



METODOLOGIA EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PARÂMETROS INDIVIDUAIS DE TENDÕES SUÍNOS

Ana Bárbara Krummenauer Formenton^[0000-0002-9596-0228], Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ana.barbara@ufrgs.br

Carlos Rodrigo de Melo Roesler^[0000-0002-9430-7059], Universidade Federal de Santa Catarina, r.roesler@ufsc.br

Jakson Manfredini Vassoler^[0000-0002-8548-8935], Universidade Federal do Rio Grande do Sul, jmvassoler@ufrgs.br

Resumo. O conhecimento do comportamento mecânico de tecidos tendinosos pode ser importante em diversas aplicações, tanto na simulação de sistemas biomecânicos, bem como na fabricação de biomaterias. O comportamento mecânico de tendões depende das fibras colágenas e do arranjo e da proporção de seus constituintes. Além disto, diferentes tendões podem ter diferentes respostas mecânicas, até mesmo no mesmo indivíduo. Esta última característica incorpora uma dificuldade adicional na caracterização destes materiais, podendo ser feita através de propriedades de seus constituintes e sua organização interna. Assim, o presente trabalho apresenta um estudo exploratório com objetivo de identificar se tendões de diferentes posições do mesmo indivíduo, ou provenientes de diferentes sexos, possuem propriedades similares. Além disto, buscou-se avaliar se parâmetros individuais das amostras possuem relação com parâmetros mecânicos do tecido. Os resultados das análises estatísticas dos parâmetros não mostraram diferenças entre machos e fêmeas, mas apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre tendões extensores e flexores. Por fim, os parâmetros individuais estudados neste trabalho não mostraram correlação estatisticamente significativa com propriedades mecânicas.

Palavras chave: Metodologia experimental. Tendões. Testes uniaxiais. Parâmetros mecânicos. Características individuais.

1. INTRODUÇÃO

A compreensão da funcionalidade e do comportamento mecânico do tecido tendinoso pode gerar impacto em diversas aplicações, como na melhoria de técnicas reparatórias e na fabricação de biomaterias para aplicações biomédicas (Caves *et al.*, 2011). Além disso, simulações numéricas precisam de dados experimentais úteis para aplicações reais. Para compreender o funcionamento do tecido, faz-se necessário conhecer seus constituintes, sua estrutura e seu comportamento mecânico.

A obtenção de dados experimentais do comportamento mecânico de tecidos biológicos é um desafio devido a fatores biológicos e experimentais. Pode-se citar a homogeneidade das amostras, a sensibilidade do tecido quanto a umidade, temperatura e degradação, além da fixação do tecido e as medidas de deformação. Além dessas dificuldades, tecidos biológicos podem mudar significativamente seu comportamento mecânico segundo sua origem, seja esta de diferentes indivíduos ou do mesmo tipo de tecido (classificação) em diferentes posições no mesmo indivíduo (Learoyd e Taylor, 1966, Maher *et al.*, 2012, Herod *et al.*, 2016). Devido a estes fatores não existe procedimento experimental consolidado para ensaios mecânicos, principalmente correlacionando propriedades de seus constituintes e sua organização interna com a resposta mecânica do tecido.

Portanto o objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia experimental que seja capaz de explorar a maioria das dificuldades inerentes do ensaio, principalmente visando identificar se alguns parâmetros individuais das amostras possuem relação com parâmetros mecânicos do tecido. Ademais, pretende-se investigar com esta metodologia a existência, ou não, de diferenças em propriedades entre machos e fêmeas, e de diferentes tipos de tendões do mesmo indivíduo.

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Tendões suínos foram escolhidos para a realização dos testes de tração uniaxial e para investigar o tecido em seus diversos níveis. Os tendões foram determinados com base na facilidade de acesso, devido ao maior comprimento, em virtude de sua pequena variação ao longo do comprimento e por apresentarem funções distintas. Foram então escolhidos os ramos do tendão flexor digital profundo para dedos acessórios e o tendão do músculo extensor do dedo V, apresentados na Fig (1).

As amostras utilizadas foram ensaiadas com no máximo 12 horas após o abate do animal. Para investigar as características individuais do tecido foram utilizadas diferentes técnicas que pudessem quantificar algum constituinte do tecido. Para este estudo foram escolhidos 3 parâmetros individuais das amostras: o peso seco do tecido, a proporção de colágeno tipo I e tipo III e o diâmetro médio das fibrilas.



Figura 1. Tendões utilizados (a) extensor e (b) flexor

O comportamento mecânico foi avaliado através de ensaios de tração uniaxiais. Para realizar essas análises cada amostra foi dividida conforme demonstrado na Fig. (2), sendo os três últimos cortes para a avaliação dos parâmetros individuais das amostras. Os fragmentos do tendão obedeceram a mesma sequência de cortes para as análises, visando utilizar sempre a mesma região para todas as amostras.



Figura 2. Exemplo de corte para cada tendão

Foram utilizados 16 tendões para os ensaios mecânicos e 24 tendões para investigar as características individuais das amostras. O procedimento experimental foi definido com base em trabalhos encontrados na literatura e nos equipamentos disponíveis, tanto para o ensaio mecânico quanto para definir quais características individuais poderiam ser quantificadas.

Primeiramente testes foram realizados para a identificação de dificuldades e posteriormente a metodologia foi proposta e testada. Nas seções seguintes cada procedimento é detalhado.

2.1. Ensaio Mecânico

Os ensaios mecânicos foram realizados *in vitro* e devido a característica de organização interna das fibras, na direção longitudinal, apenas ensaios trativos foram necessários.

Foi utilizada uma célula de carga de 500N e empregou-se uma única taxa de deformação de 0,1%/s. Foi realizado um pré-carga de 0,5N e um pré-condicionamento de 10 ciclos, com amplitude de 0,1N até 10N. A área transversal do tendão foi medida através de uma técnica sem contato, obtendo-se medidas mais precisas e com maior repetibilidade. Foram utilizados micrômetros digitais de alta velocidade e alta precisão LS-7070 da KEYENCE. Os micrômetros ópticos foram adaptados na máquina de tração através de um dispositivo de sustentação. Para tentar contornar o fenômeno de escorregamento das amostras durante o ensaio, foram utilizadas garras termoelétricas para tecidos moles (Thermoelectric Cooled - TEC) da ElectroForce/TA.

2.2. Liofilização

A obtenção do peso seco foi feito por meio da liofilização (Terroni, 2013), processo que constitui na desidratação do tecido sem danificá-lo. Primeiramente o tecido é resfriado a uma temperatura baixa (geralmente -20°C), depois é submetido a uma pressão negativa (vácuo), quando a água do tecido passa diretamente da fase sólida para a fase gasosa sem passar pela fase líquida (sublimação).

O tempo de permanência das amostras no liofilizador é determinado através de testes preliminares, já que o valor de peso seco somente é obtido quando permanece constante ao longo do tempo (Oryan e Shoushtari, 2009). Para isto neste estudo ficou estabelecido então que as amostras ficariam 24hrs dentro do liofilizador. Utilizou-se o liofilizador TERRONI LS 3000D do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Amostras de cada tendão foram pesadas logo após a dissecação e armazenadas a -20°C por aproximadamente 48 horas para então passar pelo processo de liofilização, sendo pesadas novamente ao final das 24 horas, obtendo-se assim um valor de peso seco para cada tendão.

2.3. Microscopia de luz polarizada

A quantificação de colágeno pode ser feita através de diferentes métodos, como por exemplo a imuno-histoquímica e colorações específicas. No presente trabalho optou-se por encontrar a razão entre os principais tipos de colágeno presentes no tendão, ou seja, colágeno tipo I e colágeno tipo III (Cavallo *et al.*, 2014 e Binnebösel *et al.*, 2010).

Para a obtenção da razão entre colágeno tipo I e tipo III utilizou-se a microscopia de luz polarizada juntamente com a coloração picrosirius red. O picrosirius red aumenta a birrefringência do tecido (sob luz polarizada), fornecendo um método simples, específico e sensível para a localização de colágeno (Junqueira *et al.*, 1979), sendo possível distinguir entre os colágenos tipo I e III (Junqueira *et al.*, 1978). As fibras do tipo I são mais espessas e altamente birrefringentes sendo associadas as cores amarelo, laranja e vermelho, já as fibras do tipo III são mais finas e possuem uma birrefringência fraca associada com a cor verde (Junqueira *et al.*, 1978). Assim, a cor exibida através do picrisirius red é resultado da espessura da fibra, bem como do arranjo das moléculas de colágeno (Dayan *et al.*, 1989).

Para calcular a razão de colágeno I:III seguiu-se o método apresentado por Rich e Whittaker (2005), onde a tonalidade (cor) de cada pixel dentro da imagem é separada. Nesse método a imagem é separada em matiz (hue), saturação (saturation) e valor/brilho (value), ou seja, o modelo de cor HSV. Nesta análise foi retirado primeiramente a influência do componente preto através do brilho, pois compromete a posterior quantificação, sendo subtraído o pico de concentração desta cor. O componente da matiz é então separado seguido as seguintes definições: 2-9 e 230-256 correspondem a cor vermelha, 10-38 a cor laranja, 39-51 a cor amarela e 52-128 a cor verde (Rich e Whittaker, 2005). O intervalo 129-229 consiste de espaço intersticial e elementos de tecido não birrefringentes (Rich e Whittaker, 2005). Deve-se notar que os parâmetros aqui obtidos valem para comparações com protocolos que usaram o mesmo procedimento. Caso tenham sido utilizados intervalos diferentes para definir as cores, os valores podem levar a tendências diferentes.

2.4. Microscopia eletrônica de varredura

O diâmetro da fibrila pode ser obtido através da microscopia eletrônica. As amostras dos tendões foram então coletadas e processadas. O recobrimento metálico utilizado foi o ouro. As amostras foram então examinadas com magnificação de 20000X utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6701F, operando em 5kV, do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Para cada amostra de tendão foram obtidas no mínimo 5 imagens através do MEV, correspondendo a 5 localizações diferentes de cada amostra. O diâmetro das fibrilas foi medido através do software livre ImageJ 1.52h, onde no mínimo 70 fibrilas diferentes tiveram seus diâmetros medidos, sendo que cada diâmetro foi medido em 5 localizações diferentes ao longo da mesma fibrila. Esse procedimento foi baseado no artigo de Herod *et al.* (2016).

2.5. Análise estatística

Após a obtenção de dados experimentais, faz-se necessário analisá-los através de métodos estatísticos. No presente trabalho foi analisada a influência do sexo e do tipo de tendão, assim como a relação entre parâmetros individuais e a resposta mecânica do tecido. Para verificar se existem diferenças estatisticamente significantes entre tendões de machos e de fêmeas e entre extensores e flexores utilizou-se o teste *t*. A relação entre parâmetros individuais e parâmetros mecânicos foi obtida através do coeficiente de correlação de Pearson.

3. RESULTADOS

3.1. Ensaios mecânicos

Através da metodologia apresentada foram obtidos gráficos tensão-deformação para os tendões. As amostras foram carregadas até o rompimento.

Através das curvas pôde-se extrair parâmetros mecânicos, obtendo-se para cada tendão o alongamento último (mm), o módulo tangente (MPa), o módulo tangente verdadeiro (MPa), a tensão última (MPa) e a tensão última verdadeira (MPa). O módulo tangente, associado a rigidez do tendão, corresponde a inclinação da curva tensão-deformação e foi obtido na região central da curva, que representa a região linear. O módulo tangente verdadeiro somente se diferencia do módulo tangente pois é obtido através da área atualizada, a qual foi estimada através dos micrômetros ópticos.

Na Tabela (1) é possível visualizar a média e o desvio padrão para cada um dos parâmetros separando-se por sexo e por tipo de tendão.



Tabela 1. Parâmetros mecânicos divididos entre machos e fêmeas e por tipo de tendão.

Parâmetro	Machos (n = 5)	Fêmeas (n = 11)	Tendão extensor (n = 7)	Tendão flexor (n = 9)
Alongamento	1,13 ± 0,014	1,13 ± 0,033	1,14 ± 0,027	1,13 ± 0,03
Tensão última (Mpa)	40,36 ± 14,2	45,23 ± 17,39	34,4 ± 7,32	50,94 ± 17,73
Tensão última verdadeira (Mpa)	47,99 ± 13,88	49,65 ± 18,35	43,02 ± 12,13	53,89 ± 18,71
Módulo tangente (MPa)	402,35 ± 145,1	418,53 ± 107,62	306,62 ± 53	496,58 ± 72,37
Módulo tangente verdadeiro (MPa)	504,04 ± 138,6	481,63 ± 134,45	385,2 ± 88,16	569,09 ± 99,72

Através do teste *t* pôde-se verificar que os parâmetros mecânicos não possuem diferença estatisticamente significativa entre machos e fêmeas, apesar de algumas médias possuírem diferenças perceptíveis como no módulo tangente verdadeiro e na tensão última.

Para o caso dos tipos de tendões o teste *t* verificou uma diferença estatisticamente significativa entre as médias do módulo tangente ($p < 0,001$), do módulo tangente verdadeiro ($p = 0,002$) e da tensão última ($p = 0,037$), ou seja, para esses parâmetros existe influência do tipo de tendão, considerando um valor de significância de $p < 0,05$.

3.2. Parâmetros individuais

Cada uma das técnicas experimentais resultou em um conjunto de dados. A Tabela (2) apresenta o número de amostras (n), a média, o desvio padrão (DP), o valor máximo e o valor mínimo para cada parâmetro.

Tabela 2. Resultados obtidos para os parâmetros individuais.

Parâmetro	n	Média ± DP	Valor Mínimo	Valor Máximo
% de peso seco	24	32,06 ± 2,68	27,75	36,82
Diâmetro fibrila (nm)	24	104,65 ± 10,3	84,5	135,42
Proporção I/III	24	2,02 ± 0,26	1,65	2,46

Assim como realizado para os parâmetros mecânicos, os parâmetros individuais também foram avaliados quanto ao sexo do animal e ao tipo de tendão, verificando se a diferença entre eles é estatisticamente significativa. Na Tabela (3) as médias para machos e fêmeas e para tendões extensores e flexores de cada parâmetro pode ser visualizada.

Tabela 3. Parâmetros individuais divididos entre machos e fêmeas e por tipo de tendão.

Parâmetro	Machos (n = 11)	Fêmeas (n = 12)	Tendão extensor (n = 11)	Tendão flexor (n = 12)
% de peso seco	31,95 ± 2,55	32,16 ± 2,91	32,83 ± 2,82	31,33 ± 2,29
Diâmetro fibrila (nm)	103,79 ± 5,67	105,44 ± 13,46	100,66 ± 7,56	108,44 ± 11,06
Proporção I/III	2,08 ± 0,27	1,96 ± 0,24	2 ± 0,29	2,02 ± 0,24

Através do teste *t* pôde-se verificar se as médias dos grupos são estatisticamente diferentes. Verificou-se que nenhum dos parâmetros individuais é significativamente influenciado pelo sexo do animal, assim como não é significativamente influenciado pelo tipo de tendão. Entretanto, o diâmetro da fibrila apresenta valores muito próximos da significância ($p = 0,057$), quando avaliado em relação ao tipo de tendão, considerando um valor de significância de $p < 0,05$.

3.3. Correlação entre reposta mecânica e parâmetros individuais

As correlações foram realizadas entre as quinze amostras que obtiveram valores para todos os ensaios (tanto mecânicos quanto individuais), sendo que cada um dos parâmetros mecânicos foi avaliado para cada um dos parâmetros individuais. Além disso, foi possível avaliar também a relação entre os parâmetros individuais.

Os parâmetros individuais estudados não apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$) com os parâmetros mecânicos. Assim como, não foram encontradas correlações significativas ($p < 0,05$) entre os parâmetros individuais.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou uma metodologia experimental capaz de avaliar se tendões de diferentes posições do mesmo indivíduo, ou provenientes de diferentes sexos, possuem diferentes resposta mecânicas, por meio de parâmetros



mecânicos, ou se possuem diferentes características de seus constituintes e sua organização interna, por meio de parâmetros individuais das amostras.

Através das análises não foi possível observar a diferença entre machos e fêmeas, o que pode estar vinculado ao fato de todos possuírem a mesma idade (aproximadamente seis meses). Tratando-se do mesmo tecido, mas de diferentes localizações pode-se observar diferenças estatisticamente significantes entre tendões flexores e extensores para o módulo tangente, para o módulo tangente verdadeiro e para a tensão última, o que pode ser associado a localização distinta desses tendões. Este resultado demonstra que um mesmo indivíduo pode ter tendões com respostas mecânicas diferentes.

Através do estudo de correlação entre resposta mecânica e propriedades dos constituintes e sua organização, não foram observadas relações estatisticamente significantes.

Para dar continuidade nesta linha de pesquisas alguns pontos identificados neste trabalho poderiam ser explorados em trabalhos futuros. Cita-se o uso de diferentes técnicas para obtenção de parâmetros individuais e a utilização de diferentes animais.

5. REFERÊNCIAS

- BINNEBÖSEL, M., KLINK, C., OTTO, J., CONZE, J., JANSEN, P. L., ANUROV, M., SCHUMPELICK, V., e JUNGE, K. Impact of mesh positioning on foreign body reaction and collagenous ingrowth in a rabbit model of open incisional hernia repair, **Hernia**, vol. 14(1), p. 71–77, 2010.
- CAVALLO, J. A., ROMA, A. A., JASIELEC, M. S., OUSLEY, J., CREAMER, J., PICHERT, M. D., BAALMAN, S., FRISSELLA, M. M., MATTHEWS, B. D., e DEEKEN, C. R. Remodeling characteristics and collagen distribution in synthetic mesh materials explanted from human subjects after abdominal wall reconstruction: an analysis of remodeling characteristics by patient risk factors and surgical site classifications, **Surgical endoscopy**, vol. 28(6), p. 1852–1865, 2014.
- 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.
- DAYAN, D., HISS, Y., HIRSHBERG, A., BUBIS, J., e WOLMAN, M. Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, vol. 93(1), p. 27–29, 1989.
- HEROD, T. W., CHAMBERS, N. C., e VERES, S. P. Collagen fibrils in functionally distinct tendons have differing structural responses to tendon rupture and fatigue loading, **Acta biomaterialia**, vol. 42, p. 296–307, 2016.
- JUNQUEIRA, L., BIGNOLAS, G., e BRENTANI, R. A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen, **Analytical biochemistry**, vol. 94(1), p. 96–99, 1979.
- JUNQUEIRA, L., COSSERMELLI, W., e BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy, **Archivum histologicum japonicum**, vol. 41(3), p. 267–274, 1978.
- LEAROYD, B. M. e TAYLOR, M. G. Alterations with age in the viscoelastic properties of human arterial walls, **Circulation research**, vol. 18(3), p. 278–292, 1966.
- MAHER, E., EARLY, M., CREANE, A., LALLY, C., e KELLY, D. J. Site specific inelasticity of arterial tissue, **Journal of biomechanics**, vol. 45(8), p. 1393–1399, 2012.
- ORYAN, A. e SHOUSHARI, A. Biomechanical properties and dry weight content of the developing superficial digital flexor tendon in rabbit, **Comparative Clinical Pathology**, vol. 18(2), p. 131–137, 2009.
- RICH, L. e WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution, **Braz J Morphol Sci**, vol. 22(2), p. 97–104, 2005.
- TERRONI, H. C., D. J. J. M. A. L. T. V. L. V. S. R. F. D.-B. P. d. C. Liofilização, **Revista Científica UNILAGO**, vol. 1(1), p. 271–284, 2013.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq, Finep 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.