

PROPOSTA DE UMA METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE TENDÕES SUÍNOS

Ana Bárbara Krummenauer Formenton, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ana.barbara@ufrgs.br

Carlos Rodrigo de Melo Roesler, Universidade Federal de Santa Catarina, r.roesler@ufsc.br

Arthur Paiva Grimaldi Santos, Universidade Federal de Santa Catarina, arthur.pgsantos@gmail.com

Jakson Manfredini Vassoler, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, jmvassoler@ufrgs.br

Resumo. O conhecimento do comportamento mecânico de tecidos biológicos pode ser importante em diversas aplicações. Esta informação pode ser obtida diretamente de testes experimentais sobre o tecido de interesse ou através de simulações numéricas, que por sua vez também necessitam de dados experimentais. A obtenção de dados úteis para a caracterização de um tecido biológico, tanto frente a carregamentos reais quanto a modelos de material, não é uma tarefa trivial. Inúmeras dificuldades estão associadas com o ensaio, desde etapas de preparação, como na obtenção da amostra, no controle de temperatura e umidade durante o armazenamento, assim como durante o ensaio mecânico, como dificuldades na fixação da amostra e na medição de deformações. Uma vez que na literatura não existe uma metodologia consolidada, o presente trabalho trata de uma proposta de realização de ensaios mecânicos uniaxiais em tendões suínos com velocidade de deformação quase estática, com vistas a obter dados experimentais úteis para a caracterização do tecido.

Palavras chave: Tendões. Testes uniaxiais. Metodologia experimental.

1. INTRODUÇÃO

Tecidos biológicos são compostos por uma coleção de células e de uma matriz extracelular (Junqueira *et al.*, 2004), sendo divididos em quatro grandes grupos: conectivo, epitelial, muscular e nervoso. Tendões pertencem ao grupo do tecido conectivo, possuem a função de unir o músculo ao osso e transmitir forças trativas do músculo ao osso, produzindo assim o movimento articular (Kannus, 2000). Para compreender melhor a sua funcionalidade e contribuição mecânica em sistemas biomecânicos do qual faz parte (sistema motor, em articulações), torna-se necessário conhecer o comportamento mecânico do tendão. A informação de seu comportamento pode ser importante em diversas aplicações, como na melhoria de técnicas reparatórias, que poderiam ser individualizadas para cada paciente, segundo suas necessidades físicas. Além disso, a fabricação de biomateriais, que servem para diversas aplicações biomédicas, pode ser aprimorada com a utilização de modelos mais precisos, como é o caso do biomaterial retratado no trabalho de Caves *et al.* (2011), o qual descreve a fabricação de um compósito flexível de fibra reforçada para reparação de tecido mole. Para o uso de simulações numéricas, dados experimentais úteis para a caracterização do material também são necessários.

O tendão pode ser descrito em vários níveis, da anatomia macroscópica até a organização molecular. Segundo Baer *et al.* (1992) os tendões possuem seis níveis de organização, onde o primeiro nível é a molécula de colágeno e o sexto é o tendão em si, entre esses níveis se encontram as microfibrilas, as fibrilas, as fibras e os fascículos.

A descrição geral da estrutura dos tendões é de que as fibras de colágeno que compõe o tecido são arrançadas em paralelo. Possui uma composição de fibrilas quase alinhadas, que possuem um comprimento que excede muito o pequeno diâmetro que apresentam (Cowin e Doty, 2007). Além disso, a estrutura das fibras em tendões que não estão tensionados, exibe uma ondulação conhecida como “friso” (“crimp”) do colágeno (Wang, 2006, Cowin e Doty, 2007, Franchi *et al.*, 2007, Connizzo *et al.*, 2013).

As propriedades mecânicas dos tendões dependem fortemente das fibras colágenas, mas também do arranjo e da proporção de seus constituintes, particularmente do colágeno e da elastina (Cowin e Doty, 2007).

O comportamento mecânico de um tendão, com uma determinada geometria, pode ser obtido de testes experimentais, que caracterizariam a resposta mecânica do tecido. Os ensaios de tração em tendões geralmente são realizados ao longo do eixo das fibras de colágeno, tratando-se da direção de carregamento predominante *in vivo*, sendo o comportamento resultante não-linear (Cowin e Doty, 2007).

Uma curva típica de tensão-deformação do tecido tendinoso apresenta uma região inicial onde ocorre o alongamento do tecido com pequeno aumento de carga, seguida de uma segunda região, conhecida como região linear, onde as fibras se realinham e a rigidez da amostra aumenta rapidamente (Connizzo *et al.*, 2013).

Os tendões também são considerados anisotrópicos, devido sua estrutura fibrosa orientada unidirecionalmente (Cowin e Doty, 2007). Porém, tal informação pode ter limitada aplicação na previsão do comportamento de outros tendões, mesmo do mesmo indivíduo.

Um importante ponto a ressaltar é que os tendões podem mudar significativamente seu comportamento segundo sua origem, seja esta de diferentes indivíduos e/ou posições. Uma análise da proveniência da amostra poderia, em teoria, ser correlacionada quantitativamente com a sua resposta mecânica, gerando dados úteis para análises de sistemas biológicos e simulações.

Através da literatura é possível encontrar diversos artigos que procuram correlacionar parâmetros do tecido e/ou indivíduo com sua resposta mecânica, mesmo que em termos de tendência de comportamento. Inúmeros parâmetros podem ser considerados relevantes, diretamente ou indiretamente, para com o comportamento mecânico.

Outras dificuldades técnicas ainda estão associadas a sua caracterização experimental. Os ensaios mecânicos de tecidos biológicos podem ser influenciados por muitos fatores, como por exemplo, na padronização do ensaio (homogeneidade das amostras) e no procedimento de obtenção das amostras (uniformidade geométrica), no armazenamento (umidade, temperatura, tempo de degradação), na fixação para ensaio (fenômeno de escorregamento), na medição de deformações (material muito flexível e úmido), entre outros. Para tentar contornar alguns destes problemas, diferentes tipos de garras, métodos de fixação e medição podem ser utilizados. Geralmente os ensaios são realizados *in vitro*, ou seja, tentam simular em laboratório condições que repliquem a condição *in vivo* e o carregamento fisiológico. Estes ensaios podem caracterizar totalmente o tecido através da imposição de condições de contorno específicas. Em vista dos diferentes fatores apresentados, que podem influenciar diretamente na resposta do tecido, um protocolo adequado deve ser seguido.

Assim, este trabalho apresenta um teste piloto e uma proposta de metodologia experimental que seja capaz de obter dados experimentais úteis para a caracterização do tecido. Neste teste será utilizada uma garra específica para tecidos biológicos moles de forma a evitar o escorregamento da amostra. Além disto, visto a dificuldade inerente da medição da área transversal do tecido, um micrômetro óptico é utilizado. Esta proposta já está sendo alinhada para ser utilizada futuramente na caracterização do tendão levando em consideração aspectos individuais do tecido (proveniência/tipo/localização/indivíduo), que faz parte da sequência deste trabalho. Para o teste piloto preliminar, que trata este estudo, pretende-se apenas avaliar se o procedimento experimental proposto está adequado. Assim, um número reduzido de amostras será ensaiado.

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Foram escolhidos tendões extensores suínos para a realização dos testes monotônicos de tração uniaxial. Neste estudo preliminar, foram usados dois tendões. Os tendões foram retirados das patas dianteiras de uma fêmea (linhagem Embrapa MS60) com peso aproximado de 85kg e cerca de 6 meses de idade, o que pode ser observado na Fig. (1). Estes tendões foram escolhidos, pois não apresentavam grandes mudanças ao longo do comprimento. O procedimento experimental adotado foi definido com base em trabalhos encontrados na literatura (Huang *et al.*, 2009, Baker *et al.*, 2004, Dunkman *et al.*, 2013, Karimi *et al.*, 2013, entre outros) e nos equipamentos disponíveis.

Após a realização de alguns testes para a identificação de dificuldades, uma metodologia foi proposta. As patas suínas foram resfriadas e posteriormente congeladas até o dia do ensaio. No dia do ensaio as patas foram descongeladas e os tendões foram retirados, sendo armazenados em sacos plásticos, ficando resfriados até o momento do teste. Instantes antes da realização de cada teste o tendão foi colocado em solução salina em temperatura ambiente ($\approx 24^{\circ}\text{C}$) durante 1 minuto. A extremidade de cada tendão foi presa de forma a facilitar a centralização da amostra no momento da fixação na garra, com linhas guias. Foram utilizadas garras termoeletricas específicas para o tecido mole, as quais congelam as superfícies das extremidades em contato com o mordente, a fim de evitar o escorregamento e de ter erros quanto ao deslocamento aplicado no tecido. O uso deste dispositivo de fixação, e sua avaliação, é uma das melhorias propostas frente as metodologias experimentais utilizadas no grupo de pesquisa. Além disto, visto que neste primeiro estudo se busca ensaiar de forma quase-estática a amostra, foi realizado um pré-condicionamento através de uma pré-carga de 0,5N e posterior sequência de 10 ciclos, com amplitude de 0,5N a 2N. A velocidade de carregamento do ensaio monotônico de tração, posterior ao pré-condicionamento, foi de 1mm/min. A medição inicial do diâmetro de cada amostra foi realizada no momento da pré-carga através de micrômetros ópticos de alta precisão dispostos a aproximadamente 90° . O aparato experimental pode ser observado na Fig. (2).



Figura 1. Pata dissecada.

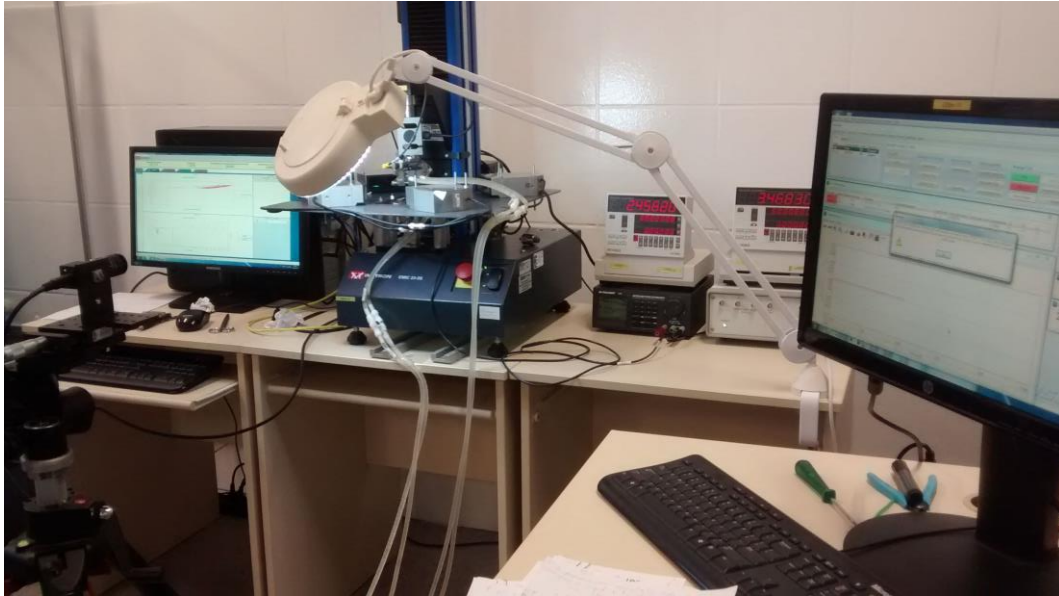


Figura 2. Aparato experimental.

3. RESULTADOS

Seguindo a metodologia apresentada foram obtidos os gráficos tensão-deformação para os tendões extensores. As amostras foram carregadas até o rompimento e/ou escorregamento. Os dados até a ruptura, dos ensaios uniaxiais monotônicos para os tendões extensores, são apresentados na Fig. (3).

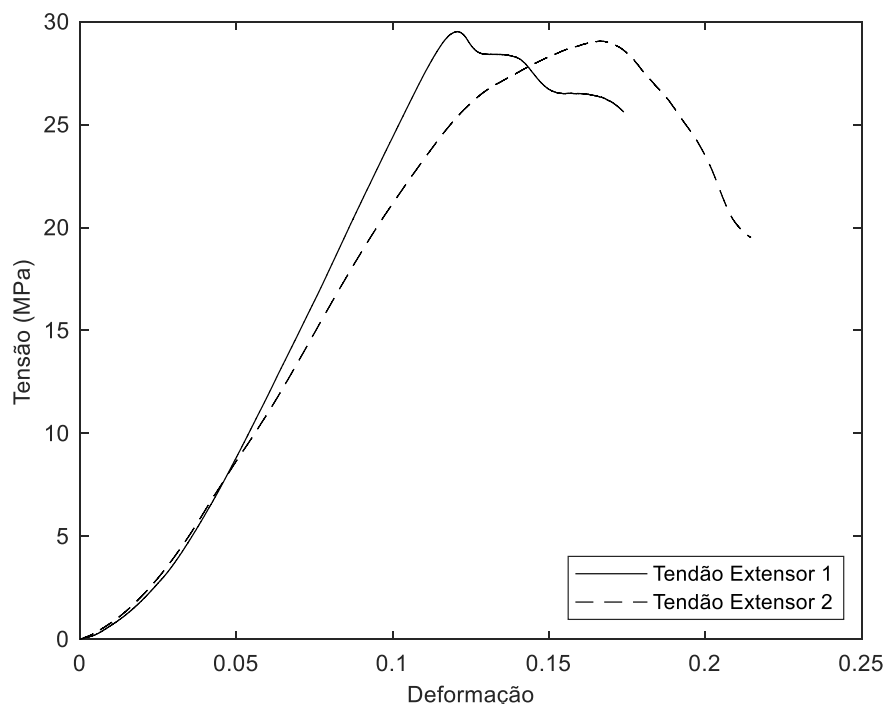


Figura 3. Curvas tensão-deformação obtidas para os tendões extensores.

A tensão apresentada na Fig. (3) está vinculada com o valor do diâmetro inicial dos tendões, os quais foram obtidos através de micrômetros ópticos de alta precisão.

Na Fig. (3) pode-se observar que a resistência entre os tendões é similar, porém a rigidez apresenta diferença significativa.

A rigidez do tecido está associada ao módulo de elasticidade, o qual pode ser extraído da curva tensão-deformação apresentada na Fig. (3). No presente trabalho o módulo de elasticidade foi medido no intervalo de deformação de 0,05 a 0,1, após a característica resposta inicial não linear do tendão, conforme descrito por Haut e Haut (1997). Os valores

obtidos foram de 313 MPa para o tendão extensor 1 e 257 MPa para o tendão extensor 2, correspondendo com os valores encontrados em literatura (Haut e Haut, 1997 e LaCroix *et al.*, 2013).

A resistência do tecido a tração é indicada pelo ponto máximo da curva tensão-deformação (Fig. (3)), nos ensaios realizados foram encontrados os valores de 29,5 MPa para o tendão extensor 1 e 29 MPa para o tendão extensor 2, estes valores ficaram um pouco abaixo do que foi apresentado por alguns estudos (LaCroix *et al.*, 2013).

Normalmente as medidas de interesse no procedimento de identificação de parâmetros são relacionadas com a geometria atual. Como em tecidos biológicos é comum que ainda existam escorregamentos suaves, técnicas de medição óptica geralmente são utilizadas, como é o caso da correlação de imagens digitais (DIC), que pode ser vista em maior detalhe em Pan *et al.* (2009).

4. CONCLUSÕES

Através deste trabalho foi possível avaliar uma proposta de uma metodologia experimental capaz de fornecer a curva nominal de tensão e deformações de tendões. O uso dos acessórios escolhidos, bem como o procedimento de preparo e manutenção das amostras, foi adequado com o escopo do trabalho, permitindo manter a amostra em condições mecânicas favoráveis ao ensaio.

As garras termoeletricas apresentaram um bom desempenho, evitando o escorregamento da amostra durante o ensaio. Entretanto mais testes são necessários para a averiguação do tempo adequado para permanência do tendão em solução salina antes do ensaio, tempo de congelamento das extremidades das amostras, entre outros.

Os micrômetros ópticos de alta precisão mediram de forma adequada o tecido em situação indeformada, uma vez que foi utilizado um método óptico, reduzindo de forma significativa a interferência nas medidas, como nas técnicas de contato tradicionalmente utilizadas.

Observou-se que ainda são necessárias algumas melhorias na metodologia, como a utilização do método do DIC para obtenção de deslocamento diretamente sobre o tecido, a determinação de temperatura das amostras durante o ensaio, a medição do diâmetro das amostras durante os ensaios, entre outras.

Os ensaios uniaxiais monotônicos, forneceram informações importantes para um procedimento de identificação de parâmetros de modelos constitutivos. Para a caracterização do tecido, mais amostras são necessárias de forma a obter respostas com certa segurança estatística.

Apesar do número reduzido de amostras, observou-se que mesmo tendões do mesmo tipo podem ter comportamentos mecânicos diferentes, indicando a possível necessidade de considerar aspectos individuais na caracterização do tendão. Mais amostras são necessárias para esta confirmação.

Como proposta de trabalho futuro pretende-se realizar o estudo em diferentes animais para averiguar a influência da proveniência da amostra. Uma vez que não existe um procedimento consolidado, este trabalho poderá contribuir na definição de procedimentos para futuros testes *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS

- BAER, E.; HILTNER, A.; MORGAN, R. Biological and synthetic hierarchical composites. **Physics Today**, v. 45, p. 60–67, 1992.
- BAKER, A.; ABREU, E.; MASCHA, E.; DERWIN, K. A. Homotypic variation of canine flexor tendons: implications for the design of experimental studies in animal models. **Journal of biomechanics**, v. 37(7), p. 959–968, 2004.
- CAVES, J.M.; CUI, W.; WEN, J.; KUMAR, V.A.; HALLER, C.A.; CHAIKOF, E.L. Elastin-like protein matrix reinforced with collagen microfibers for soft tissue repair. **Biomaterials** v. 32, n. 23, p. 5371–5379, 2011.
- CONNIZZO, B. K.; YANNASCOLI, S. M.; SOSLOWSKY, L. J. Structure–function relationships of postnatal tendon development: a parallel to healing. **Matrix Biology**, v. 32(2), p. 106–116, 2013.
- COWIN, S. C.; DOTY, S. B. Tissue mechanics. Springer Science & Business Media, 2007.
- DUNKMAN, A.A.; BUCKLEY, M.R.; MIENALTOWSKI, M.J.; ADAMS, S.M.; THOMAS, S.J.; SATCHELL, L.; KUMAR, A.; PATHMANATHAN, L.; BEASON, D.P.; IOZZO, R.V.; BIRK, D.E.; SOSLOWSKY, L.J. Decorin expression is important for age-related changes in tendon structure and mechanical properties. **Matrix Biology**, v. 32(1), p. 3–13, 2013.
- FRANCHI, M.; TRIRÈ, A.; QUARANTA, M.; ORSINI, E.; OTTANI, V. Collagen structure of tendon relates to function. **The Scientific World Journal**, v. 7, p. 404–420, 2007.
- HAUT, T. L.; HAUT, R. C. The state of tissue hydration determines the strain-rate-sensitive stiffness of human patellar tendon. **Journal of biomechanics**, v. 30, n. 1, p. 79–81, 1997.
- HUANG, C.-Y.; WANG, V. M.; FLATOW, E. L.; MOW, V. C. Temperature-dependent viscoelastic properties of the human supraspinatus tendon. **Journal of biomechanics**, v. 42(4), p. 546–549, 2009.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P.A.; ZORN, T.M.T.; SANTOS, M.F. d. Histologia básica: texto e atlas, 2004.
- KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 10(6), p. 312–320, 2000.

KARIMI, A.; NAVIDBAKHS, M.; SHOJAEI, A.; FAGHIHI, S. Measurement of the uniaxial mechanical properties of healthy and atherosclerotic human coronary arteries. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33(5), p. 2550–2554, 2013.

LACROIX, A. S.; DUENWALD-KUEHL, S. E.; LAKES, R. S.; VANDERBY, R. Relationship between tendon stiffness and failure: a metaanalysis. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 1, p. 43-51, 2013.

PAN, B.; QIAN, K.; XIE, H.; ASUNDI, A. Two-dimensional digital image correlation for in-plane displacement and strain measurement: a review. **Measurement science and technology**, v. 20(6), p. 062001, 2009.

WANG, J. H.-C. Mechanobiology of tendon. **Journal of biomechanics**, v. 39(9), p. 1563–1582, 2006.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao LEBm, CNPq e CAPES, que forneceram suporte financeiro para a realização deste trabalho.

7. RESPONSABILIDADE PELAS INFORMAÇÕES

Os autores são os únicos responsáveis pelas informações incluídas neste trabalho.