José Carlos Garcia Júnior

**Aspectos cicatriciais do reparo das porções
gastrocnêmias do tendão calcâneo envelopados
com poli ácido láctico-trimetileno carbonato em
coelhos**

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

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientadora: Prof. Dra. Edna Frasson de Souza Montero

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Garcia Júnior, José Carlos

Aspectos cicatriciais do reparo das porções
gastrocnêmias do tendão calcâneo envelopados com
poli ácido láctico-trimetileno carbonato em coelhos
/ José Carlos Garcia Júnior. -- São Paulo, 2017.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientadora: Edna Frasson de Souza Montero.

Descritores: 1.Tendão calcâneo 2.Tendões
3.Ruptura 4.Glicosaminoglicanos 5.Colágeno
6.Colágeno tipo I 7.Coelhos

USP/FM/DBD-443/17

Dedicatória

Dedico essa tese à minha esposa e amor, Jesely Pereira Myrrha Garcia, que tem me dado o suporte necessário todos os momentos de minha vida e que com grande compreensão e carinho sempre me ajudou e animou a continuar seguindo em frente.

À minha mãe, Marlene Marques Esteves, que com seu amor, amparo nos momentos importantes, ensinamentos desde a infância e carinho proporcionou as condições para que tudo isso fosse possível.

Aos meus sogros, Washington Luiz Myrrha e Ângela Maria Pereira Myrrha, que também contribuíram de forma decisiva auxiliando a mim e à minha esposa e sendo também nosso porto seguro.

Ao Nildo e à Lika que sempre estiveram ao meu lado durante a elaboração dessa tese.

Ao meu querido irmão, José Ricardo Esteves Garcia, amigo com o qual posso contar nos momentos difíceis.

Agradecimentos

À Profa. Dra Edna Frasson de Souza Montero, minha orientadora, uma professora que é exemplo para seus alunos tanto por sua capacidade técnica e dedicação quanto como ser humano. Um exemplo que não apenas informa mas forma seus alunos para serem pessoas melhores. Pessoas como ela levam-me acreditar no futuro da humanidade.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Massazo Uttiyama, Professor Titular da Disciplina de Clínica Cirúrgica e do Trauma pela, FMUSP, pela oportunidade de me acolher nessa casa.

À Profa. Dra. Eliana de Rezende Duek, que com sua paciência, simplicidade, simpatia e dedicação me ajudou a melhor compreender a área dos biomateriais.

À Profa. Dra. Helena Bonciani Nader, Professora Titular da Biologia Molecular da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, que abriu seu laboratório para os estudos de biologia molecular.

Ao Dr. Renan Pelluzzi Cavaleiro, que contribuiu de forma decisiva para que a parte de biologia molecular dessa tese fosse realizada.

Aos membros do LIM-62, Mário Matsuo Itinoshe, Ana Maria Cattani Heimbecker, Elisabeth Hiroe Minami, Luci Yukiko Takasaka e Marco de Luna pelo apoio incondicional e suporte.

“Entre as pequenas coisas que não fazemos e as grandes que não podemos fazer, o perigo está em não tentarmos nenhuma”.

Confúcio

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”.

Isaac Newton

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Resumo.....	XI
Abstract.....	XIII
Introdução.....	01
Objetivo.....	05
Materiais e Métodos.....	06
1. Preparo da Membrana.....	06
2. Dinamometria digital da Membrana.....	06
3. Ética.....	07
4. Animais.....	07
Figura 1. Distribuição dos animais nos grupos	08
5. Anestesia.....	09
6. Procedimentos Operatórios.....	09
Figura 2. Preparo.....	09
Figura 3. Via e exposição dos tendões.....	10
Figura 4. Sutura Tendínea.....	11
Figura 5. Aspecto Final Tendão Envelopado.....	11
7. Imobilização.....	12
Figura 6. Animal com gesso circular.....	12
Figura 7. Órtese plástica.....	13
Figura 8. Órtese posicionada.....	13
Figura 9. Coelho com órtese.....	14
8. Coleta das Amostras.....	14
Figura 10. Esquema de Diérese do Tendão.....	15
9. Eutanásia e Descarte dos animais.....	15

10.	Testes Biológicos de efetividade da membrana.....	16
11.	Avaliação Macroscópica.....	16
12.	Análise Histológica.....	16
13.	Classificação da cicatriz.....	17
	Tabela 1. Classificação de Watkins Modificada.....	18
14.	Avaliação Digital das Lâminas.....	18
15.	Mensuração quantitativa dos glicosaminoglicanos.....	19
16.	Mensuração da expressão gênica dos proteoglicanos.....	21
17.	Análise Estatística.....	24
	Resultados	26
1.	Ensaio Biomecânico.....	26
	Figura 11. Curvas de deformação das membranas.....	26
	Figura 12. Histograma do módulo elástico.....	27
	Figura 13. Histograma da deformação máxima.....	28
2.	Avaliação Macroscópica.....	29
	07 Dias.....	29
	14 Dias.....	29
	Figura 14. Histogramas de aderência e continuidade.....	30
	28 Dias.....	30
	Figura 15. Histogramas de aderência e continuidade.....	31
	Figura 16: Aparência do tendão.....	31
3.	Histologia.....	32
	07 Dias.....	32
	14 Dias.....	32
	Figura 17: Classificação de Watkins modificada.....	33

28 Dias.....	33
Figura 18: Classificação de Watkins modificada.....	34
Parâmetros Isolados.....	34
Picrosirius Red: avaliação objetiva.....	36
07 Dias	36
14 Dias Cor Verde.....	36
Figura 19: Picrosirius Red Microscopia verde 14 dias....	36
Figura 20: Picrosirius Red dados cor verde 14 dias.....	37
28 Dias Cor Verde.....	37
Figura 21: Picrosirius Red microscopia verde 28 dias....	38
14 Dias Cor Vermelha.....	38
Figura 22: Picrosirius Red microscopia vermelho 14d....	39
Figura 23: Picrosirius Red dados vermelho 14d.....	39
28 Dias Cor Vermelha.....	39
Figura 24: Picrosirius Red microscopia vermelho 28d....	40
Figura 25: Picrosirius Red dados vermelho 28d.....	40
Figura 26: Picrosirius Red microscopia tendão normal..	41
Figura 27: Picrosirius Red dados comparação todos.....	41
4.Mensuração quantitativa dos glicosaminoglicanos.....	41
Condroitin-Sulfato.....	42
Tabela 2: Resultados 7 dias.....	43
Figura 28: Curvas comparativas 7 dias.....	43
Tabela 3: Resultados 14 dias.....	43
Figura 29: Curvas comparativas 14 dias.....	43
Dermatan-Sulfato.....	44

Tabela 4: Resultados 7 dias.....	44
Figura 30: Curvas comparativas 7 dias.....	44
Tabela 5: Resultados 14 dias.....	45
Figura 31: Curvas comparativas 14 dias.....	45
5.Mensuração da expressão gênica dos proteoglicanos.....	45
Figura 32: Expressão gênica de proteoglicanos.....	46
Discussão	47
Conclusão	55
Referências	56

Garcia Júnior JC. *Aspectos cicatriciais do reparo das porções gastrocnêmias do tendão calcâneo envelopados com poli ácido láctico-trimetileno carbonato em coelhos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Resumo

Este estudo avaliou a efetividade de uma nova membrana bioabsorvível com propriedades mecânicas e químicas mais adequadas para o uso em tendões. A avaliação foi realizada em coelhos submetidos a reconstrução da porção gastrocnêmia do tendão calcâneo. Foi feita uma avaliação prévia das propriedades mecânicas da membrana com uso de dinamômetro digital que demonstrou capacidade de deformação elástica mínima de 100%. Todos os coelhos foram submetidos a tenotomia e reparo da porção gastrocnêmia do tendão direito, após isso foram randomicamente separados em grupos envelopado com membrana e controle. A extração foi realizada nos seguintes períodos: sete, 14 e 28 dias.

A avaliação foi realizada através da macroscopia, histologia, mensuração objetiva do colágeno à luz polarizada pelo image-J®, mensuração de glicosaminoglicanos sulfatados e expressão gênica de proteoglicanos.

Na avaliação macroscópica o grupo com membrana apresentou menos aderência e melhor direcionamento das fibras e tecido mais homogêneo em 14 e 28 dias, $p=0,02$ e $0,03$ respectivamente. Na histologia a Classificação de Watkins modificada apresentou as seguintes médias: $14,67\pm0,42$ membrana e $12,67\pm0,56$ sem membrana, $p=0,03$ em 14 dias, e $19,88\pm0,83$ membrana e $17,25\pm0,62$ sem membrana, $p=0,02$ em 28 dias. Na mensuração do colágeno as médias dos valores de cinza(mvc) o colágeno tipo III foram de $17,97\pm1,83$ membrana e $12,63\pm1,07$ sem membrana $p=0,03$ em 14 dias. Para o

colágeno tipo I as médias foram de $2,41 \pm 0,33$ mvc membrana e $1,31 \pm 0,18$ mvc sem membrana $p=0,01$ em 14 dias e $7,30 \pm 0,63$ mvc membrana e $2,92 \pm 0,32$ mvc sem membrana $p<0,0001$ em 28 dias. A média dos GAGs foi avaliada em três porções do tendão, proximal, central e distal, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido seco. Em sete dias apresentou diferença significativa apenas na porção distal $0,80 \pm 0,04$ com e $0,38 \pm 0,04$ sem membrana para condroitin-sulfato em 14 dias não apresentou diferenças entre os grupos. O dermatan-sulfato apresentou diferença estatisticamente significante em 7 dias apenas na porção central $0,42 \pm 0,09$ com membrana e $1,29 \pm 0,67$ sem membrana $p=0,02$. Em 14 dias não foram observadas diferenças entre os grupos. Houve grande variabilidade na expressão gênica no teste das amostras com β -Actina e GAPDH levando a resultados inconclusivos ou não variação entre os grupos que pode sugerir não variabilidade na expressão gênica dos GAGs no período de 28 dias. Os dados fornecidos por esse trabalho mostram que a envelopagem com a membrana bioabsorvível promoveu aceleração dos processos cicatriciais da porção gastrocnêmia do tendão calcâneo de coelhos.

Descritores: tendão calcâneo, tendões, ruptura, glicosaminoglicanos, colágeno, colágeno tipo I, coelhos.

Garcia Júnior JC. *Healing patterns related to the reconstruction of the gastrocnemius part of the Achilles tendon wrapped by a poly lactic acid trimethylene carbonate membrane on rabbits*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Abstract

This study assessed the effectiveness of a new absorbable membrane, that presents mechanical and chemical features more suitable to tendons, in rabbit tendons. Before the animal model assessments a mechanical study of the membrane was carried out demonstrating that the minimal capability for elastic deformation of the membrane was more than 100%. All rabbits underwent to tenotomy and reconstruction of the right gastrocnemius tendons, thereafter they were randomly divided in tendon wrapped by the membrane and control groups. Extraction was performed in the following periods of time: seven, 14 and 28 days.

Assessments used macroscopy, histology, objective collagen assessment by using polarized light and Image-J® program in mean of gray values(mgv), sulphated glycosaminoglycans, genetic expression of proteoglycans.

In the macroscopic 14 and 21-day assessments the membrane group presented less adherences $p=0.02$ and $p=0.03$ respectively. The modified Watkins classification: $14,67\pm0,42$ membrane and $12,67\pm0,56$ without membrane $p=0,03$ for 14 days; $19,88\pm0,83$ membrane and $17,25\pm0,62$ without membrane $p=0,02$ for 28 days. The type III collagen were $17,97\pm1,83$ membrane and $12,63\pm1,07$ without membrane $p=0,029$ for 14 days. For type I collagen were $2,41\pm0,33$ membrane and $1,31\pm0,18$ without membrane $p=0,01$ for 14 days and $7,30\pm0,63$ membrane and $2,92\pm0,32$ without membrane $p<0,0001$ for 28 days. The glycosaminoglycans were measured in 3 tendon

portions, distal, central and proximal, by using $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry tissue. In seven days just the distal part presented statistical differences $0,80\pm0,04$ membrane and $0,38\pm0,04$ without membrane, for 14 days no differences were found for Chondroitin-Sulphate. For Dermatan-Sulphate the central part of the tendon $0,42\pm0,09$ and $1,29\pm0,67$ $p=0,02$, for 14 days no differences were found. There was high variability for β -actin and GAPDH for the samples in 28 days with inconclusive results that may mean no variability in gene expression of GAGs at this time period. Results as mentioned above demonstrated that the wrapped tendons by the new membrane presented acceleration in the healing processes for gastrocnemius tendons of New Zealand Rabbits.

Descriptors: achilles tendon, tendons, ruptures, glycosaminoglycans, collagen, collagen type I, rabbits.

Introdução

No tendão intacto há baixa celularidade e vascularização, sendo sua maior parte composta pela matriz extracelular e por colágeno tipo I. Essas características fazem dos tendões, tecidos resistentes, mas com limitada capacidade de regeneração (Enwemeka, 1989). Os tenoblastos, antes de diferenciarem-se em tenócitos, são responsáveis pela produção dos constituintes da matriz extra celular do tendão. Os tenócitos são células tendíneas esparsas que representam cerca de 3% do peso dos tendões (Junqueira & Carneiro, 2004). São também células quiescentes, que só retomam a sua atividade em situações nas quais ocorrem lesão tendínea (Hayem, 2001).

A arquitetura tecidual do tendão é organizada, possibilitando alta resistência à tração principalmente associada ao colágeno tipo I (O'Brien, 1997). Esse tipo de colágeno é o mais resistente às forças de tração, sendo também o mais abundante no tecido do tendão. Suas pontes dissulfeto ajudam a garantir a estabilização e a organização entre as fibras proteicas. A combinação das propriedades de resistência, associada principalmente ao colágeno, e o módulo elástico do tendão, associado principalmente à elastina, são harmoniosamente combinados a fim de garantir o menor índice de lesão tendínea. O colágeno representa cerca de 80% do peso seco do tendão, enquanto a elastina representa 1 a 2% desse peso (Kannus, 2000). Essa combinação embebida em água e proteoglicanos faz com que parte da energia cinética a que o tendão é submetido seja absorvida em concordância com o módulo elástico fornecido pela elastina, dessa forma absorve-se energia amortizando variações de tração que poderiam potencialmente causar uma lesão maior às fibras colágenas. Os proteoglicanos da matriz celular apresentam papel fundamental na regulação da produção de colágeno tipo I e na reparação tecidual.

Os proteoglicanos mais abundantes da matriz extracelular são Decorin, Biglican,

Fibromodulina, Lumican, Agrecan e Versican(Yoon & Halper, 2005). Dentre os glicosaminoglicanos, o Dermatan Sulfato (Towbridge & Gallo, 2002), Queratan Sulfato, Condroitin Sulfato e Hialuronan (Yoon & Halper, 2005) são os mais ligados aos processos cicatriciais e às fibroses nos tendões.

Com a lesão os tendões tendem a retrair em sentidos opostos à lesão, o que muitas vezes impossibilita uma cicatrização isenta de interferência externa. A lesão do tendão, ou mesmo após qualquer manipulação cruenta de uma lesão prévia, promove uma série de alterações bioquímicas que irão mediar os processos inflamatórios e reparativos criando condições para que a cicatrização tendínea ocorra. Essa cascata inflamatória faz com que o processo cicatricial seja iniciado com a liberação de citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos e moléculas bioativas que levarão a uma resposta celular (Abate et al, 2009)(Shal & Clever, 1994). A modulação celular dos processos reparativos e de remodelação, iniciados pela cascata bioquímica, estará também diretamente ligada às diferentes expressões de proteoglicanos e, conseqüentemente, à maior presença de glicosaminoglicanos - GAGs (Yoon & Halper, 2005).

A reparação tendínea ocorre em fases que se sobrepõem, começando com a inflamação, imediatamente após a lesão até cerca de sete dias. Na fase proliferativa ou fibroblástica, começa a produção de moléculas de colágeno. Inicialmente, as fibras são desordenadas e há predomínio de colágeno tipo III, sete a 14 dias (Yokoya et al, 2008). A remodelação, fase que se segue, caracteriza-se, principalmente, pelo realinhamento do colágeno, tipo I, ao longo da linha de força do tecido (Beredjiklian, 2003).

A arquitetura resultante de cada um desses dois tipos de colágeno é distinta, enquanto o colágeno tipo III apresenta um padrão aleatório de organização tecidual, o colágeno tipo I tem um padrão organizado e linear. É esperado que ocorra também um

aumento da concentração dos proteoglicanos e, conseqüentemente, de seus GAGs, responsáveis pela modulação celular em uma fase precoce da cicatrização. A qualidade do reparo tendíneo dependerá, portanto, diretamente da modulação da resposta celular na produção e organização do colágeno, assim como dos outros componentes do tendão. Com o tempo as ligações cruzadas e o paralelismo tecidual levarão a uma melhora biomecânica da resistência à tração no tendão reconstruído (Carvalho & Imamura, 2003).

Esse processo todo tem como chave os mediadores celulares advindos da cascata inflamatória, e, em um momento subsequente, também uma reação adaptativa do tendão às forças de tração e mobilização de acordo com a lei de Davis, análoga de tecidos moles à Lei de Wolff no tecido ósseo (Davis, 1867).

O tratamento clássico de lesões tendíneas em geral é a tenorrafia com fios inabsorvíveis. Entretanto, o processo de cicatrização completo é lento e pode incapacitar o paciente durante grande parte desse processo. Uma aceleração no processo cicatricial poderia promover um retorno precoce às atividades. Neste sentido, a literatura tem mostrado que a envelopagem dos tendões com biomembranas acarreta uma aceleração dos processos reparativos com maior produção de colágeno tipo I e maior organização tecidual em modelos animais (Zhao et al, 2015) e humanos (Demirkian et al 2002)(Leppänen et al, 2016). Essa melhora dos processos reparativos tem sido associada ao menor número de aderências que o tendão reparado apresentou, promovendo melhores condições para que a tração exercida sobre o tecido apresente uma direção mais homogênea, com linhas de força mais paralelas orientando uma cicatrização mais efetiva (Zhao et al, 2013).

Algumas biomembranas já se encontram no mercado, como o *GraftJacket*® (Wright-Memphis-EUA), uma membrana com base em colágeno da derme humana

decelularizada. Entretanto, devido à complexidade da legislação brasileira referente a tecidos com origem humana, há dificuldade de importação. Membranas sintéticas bioabsorvíveis podem ter maior facilidade de aceitação e de comercialização no Brasil, além de poderem ser mais finas que as biomembranas. No exterior, existe disponível a *OrthoWrap®*, que consiste em um polímero bioabsorvível feito de poli ácido láctico (Mastbiosurgery-San Diego-EUA).

A maioria das membranas usadas no mercado, como a acima citada, tem o copolímero Poli (L-co-D,L ácido láctico), de sigla PLDLA, na proporção 70:30 (Badia, 2007). Essa combinação polimérica viabiliza um material de vasto uso clínico na área médica por possuir boas propriedades mecânicas e excelente biocompatibilidade (Duek et al, 2014).

Com o intuito de acelerar o processo cicatricial tendíneo e torná-lo de melhor qualidade, vislumbrando promover o retorno precoce de futuros pacientes às suas atividades rotineiras, decidiu-se avaliar uma membrana contendo segmentos de 1,3 trimetileno carbonato, TMC, um policarbonato alifático elastomérico, ao longo da cadeia do copolímero PLDLA, que resulta em um material mais visco-elástico, portanto, sujeito a maiores deformidades. Essa propriedade pode tornar o novo material mais biocompatível (Duek et al, 2014) e, no caso do tendão, o módulo de deformidade diminuído age favoravelmente com maior compatibilidade mecânica e possíveis consequências biológicas melhorando sua ação para o tecido alvo (Buchholz, 1993). Para este estudo, empregou-se modelo experimental de lesão tendínea em coelhos.

Objetivo:

Verificar a ação do envelopamento tendíneo com o novo polímero bioabsorvível (PLDLA-co-TMC de alta massa molecular) na cicatrização pós-cirúrgica das porções gastrocnêmias dos tendões calcâneos de coelhos.

Materiais e Métodos:

Preparo da membrana:

A membrana polimérica de PLDLA-TMC 70/30 foi preparada pelo método de “casting”, processo que depende da secagem por evaporação do solvente. A primeira etapa foi adicionar esse polímero em clorofórmio (a relação utilizada massa do polímero (m) e volume de clorofórmio (v) utilizado foi de 5% m/v), agitou-se até a completa solubilização do mesmo e em seguida verteu-se essa solução em uma placa de vidro. Essa placa foi colocada dentro de uma caixa de vidro, a qual continha uma atmosfera saturada de clorofórmio e deixada por 48h para secar. Após esse tempo as amostras foram ensaiadas mecanicamente e usadas em cirurgia. As utilizadas em cirurgia foram esterilizadas em óxido de etileno.

Dinamometria digital da membrana:

Para verificar a propriedade elástica da membrana, foi realizado o teste de dinamometria digital de tração com as membranas presas às pás de tração padrões do dinamômetro digital Instron-DX (Instron-High Wycombe-Reino Unido). Primeiramente, as amostras foram cortadas e apresentaram as seguintes dimensões: 3 cm de comprimento e 2 cm de largura. O ensaio foi realizado com 5 amostras para garantir a confiabilidade do teste. Nesse ensaio foi utilizada uma velocidade de estiramento de 1,5 mm/min e a amostra foi tracionada até o seu completo rompimento.

Ética:

O projeto foi desenvolvido de acordo com aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP protocolo CEP 421/13 Registro online 11252.

Todos os princípios internacionais (Festing & Wilkinson, 2007) e nacionais, lei 11.794/2008 (Silva et al, 2008), sobre experimentação animal foram observados em todo o estudo.

Animais:

Foram utilizados inicialmente utilizados 49 coelhos albinos, Nova Zelândia, machos, com idade entre três e quatro meses, com peso em torno de 2000g, procedentes do Centro de Bioterismo da FMUSP de acordo com padrões internacionais de escolha de animais (ICH, 2009). Os coelhos tiveram dieta adequada para a espécie e estiveram sob ciclo circadiano apropriado.

Para estabelecer os padrões de normalidade, nove coelhos foram submetidos ao procedimento cirúrgico de extração de tendão intacto (grupo referência) a fim de utilizar os seus tendões íntegros. De acordo com o período para eutanásia: 7 dias, 14 dias e 28 dias, cada período representando uma das fases da cicatrização, 36 animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de seis coelhos cada; sendo em cada período, um grupo sem membrana e um grupo com a membrana. No período de 28 dias, foram acrescentados quatro outros coelhos em concordância com as avaliações estatísticas interinas no modelo estatístico de análise adaptativa. O modelo estatístico de análise adaptativa (Chow & Chang, 2008) permite inclusão de novos animais a serem analisados em se dependendo dos resultados interinos do estudo. Com isso há

otimização de dados evitando uso desnecessário de animais (Royal Statistical Society (2007)(Animal Legal and Historical Center, 2013) e também perda de dados.

A distribuição dos animais está exemplificada na Figura 1, a seguir.

Figura 1: Distribuição dos animais nos respectivos grupos

Os coelhos foram randomizados, pelo aplicativo de randomização denominado Randomization Lite® (The Apps Factory, 2011) para iphone®, para receber ou não o envelopamento.

Todos coelhos dos seis grupos foram submetidos a procedimentos cirúrgicos dos tendões gastrocnêmios direito com sutura término-terminal como explicado a seguir no procedimento operatório.

Em três grupos foi realizada sutura tipo Kessler (1973) modificada associada à inserção de uma membrana de PLDLA-TMC.

Nos outros três grupos foi realizada apenas sutura tipo Kessler (1973) modificada sem inserção da membrana.

Anestesia:

Os animais foram submetidos à anestesia geral por via intramuscular com cloridrato de ketamina (30 mg/kg de peso) associado a cloridrato de xilazina (5 mg/kg de peso).

Antes da cirurgia, os animais permaneceram em jejum por 12 horas.

Foi usado o como analgesia pós-cirúrgica o cloridrato de tramadol 1mg/Kg de 12 em 12 horas IM por 4 dias.

A doxicilina foi usada como antibiótico profilático no pós-cirúrgico por 7 dias em 100mg/litro de água deixado no bebedouro.

Procedimentos operatórios:

Após anestesia com o protocolo supracitado, foi realizada tricotomia das patas traseiras direitas dos coelhos, os mesmos foram posicionados em mesa cirúrgica veterinária padrão apropriada, em decúbito ventral horizontal. A anti-sepsia foi feita com solução de clorexidina alcoólica aplicada com gazes estéreis (Figura. 2).

Figura 2. Fotografia da pata direita do coelho, preparada para o ato operatório.

Foram usados, campos cirúrgicos, luvas cirúrgicas estéreis e materiais cirúrgicos esterilizados em autoclave a 180°C por 2 horas.

O acesso foi feito através de uma incisão posterior longitudinal sobre os tendões gastrocnêmios, seguida de dissecação cuidadosa e hemostasia com bisturi elétrico. Das três porções do tendão calcâneo, foi realizada tenotomia no plano transversal apenas nas porções advindas dos gastrocnêmios medial e lateral (Figura 3).

Figura 3: Fotografia para mostrar a via de acesso e a exposição dos tendões.

A tenorrafia foi realizada utilizando-se pela técnica de Kessler (1973) modificada, com uso de fio Fiberwire® (Arthrex-Naples-EUA) número 2 (Figura 4).

Todos coelhos foram submetidos a lesão completa dos tendões gastrocnêmios direito, que foram suturados com pontos tipo Kessler (1973) modificado. Nos grupos com membrana após a sutura acrescentou-se a aplicação da membrana de PLDLA-TMC ao

redor de toda a área da tenorrafia, envelopando-a completamente, sem estrangulamento. Esta membrana foi fixada com quatro pontos simples com fio de nylon 4-0, sendo 2 pontos em cada extremidade (Figura 5).

Figura 4: Fotografia para mostrar a sutura tendínea.

Figura 5: Aspecto final do tendão suturado e envelopado.

Ao final do procedimento, em todos animais, a pele foi suturada com pontos simples, utilizando-se fio de nylon 4.0. Os animais foram encaminhados às gaiolas individuais, sem compartilhamento com outros animais, onde foram mantidos até o momento da eutanásia, 7 dias, 14 dias ou 28 dias, quando foi realizada a extração da peça para estudo.

Imobilização:

Para a imobilização, em três coelhos utilizou-se gesso circular por 2 semanas em equino, visando a proteção da primeira fase do processo cicatricial e inicial dos coelhos com diminuição do sofrimento animal analgesia (Severo et al, 2012) (Figura 6). Entretanto, observou-se que o animal roía o gesso e o removia. Esses animais foram excluídos do estudo.

Figura 6: Animal com gesso circular na pata.

Discutido com o veterinário responsável pelo biotério, optamos por tentar utilizar uma órtese plástica (Figura 6) com posicionamento do gesso mais fisiológico, com certo

grau de flexão, com isso o animal ficou em uma posição mais confortável e ao mesmo tempo com proteção do tendão (Figuras 7, 8 e 9). Essa órtese foi adaptada com uso de faixa crepe, o que lhe conferia a vantagem de poder ser trocada quantas vezes fosse necessário.

Figura 7: Órtese plástica.

Figura 8: Órtese Posicionada.

Figura 9: Coelho com Órtese.

Coleta das Amostras:

Para a obtenção das amostras, foi repetido o protocolo anestésico e o procedimento operatório realizado respeitando os princípios de esterilidade, já descritos. O acesso foi feito através de uma incisão posterior longitudinal sobre o tendão calcâneo, seguida de dissecação cuidadosa. Os tendões foram seccionados 1,0 cm proximal e 1,0 cm distal ao local da sutura. Os tendões foram examinados cuidadosamente realizando-se a avaliação macroscópica dos reparos obtidos, foram retirados todos os pontos de sutura cuidadosamente, para não traumatizar o tecido e divididos imediatamente em duas partes no plano longitudinal (Figura 10).

Figura 10: Esquema de Diérese do Tendão.

Metade do tendão cortado no plano longitudinal foi colocada em solução de Formol 10% para fixação por um período de 24 horas, em recipiente de vidro, individualmente identificados, para processamento e posterior análise histológica.

A outra metade do tendão foi colocada em recipiente de plástico, individualmente identificado e colocado no nitrogênio líquido e armazenado por 28 dias para extração de GAGs para os grupos 7 e 14 dias e PCR (Polimerase Chain Reaction) para os grupos de 28 dias.

Eutanásia e Descarte dos Animais:

Os coelhos foram submetidos à eutanásia farmacológica com injeção intracardíaca de 5mL cloreto de potássio a 19,1% logo após o procedimento cirúrgico.

Esse procedimento de eutanásia foi feito, sob anestesia. Após a eutanásia dos animais, houve o descarte dos mesmos, conforme o protocolo recomendado pelo Centro de Bioterismo da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo.

Testes Biológicos de efetividade da membrana

Para testar a hipótese do estudo foram realizadas as seguintes análises dos tendões de coelhos: avaliação macroscópica de aderências; histologia; quantificação de GAGs com eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria; e amplificação gênica em cadeia por tempo real.

Avaliação macroscópica:

A análise macroscópica foi realizada de forma subjetiva usando três parâmetros:

- Reparação – diz respeito à cicatrização propriamente dita do defeito, será caracterizada como presente ou ausente.
- Continuidade – organizada ou desorganizada.
- Aderência- avaliação durante a retirada do tendão será caracterizada como ausente, mínima, média, moderada e alta sendo uma medida categórica.

Esses parâmetros forneceram dados categóricos ordinais comparativos de origem subjetiva(Duek et al 2014). Há impossibilidade de se obter esses dados de forma cega pois a presença de sinais do uso ou não da membrana bioabsorvível são evidentes.

Análise Histológica:

Após o processamento, com fixação, desidratação, emblocamento, secção de 4 micra e montagem nas lâminas, as peças foram coradas da seguinte forma:

#Eosina-hematoxilina para avaliação de características celulares básicas e vascularização

#Picrosirius red para a caracterização do colágeno total na microscopia óptica convencional e com luz polarizada para caracterização quanto ao tipo de colágeno, I ou III.

#Tricrômio de Masson que é um composto formado por três corantes básicos que coram de verde a queratina e as fibras musculares, azul ou verde o colágeno e tecidos ósseos, vermelho citoplasma e núcleo celular.

Classificação da cicatriz:

Foi utilizada a classificação de maturação de cicatriz de Watkins et al(1985) modificada por Yokoya et al, (2008) , excluindo-se dado histológico de continuidade, por ser esse parâmetro relacionado a aderência tendão-osso, e a imunohistoquímica foi substituída pela análise com microscópio de luz polarizada (Tabela. 1 na página seguinte).

Essa classificação atribui pontuação de 1 a 4 para 7 variáveis, totalizando entre 7 e 28 pontos. Esse dado é considerado métrico, ou numérico, e discreto. As subdivisões da classificação foram avaliadas como dado numérico e discreto.

- a) Celularidade: 1:acentuada, 2:moderada, 3:média e 4:mínima.
- b) Fibrócitos/tenócitos: 1:25%, 2:25-50%, 3:50-75% e 4:>75%.
- c) Vascularização: 1 :>15 vasos por campo, 2:11-15 vasos por campo, 3:6-10 vasos por campo e 4: <6 vasos por campo.
- d) Proporção de fibras de diâmetro largo: 1:<25%, 2:25-50%, 3:50-75% e 4:>75%.
- e) Paralelismo celular: 1:<25%, 2:25-50%, 3:50-75% e 4:>75%.
- f) Paralelismo de fibras: 1:<25%, 2:25-50%, 3:50-75% e 4:>75%.
- g)Quantidade de colágeno Tipo I: 1:<25%, 2:25-50%, 3:50-75% e 4:>75%.

	1	2	3	4
Cellularidade	Marcada	Moderada	Média	Mínima
Fibrócitos	25%	25-50%	50-75%	>75%
Vascularização	15 v/C	11-15 v/C	6-10 v/C	<6 v/C
Fib. Diam. Largo	25%	25-50%	50-75%	>75%
Paral. celular	25%	25-50%	50-75%	>75%
Paral. Fibras	25%	25-50%	50-75%	>75%
Luz Polarizada	I(-) III(++)	I(+) III(++)	I(+) III(+)	I(++) III(+)

Tabela 1: Classificação de Watkins Modificada

As subdivisões da classificação também foram avaliadas como dados numérico, e discreto.

Avaliação digital das lâminas

Esse é o dado primário do trabalho para 14 e 28 dias.

O programa Image-J® (National Institutes of Health, USA) foi usado para avaliação de pixels baseado no sistema de decodificação de cores do programa, a fim de estabelecer parâmetros objetivos de quantificação para os diversos tipos de colágeno nos tempos 14 e 28 dias, visto o tecido de 7 dias ser impossível de realizar tais mensurações devido à consistência do tecido extraído e à ausência de colágeno cicatricial viável.

O colágeno tipo I tem aparência laranja com variações para avermelhado à luz polarizada enquanto o colágeno tipo III é verde. Todas as avaliações do Image-J® usam as médias dos valores de cinza (mvc) nas diferentes decodificações de cores (azul, verde e vermelho). A mvc é a soma dos valores de cinza dividido pelo número de pixels. Para o Colágeno tipo I a cor vermelha é utilizada na decodificação de cores

para cinza no Image-J® como parâmetro. Para o Colágeno tipo III a cor verde é utilizada na decodificação de cores para cinza no Image-J® como parâmetro. Foram usados cinco campos diferentes, todos da porção central do tecido cicatricial a fim de se evitarem vieses de seleção. Os aumentos de 400x em fotos de 1443520 (1388 x 1040) pixels foram utilizados para todas as análises do colágeno pelo Image-J®. Cada um dos campos fotografados foi avaliado como amostra independente com finalidades estatísticas.

Como a intensidade de luz influencia os resultados, foi realizada otimização para luz vermelha com iluminação em 4 pontos de Led verde no Microscópio Zeiss® Imager Axio A2 e 10 pontos de Led verde no Microscópio Zeiss® Imager Axio A2 para cor verde. Com essa otimização as cores ficaram mais evidentes possibilitando sua melhor mensuração.

Mensuração quantitativa dos glicosaminoglicanos em 7 e 14 dias com espectrometria:

Essa avaliação deve ocorrer no início dos processos reparativos, até cerca de 14 dias, portanto apenas amostras de 7 e 14 dias foram utilizadas nessa avaliação, para estabelecer o padrão de normalidade, o grupo de 9 coelhos com tendão intacto foi também usada (Grupo Referência).

As amostras do tendão foram divididas em áreas proximal, média e distal. A porção média do tendão é a porção de foco nas avaliações por ser a secção onde a sutura e, conseqüentemente, os processos reparativos se encontram. As peças foram inicialmente picotadas na acetona e maceradas. Peptídeos e fragmentos de ácidos nucleicos foram removidos por precipitação no ácido tricloroacético (ATA) a 4°C. Após a centrifugação de 10 minutos a 3500G a 4°C, o sobrenadante contendo GAGs foi

retirado e precipitado pela adição de dois volumes de metanol por 18 horas a 4°C. O precipitado foi separado e coletado por centrifugação de 10 minutos a 3500G a 4°C, após sua separação, foi seco e suspenso em 40 mL de água destilada. Após isso, foi possível iniciar a análise de GAGs sulfatados. A extração de GAGs por esse método apresenta efetividade de 95%(Dietrich & Dietrich, 1976).

Os GAGs sulfatados foram identificados e quantificados pela eletroforese no gel de agarose em buffer de 0,05M de 1,3-acetato de diaminopropano em pH de 9,0. Cada amostra forneceu 5mL da solução de GAGs descrita acima para eletroforese por 1 hora a 100V. Os GAGs foram precipitados no gel com 0,1% de cetil-trimetilamonio-bromídeo por 2 horas a temperatura ambiente. O gel foi seco e colorido com solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético, etanol e água (0,1:5:4,9, vol/vol). A quantificação foi realizada através da densitometria a 530nm do slide corado por azul de toluidina. Os coeficientes da extinção de GAGs foram calculados usando padrões de condroitin-sulfato e dermatan-sulfato. Identificação dos GAGs sulfatados foi baseada na migração dos componentes comparados com os padrões. A identidade dos GAGs foi comprovada pelo tratamento com enzimas específicas. A eletroforese foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos peso por peso de tendão μmg^{-1} .

Mensuração da expressão gênica dos proteoglicanos em cadeia por tempo real, 28 dias:

Foi realizada avaliação gênica a fim de se detectar atividade residual de produção de proteoglicanos de forma diferente entre grupos membrana e sem membrana mesmo em longo prazo, visto ser em estágios iniciais como 7 e 14 dias, seu aumento de produção óbvio e mensurável por métodos diretos como o previamente descrito. Em períodos tardios, espera-se que se houver diferença a mesma possa apenas ser observada no nível da atividade gênica, sem diferenças estatisticamente significantes por outros métodos.

O preparo do material de análise inicia-se com o rompimento da matriz e das células por maceração ou trituração. Para realizá-la um prévio fatiamento do tendão foi realizado em um Eppendorf com uso de tesouras de Iris em solução de Trizol®(Thermo-Fischer-Waltham-USA). Após isso a cada ml de Trizol adicionou-se 0,2ml de clorofórmio, os Eppendorfs foram tapados de forma segura, essas amostras foram então deixadas em -80°C por um período de 1 semana. Os pedaços de tecido em solução foram então triturados com uso de homogeneizador de amostra (Polytron-Santo André-Brasil) e retornaram a -80°C por mais 2 dias.

O RNA total foi extraído das células utilizando o reagente Trizol®, seguindo o seguinte protocolo: A solução mencionada foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 20°C. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em 3 partes: no fundo do tubo uma fase avermelhada (fenol + clorofórmio), uma interfase, e uma fase aquosa superior (onde está contido o RNA). A fase aquosa consiste em aproximadamente 60% do volume de Trizol® utilizado no início da homogeneização.

A parte aquosa, sobrenadante, foi então transferida para um novo eppendorf. Após isso, precipitou-se o RNA contido no eppendorf misturando álcool isopropílico

em uma concentração de 0,5mL para cada 1mL de Trizol® usado. As amostras ficaram incubadas por 10 minutos a 20°C. Após isso, foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 20°C. O RNA precipitou-se formando um “pellet” em forma similar a um gel no fundo e nas paredes do eppendorf. O sobrenadante mais líquido foi então removido. O “pellet” foi lavado apenas uma vez com etanol 75°, usando no mínimo 1mL para cada mL do Trizol® utilizado. Essa amostra foi misturada com auxílio de um Vórtex, após isso foi novamente centrifugada a 7.500 x g por 5 minutos a 20°C. Na sequência o “pellet” foi seco rapidamente a vácuo por 5 a 10 minutos, tomando o cuidado de não o deixar secar por completo.

O RNA foi então dissolvido em água sem RNase, passou-se a solução através ponteira algumas vezes. A solução foi incubada por 10 minutos a 60°C. Um tubo estéril foi colocado no gelo livre de nucleases com os seguintes reagentes na seguinte ordem: 1µg de RNA, 1µL de primers oligo(dT)18, completou-se o volume até 12µL usando água miliQ estéril. A solução foi incubada a 65°C por 5min e resfriada no gelo dado um ‘spin’. Após isso foram adicionados os reagentes na seguinte ordem: 4µL 5X Reaction Buffer, 1µL Ribolock RNase Inhibitor, 2µL de 10mM DNTP Mix e 1µL Revert-Aid Reverse Transcriptase. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 32°C. Inativou-se a Transcriptase aquecendo a solução 70°C por 5 minutos. As amostras foram guardadas em um freezer a -80°C.

Para a obtenção do cDNA, 4 µg de RNA total de cada célula foi utilizado no primeiro passo da reação, juntamente com 0,5 µg do primer oligo dT, e água livre de RNase qsp 5 µL. A reação consistiu em 1 ciclo de 70°C por 5 minutos e 4°C por 5 minutos. Em seguida, para a reação de transcrição reversa (produção de cDNA) utilizou-se 0,5 µL da enzima transcriptase reverse (Kit ImpromII, Promega), 4µL de tampão de reação (5x), 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPmix (10 mM) e 0,5

μL de RNAsin (inibidor de RNase), que foram adicionados ao produto da reação anterior. Água livre de RNase também foi adicionada para um volume final igual a 20 μL. A reação consistiu em 1 ciclo de 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos (extensão) e 70°C por 15 minutos (inativação da transcriptase reversa). Os cDNAs obtidos foram submetidos às reações de PCR em tempo real usando o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram analisadas as expressões de diferentes genes alvo e genes controle endógenos: β-actina e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). As reações foram realizadas utilizando-se o kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), e os resultados analisados com auxílio do programa do próprio equipamento.

Ligou-se fluxo e UV. Limpou-se o fluxo e micropipetas com álcool e foram aguardados 30 minutos. As ponteiros e os Eppendorfs devem ser sempre estéreis nessa fase e as luvas sem talco. Enquanto o tempo do UV foi aguardado, ligou-se o computador que foi utilizado pelo equipamento de PCR, montou-se a placa no software, abriu-se o protocolo padrão de termociclagem, explicado abaixo, ligou-se o equipamento de PCR e aguardou-se até que o mesmo fosse reconhecido pelo computador.

Após isso foi realizada diluição das amostras de cDNA para curva padrão (teste de eficiência dos primers). Isso foi realizado retirando-se 3 μl da concentração inicial e adicionando-se 27 μl de água MilliQ para fazer a amostra diluída 10 vezes, em tubo de 200 μl.

Diluição dos primers: no estoque a 100 μM: Sempre se dilui o equivalente à quantidade em nmol x 10, em microlitros de água MilliQ.

Prepara-se então o Master Mix para PCR, como segue:

Para se calcular a quantidade de poços a serem utilizados: $n = (\text{amostras} \times \text{diluições} \times$

réplicas) + controle negativo + 1 (segurança para viés de pipetagem). Pipeta-se 18 µl do Master Mix por poço, e depois se acrescenta 2 µl de cada amostra. Sela-se a placa e centrifuga-se rapidamente. Coloca-se então a placa no equipamento de PCR e inicia-se o protocolo de termociclagem (Mackay et al, 2002).

Primers de β -Actina e GAPDH são de praxe usados como controles endógenos para padronização das amostras. Essa padronização serve para se poder corrigir eventuais distorções do gene de interesse quando feito primer específico para esse gene. Ocorre que se as amostras de um mesmo grupo em PCR-RT mostram curvas discrepantes, há possibilidade de contaminação ou mesmo falha do método, aumentando em muito o intervalo de confiança e diminuindo a possibilidade de haver diferença estatística entre as amostras por avaliação métrica discreta.

Tanto primers para o gene endógeno como para o gene de interesse são desenhados com uso do Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research-Cambridge-EUA). A medição então é realizada pelo computador acoplado a máquina da PCR.

Análise estatística:

Um modelo estatístico de análise adaptativa que aperfeiçoou o número de animais foi utilizado, permitindo variações nas amostras de acordo com resultados preliminares obtidos (Chow & Chang, 2008).

A avaliação dos grupos e a análise estatística foram cegas, excetuando-se a avaliação macroscópica (ICH, 1998).

O processo estatístico respeitou a natureza das variáveis (Bland & Altman, 1994) para dados métricos e categóricos (Pocock, 1983), estabelecendo-se nível de significância com $p \geq 0,05$ em curva bicaudal, fornecendo-se o valor de p no estudo (Nicholls, 2000).

A normalidade das curvas foi testada pelo método de D'Agostino & Pearson, quando

considerado normal, foi avaliado também pelo teste de Shapiro-Wilk e se encontrada divergência o gráfico Q-Q foi utilizado para a determinação da normalidade.

Em análises de dados categóricos foram usados os testes de Qui quadrado e Qui quadrado para tendências.

Quanto ao cálculo do tamanho da amostra não há nenhuma padronização prévia de medição de glicosaminoglicanos ou porcentagem de colágeno objetiva em estudos passados, portanto utilizou-se um número arbitrário de seis coelhos por grupo afim de realizar análise interina durante o experimento e a partir desse padrão interino avaliar o número de amostras de cada grupo. O software utilizado para os cálculos estatísticos foi o STATA 15 for Mac (STATACorp-Tx-EUA) e Wizard 1.9.1 (University of California-CA-EUA). As médias dos dados são apresentados nesse estudo seguidas de seu erro padrão. Em alguns gráficos o erro padrão é multiplicado pelo fator k, que tem valores dependentes dos graus de liberdade da amostra.

O tamanho da amostra foi então instituído baseando-se nessas análises interinas dentro do modelo adaptativo. Considerando-se um alpha de 0,05 com poder estatístico de 90% e utilizando-se os dados dos seguimentos primários dentro de um efeito de pelo menos 1,00mvc para 14 dias e 1,50mvc para 28 dias o tamanho da amostra foi estabelecido para cada período.

O período de 28 dias necessitou assim de mais 2 animais por grupo, enquanto os outros períodos não necessitaram mudanças.

Resultados:

Ensaio Biomecânico

O resultado do ensaio mecânico de tração mostrou o comportamento visco-elástico da membrana polimérica e, além disso, é possível notar a não uniformidade entre as amostras, uma vez que as curvas acabam tendo uma diferença entre elas. Entretanto, o comportamento visco-elástico é mantido para todas as amostras.

Houve diferença em relação às membranas sem adição de TMC.

A Figura 11 ilustra as curvas do ensaio mecânico de tração. É possível observar através desse teste o comportamento mecânico do PLDLA-TMC 70/30 quando esforçado mecanicamente.

Figura 11: Curvas de deformação das membranas.
Dados em MegaPascal (MPa) no eixo das ordenadas.
Dados em porcentagem de deformação no eixo das abscissas

Analisando o comportamento apresentado pelas amostras é possível notar, novamente, a não homogeneidade da estrutura da amostra, pois há uma variação nos valores do módulo elástico. Em relação aos valores obtidos de módulo elástico nas amostras estes são coerentes, pois o PLDLA apresenta valores em torno de 2800 MPa, ou seja, a incorporação de um material elastomérico (TMC) na estrutura do PLDLA, reduziu o valor do módulo elástico do copolímero final obtido (PLDLA-TMC) para valores inferiores a 400MPa (Figura 12).

Figura 12: Módulos elásticos em MegaPascal(MPa).

No gráfico da página seguinte (Figura 13) é possível analisar a deformação do material durante o ensaio mecânico de tração. É possível observar que as amostras de PLDLA-TMC (70/30), quando ensaiadas mecanicamente, se deformaram mais de 200% antes de atingirem seus pontos de fadiga e romperem. Isso mostra o comportamento visco-

elástico desse copolímero. Além disso, observa-se, também, que as amostras apresentam um comportamento não homogêneo, uma vez que a deformação máxima das amostras variou de 200 a 400%. Esse resultado corrobora com o observado na figura 12 da página anterior. Observa-se, também, que as amostras apresentam um comportamento não homogêneo, uma vez que a deformação máxima das amostras varia de 200 a 400%.

Figura 13: Deformação máxima até ponto de ruptura, em porcentagem

É possível observar na figura acima a Tensão na Força Máxima (MPa) das amostras, nesse caso ela coincide com a Tensão de ruptura. Assim como nas Figuras anteriores é possível observar uma diferença entre as amostras de PLDLA-TMC (70/30).

Avaliação Macroscópica:

7 dias

Em sete dias não foi possível avaliação dos critérios macroscópicos pois a região alvo do estudo apresentava-se com consistência gelatinosa/líquida em ambos os grupos. Sendo que no grupo com membrana a região envelopada estava mais liquefeita que a mesma região do grupo controle.

14 dias

A avaliação macroscópica de 14 dias (Figura 14) mostrou diferença estatisticamente significativa nas aderências entre os grupos membrana e sem membrana favorável ao grupo membrana pelo método de Qui quadrado de contingência para tendências em um nível de $p=0,02$.

Para continuidade o teste de Qui quadrado apresentou $p=0.04$, com diferença estatisticamente significativa.

O reparo estava presente em todos tendões analisados.

Figura 14: Histogramas 14 dias
A:Aderências B:Continuidade

28 Dias

A avaliação macroscópica de 28 dias (Figura 15) mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos membrana e sem membrana favorável ao grupo membrana pelo método de Qui quadrado de contingência para tendências em um nível de $p=0,03$ para aderências. Para continuidade o teste de Qui quadrado apresentou $p=0,13$, com melhores dados para o grupo membrana mas sem significância estatística.

O reparo estava presente em todos tendões analisados.

A figura 16 na página a seguir exemplifica uma aderência alta e uma aderência mínima.

Figura 15: Histogramas de 28 dias
A: Aderências B: Continuidade

Figura 16: Aparência do tendão no momento da extração
A: aparência desorganizada, sem membrana, e com aderências de alto grau
B: aparência organizada, com membrana, e aderências mínimas

Histologia:

Critérios de Watkins et al(1985) modificada por Yokoya et al, (2008) adaptada.

7 dias

Em sete dias não foi possível avaliação dos critérios microscópicos pois a região alvo do estudo apresentava-se gelatinosa/liquefeita em ambos os grupos apenas com infiltrado inflamatório e proliferação de proteoglicanos típicos do período.

14 Dias

A avaliação pelos critérios de Watkins et al (1985) modificada mostrou média de $14,67 \pm 0,42$ (mediana 14) para o grupo membrana e $12,67 \pm 0,56$ (mediana 14) para o grupo sem membrana.

Ambas curvas da classificação geral de Watkins modificada não passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. O teste Mann-Whitney demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com $p=0,03$ (Figura 17).

Figura 17: Classificação de Watkins Modificada 14 dias.

28 Dias

A avaliação pelos critérios de Watkins et al (1985) modificada mostrou média de $19,88 \pm 0,83$ para o grupo membrana e $17,25 \pm 0,62$ para o grupo sem membrana.

Ambas curvas da classificação geral de Watkins modificada passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk. O teste F demonstrou equivalência entre as variâncias com $F=0,74$ $p=0,71$, o teste t demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com $p=0,03$ (Figura 18).

Figura 18: Classificação de Watkins Modificada 28 dias.

Parâmetros isolados da classificação modificada de Watkins:

Fibras de diâmetro largo e vascularização não apresentaram variação entre os grupos membrana e sem membrana tanto em 14 quanto em 28 dias.

Em 14 dias o paralelismo celular, paralelismo de fibras e colágeno tipo I apresentaram todos valores de $p > 0,999$ pelo teste de Mann-Whitney, demonstrando equivalência entre as amostras membrana e sem membrana.

Em 28 dias o paralelismo celular apresentou média $2,87 \pm 0,23$ para o grupo membrana e $2,37 \pm 0,32$ para o grupo sem membrana.

Ambas curvas do paralelismo celular passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson mas o paralelismo celular no grupo membrana não passou pelo teste de Shapiro-Wilk confirmado pelo gráfico Q-Q. O teste de Mann-Whitney demonstrou resultado favorável ao grupo membrana sem alcançar a significância estatística com $p = 0,23$.

Em 28 dias o paralelismo de fibras apresentou média $2,75 \pm 0,25$ para o grupo membrana e $1,87 \pm 0,23$ para o grupo sem membrana.

Ambas curvas do paralelismo de fibras passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, mas não pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de Mann-Whitney demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com $p=0,03$.

Em 28 dias porcentagem de colágeno tipo I apresentou média $2,62 \pm 0,26$ para o grupo membrana e $1,62 \pm 0,26$ para o grupo sem membrana.

Ambas curvas da porcentagem de colágeno tipo I passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson mas não passaram no teste de Shapiro-Wilk confirmado pelo gráfico Q-Q. O teste de Mann-Whitney demonstrou diferença estatisticamente significativa favorável ao grupo membrana com significância estatística, $p=0,02$ (Figura 20).

Em 14 dias a celularidade apresentou média de $4,00 \pm 0,00$ (mediana 4) para o grupo membrana e $3,50 \pm 0,22$ (mediana 3,5) para o grupo sem membrana com $p=0,18$ sem significância estatística pelo teste de Mann-Whitney.

Todas as curvas não apresentaram padrões de normalidade no teste de D'Agostino & Pearson.

Em 28 dias a celularidade apresentou média $2,62 \pm 0,18$ (mediana 3) para o grupo membrana e $2,37 \pm 0,18$ (mediana 2) para o grupo sem membrana.

Ambas curvas passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, entretanto não passaram no Shapiro-Wilk nem no gráfico q-q.

O teste de Mann-Whitney não demonstrou diferença estatisticamente significativa com $p=0,62$.

Para Fibrócito/Tenócitos em 14 dias não houve diferença alguma entre os grupos.

Para Fibrócito/Tenócitos em 28 dias a curva do grupo sem membrana não passou no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. O grupo membrana apresentou média de $3,25 \pm 0,16$ e o controle $3,50 \pm 0,19$. O teste de Mann-Whitney teve $p=0,61$, sem significância estatística.

Picrossírius Red, Avaliação objetiva.

7 dias

Em sete dias não foi possível avaliação dos critérios microscópicos pois a região alvo do estudo apresentava-se gelatinosa/liquefeita em ambos os grupos apenas com infiltrado inflamatório e proliferação de proteoglicanos típicos do período.

Otimização para a cor verde (Colágeno tipo III).

14 dias

A quantificação de pixels apresentou média de $17,97 \pm 1,83$ mvc para o grupo membrana e $12,626 \pm 1,07$ mvc para o grupo sem membrana (Figura 19).

Figura 19: Microscopia coloração de Picrossírius red à luz polarizada Otimização para cor verde, 14 dias
Esquerda: Membrana Direita: Sem Membrana

A curva do grupo sem membrana passou nos testes de normalidade enquanto a curva do

grupo membrana não passou no teste de D'Agostino & Pearson.

De acordo com o método de Mann-Whitney há diferença estatisticamente significativa com $p=0,03$ entre membrana e sem membrana para os pixels verdes (Figura 20).

Entretanto como esse método usa maior luminosidade e alguns pixels vermelhos podem estourar a imagem sendo computados como pixels brancos, que na separação de cores também acabam por entrar entre os verdes, pode haver enviesamento dos dados a favor de grupos com mais pixels vermelhos.

Figura 20: Picrosirius red, em mcv, da otimização para cor verde, 14 dias

28 dias

O exame para cor verde com 28 dias não se demonstrou factível, visto esse método usar maior luminosidade. O grande aumento dos pixels vermelhos tende a estourar a imagem sendo com isso computados como pixels brancos, na separação de cores os pixels brancos também acabam por entrar entre os verdes, havendo assim obvio enviesamento dos dados nesse tempo a favor de grupos com mais pixels vermelhos.

Imagens a seguir podem exemplificam esse achado (Figura 21).

Figura 21: Microscopia coloração de Picrossírius red à luz polarizada Otimização para cor verde, 28 dias
Esquerda: Membrana Direita: Sem Membrana

Otimização para cor vermelha (Colágeno tipo I).

14 dias

A quantificação apresentou média de $2,41 \pm 0,33$ mvc (mediana 2,14) para o grupo membrana e $1,31 \pm 0,18$ mvc (mediana 1,03) para o grupo sem membrana (Figura 27).

As curvas dos grupos membrana e sem membrana não passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson.

De acordo com o método de Mann-Whitney há diferença estatisticamente significativa com $p=0,01$ entre membrana e sem membrana para os pixels vermelhos (Figuras 22 e 23).

Figura 22: Picrosirius red, microscopia, otimização cor vermelha, 14 dias
Esquerda: Membrana Direita: Sem Membrana

Figura 23: Picrosirius red, em mcv, otimização para a cor vermelha, 14 dias

28 dias

A quantificação de pixels apresentou média de $7,30 \pm 0,63$ mvc para o grupo membrana e $2,92 \pm 0,32$ mvc para o grupo controle (Figuras 24 e 25).

As curvas dos grupos membrana e sem membrana passaram no teste de normalidade de D'Agostino & Pearson mas não passaram pelo teste de Shapiro-Wilk.

Figura 24: Picrosirius red, microscopia, otimização cor vermelha, 14 dias.
Esquerda: Membrana Direita: Sem Membrana

Pelo método de Mann-Whitney há diferença estatisticamente significativa com $p < 0,0001$ entre membrana e sem membrana favorável para os pixels vermelhos (Figura 25).

Figura 25: Picrosirius Red, dados em mcv, da otimização cor vermelha, 28 dias

A curva do grupo referência passou nos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e pelo gráfico Q-Q.

A quantificação de pixels apresentou média de $41,10 \pm 3,25$ mvc para o grupo tendão normal. Quando comparado com os outros grupos em todos tempos individualmente pelo teste de Mann-Whitney houve diferença estatisticamente significativa com $p < 0,0001$.

Mostrando que as áreas analisadas não apresentaram características do tendão normal (Figuras 26 e 27).

Figura 26: Tendão normal (grupo referência), otimização para vermelho

Figura 27: Comparação tendão normal e demais grupos, otimização para vermelho, dados em mcv.

Mensuração Quantitativa dos Glicosaminoglicanos(GAGs):

As medidas foram feitas de forma separada para condroitin-sulfato (CS) e dermatan sulfato (DS) alguns dos principais GAGs da estrutura do tendão. Todas as medidas foram realizadas nas diferentes porções do tendão a saber:

1)Proximal à reconstrução.

2)Na área da reconstrução (Central).

3)Distal à reconstrução.

Os gráficos apresentam sempre a seguinte ordem de aparecimento: proximal, central e distal.

Condroitin-Sulfato:

Todas medidas de sete dias passaram pelos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e plotagem Q-Q, todas comparações passaram no teste F de equivalência de variâncias ($p < 0,05$ bicaudal) e foram avaliados pelo teste T.

Todas medidas de 14 dias, com exceção da a região central, passaram pelos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk e plotagem q-q. A região proximal de 14 dias não passou no teste F de equivalência de variâncias ($p > 0,05$ bicaudal) e sua média foi avaliadas com uso do teste T com correção de Welch, a porção média foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney e a distal passou no teste F de equivalência de variâncias ($p < 0,05$ bicaudal) e sua média foi avaliadas com uso do teste T.

Os resultados são apresentados nas tabelas 2 e 3 e demonstradas graficamente nas figuras 28 e 29.

7 Dias	Proximal	Central	Distal
Condroitin Membrana	0,48±0,05	0,44±0,07	0,80±0,04
Condroitin Sem Membrana	0,31±0,08	0,69±0,09	0,38±0,04
p	0,084	0,051	0,029

Tabela 2: Condroitin-Sulfato 7 dias

Figura 28: Curvas Condroitin-Sulfato 7 dias, membrana(M) acima, sem membrana(SM) abaixo Proximal(P) a esquerda, Central(C) ao centro e Distal(D) a direita

14 Dias	Proximal	Central	Distal
Condroitin Membrana	0,67±0,21	1,01±0,13	0,65±0,09
Condroitin Sem Membrana	0,67±0,07	0,71±0,25	0,69±0,09
p	0,994	0,394	0,802

Tabela 3: Condroitin-Sulfato 14 dias

Figura 29: Curvas Condroitin-Sulfato 14 dias, membrana(M) acima, sem membrana(SM) abaixo Proximal(P) a esquerda, Central(C) ao centro e Distal(D) a direita

Comparando-se as concentrações de condroitin-sulfato na porção central para o grupo membrana entre sete e 14 dias pelo método de Mann-Witney obteve-se $p=0.01$. Para o grupo sem membrana a mesma comparação apresentou $p=0,71$.

O grupo referência não apresenta Condroitin-Sulfato em suas amostras.

Portanto apresenta diferenças estatísticas com todas as outras amostras com $p<0,0001$.

A variação do condroitin na porção central foi expressiva quando comparados os tempos sete e 14 dias, $p=0,01$ no grupo membrana, já no grupo sem membrana na porção central não apresentou diferença estatisticamente significativa $p=0,71$

Dermatan-Sulfato:

Todas medidas de sete dias passaram pelos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e plotagem Q-Q. As regiões proximal e distal passaram no teste F de equivalência de variâncias ($p<0,05$ bicaudal) e sua média foi avaliada com uso do teste T, a porção média não passou no teste F de equivalência de variâncias ($p>0,05$ bicaudal) e sua média foi avaliada com uso do teste T com correção de Welch.

Todas medidas de 14 dias passaram pelos testes de normalidade de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e plotagem q-q, com exceção da região distal. Para 14 dias as regiões proximal e média passaram no teste F de equivalência de variâncias ($p<0,05$ bicaudal) e suas médias foram avaliadas com uso do teste T e a porção distal com teste de Mann-Whitney.

Os resultados estão apresentados nas tabelas 3 e 4 e figuras 30 e 31 a seguir.

7 Dias	Proximal	Central	Distal
Dermatan Membrana	1,21 $\pm$ 0,11	0,42 $\pm$ 0,09	1,48 $\pm$ 0,20
Dermatan Sem Membrana	0,90 $\pm$ 0,10	1,29 $\pm$ 0,67	1,17 $\pm$ 0,13
p	0,069	0,023	0,226

Tabela 4: Dermatan-Sulfato 14 dias

Figura 30: Curvas Dermatan-Sulfato 7 dias, membrana(M) acima, sem membrana(SM) abaixo Proximal(P) a esquerda, Central(C) ao centro e Distal(D) a direita

14 Dias	Proximal	Central	Di
Dermatan Membrana	1,20±0,13	1,39±0,22	1,11±0,05
Dermatan sem Membrana	1,08±0,23	1,16±0,38	1,27±0,12
p	0,656	0,585	0,870

Tabela 5: Dermatan-Sulfato 14 dias

Figura 31: Curvas Dermatan-Sulfato 14 dias, membrana(M) acima, sem membrana(SM) abaixo Proximal(P) a esquerda, Central(C) ao centro e Distal(D) a direita

O grupo referência não apresenta Dermatan-Sulfato na concentração média de $1.50 \pm 0,14 \mu\text{g/mg}$ seco em suas amostras.

Em relação ao grupo referência os grupos que apresentaram diferenças estatisticamente significantes em 7 dias foram: Membrana Central ($p < 0,0001$), favorável ao grupo referência, e sem membrana proximal ($p = 0,01$) também favorável ao grupo referência. Com 14 dias, apenas a porção distal com membrana apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$).

A variação do dermatan na porção central foi expressiva quando comparados os tempos de sete e 14 dias ($p = 0,01$) no grupo membrana, já no grupo sem membrana a porção central não apresentou variação de concentrações estatisticamente significativa $p = 0,87$.

Mensuração da expressão gênica dos proteoglicanos (28 dias):

Quando realizada a reação em cadeia por tempo real, sua amplificação em testes iniciais tanto com β -Actina quanto com GAPDH apresentaram curvas extremamente discrepantes tanto no grupo membrana como no grupo controle. Isso pode ter

demonstrado certa variabilidade da amostra, que pode ocorrer devido a uma expressão variável mas similar. Esses dados podem sugerir que a amostra foi extraída em uma fase tardia da cicatrização, ou seja, possivelmente não se caracterizaram diferença entre os grupos devido à clara variabilidade de dados e possível mínima expressão gênica de proteoglicanos nessa fase (Figura. 32).

Figura 32: Resultados da expressão gênica de proteoglicanos

Discussão

A biologia celular básica do tendão é ainda mal compreendida assim como detalhes de seus processos cicatriciais (Sharma & Maffulli, 2005). O consumo de oxigênio é baixo em fibras tendíneas, sendo até 7,5 vezes menor que em fibras musculares (Valias et al, 1978). Essa baixa oxigenação resulta muitas vezes em um longo processo cicatricial (Williams, 1986). Tenócitos são células com baixa atividade metabólica, porém com o estímulo da lesão tissular ocorre estímulo da atividade celular com angiogênese, collagenogênese e dos processos cicatriciais.

Já foi demonstrado que as células tendíneas são sensíveis aos estímulos mecânicos, refletindo diretamente sobre a organização e velocidade da cicatrização tecidual através de mecanismos não bem estabelecidos (Galloway, Lalley & Shearn, 2013). Tendões patelares de coelhos reconstruídos e estimulados mecanicamente apresentaram 2,5 vezes maior rigidez linear e 4 vezes maior módulo linear que os grupos não estimulados (Juncosa-Melvin et al, 2007).

As biomembranas tem sido sugeridas como possíveis agentes de aceleração dos processos cicatriciais para tendões (Sukow et al, 2007). Recentemente mesmo a difícil cicatrização da interface tendão osso tem apresentado bons resultados com uso de membranas com base de ácido polilático (Zhao et al, 2015). A biocompatibilidade do ácido polilático foi demonstrada quando enxertos desse material obtiveram bons resultados na reconstrução de lesões tendíneas, mesmo com perda tecidual (Yokoya et al 2008).

A inserção de segmentos de 1,3 trimetileno carbonato, TMC, um polycarbonato alifático elastomérico, ao longo da cadeia do copolímero PLDLA, resulta em um material mais visco-elástico, portanto, mais tolerante a deformidades e com menor módulo de deformação. Essa propriedade pode tornar o novo material mais

biocompatível (Duek et al, 2014). No caso do tendão o módulo de deformação diminuído age favoravelmente com maior compatibilidade mecânica e possíveis consequências biológicas melhorando sua ação para o tecido alvo (Buchholz, 1993).

A eficiência no preparo de implantes biomédicos empregando TMC já foi previamente confirmada (Engelberg & Kohn, 1991), validando assim sua escolha para fazer parte da cadeia do copolímero PLDLA. A presença simultânea, na cadeia polimérica, de segmentos de L-lactide, DL-lactide e TMC de alto peso molecular está sendo apresentada em nosso estudo como nova opção de membrana bioabsorvível para uso em tendões.

A principal diferença desse terpolímero em relação aos usados no mercado, com cadeias poliméricas formadas por L-lactide/ TMC ou DL-lactide/ TMC, é que o efeito da incorporação das unidades de TMC numa cadeia polimérica já contendo em sua composição tanto o L-lactide quanto o DL-lactide diminuirá a alta cristalinidade da membrana, implementando seu processo absorvivo (Motta & Duek, 2006). Essa diminuição da cristalinidade fez com que o copolímero fosse mais fácil de ser reabsorvido (Motta & Duek, 2006), diminuindo potenciais reações a médio prazo que potencialmente podem atrapalhar o processo cicatricial (Ambrose & Clanton, 2004) (Anderson et al, 2008).

Nesta tese, utilizou-se também a otimização das condições de síntese para obter o terpolímero, PLDLA-co-TMC, de alta massa molar, essa modificação aumentou a resistência mecânica e biológica do polímero, fazendo-o, portanto, mais resistente e equilibrando o tempo de degradação sem perder a elasticidade.

Com tais características o polímero criado apresentou maior compatibilidade mecânica com um tendão (Gogolewski et al, 1993).

O uso dessa nova membrana fez com que o reparo do tendão fosse protegido da formação de aderências, melhorando as condições de excursão tendínea e consequentemente sua mobilidade (Zhao et al, 2011), com aumento dos estímulos mecânicos diretos e melhor direcionados (Yoon & Halper, 2005) (Galloway, Lalley & Shearn, 2013).

Desta forma, observou-se uma menor quantidade de aderências à avaliação macroscópica associada a um melhor padrão de paralelismo das fibras nos grupos que apresentavam proteção com a membrana em estudo. O grupo não envelopado (sem membrana) apresentou fibras em direções mais radiais, com predomínio do colágeno desorganizado tipo III por períodos maiores que o grupo envelopado (membrana). Como o grupo envelopado pela membrana apresentou menos aderências sugerimos que isso proporcionou um melhor direcionamento dos estímulos mecânicos, favorecendo o paralelismo celular.

A membrana proporcionou portanto, maior liberdade de movimento com a diminuição de aderências, assim o estímulo mecânico tornou-se mais efetivo (Zhao et al, 2011). Não se descartam, entretanto, outros efeitos ainda desconhecidos da membrana que possam também acelerar os processos reparativos.

O aspecto histológico geral também pode se modificar nas diferentes fases da cicatrização tendínea (Rochkind, Roussov & Nissan, 1989). Para quantificar esses parâmetros da cicatrização do tendão foi descrita uma classificação histológica multifatorial de maturação de cicatriz (Watkins et al, 1985). As sete principais variáveis analisadas nessa classificação são: celularidade, fibrócitos/tenócitos, vascularização, proporção de fibras de diâmetro largo, paralelismo celular, paralelismo de fibras e porcentagem de colágeno tipo II.

A avaliação cega subjetiva dentro dos parâmetros de Watkins et al (1985) e de Yokoya et al (2008) modificados mostraram diferença estatisticamente significantes na avaliação qualitativa ordinal cega nos tempos 14 e 28 dias. O paralelismo do colágeno apresentou diferença apenas no grupo 28 dias, enquanto o paralelismo celular apresentou tendência a diferença no mesmo período. Isso revela que o processo de cicatrização celular mesmo acelerado tem um tempo mínimo afim de se remodelar do modo mais similar ao tendão normal, e que o processo de remodelação é lento. Entretanto as diferenças entre os grupos membrana e sem membrana sugerem que mesmo no início da fase tardia da cicatrização há aceleração da remodelação no grupo com membrana. Esse fato pode fazer inferir que procedimentos cirúrgicos em coelhos e outros animais com uso da biomembrana estudada podem implementar os processos cicatriciais acelerando o retorno às atividades normais.

A celularidade não apresentou diferença estatisticamente significativa em nenhum tempo analisado, portanto a aceleração nos processos reparativos pode ser mais associado à performance celular por estímulos externos como o mecânico que por uma maior quantidade de células.

A quantidade de colágeno tipo III foi maior no grupo envelopado nos primeiros 14 dias, de acordo com medição direta de pixels verdes, e maior no grupo controle no tempo 28 dias, de acordo com medida indireta de porcentagem de colágeno. Entretanto, a análise de pixels verdes mesmo no período precoce não está livre de vieses, já descritos acima, por necessitar maior luminosidade. O colágeno tipo I apresentou diferença favorável ao grupo envelopado tanto em 14 quanto em 28 dias, entretanto quando comparado com o tendão normal, ainda havia uma diferença muito acentuada. Isso sugere que mesmo com a aceleração dos processos reparativos as fibras requerem um tempo adequado para o retorno a atividades em padrões normais.

Nos processos cicatriciais há um aumento da atividade metabólica com alteração da composição da matriz extracelular e grande aumento dos GAGs (Movin, Reinholt & Rolf, 1997). Outras membranas também já apresentaram bons resultados na aceleração de processos cicatriciais, inclusive demonstrando relação com aumento de GAGs como o ácido hialurônico (Baymurat et al, 2014).

Sabe-se que expressão gênica na formação dos GAGs ocorre nas primeiras fases dos processos cicatriciais teciduais seguindo, ou causando o aumento do TGF- β 1 (Fator de Crescimento do Tendão) e IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina) (Dahlgren et al, 2005).

A mensuração quantitativa dos GAGs pela espectroscopia em sete dias mostrou haver diferença entre os grupos com maior presença dos GAGs sulfatados nas fases iniciais sendo atenuada pelo uso da membrana em estudo na região central do tendão, a região da sutura. As outras regiões do tendão apresentaram aumentos na condroitina principalmente nos grupos envelopados. Ozer et al (2011) sugere o efeito benéfico do uso oral da condroitina e glicosamina na recuperação de tendões em ratos. Nesse estudo a elevação da condroitina nos tendões pode sugerir a importância desse glicosaminoglicano no processo cicatricial, visto o tendão normal não apresentar condroitina em nosso grupo referência.

Processos patológicos do tendão também aumentam os glicosaminoglicanos sulfatados, principalmente condroitina, podendo estabelecer uma relação entre seu aumento e demais processos e sinalizações inflamatórias (Attia et al, 2013) (Movin et al, 1997) (Riley et al, 1994) (Smith et al 2008).

A mensuração direta com espectroscopia em 14 dias mostrou não haver diferença entre os grupos, entretanto os valores encontrados de GAGs, principalmente

condroitin-sulfato, que ainda se encontravam elevados em ambos os grupos. Isso sugere precocidade dos mecanismos de reparo celular dependentes dos proteoglicanos. O Decorin é um dos principais proteoglicanos envolvidos na síntese de colágeno, ele é altamente suscetível a estímulos de tração (Yoon & Halper, 2005) e possivelmente no modelo apresentado, onde a órtese usada dava certa mobilidade precoce ao coelho, fizeram com que as amostras entrassem na fase tardia, remodelação, precocemente tanto nos grupos membrana quanto sem membrana, entretanto nos grupos com membrana, nota-se uma atividade de GAGs mais pronunciada precocemente proximal e distal à lesão, apresentando nessa última região diferença estatisticamente significativa na expressão da condroitin-sulfato.

A região central do tendão na fase mais precoce, sete dias, apresentou consistência mais líquida no grupo membrana. Esse fato vem de acordo com a literatura (Baymurat, 2014), inferindo maior produção de ácido hialurônico, visto o mesmo ser altamente hidrofílico, com a consequente diluição de outros GAGs. A sugerida maior diluição em 7 dias na porção central associada ao aumento dos condroitim-sulfato nas porções proximal e distal em relação ao grupo sem membrana pode demonstrar alta atividade de comunicação celular (Park and Tsuchiya, 2002).

Em 14 dias, já com o tendão macroscopicamente de aspecto consistente, na porção central do grupo membrana há uma grande variação na concentração de condroitin-sulfato, em relação ao tempo de sete dias $p=0,01$, corroborando com a hipótese da importância desse GAG nos processos cicatriciais precoces e da ação benéfica da membrana para o tendão. O grupo sem membrana não apresentou mudanças estatisticamente significantes na porção central entre sete e 14 dias $p=0,71$. O dermatan-sulfato apresentou comportamento similar aumentando sua concentração significativamente na porção central do grupo membrana e também não houve

variação significativa no grupo sem membrana. A baixa concentração desse GAG na fase precoce também aponta para alta atividade hidrofílica com diluição do mesmo, corroborando com o achado macroscópico.

O estudo da expressão gênica dos proteoglicanos pode sustentar a hipótese de desse componente apresentar maior importância nas fases iniciais dos processos de cicatrização. Houve resultado inexpressivo ou inconsistente no nível de avaliação do metabolismo celular para proteoglicanos na avaliação gênica. Esse resultado pode ser comprovado pelas provas com β -Actina e GAPDH durante os testes preliminares, antes mesmo de serem desenhados os primers para os genes alvo dos proteoglicanos. A β -Actina e GAPDH funcionam como controles internos para a amostra, quando os resultados da cadeia de reação da polimerase para esses dois testes dão resultados de curvas esparsas, significa inviabilidade da continuidade do estudo por óbvio aumento dos intervalos de confiança (Li et al, 2010) e portanto óbvia inviabilidade de obtenção de um resultados estatisticamente significativo entre as amostras. Portanto infere-se que no momento 28 dias a expressão gênica dos proteoglicanos supostamente já estava baixa ou de impossível mensuração adequada.

Em verdade dentro dos processos cicatriciais há uma grande atividade celular nas fases iniciais e a fase de remodelação parece realmente ser um processo mais lento e menos ativo no nível celular e da matriz extracelular.

Entretanto há um aumento de celularidade em relação ao tendão normal na avaliação das peças coradas em HE em todas as amostras de 28 dias, com células que possivelmente já se encontravam quiescentes ou a caminho de ficarem quiescentes.

Como esse estudo é pré-clínico, em modelos animais e controlado o poder estatístico ($1-\beta$) não necessita ser alto, portanto atingir a significância tendo $\alpha < 0,05$ em curva bicaudal é o suficiente. Entretanto a avaliação objetiva do colágeno tipo 1

teve um dado consistente que, obedecendo a borda de Haybittle-Peyto, pode ser considerado definitivo e sem necessidade de mais comprovações nesse modelo animal (Pocock, 2005).

Para futuros estudos clínicos em seres humanos, entretanto, é necessário estabelecer um poder estatístico adequado com amostras grandes, fato não necessário em estudos pré-clínicos. O cálculo do tamanho da amostra nesses casos dependerá do desvio padrão medido em humanos dentro de estudos fase dois prévios.

Conclusão

A envelopagem do tendão calcâneo de coelhos com a membrana PLDLA-co-TMC proporcionou uma aceleração dos processos reparativos nos tecidos estudados em diferentes fases da cicatrização em coelhos.

Referências:

Abate M, Gravare Silbernagel K, Siljeholm C, Di Iorio A, De Amicis D, Salini V, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res & Ther.* 2009;11(3):235.

Ambrose C and Clanton T. Bioabsorbable implants: review of clinical experience in orthopedic surgery. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(1):171–7.

Anderson J, Rodriguez A, Chang D. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology.* 2008;20(2):86–100.

Animal Legal and Historical Center. *US Animal Welfare Act: §2143. Research facility Committee; establishment, membership, functions, etc.* [Online]. 2013 [Cited 15 February 2015] available from: www.animallaw.info/statutes/stusawa.htm#2143

Attia M, Carpentier G, Etienne S, Thierart S, Scott A, Oystein L et al Histochemical analysis of GASs in altered tendon: A means to evaluate the degree of pathology. *Br J Sports Med.* 2013;47(9):e2.

Badia A. Use of a Bioresorbable Polyactide Sheet (OrthoWrap Reduction of Soft Tissue Attachments in Hand Surgery. *Clinical Data Series in Bioresorbable Technology*, MAST Biosurgery Inc., San Diego; 2007 [Cited Jan 5, 2016]. Available from https://www.researchgate.net/profile/Alejandro_Badia/publication/242237345_Use_of_a_Bioresorbable_Polyactide_Sheet_OrthoWrap_for_Reduction_of_Soft_Tissue_Attachments_in_Hand_Surgery/Clinical_Data_Series_in_Bioresorbable_Technology

[ments in Hand Surgery/links/57c43a3508aee465796c0de1.pdf?origin=publication_detail](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4048441/pdf/57c43a3508aee465796c0de1.pdf?origin=publication_detail)

Baymurat AC, Ozturk AM, Yetkin H, Ergun MA, Helvacioğlu F, Ozkizilcik A et al. Bio-engineered synovial membrane to prevent tendo adhesions in rabbit flexor tendo model. 2014; 103(1): 84-90.

Beredjiklian PK. Biologic Aspects of Flexor Tendon Laceration and Repair. *J Bone Joint Surg.* 2003 85A: 539-50.

Bland MJ and Altman DG. One and two sided tests of significance., *BMJ*; 1994, 309(6949): 248.

Buchholz B. Analysis and Characterization of Resorbable DL- Lactide-Trimethylene Carbonate Copolyesters.’, *J Mater Sci Mater Med*; 1993, 4: 381-8.

Carvalho Jr AE and Imamura M. Lesões Tendíneas. Ortopedia e Traumatologia: Princípios e Prática. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.

Chow SC and Chang SC. Adaptive design methods in clinical trials - a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2008;3(11) [Online] Available from: <http://dx.doi.org.ezproxy.liv.ac.uk/10.1186/1750-1172-3-11> [Accessed 27 July 2013]

Collective summary of strength and biocompatibility testing data comparisons of polyester and polyblend sutures. Arthrex; nd [Online] [Cited 18 January 2016] Available from: <http://www.arthrexvetsystems.com/en/mediacenter/whitepapers/upload/FiberWire-White-Paper.pdf> (Accessed 18 January 2016)

Davis HG. Conservative Surgery. New York: Appleton & Co; 1867.

Dahlgren LA, Mohammed HO and Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon. *J Orthop Res*. 2005; 23(1):84-92.

Demirkian F, Colakoglu N, herek O and Erkula G. The use of amniotic membrane in flexor tendon repair: an experimental model. *Arch Orthop trauma Surg*. 2002; 122(7): 396-9.

Dietrich CP and Dietrich SM. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical. Biochemistry*. 1976;70(2):645-7.

Duek, JR, Riquetto ML, Jesus DC, Sabongi JS Neto, Barbo MLP, Duek EAR et al. Membrana de PLDLA-TMC como protetor na regeneração do tendão calcâneo. Estudo in vivo em coelhos. *Polímeros*. 2014; 24(3):360-6.[in Portuguese]

Engelberg I and Kohn J. Physico-mechanical Properties of Degradable Polymers Used in Medical Applications: a Comparative Study.', *Biomaterials*. 1991; 12(3):292-304.

Enwenka CS. Inflammation, cellularity and fibrillogenesis in regenerating tendon: Implications for tendon rehabilitation. *Physical Therapy*. 1989; 69(10): 816-25.

Esenyel CZ, Demirhan M, Kiliçoglu O, Adanir O, Bilgiç B, Güzel O et al. Evaluation of soft tissue reactions to three nonabsorbable suture materials in a rabbit model. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2009; 43(4):366-72.

Festing S and Wilkinson R. (2007) The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. *EMBO Reports*. 2007; 8(6):526-30.

Franciozi CE, Tarini VA, Reginato RD, Gonçalves PR, Medeiros VP, Ferretti M, et al. Gradual strenuous running regimen predisposes to osteoarthritis due to cartilage cell death and altered levels of glycosaminoglycans. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013; 21(7):965-72.

Galloway MT, Lalley AL and Shearn JT. ‘The role of mechanical loading development, maintenance, injury and repair.’, *J. Bone Joint Surg*. 2013; 95A(17):1620-8.

Gogolewski S, Jvanovic M, Perren SM, Dillon JG and Hughes MK. The effect of melt-processing on the degradation of selected polyhydroxyacids - polylactides, polyhydroxybutyrate, and polyhydroxybutyrate-co-valerates. *Polimer degradation & Stability*. 1993; 40(3):313-22.

Hayem G. Tenology: a new frontier. *J Bone Spine*. 2001; 68:19-25.

ICH. *Statistical principles for clinical trials (E9)*. [Online]. 1998 [Cited: 20 July 2014]

Available online from:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E9/Step4/E9_Guideline.pdf

ICH. *Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2)*. [Online]. 2009 [Cited 19 February 2013] Available from:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E8/Step4/E8_Guideline.pdf

Juncosa-Melvin N, Matlin KS, Nirmalanandhan VS and Butler DL. Mechanical stimulation increases collagen type I and collagen type III gene expression of stem cell-collagen sponge constructs for patellar tendon repair. *Tissue Eng.* 2007;13(6):1219-26.

Junqueira LC and Carneiro J. *Histologia Básica*. 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.

Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*. 2000;10:312-20.

Kessler I. The “grasping” technique for tendon repair. *Hand*. 1973;5(3):253–255.

Leppänen OV, Karjalainen T, Göransson H, Hakamäki A, Havulinna J, Parkkinen J et al. Outcomes after flexor tendon repair combined with the application of human amniotic membrane allograft. 2017; 42(6):474e1-e8

Li Z, Yang L, Wang J, Shi W, Pawar RA, Liu Y et al. Beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol*. 2010; 29(1):89-93.

Mackay IM, Ander KE and Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(6):1292-305.

Martins JR, Passerotti CC, Maciel RM, Sampaio LO, Dietrich CP, Nader HB. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem*. 2003;319:65-72.

Motta AC and Duek EAR. Synthesis, characterization and "in vitro" degradation of Poly (L-lactic acid). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2006;16(1):26 [In Portuguese].

Movin T, Gad A, Reinholt FP and Rolf C. Tendon pathology in long-standing achillodynia: Biopsy findings in 40 patients. *Acta Orthop Scand*. 1997;68(2):170-5.

Nicholls, N. The insignificance of significance testing. *Bulletin of the American Meteorological Society* 2000 81(5):pp. 981-6.

O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports*. 1997;7:55-61.

Özer H, Taskesen A, Kul O, Selek HY, Turanlı S and Köse K. Glukozamin kondroitin sülfatın onarılmış tenotomize sıçan Aşıl tendonları üzerine etkisi. *Joint Dis Rel Surg*. 2011;22(2):100-6. [in Turkish]

Park JU and Tsuchiya T. Increase in gap junctional intercellular communication by high molecular weight hyaluronic acid associated with fibroblast growth factor 2 and keratinocyte growth factor production in normal human dermal fibroblasts. *Tissue Eng*. 2002; 8(3):419-27.

Pocock JP. 1983 Basic principles of statistical analysis. In: Pocock, JP (Ed) *Clinical trials: a practical approach*. Chichester: John Wiley & Sons; 1983. P.187-210.

Pocock SJ. When to stop a clinical trial for benefit. *JAMA*. 2005;294(17):2228–30.

Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE and Hazleman BL. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: Changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:367–76.

Royal Statistical Society (2007) *Reporting of the working Party on Statistical Issues in First-in-man studies*. 2007 [Online] [Cited 13 February 2013] Available from: <http://www.rss.org.uk/uploadedfiles/documentlibrary/752.pdf>

Rochkind, S, Rouso M and Nissan M. Systematic effects of low power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med.* 1989; 9:174-8.

Severo AL, Arenhart R, Siveira D, Áila AOV, Berral FJ, Lemos MB et al. Biomechanics and histological analysis in the rabbit flexor tendons repaired using three suture techniques(four and six stands) with early active mobilization. *Rev bras ortop.* 2012; 47(1): 92-101.

Shal, W.J. and Clever, H. Cutaneous Scars: Part I. *Int J Dermatol.* 1994; 33(10): 681-91.

Sharma P and Maffulli N. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J of Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6:181–90.

Silva LI, Genro T, Stephanes R, Temporão JG, Jorge M, Elias LAR et al. *Lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008* [Online] 2008 [Cited 03 September 2013] Available from:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm.

Smith MM, Sakurai G, Smith SM, Young AA, Melrose J, Stewart CM, et al. Modulation of aggrecan and ADAMTS expression in ovine tendinopathy induced by altered strain. *Arthritis Rheum.* 2008;58(4):1055–66.

Solis MA, Chen YH, Wong TY, Bittencourt VZ, Lin YC and Huang LLH. Hyaluronan regulates cell behavior: A potencial niche matrix for stem cells. *Biochemistry Research International*. 2012; article ID 346972. [Cited 02 January, 2017] Available form: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2012/346972/>

Suckow MA, Hodde JP, Wolter WR and Hiles MC. (2007) 'Repair of experimental Achilles tenotomy with porcine renal capsule in a rat model. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18(6): 1105-10.

Trowbridge JM and Gallo RL. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*. 2002; 12(9), pp117R-25R.

Valias AC, Tripton CM, Laughlin HL, Tchong TK and Matthes RD. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *J Appl Physiol Respir Environ Physiol*. 1978;44(4):542-6.

Watkins JP, Auer JA, Gay S and Morgan SJ. Healing of surgically created defects in the equine superficial digital flexor tendon: collagen-type transformation and tissue morphologic reorganization. *Am J Vet Res*. 1985;46:2091-6.

Williams JG. Achilles tendon lesions in sport. *Sports Med*. 1986; 3:114-35.

Yokoya S, Mochizuki Y, Nagata Y, Deie M and Ochi M. Tendon-bone insertion repair and regeneration using polyglycolic acid sheet in the rabbit rotator cuff injury model. *Am J Sports Med.* 2008;36(7):1298-309.

Yoon JH and Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interac.* 2005;5(1):22-34.

Zhao H, Guan HG, Luo ZP, Gu J, Luo ZP, Zhang W et al. Collagen membrane alleviates peritendinous adhesion in the rat achilles tendon injury model. *Chin Med J.* 2013;126(4):729-33.

Zhao HM, Yu GR, Yang YF, Zhou JQ and Aubeeluck A. Outcomes and complications of acute Achilles tendon rupture: a meta-analysis. *Chin Med J.* 2011;124:4050-5.

Zhao S, Xie X, Pan G, Shen P, Zhao J and Cui W. Healing improvement after rotator cuff repair using gelatin-grafted poly-(L-lactide) electrospun fibrous membranes. *J Surg Res.* 2015;193(1):33-42., *Journal of Surgical Research*, 193(1):33-42.