacência tecidual, ou mesmo, menor deformação na fase elástica até ocorrer a ruptura. Isso significa que o LR no lado luxado deve ter menor elasticidade do que o ligamento do lado controle. É importante mencionar que a inclinação da curva no gráfico de um ensaio de tração, na fase elástica, está relacionada com a rigidez do corpo de prova (no caso, o LR). O módulo de elasticidade não pode ser mensurado nesse estudo por não estar disponível a mensuração do diâmetro do ligamento. Como o formato do LR não é totalmente homogêneo e cilíndrico, isso dificulta sua mensuração e pode interferir com o resultado, logo foi optado por não utilizar essa medida.

Como pode ser notado, o ligamento no lado luxado apresentou menor deformação em valores percentuais em relação a seu comprimento original, apesar de não ter sido realizada a mensuração do comprimento nos ligamentos que foram submetidos ao teste biomecânico. Isso mostra que pode haver alteração na elasticidade desses ligamentos em um ambiente de instabilidade e provavelmente quanto maior as alterações estruturais, maior será a alteração na elasticidade do ligamento. Apesar dessa diferença percentual na deformação do LR no lado luxado, a resistência tênsil dos mesmos não foi alterada de maneira significativa.

Uma consideração muito importante a ser feita neste ponto mais uma vez diz respeito aos casos de luxação que não apresentaram o ligamento. Um questionamento a ser levantado, nesse sentido, seria se com maior tempo de experimento, mais quadris luxados também não apresentariam o LR. Essa questão permanece e deve inclusive ser lembrada na prática clínica, nos casos de luxação de quadril mais graves, em pacientes com maior idade, logo com mais tempo de luxação.

Em suma, apesar das considerações relevantes citadas no parágrafo anterior e levando em consideração as análises realizadas no presente estudo, além das informações levantadas na literatura correspondente, pode-se acreditar que os ligamentos redondos de quadris instáveis (subluxados ou luxados) sofrem alterações morfológicas devido, provavelmente, ao próprio ambiente de instabilidade. Mas, de maneira geral, não há alteração funcional relevante que impossibilite o uso do ligamento nas cirurgias para correção da luxação do quadril na infância. Lembrando que há necessidade de maior cautela em quadris com luxações mais graves e que estão nessa situação há muito tempo, já que existe a possibilidade de ausência do ligamento redondo nesses casos. Claro que essa afirmação carece ainda de melhor investigação através de estudos clínicos com relevância científica.

O benefício buscado com a utilização do LR nas correções cirúrgicas de quadris luxados na infância é a maior eficácia do procedimento, diminuindo a taxa de relaxação. Sabe-se através desse e de outros estudos que analisaram os ligamentos redondos do ponto de vista morfológico, que os ligamentos sofrem alterações histológicas em ambiente de instabilidade. Porém, na presente investigação as propriedades biomecânicas do LR puderam ser avaliadas também e apesar de apresentarem força tênsil menor do que o lado normal, essa alteração não foi significativa, logo há possibilidade de uso desse ligamento para auxiliar na estabilidade da correção cirúrgica de um quadril luxado. Essa consideração é especialmente válida se pensarmos que o principal auxílio na estabilidade do quadril seria nos primeiros meses de pós-operatório, até ocorrer a cicatrização capsular, ligamentar e óssea, mantendo a congruência articular após esse período. Mesmo que o ligamento de um quadril luxado não apresente a mesma qualidade histológica e bioquímica do LR de um quadril normal, a função de auxiliar na estabilidade da articulação pós correção cirúrgica pode ser atingida, ainda que através de um mecanismo contensor mais simples e sem exigir todas as propriedades visco-elásticas de um ligamento normal.

Como já mencionado anteriormente, são necessários mais estudos clínicos que comprovem não somente a eficácia da utilização do LR na correção cirúrgica do quadril luxado na infância, mas também sua segurança. Além disso, a melhor técnica para realizar tal procedimento também deve ser foco de investigações futuras.

6.4 Limitações do estudo

O fato do desenho do estudo ser experimental em animais é um fator limitante para definições ou mesmo sugestões a serem realizadas para prática clínica. Porém, devido à necessidade de comparação de propriedades entre ligamentos em quadris luxados e normais, seria impossível realizar o mesmo estudo em humanos.

Outro fator importante, já citado anteriormente, foi a impossibilidade de mensurar os ligamentos que foram submetidos ao teste biomecânico para atestar as possíveis alterações na deformação dos ligamentos de maneira mais proporcional. Talvez com métodos de mensuração mais sofisticados, esse dado estaria disponibilizado para análise.

A análise dos ligamentos por um tempo maior talvez pudesse acrescentar informações a respeito do comportamento dos ligamentos em quadris luxados de modo mais crônico e

inveterado, apesar de todos os estudos experimentais encontrados não ultrapassarem o limite de 8 semanas. No presente estudo foi utilizado o período de 6 semanas.

Talvez uma análise estratificada dos quadris do grupo luxado trouxesse ainda mais informações sobre quais ligamentos apresentariam mais alterações morfológicas e funcionais. Isso foi inviabilizado, nesse estudo, pela necessidade de ampliar de maneira significativa a amostragem.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

No presente estudo foram identificadas alterações histológicas significantes e bioquímicas importantes, estas sem significancia estatística, entre os ligamentos dos grupos luxado e controle, porém não houve alteração significantes no teste biomecânico.

Isso confirma a hipótese inicial no que diz respeito à avaliação histológica e não confirma em relação às alterações bioquímicas. Também não houve confirmação do ponto de vista biomecânico, pois não houveram alterações biomecânicas relevantes nos ligamentos redondos de quadris instáveis.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Bache CE, Graham HK, Dickens DR, Donnan L, Johnson MB, Nattrass G, et al. Ligamentum teres tenodesis in medial approach open reduction for developmental dislocation of the hip. *J Pediatr Orthop*. 2008; 28(6):607-13.

Bali N, Harrison J, Laugharne E, Bache CE. A modification of the Dunn osteotomy with the preservation of the ligamentum teres. *J Pediatr Orthop* 2017; 37(4): 279-84.

Bertol P, Ishida A, Macnicol MF. Tratamento da displasia do desenvolvimento do quadril pela técnica de Salter isolada ou associada à osteotomia do fêmur. *Rev Bras Ortop*. 2004; 39(5):232-44.

Bland YS, Ashhurst DE. The hip joint: the fibrillar collagens associated with development and ageing in the rabbit. *J Anat*. 2001;198(Pt 1):17-27.

Branco CAGM. Ensaios de materiais e análise elementar de tensões no domínio plástico. In: *Mecânica dos materiais*. Porto: Orgal; 1985. p 697–787.

Brewster SF. The development of the ligament of the head of the femur. *Clin Anat*. 1991; 4: 245–55.

Brunner R, Baumann JU. Clinical benefit of reconstruction of dislocated or subluxated hip joints in patients with spastic cerebral palsy. *J Pediatr Orthop*. 1994;14(3):290-4.

Buckley SL, Sponseller PD, Magid D. The acetabulum in congenital and neuromuscular hip instability. *J Pediatr Orthop*. 1991;11(4):498-501.

Buehler MJ. Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(33):12285-90.

Chamberlain CS, Crowley E, Vanderby R. The spatio-temporal dynamics of ligament healing. *Wound Repair Regen*. 2009;17(2):206-15.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Brasil). Resolução normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013. Diretrizes da prática de eutanásia do conselho nacional de controle de experimentação animal - CONCEA. Diário Oficial da União 26 set 2013; Seção 1.

Cooperman DR, Bartucci E, Dietrick E, Millar EA. Hip dislocation in spastic cerebral palsy: long term consequences. *J Pediatr Orthop*. 1987;7(3):268-76.

Dehao BW, Bing TK, Young JLS. Understanding the ligamentum teres of the hip: a histological study. *Acta Ortop Bras* 2015; 23(1): 29-33.

De Mello Malheiro OC, Giacomini CT, Justulin LA Jr, Delella FK, Dal-Pai-Silva M, Felisbino SL. Calcaneal tendon regions exhibit different MMP-2 activation after vertical jumping and treadmill running. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009; 292(10):1656-62.

Demange MK, Kakuda CMS, Pereira CAM, Sakaki MH, Albuquerque RFM. Influência do ligamento da cabeça do fêmur na mecânica do quadril. *Acta Ortop Bras*. 2007; 15(4):187-90.

Dodds MK, Lee J, McComarck D. Transarticular stabilization of the immature femoral head: assessment of a novel surgical approach to the dislocated pediatric hip in a porcine model. *J Pediatr Orthop*. 2008; 28(1):36-42.

Drummond DS, Moreau M, Cruess RL. The results and complications of surgery for paralytic hip and spine in myelomeningocele. *J Bone Joint Surg Br*. 1980; 62(1):49-53.

Eberhardt O, Wirth T, Fernandez FF. Arthroscopic anatomy of the dislocated hip in infants and obstacles preventing reduction. *Arthroscopy*. 2015; 31(6): 1052-9.

Feiwell E, Sakai D, Blatt T. The effect of hip reduction on function in patients with myelomeningocele: potential gains and hazards of surgical treatment. *J Bone Joint Surg Am*. 1978;60(2):169-73.

Flynn JM, Miller F. Management of hip disorders in patients with cerebral palsy. *J Am Acad Orthop Surg*. 2002; 10(3):198-209.

Frank CB. Ligament structure, physiology and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(2):199-201.

Gabrieli AP, Vankoski SJ, Dias LS, Milani C, Lourenco A, Filho JL, Novak R. Gait analysis in low lumbar myelomeningocele patients with unilateral hip dislocation or subluxation. *J Pediatr Orthop.* 2003;23(3):330-4.

Garcia Filho FC, Guarniero R, Godoy Júnior RM, Pereira CAM, Matos MA, Garcia LC. Sutura simples e âncoras em quadris de coelhos. *Acta Ortop Bras.* 2012; 20(5): 280-4.

Gartner LP, Hiatt JL. Tecido conjuntivo. In: Gartner LP, Hiatt JL, editores. *Atlas de Histologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p 34-48.

Goh JC, Ouyang HW, Teoh SH, Chan CK, Lee EH. Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Eng.* 2003; 9(Suppl 1):S31-44.

Gore TA, Flynn M, Stevens J. Measurement and analysis of hip joint movements. *IMEchE.* 1979; 8(1):21-5.

Greenhill BJ, Hainau B, Ellis RD, el-Sayed RM. Acetabular changes in an experimental model of developmental dysplasia of the hip (DDH). *J Pediatr Orthop.* 1995;15(6):789-93.

Guarniero R. Displasia do desenvolvimento do quadril: atualização. *Rev Bras Ortop.* 2010; 45(2):116-21.

Haines JL, Wroble RR, Grood ES, Noyes FR. Role of the medial structures in the intact and anterior cruciate ligament deficient knee: limits of motion in the human knee. *Am J Sports Med.* 1994;22(3):402-9.

Heeg M, Broughton NS, Menelaus MB. Bilateral dislocation of the hip in spina bifida: a long-term follow-up study. *J Pediatr Orthop.* 1998;18(4):434-6.

Herring JA. Developmental dysplasia of the hip. In: Herring JA, editor. *Tachdjian's Pediatric Orthopaedics*, 4th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 637-770.

Hosalkar HS, Varley ES, Glaser D, Farnsworth CL, Bomar JD, Wenger DR. Isocentric reattachment of ligamentum teres: a porcine study. *J Pediatr Orthop*. 2011; 31(8):847-52.

Ippolito E, Ishii Y, Ponseti IV. Histologic, histochemical and ultrastructural studies of the hip joint capsule and ligamentum teres in congenital dislocation of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 1980; 146:246-58.

Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979; 11(4):447-55.

Justulin LA Jr, Della-Coleta HH, Taboga SR, Felisbino SL. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *Int J Androl*. 2010; 33(5):696-708.

Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;61(2):205-9.

Li T, Zhang M, Wang H, Wang Y. Absence of the ligamentum teres in developmental dysplasia of the hip. *J Pediatr Orthop*. 2015; 35(7):708-11.

Martin RL, Palmer I, Martin HD. Ligamentum teres: a functional description and potential clinical relevance. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012; 20: 1209-14.

Martin HD, Hatem MA, Kivlan BR, Martin RL. Function of the ligamentum teres in limiting hip rotation: a cadaveric study. *Arthroscopy* 2014; 30(9): 1085-91.

Menelaus MB. The evolution of orthopaedic management of myelodysplasia. *J Pediatr Orthop*. 1998; 18(4):421-2.

Michaels G, Matles AL. The role of the ligamentum teres in congenital dislocation of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 1970; 71:199-201.

Michésson JE, Langenskiöld A. Dislocation or subluxation of the hip: regular sequels of immobilization of the knee in extension in young rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1972; 54(6): 1177-86.

Milani C, Ishida A, Lourenço AF, Kuwajima SS, Dobashi E, Damasceno FL. Estudo comparativo da frequência da necrose avascular da cabeça femoral no tratamento cirúrgico da luxação congênita do quadril com e sem osteotomia de encurtamento do fêmur. *Rev Bras Ortop* 1995; 30(1): 21-4.

Mubarak S, Garfin S, Vance R, McKinnon B, Sutherland D. Pitfalls in the use of the Pavlik harness for treatment of congenital dysplasia, subluxation, and dislocation of the hip. *J Bone Joint Surg Am.* 1981;63(8):1239-48.

Mubarak SJ, Bialik V. Pavlik: The man and his method. *J Pediatr Orthop.* 2003; 23(3):342-6.

Mubarak SJ, Valencia FG, Wenger DR. One-stage correction of the spastic dislocated hip. use of pericapsular acetabuloplasty to improve coverage. *J Bone Joint Surg Am.* 1992; 74(9):1347-57.

Muratli HH, Biçimoglu A, Tabak YA, Çelebi L, Pakel I. Mechanoreceptor evaluation of hip joint capsule and ligamentum capitis femoris in developmental hip dysplasia: a preliminary study. *J Pediatr Orthop B.* 2004; 13: 299-302.

O'Donnell JM, Pritchard M, Salas AP, Singh PJ. The ligamentum teres – its increasing importance. *J Hip Preserv Surg.* 2014; 1(1): 3-11.

Philippon MJ, Pennock A, Gaskill TR. Arthroscopic Reconstruction of the Ligamentum Teres: Technique and early outcomes. *J Bone Joint Surg Br.* 2012;94(11):1494-8.

Pimentel ER, Gomes L, Carvalho HF. Matriz Extracelular. In: Carvalho HF. *A Célula*, 2ª ed Barueri: Manole, 2007. p 276-94.

Ponseti IV. Growth and development of the acetabulum in the normal child. *J Bone Joint Surg Am.* 1978; 60(5):575-85.

Provenzano PP, Hayashi K, Kunz DN, Markel MD, Vanderby R Jr. Healing of subfailure ligament injury: comparison between immature and mature ligaments in a rat model. *J Orthop Res.* 2002;20(5):975-83.

Provenzano PP, Alejandro-Osorio AR, Valhmu WB, Jensen KT, Vanderby Jr R. Intrinsic fibroblast-mediated remodeling damaged collagenous matrices in vivo. *Matrix Biol.* 2005; 23: 543-55.

Provenzano PP, Vanderby R Jr. Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.* 2006;25(2):71-84.

Rao J, Zhou YX, Villar RN. Injury to the ligamentum teres: mechanism, findings and results of treatment. *Clin Sports Med.* 2001;20(4):791-9.

Rees JD, Maffulli N, Cook J. Management of tendinopathy. *Am J Sports Med.* 2009; 37(9):1855-67.

Reimers J. The stability of the hip in children: a radiological study of the results of muscle surgery in cerebral palsy. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1980;184:1-100.

Resende JL, Faria MTC, Las Casas EB, Saffar JME, Oliveira EA. Determinação das propriedades mecânicas dos ligamentos cruzados via ensaios uniaxiais de tração. *Brazilian Journal of Biomechanics.* 2008; 9: 73-80.

Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis.* 1996; 2(1):70-6.

Robbins SL. Inflammation and repair. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ, editors. *Robbins pathologic basis of disease.* 5th ed. Philadelphia: Saunders; 1994. p. 51-92.

Rodeo SA, Arnocsky SP, Torzilli PA, Hidaka C, Warren RF. Tendon-healing in a bone tunnel: a biomechanical and histological study in the dog. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(12):1795-803.

Salter RB. Innominate Osteotomy in the treatment of congenital dislocation and subluxation of the hip. *J Bone Joint Surg Br.* 1961; 43(3): 518-39.

Salter RB. Role of innominate osteotomy in the treatment of congenital dislocation and subluxation of the hip in the older child. *J Bone Joint Surg Am.* 1966;48(7):1413-39.

Sarban S, Baba F, Kocabey Y, Cengiz M, Isikan UE. Free nerve endings and morphological features of the ligamentum capitis femoris in developmental dysplasia of the hip. *J Pediatr Orthop B.* 2007; 16(5): 351-6.

Scaglietti O, Calandriello B. Open reduction of congenital dislocation of the hip. *J Bone Joint Surg Br.* 1962;44-B:257-83.

Scrutton D. The early management of hips in cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 1989; 31(1):108-16.

Senaran H, Shah SA, Glutting JJ, Dabney KW, Miller F. The associated effects of untreated unilateral hip dislocation in cerebral palsy scoliosis. *J Pediatr Orthop.* 2006; 26(6):769-72.

Shelburne KB, Pandey MG, Torrey MR. Comparison of shear forces and ligament loading in the healthy and ACL-deficient knee during gait. *J Biomech.* 2004;37(3):313-9.

Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58.

Simpson JM, Field RE, Villar RN. Arthroscopic reconstruction of the ligamentum teres. *Arthroscopy.* 2011;27(3):436-41.

Smith WS, Coleman CR, Olix ML, Slager RF. Etiology of congenital dislocation of the hip: an experimental approach to the problem using young dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1963;45(3):491-500.

Strayer Jr LM. The embryology of the human hip joint. *Yale J Biol Med.* 1943;16(1):13-26.

Trueta J. The normal vascular anatomy of the human femoral head during growth. *J Bone Joint Surg Br.* 1957;39(2):358-94.

Walker JM. Growth characteristics of the fetal ligament of the head of femur: significance in congenital hip disease. *Yale J Biol Med.* 1980;53(4):307-16.

Weinstein SL, Mubarak SJ, Wenger DR. Developmental hip dysplasia and dislocation. Part I. *J Bone Joint Surg Am.* 2003a; 85(9): 1824-32.

Weinstein SL, Mubarak SJ, Wenger DR. Developmental hip dysplasia and dislocation. Part II. *J Bone Joint Surg Am.* 2003b; 85(10): 2024-35.

Weinstein SL. Displasia e luxação evolutivas do quadril. In: Morissy RT, Weinstein SL, editors. *Lovell and Winter's pediatric orthopaedics.* 5th ed. Tradução de: Lambrinidis CD, Nascimento FG, Strong S. Barueri, SP: Manole; 2005. p 985 – 1040.

Wenger D, Miyajni F, Mahar A, Oka R. The mechanical properties of the ligamentum teres: a pilot study to assess its potential for improving stability in children's hip surgery. *J Pediatr Orthop.* 2007;27(4):408-10.

Wenger DR, Mubarak SJ, Henderson PC, Miyajni F. Ligamentum teres maintenance and transfer as a stabilizer in open reduction for pediatric hip dislocation: surgical technique and early clinical results. *J Child Orthop.* 2008;2(3):177-185.

Wilkinson JA, Sedwick EM. Occult Spinal Dysraphism in Established Congenital Dislocation of the Hip. *J Bone Joint Surg Br.* 1988;70(5):744-9.

Woo SL, Chan SS, Yamaji T. Biomechanics of knee ligament healing, repair and reconstruction. *J Biomech.* 1997;30(5):431-9.

Woo SL, Debski RE, Zeminski J, Abramowitch SD, Saw SS, Fenwick JA. Injury and repair of ligaments and tendons. *Annu Rev Biomed Eng.* 2000; 2:83-118.

Referências

Youssef AO. Medial approach open reduction with ligamentum teres partial excision and plication for the management of congenital hip dislocation. J Pediatr Orthop B. 2017 Mar 30. [Epub ahead of print]

Zenios M, Sampath J, Cole C, Khan T, Galasko CS. Operative treatment for hip subluxation in spinal muscular atrophy. J Bone Joint Surg Br. 2005;87(11):1541-4.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A – Identificação do coelho, status do quadril, peso inicial, peso final e análise realizada

Coelho	Status	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Análise
1	Luxado	641	1980	Biomecânica
2	Luxado	605	2080	Biomecânica
3	Ruptura	627	1140	0
4	Morte	679		0
5	Morte	599		0
6	Luxado	781	2089	Biomecânica
7	Morte	641		0
8	Luxado	608	1841	Biomecânica
9	Não Luxado (perda fixação)	1000	2120	0
10	Morte	868		0
11	Luxado	775	2230	Biomecânica
12	Ruptura	1000	1824	0
13	Morte	960		0
14	Luxado	910	2114	Biomecânica
15	Morte	780		0
16	Morte	579		0
17	Luxado	624	1698	Histologia
18	Morte	612		0
19	Luxado	766	1818	Histologia
20	Morte	866		0
21	Não Luxado	640	1582	0
22	Luxado	860	1749	Histologia
23	Luxado	738	1819	Histologia
24	Luxado	694	1686	Histologia
25	Luxado	590	1943	Zimografia
26	Luxado	632	1781	Zimografia

27	Luxado	620	1111	Zimografia
28	Não Luxado (perda fixação)	535	1688	0
29	Luxado	639	1509	Zimografia
30	Luxado	532	1875	Zimografia
31	Luxado	589	1602	Zimografia
32	Não Luxado (perda fixação)	540	1480	0
33	Luxado	535	1648	Histologia
34	Luxado	739	1909	Histologia
35	Luxado	890	1710	Histologia
36	Ruptura	701	1790	0
37	Luxado	566	1660	Imunohistoquímica
38	Não Luxado (fratura fêmur)	956	1982	0
39	Luxado	518	1393	Histologia
40	Ruptura	594	1458	0
41	Morte	321		0
42	Luxado	659	1765	Histologia
43	Morte	641		0
44	Não Luxado	573	1727	0
45	Não Luxado	538	1756	0
46	Não Luxado (pioartrite)	463	864	0
47	Luxado	382	1129	Histologia
48	Luxado	549	1462	Histologia
49	Luxado	411	1447	Histologia
50	Luxado	364	1237	Zimografia
51	Luxado	353	1112	Histologia
52	Luxado	346	905	Zimografia
53	Morte	1200		0
54	Morte	1218		0

55	Não Luxado (fratura fêmur)	1249	1224	0
56	Luxado	1159	1609	Biomecânica
57	Não Luxado	1321	1899	0
58	Morte	821		0
59	Não Luxado	973	1261	0
60	Não Luxado (fratura fêmur)	821	1231	0
61	Não Luxado	1176	1166	0
62	Luxado	989	1376	Biomecânica
63	Morte	1069		0
64	Luxado	1183	1841	Biomecânica
65	Morte	986		0
66	Não Luxado	1284	1750	0
67	Não Luxado	1233	1723	0
68	Não Luxado	1143	1620	0
69	Luxado	703	1660	Biomecânica
70	Não Luxado (fratura fêmur)	598	2091	0
71	Não Luxado (perda fixação)	656	1958	0
72	Luxado	613	1880	Imunohistoquímica
73	Não Luxado (perda fixação)	771	2660	0
74	Não Luxado (perda fixação)	719	1999	0
75	Não Luxado (perda	577	2111	0
	fixação)			
76	Não Luxado	604	1984	0
77	Ruptura	552	1908	0
78	Não Luxado (perda fixação)	567	1990	0

Apêndices

79	Não Luxado	472	1430	0
80	Morte	566		0
81	Não Luxado	686	1841	0
82	Não Luxado	589	1511	0
83	Luxado	432	1143	Biomecânica
84	Não Luxado	534	1381	0
85	Morte	518		0
86	Luxado	500	1894	Biomecânica
87	Morte	447		0
88	Não Luxado	397	1240	0

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		 <p>Comissão de Ética no Uso de Animais</p>  <p>Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012</p>
<h1>Certificado</h1>			
<p>CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1012/2013) "Análise biomecânica do ligamento redondo e da redução cruenta associado a reconstrução do ligamento redondo de quadris luxados de coelhos imaturos através de técnica utilizando túnel femoral", a ser conduzido por Alexandre Zuccon, orientado pela Profª Drª Daniele Cristina Catão, Co-orientado pelo Prof. Dr. Hamilton da Rosa Pereira, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "coelhos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>			
<p>Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 25/04/2013</p>			
<p>Profª. Drª. Noeme Sousa da Rocha Vice-Presidente da CEUA</p> 	<p>Alberto Santos Capellupi Secretário da CEUA</p> 		
<p>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP. 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</p>			