



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas – PCM

VIVIANE DA CRUZ ROSÁRIO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DA REPARAÇÃO DE
TENDÃO PATELAR EM RATOS APÓS A IMPLANTAÇÃO
DO BIOPOLÍMERO ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre na área de Ciências Morfológicas – Programa MINTER.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rodrigues de Andrade

Co-orientador: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa

Salvador, fevereiro de 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FOLHA DE APROVAÇÃO

VIVIANE DA CRUZ ROSÁRIO

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA REPARAÇÃO DE TENDÃO PATELAR EM RATOS APÓS A IMPLANTAÇÃO DO BIOPOLÍMERO ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências da Saúde, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

_____ - Orientador

Prof. Dr. Leonardo Rodrigues de Andrade (Instituto de Ciências Biomédicas- UFRJ)

_____ - Co-orientadora

Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa (Instituto de Ciências da Saúde- UFBA)

Banca Examinadora:

_____ - Revisora

Profa. Carolina N. Keim (Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ)

_____ - Examinador

Prof. Radovan Borojevic (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

_____ - Examinador

Profa. Christina Maeda Takiya (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

_____ - Examinador

Prof. Nelson Gnoatto (Fundação Bahiana de Desenvolvimento das Ciências - BA)

_____ - Coordenador do PCM

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

Salvador, fevereiro de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica:

Rosário, Viviane da Cruz

Título do Trabalho: Análise morfológica da reparação de tendão patelar em ratos após a implantação do biopolímero ácido poli-l-láctico

Orientador: Leonardo Rodrigues de Andrade

Co-Orientador: Fabiana Paim Rosa

Nº de páginas extras (10), nº de páginas f. 64

Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, PCM, ICB, UFRJ.

1- Bioengenharia Tecidual 2 - Biomaterial
3- PLA 4 – Tendão

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Grau: Mestre em Ciências Morfológicas,

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Este trabalho foi realizado sob as orientações do Prof. Dr. Leonardo Rodrigues de Andrade (ICB, UFRJ) e co-orientação da Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa (ICS, UFBA) no período de março de 2005 a fevereiro de 2008. Esta Dissertação de Mestrado faz parte do Programa MINTER-CAPES de intercâmbio interinstitucional firmado entre a Universidade Federal do Rio de Janeiro e a Universidade Federal da Bahia. Participaram da execução desta dissertação os seguintes laboratórios:

Laboratório de Biomineralização, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.

Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, IBCCF, UFRJ.

Biotério Central, UFBA.

Laboratório de Biomateriais e Bioengenharia Tecidual, Instituto de Ciência da Saúde, UFBA.

Laboratório de Histopatologia CPGM, FIOCRUZ, BA.

Laboratório de Microscopia Eletrônica, CPGM, FIOCRUZ, BA.

Apoio Financeiro: CAPES, FAPESB, UFRJ e UFBA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Saint-Clair e Vilma, minha irmã Lílian e meu esposo Alan, pelo grande amor que sinto por vocês.

AGRADECIMENTOS

- À Deus acima de tudo por abençoar a minha vida a cada dia;
- Ao professor Leonardo Rodrigues de Andrade pela preciosa orientação bem como pelo exemplo de profissionalismo, brilhantismo científico, dedicação, incentivo, paciência, entusiasmo e disponibilidade. Minha admiração, respeito e eterna gratidão;
- À professora Fabiana Paim Rosa pelo aprendizado na realização deste trabalho;
- Aos professores Radovan Borojevic e Vivaldo Moura Neto idealizadores do Programa de Pós-graduação Interinstitucional UFRJ/UFBA;
- Aos professores Ana Maria Blanco Martinez, Cláudia dos Santos Mermelstein, Christina Maeda Takiya, Helena Marcolla Araújo, José Garcia Abreu, Lenira Moura, Luiz Eurico Nasciutti, Maria Isabel Doria Rossi, Maria Eugênia Leite Duarte, Marcos Farina de Souza, Morgana Castelo Branco, Silvana Allodi e Stevens Rehen, como corpo docente, pelo aprendizado;
- Ao Laboratório de Biomineralização - UFRJ e a todos os colegas que me apoiaram, em especial, o estagiário Daniel, pela inestimável ajuda no processamento e análise do material;
- À Mair Machado de Oliveira pela paciência, boa vontade e ajuda na confecção dos procedimentos histológicos;
- Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer IBCCF, UFRJ e, em especial, à professora Loraine Campanati de Andrade pelo apoio e incentivo;
- Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica CPGM/FIOCRUZ e aos professores Marcos André Vannier e Adriana Lanfredi Rangel pelo grande auxílio e colaboração no processamento dos materiais;
- Ao Laboratório de Histopatologia CPGM/FIOCRUZ e ao professor Aryon Barbosa pela ajuda com o processamento histológico do material;
- Ao Biotério Central / UFBA assim como seus funcionários pela colaboração na realização do ato cirúrgico nos animais;

- Ao Sr. Mário Teles de Andrade pela receptividade e acolhimento, que me fizeram não sentir tanto a saudade de casa;
- Aos amigos Caroline, Nelzair e Paulo Sérgio que vivenciaram tanto as vitórias como as dificuldades e etapas difíceis desta jornada;
- Aos colegas de trabalho pela colaboração, incentivo e ajuda na difícil conciliação entre as atividades profissionais e acadêmicas;
- À CAPES e à FAPESB pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho;
- Aos meus pais Saint-Clair e Vilma, companheiros incondicionais, eternos incentivadores, pelo cuidado e por me transmitirem segurança e persistência para alcançar meus objetivos;
- Ao meu esposo Alan, pelo seu carinho, amor, companheirismo e compreensão pelos momentos ausentes;
- À minha querida irmã Lílian, sempre disposta a me ajudar, pela sua presença em momentos difíceis e por ser cada dia mais minha amiga;
- Aos meus familiares e todos aqueles que acreditaram neste trabalho e que, de alguma maneira contribuíram para a execução do mesmo. O meu mais profundo carinho e reconhecimento.

RESUMO

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA REPARAÇÃO DE TENDÃO PATELAR EM RATOS APÓS A IMPLANTAÇÃO DO BIOPOLÍMERO ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO

Viviane da Cruz Rosário

Orientador: Leonardo Rodrigues de Andrade

Co-orientador: Fabiana Paim Rosa

O uso de biomateriais como implantes ortopédicos tem crescido significativamente nos últimos 10 anos. A maioria destes são cerâmicas ou polímeros, como o ácido poli-L-láctico, PLLA, que é um dos mais promissores polímeros bioabsorvíveis devido a sua excelente biocompatibilidade e reabsorção. PLLA é biocompatível porque sua degradação ocorre por hidrólise e os produtos finais são metabolizados pelo organismo, evitando uma cirurgia para remoção do implante. Tendão é um tecido conjuntivo muito organizado que funciona transferindo cargas dos músculos para os ossos. As lesões em tendões são muito comuns em indivíduos que praticam esportes e pessoas de idades mais avançadas. Não existe um tratamento totalmente eficiente para a reconstituição do tendão, e novas abordagens vem sendo testadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o PLLA como implante para guiar a recuperação do tendão. O tendão patelar de ratos foi usado como modelo em nosso estudo. Um “defeito em janela” artificial foi realizado cirurgicamente em 40 ratos, onde 20 foram implantados com PLLA, e na outra metade não. A movimentação imediata pós-cirúrgica foi permitida. Após 2, 4, 8 e 12 semanas, os ratos foram eutanasiados e as regiões com os defeitos foram removidas e preparadas para microscopia óptica, imunofluorescência para elastina e decorina, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Foi estudada a morfologia das células aderidas ao PLLA, as respostas teciduais ao PLLA e a degradação do PLLA. Nos ratos com PLLA implantado por 12 semanas, foram observadas numerosas células alongadas fibroblastóides próximas ao PLLA com orientação paralela ao tendão intacto. Nos ratos não implantados com o PLLA, as células encontradas dentro da lesão não mostraram organização, refletindo numa possível transferência de cargas deficiente. In PLLA non-implanted rats, the cells found into the lesion didn't show organization, reflecting in a deficient load transfer. Macrófagos e células gigantes de corpo estranho estavam presentes sobre a superfície do PLLA participando do início da sua degradação. Nenhum infiltrado inflamatório foi observado. Concluindo, a resposta do tendão ao PLLA foi adequada em relação à biocompatibilidade, com boas perspectivas para ser testado como técnica alternativa para reparação de tecidos conjuntivos, como tendões humanos.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HEALING IN THE RAT PATELLAR TENDON AFTER POLY (L- LACTIC ACID) BIOPOLYMER IMPLANTATION

Viviane da Cruz Rosário

Advisor: Leonardo Rodrigues de Andrade

Co-advisor: Fabiana Paim Rosa

The use of biomaterials as orthopedic implants has been significantly increased in past 10 years. Most of them are ceramics or polymers, such as poly (L- lactic acid), PLLA, that is one of the most promising bioabsorbable polymers due to its remarkable biocompatibility and re-absorption. PLLA is biocompatible because its degradation occurs by hydrolysis and final products are metabolized by the organism, avoiding the surgery to remove the implant. Tendon is a very organized connective tissue that functions transferring the loads from muscles to bones. Tendons lesions are very common principally in individuals that practice sports and advanced age people. There is no totally efficient treatment to tendon reconstitution, and new approaches are been testing. The aim of this study was to evaluate the PLLA as an implant to guide tendon healing. Rat patellar tendon was used as model in our study. An artificial “window defect” was surgically realized in 40 rats, where 20 were implanted with PLLA, and the other half not. The immediate pos-surgery move was permitted. After 2, 4, 8 and 12 weeks, the rats were euthanized and the regions of the defects were removed and prepared to optical microscopy, immunofluorescence for elastine and decorin, transmission and scanning electron microscopy. It was studied the cells morphology adhered to PLLA, tissue responses to PLLA and PLLA degradation. In 12 weeks PLLA implanted rats, it was observed numerous elongated fibroblastic cells close to PLLA with a parallel orientation to the intact tendon. In PLLA non-implanted rats, the cells found into the lesion didn't show organization, reflecting in a possible deficient load transfer. Macrophages and foreign body giant cells were present on the PLLA surface leading its initial degradation. No inflammatory infiltrate was observed. In conclusion, tendons response to PLLA was adequate concerning the biocompatibility, with good perspectives to be tested as an alternative technique to connective tissues repair, like human tendons.

LISTA DE ABREVIATURAS

FDA- *Food and Drug Administration* (Instituição Americana que legisla sobre o uso de materiais em humanos)

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GAG- glicosaminoglicana

HE- hematoxilina e eosina

kDa- quilodaltos

MET- microscopia eletrônica de transmissão

MEV- microscopia eletrônica de varredura

OTC – composto para criopreservação de tecidos (Temperatura crítica ótima)

PBS – tampão fosfato com salina

PGA- ácido poli-glicólico

pH- potencial hidrogeniônico

PLLA - ácido poli-L-láctico

TRICT – isotiocianato de tetraetilrodamina

3D- tridimensional

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| FOLHA DE APROVAÇÃO | II |
| INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES | III |
| FICHA CATALOGRÁFICA | IV |
| DEDICATÓRIA | V |
| AGRADECIMENTOS | VI |
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| LISTA DE ABREVIATURAS | X |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1 BIOENGENHARIA DE TECIDOS..... | 01 |
| 1.2 ESTRUTURA DO TENDÃO..... | 03 |
| 1.3 COMPONENTES DO TENDÃO: CÉLULAS E MATRIZ..... | 05 |
| 1.3.1. Células..... | 05 |
| 1.3.2 Matriz extracelular..... | 05 |
| 1.4 SÍNTESE DE COLÁGENO E FORMAÇÃO DO TENDÃO..... | 08 |
| 1.5 SUPORTE VASCULAR DO TENDÃO..... | 12 |
| 1.6 LESÃO DE TENDÃO PATELAR..... | 12 |
| 1.7 BIOMATERIAIS..... | 14 |
| 1.7.1 Poliésteres..... | 15 |
| 1.7.2. PLLA..... | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 GERAL..... | 19 |
| 2.2. ESPECÍFICOS..... | 19 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1 ANIMAIS..... | 19 |
| 3.2. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO..... | 20 |
| 3.3 BIOMATERIAL - ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO..... | 21 |
| 3.4 MICROSCOPIA ÓPTICA..... | 21 |
| 3.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA..... | 22 |
| 3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)..... | 22 |
| 3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 22 |
| 4. RESULTADOS..... | 23 |
| 4.1. PRANCHAS..... | 28 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 50 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 58 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOENGENHARIA DE TECIDOS

A bioengenharia de tecidos é uma nova área da ciência que vem buscando alternativas de tratamento para diversas enfermidades ou para a reparação de tecidos danificados. As estratégias de tratamentos baseados na implantação de biomateriais celularizados possuem grande potencial na prática da medicina reparadora, trazendo grandes inovações para tratamento de doenças comuns como enfarte do miocárdio, diabetes, queimaduras de pele, osteoartrites, dentre outras (ALSBERG *et al.*, 2002). Além disso, as técnicas utilizadas na Bioengenharia permitem investigar em laboratório as relações entre estrutura e função associadas à formação de um novo tecido, contribuindo para o sucesso do tratamento clínico específico (SHIN *et al.*, 2003).

Há três objetos importantes relacionados com a bioengenharia de tecidos: as células, o arcabouço ou matriz de material biocompatível, e os fatores bioativos. Para a funcionalidade de biopróteses, precisamos aliar tipos celulares específicos a polímeros biocompatíveis e, preferencialmente, biodegradáveis, que formem o arcabouço que irá carrear as células para o local do implante (LU *et al.*, 2001; ALSBERG *et al.*, 2002; SHIN *et al.*, 2003).

As células utilizadas nesses tratamentos podem ser células diferenciadas específicas, isoladas a partir de biópsias, ou células progenitoras que possuam capacidade de se diferenciar no tipo celular de interesse sob condições específicas. De maneira geral, as células são expandidas ou proliferadas em cultura e, após a formação do novo tecido funcional, são re-implantadas no paciente, de maneira que se restabeleçam as funções normais. Muitas das células utilizadas em processos de bioengenharia precisam ser cultivadas em arcabouços tridimensionais para a manutenção do fenótipo característico. Um exemplo de célula que necessita do arcabouço 3D são as células de cartilagem, os condrócitos. Quando essas células são mantidas em monocamada sobre uma placa de cultivo, elas perdem suas formas esféricas características e param de produzir moléculas específicas da matriz cartilaginosa, como colágeno tipo II, e produzem colágeno tipo I, característico de fibroblastos. No entanto, quando cultivados em arcabouços tridimensionais (3D), mantêm seu fenótipo diferenciado (TEMENOFF & MIKOS, 2000).

O arcabouço ou matriz 3D atua como substrato para a adesão, proliferação, migração celular, e também como suporte mecânico para a formação do novo tecido, proporcionando espaço definido e limitado para o desenvolvimento do tecido artificial, induzindo o processo de regeneração do tecido lesado (SHIN *et al.*, 2003; SITTINGER *et al.*, 2004).

Os biomateriais utilizados como arcabouços celulares podem ainda ser utilizados como carreadores de fármacos ou fatores bioativos, que modulam funções celulares específicas (GRIFFITH, 2000; SHIN *et al.*, 2003, LANGER & TIRRELL, 2004). Existem diferentes materiais que estão sendo testados e utilizados para estes fins, mas apenas poucos materiais, como os ácidos poli-láctico (PLLA), poli-glicólico (PGA) e seus copolímeros o ácido poli-co-glicólico-láctico (PLGA), possuem autorização pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em humanos (TEMENOFF & MIKOS, 2000). Estes polímeros vêm sendo testados e utilizados na prática clínica devido a fatores como tempo de degradação, baixo índice de reações inflamatórias e biocompatibilidade (ATHANASIOU *et al.*, 1996; MIDDLETON & TIPTON, 2000; AMBROSE & CLANTON, 2004).

A não necessidade de implantes permanentes vem fazendo com que a utilização de polímeros bioabsorvíveis seja cada vez mais requisitada em diversas aplicações clínicas, principalmente no campo da cirurgia ortopédica e traumatologia, o que inclui reposição óssea, reparação de meniscos, fixação de ligamentos e fixações de fraturas (ROKKANEN *et al.*, 2000; WUISMAN & SMIT, 2006).

A busca por materiais que sejam biocompatíveis, biodegradáveis e que possuam características semelhantes ao tecido tem sido o ponto central de pesquisas em bioengenharia (SHIMAO, 2001). Os poli-ésteres vêm sendo muito utilizados em reparação de tecido ósseo e podem se tornar materiais utilizados rotineiramente em cirurgias ortopédicas, o que inclui a reparação de tendões. Tais dispositivos bioabsorvíveis podem ser utilizados como alternativas para as osteotomias e fixação de fraturas, por exemplo, uma vez que sofrem o processo de degradação ao passo que transferem a tensão gradualmente para o tecido em cicatrização (MIDDLETON & TIPTON, 2000; ROKKANEN *et al.*, 2000; WUISMAN & SMIT, 2006).

A bioengenharia relacionada a tendões e ligamentos é muito insipiente e com poucos bons resultados. Os tendões são estruturas comumente propensas a lesões pelo fato de estarem sujeitos a movimentações repetitivas e processo de degeneração ao longo do tempo. Contudo, as suas propriedades estruturais, mecânicas e organizacionais após a cicatrização são inferiores ao tendão normal, acarretando em baixo rendimento de resposta às tensões e, conseqüentemente, podem ser responsáveis por custos elevados com a saúde (CARPENTER & HANKENSON, 2004; LIN *et al.*, 2004). A bioengenharia tecidual pode se tornar uma forma alternativa de tratamento a diversos tipos de lesões tendíneas com o uso de biomateriais adequados à fisiologia ou às características específicas deste tipo de tecido.

1.2 ESTRUTURA DO TENDÃO

O tendão é definido como um tecido conjuntivo denso modelado, organizado em fibras paralelas de colágeno, que de maneira geral liga um músculo ao osso e forma uma unidade músculo-tendínea. Sua função primária é transmitir cargas de tensão geradas pela contração das células musculares para os ossos, gerando os movimentos (O'BRIEN, 1997; KANNUS, 2000; LIN *et al.*, 2004).

Sob condições normais, os tendões se comportam como estruturas dinâmicas que se adaptam às demandas funcionais do sistema músculo-esquelético e possuem diversas propriedades funcionais e estruturais envolvidas que permitem que as forças aplicadas sejam direcionadas de forma apropriada (LIN *et al.*, 2004).

Os tendões deslizam sobre o osso e geralmente se movem através de canais e bainhas que os ajudam a guiar o seu curso e limitar a quantidade de fricção que os mesmos precisam superar. Dentre as estruturas adjacentes aos tendões que atuam na redução de fricção e auxiliam no deslizamento estão bainhas fibrosas e sinoviais, e as bursas tendíneas (KANNUS, 2000). O ponto de união do tendão com o músculo é denominado junção miotendínea, e o ponto de união com o osso, junção ósteo-tendínea. Nesta, as fibras de colágeno penetram no osso como fibras de Sharpey, responsáveis por ancorar os tendões, os ligamentos e o periósteo ao osso (KIRKENDALL, 1997; BENJAMIN *et al.*, 2002). Esta junção envolve uma transição gradual do tendão para fibrocartilagem e posteriormente para osso lamelar. Poucos vasos cruzam o osso para a junção com o tendão. A junção miotendínea representa a área entre o músculo e o tendão e está sujeita a um grande estresse mecânico durante a transmissão de força muscular contrátil ao tendão. É considerada como a lâmina de crescimento do músculo, por conter células que podem prolongar-se rapidamente e depositar colágeno. É uma área complexa que contém aparelho de Golgi, retículo rugoso e receptores nervosos abundantes (O'BRIEN, 1997).

Os tendões saudáveis são de cor branca brilhante e fibroelásticos em textura, com grande resistência às cargas mecânicas. Durante o desenvolvimento, as fibras tendíneas são formadas em resposta a trações exercidas em um determinado sentido, orientadas de modo a oferecer o máximo de resistência às forças que normalmente atuam sobre o tecido. Macroscopicamente, os tendões podem ter diferentes morfologias e variar consideravelmente em forma e modo como são unidos ao osso. Compreendem desde tendões largos e achatados a tendões cilíndricos, em forma de leque e em forma de fita (KANNUS, 2000). A faixa de movimento de uma unidade miotendínea e a força aplicada ao tendão determinam a orientação das fibras em relação ao eixo do mesmo (O'BRIEN, 1997).

Os elementos constituintes do tendão são: as fibras colágenas, elásticas, células e substância fundamental ou matriz extracelular, uma substância viscosa rica em proteoglicanas (O' BRIEN, 1997). O tendão é constituído por camadas: o endotendão, o epitendão e o paratendão. O tendão é inteiramente coberto por uma fina camada de tecido conjuntivo, o epitendão. A superfície interna do epitendão é contínua com o endotendão, que se liga ao colágeno e contém o suprimento vascular, linfático e neural (Figura 1). Mais superficialmente, em muitos tendões, o epitendão é envolvido pelo paratendão, tecido conjuntivo frouxo, formado essencialmente por fibrilas de colágeno tipo I e tipo III, algumas fibrilas elásticas e um revestimento interno de células sinoviais. O paratendão tem a função de possibilitar o livre movimento do tendão entre os tecidos circunvizinhos. Em alguns tendões em que não há uma bainha sinovial de fato, pode haver a presença do paratendão com o objetivo de reduzir a fricção (KANNUS, 2000; LIN *et al.*, 2004). A presença de fibras elásticas no paratendão permite o estiramento especialmente em tendões que se movem ao longo de trajetórias em linha reta. Juntos, o paratendão e o epitendão são, às vezes, chamados de peritendão (KIRKENDALL, 1997). O epitendão é uma rede de colágeno fibrilar relativamente densa com filamentos de 8-10 nm em espessura. Esta rede pode conter fibrilas longitudinais, oblíquas e transversais. Superficialmente, o epitendão é contínuo com o paratendão e na sua superfície interna com o endotendão. Dentro do tendão, o endotendão é uma fina rede reticular de tecido conjuntivo que reveste cada fibra de tendão e une fibras individuais em feixes de fibras maiores. Esse arranjo do paratendão, epitendão e endotendão proporcionam mínima resistência ao movimento deslizante através dos tecidos e precisa ser preservado para manter a função do tendão (JOZSA *et al.*, 1991; KANNUS, 2000). As propriedades mecânicas do tendão são dependentes de um número de fatores que incluem: a orientação, diâmetro e comprimento das fibrilas e fibras, além do conteúdo da matriz interfibrilar. Os segmentos de fibrila são montados em canais extracelulares definidos pelos fibroblastos que crescem pela adição de colágeno em suas extremidades (BIRK *et al.*, 1997).

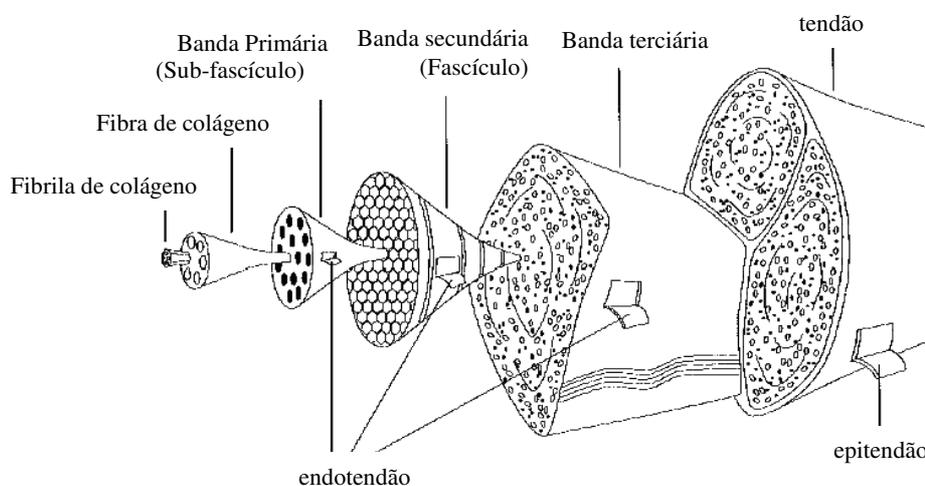


Figura 1 - Estrutura organizacional do tendão (KIRKENDALL, 1997).

1.3 COMPONENTES DO TENDÃO: CÉLULAS E MATRIZ

1.3.1. Células

A componente celular do tendão compreende poucas células, sendo que o principal tipo de célula encontrado é o fibroblasto, também chamados de tenoblastos, que podem ter diferentes funções em um mesmo tendão. Podem funcionar como fibroblastos modificados com capacidade para reparar uma laceração ou mesmo uma lesão por compressão (O'BRIEN, 1997). Os fibroblastos são caracterizados como células alongadas ou estreladas, geralmente encontradas entre os feixes de colágeno, com longas extensões citoplasmáticas afiladas. Eles possuem um núcleo fino achatado e podem ser altamente móveis e proliferativos. Possuem o retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, em que os polipeptídeos precursores de colágeno, a elastina, e parte das proteoglicanas e glicoproteínas são sintetizados (O' BRIEN, 1997; TUIE *et al.*, 1997; SANTANDER *et al.*, 1999). Os tenoblastos são células de tendão imaturas, e ao passo que maturam, os tenoblastos se alongam e se transformam em tenócitos, se tornando os responsáveis pela produção de colágeno do tendão e sua matriz. O tenócito possui forma cilíndrica capaz de produzir os precursores da matriz, colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas. Quando existem poucos tenócitos, há uma substância fundamental abundante e alguma elastina (KIRKENDALL, 1997). Dentro da rede de matriz extracelular, os tenoblastos e os tenócitos constituem cerca de 90% a 95% dos elementos celulares dos tendões (KANNUS & JOZSA, 1991).

Os tenócitos possuem uma relação núcleo-citoplasma menor quando comparados aos tenoblastos, com atividade metabólica diminuída. Os 5% a 10% de remanescentes dos elementos celulares consistem em condrócitos na ligação com o osso e sítios de inserção, células sinoviais da bainha do tendão, e células vasculares, incluindo células endoteliais capilares e células de músculo liso das arteríolas (KANNUS & JOZSA, 1991).

1.3.2 Matriz extracelular

A matriz extracelular do tendão é constituída na sua maioria de proteínas colágenos (principalmente tipo I), proteoglicanos e elastina embebidos em uma substância fundamental, sendo a massa seca distribuída nestes em 85%, 1-5% e 2%, respectivamente. Estes elementos são produzidos pelos tenoblastos e tenócitos e são organizados em um esquema hierárquico complexo para formar o tendão propriamente dito (KIRKENDALL, 1997; O'BRIEN, 1997; KANNUS, 2000; LIN *et al.*, 2004). A substância fundamental da matriz extracelular representa um gel salino vital que proporciona as propriedades viscoelásticas para o tendão além de lubrificação e espaçamento

das fibras, o que é essencial para o deslizamento e interações entre os tecidos. Ela envolve as fibras de colágeno e possui uma viscosidade elevada que proporciona um suporte estrutural e um meio propício para a difusão de gases e nutrientes. A água contribui de 60 a 80% da massa úmida do tendão. A matriz é constantemente modificada e remodelada pelos fibroblastos e pelas enzimas de degradação como as colagenases, proteoglicanases e glicosaminoglicanases (O'BRIEN, 1997).

O colágeno é responsável pela integridade estrutural do tendão, enquanto que a elastina é responsável por sua flexibilidade (O'BRIEN, 1997; TUIE *et al.*, 1997). A formação do colágeno será detalhada mais adiante. A molécula de elastina (tropoelastina) faz parte do grupo das proteínas elastoméricas com alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, geralmente é menor do que 1 µm em comprimento, não tem periodicidade e requer coloração especial para ser observada. A elastina não contém muita hidroxiprolina ou lisina, porém é rica em glicina e prolina. Ela contém uma grande quantidade de valina, desmosina e isodesmosina, que formam ligações cruzadas entre os polipeptídeos. A elastina se alonga, enquanto que as fibras de colágeno tendem a deslizar umas sobre as outras. Pode, em alguns momentos, alongar-se em até 70% do seu comprimento inicial, sem se romper. Geralmente se rompe a 150%, diferente do colágeno que pode alongar-se somente 4% antes do rompimento (O'BRIEN, 1997; SCOTT, 2003).

A tropoelastina se agrega às fibrilas de colágeno e é estabilizada através de ligações cruzadas por um processo dependente da lisil-oxidase, como ocorre com o colágeno (SCOTT, 2003; SMITH & RENNIE, 2007). A elastina é requerida em estruturas que são submetidas a grandes alterações no comprimento na ausência de qualquer mudança em sua estrutura. A elastina e o colágeno agem em conjunto. A resistência da elastina é suplementada e ajustada ao passo que a tensão é aplicada dentro da rede fibrilar de colágeno (SCOTT, 2003).

Outro componente importante da estrutura do tendão são as proteoglicanas (Quadro 1), sendo que sua concentração e disposição dependem de fatores como a idade do organismo, posição e história da carga mecânica aplicada. As proteoglicanas representam uma família diversa de proteínas glicosiladas que contêm numerosas cadeias laterais de polissacarídeos sulfatados, os glicosaminoglicanos ou GAGs (KIRKENDALL, 1997). As proteoglicanas são importantes componentes da matriz extracelular do tendão devido à sua contribuição para as propriedades mecânicas e viscoelásticas do tecido, pois são negativamente carregadas o que faz com que mantenham a água dentro do tecido, e ainda estão envolvidas com interações celulares e intermoleculares (O'BRIEN, 1997; GRAHAM *et al.*, 2000; YOON & HALPER, 2005). Essas moléculas também são fundamentais para a estabilização do sistema colágeno como um todo, para a manutenção da homeostase iônica e fibrilogênese de colágeno (KIRKENDALL, 1997; KANNUS, 2000).

| Proteoglicanas | Cadeias de GAGs (número) | Propriedades e função |
|----------------|---------------------------------|---|
| Decorina | CS/DS (1) CS/DS (1) + KS (1) | Ligação com fibrila de colágeno, inibe fibrilogênese, se liga com TGFβ e EGF. |
| Biglicana | CS/DS (1-2) | Ligação com fibrila de colágeno, ausente em aves. |
| Fibromodulina | KS (4) | Ligação com colágeno tipo I, facilita a formação de fibrilas grandes e maduras, modula a força do tendão. |
| Lumicana | KS (2-3) | Ligação com colágeno tipo I, inibe o tamanho das fibrilas, modula a força do tendão. |
| Agrecana | CS (~100) KS (~60) | Ligação com hialuronana confere resistência, baixas concentrações em regiões de tensão e elevadas nas de compressão do tendão, próximo a fibrocartilagem. |
| Versicana | CS/DS (10-30) | Ligação com hialuronana confere resistência, baixas concentrações em regiões de tensão e elevadas nas de compressão do tendão. Aumenta a viscoelasticidade, mantém a forma celular. |

Quadro 1: Propriedades e composição de GAGs dos proteoglicanas mais encontrados nos tendões.

CS= condroitin-sulfato, DS= dermatan-sulfato, KS= queratan-sulfato. (Yoon & Halper, 2005)

A decorina é a proteoglicana mais abundante no tendão, está intimamente relacionada com o crescimento das fibrilas, pois inibe a formação de fibrilas largas, permitindo que o tecido se adapte e compense forças tensionais. Participa da organização com uma “decoreção” das fibrilas de colágeno em locais discretos que propiciam a união e a maturação das fibrilas (CANTY & KADLER, 2002; SCOTT, 2003). As proteoglicanas de maior peso molecular agrecana e versicana estão presentes nas regiões fibrocartilaginosas do tendão, que são submetidas a cargas compressivas (Quadro1) (KIRKENDALL, 1997).

Podem ainda ser encontradas na matriz extracelular: fibronectina associada às células, proteína oligomérica de cartilagem e colágenos tipo VI, XII e XIV em arranjos microfibrilares (SMITH *et al.*, 2002). A fibronectina é uma glicoproteína extracelular não-colágena de alto peso molecular que atua de forma importante na adesão e migração celular, além de agir como um suporte para a formação de fibras de colágeno durante a fase de remodelação. Ela também está relacionada com a junção, expansão e proliferação de fibroblastos, o que facilita o processo de reparo. Durante uma lesão, a fibronectina pode atuar na organização das fibrilas em feixes de

colágeno e pode atuar como um molde para a formação da fibra de colágeno na fase de remodelação (O'BRIEN, 1997).

O tecido tendíneo e o ligamentoso também possuem outras proteínas como, por exemplo, a tenacina-C. A tenacina-C, outra componente importante da matriz extracelular, é abundante no corpo do tendão e nas junções osteotendinosas e miotendinosas. Ela pode se associar com a fibronectina em resposta à carga mecânica. Seu papel está relacionado com o alinhamento das fibras de colágeno e sua orientação (KANNUS, 2000).

Existem evidências de que a matriz extracelular possa ser um meio de modulação que induza a célula a alterar o seu padrão de síntese protéica em resposta ao uso ou à imposição de uma carga (O'BRIEN, 1997). Uma grande quantidade das propriedades viscoelásticas do tendão é devida a sua substância fundamental. A capacidade das proteoglicanas, glicosaminoglicanas, proteínas do plasma e outras moléculas pequenas de se ligarem à água estabiliza o esqueleto colágeno do tendão. As porções do tendão que suportam as maiores forças de tensão possuem baixo conteúdo de proteoglicanas e níveis elevados de síntese de colágeno, ao contrário das áreas que são submetidas a forças compressivas e de fricção (KIRKENDALL, 1997).

1.4 SÍNTESE DE COLÁGENO E FORMAÇÃO DO TENDÃO

O colágeno representa a proteína mais abundante do organismo humano, sendo que, até o presente momento, já foram identificados 28 tipos (SMITH & RENNIE, 2007). As fibrilas de colágeno são as principais fontes de resistência mecânica e definem a forma dos tecidos e órgãos (CANTY & KADLER, 2002; 2005; SMITH & RENNIE, 2007). A habilidade do colágeno em promover resistência aos tecidos é uma característica importante e está diretamente relacionada à estrutura da molécula. O colágeno fornece ao tendão força tênsil enquanto que a substância fundamental fornece a sustentação estrutural para as fibras colágenas (KHAN *et al.*, 1999).

A maior parte do colágeno encontrado na matriz extracelular é fibrilar e compreende principalmente os tipos I, II, III, V e XI (SMITH & RENNIE, 2007). Nos tendões, ossos e pele, o colágeno tipo I é o principal componente (CANTY & KADLER, 2002; 2005; SMITH & RENNIE, 2007), enquanto que, na cartilagem, as fibrilas são compostas principalmente de colágeno tipo II (CANTY & KADLER, 2002; 2005).

A unidade estrutural do colágeno é o tropocolágeno ou microfibrila, uma proteína longa de 280-300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Em torno de 05 unidades de tropocolágeno são necessárias para formar uma fibrila de colágeno de 20-150 nm de diâmetro (KADLER *et al.*, 1996; O'BRIEN, 1997; CANTY & KADLER, 2005).

A proteína colágeno é distinta das outras por compreender três cadeias polipeptídicas (cadeias- α) enroladas umas nas outras formando uma estrutura única em tripla-hélice. Para as três cadeias formarem uma tripla-hélice, elas precisam do menor aminoácido, a glicina, em cada terceiro resíduo ao longo de cada cadeia. Conseqüentemente, cada uma das três cadeias tem a estrutura Gly-Xaa-Yaa repetida, em que a Xaa e a Yaa podem ser qualquer aminoácido, porém são frequentemente os aminoácidos prolina e hidroxiprolina (KADLER *et al.*, 1996; O'BRIEN, 1997; CANTY & KADLER, 2002; 2005; SMITH & RENNIE, 2007) (Figura 2).

A tripla hélice da molécula de colágeno é composta por duas cadeias $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ organizadas em fibrilas que se unem em fibras, feixes de fibras e fascículos, uma organização que se presume ser a base das propriedades mecânicas dos tendões (KADLER *et al.*, 1996).

A biossíntese da fibrila de colágeno é basicamente um processo de auto-montagem e é controlada por um conjunto de eventos intracelulares e extracelulares (KADLER *et al.*, 1996; BIRK *et al.*, 1997; HOLMES *et al.*, 1998; SANTANDER *et al.*, 1999). Os colágenos tipo I, II, III, V e XI são montados em fibrilas estriadas cruzadas com uma periodicidade D (onde D = 67 nm, a periodicidade axial característica do colágeno) e, coletivamente, são os tipos de colágeno mais abundantes nos vertebrados (KADLER *et al.*, 1996; HOLMES *et al.*, 1998).

As fibrilas de colágeno são sintetizadas como procolágenos solúveis (KADLER *et al.*, 1996). Os pro-peptídeos tornam a molécula de procolágeno solúvel e previnem a formação prematura de colágeno intracelular. Os peptídeos de registro são como um comprimento extra em cada cadeia alfa nas suas terminações N e C e provavelmente asseguram a posição correta de cada cadeia na tripla hélice (O'BRIEN, 1997). O procolágeno é liberado no espaço extracelular através de vesículas secretoras assistidas por microtúbulos e microfilamentos (O'BRIEN, 1997). O procolágeno solúvel, então, é convertido em tropocolágeno insolúvel pela clivagem enzimática específica dos pro-peptídeos terminais através das procolágeno-metaloproteinases. Sem estas enzimas, a síntese de fibrilas de colágeno não ocorreria (KADLER *et al.*, 1996; 2002; HOLMES *et al.*, 1998). As moléculas solúveis formam ligações covalentes cruzadas para criar moléculas insolúveis de colágeno, que se agregam para formar fibrilas de colágeno (O'BRIEN, 1997; KANNUS, 2000). As ligações covalentes entre as moléculas de tropocolágeno reforçam a estrutura fibrilar sob a ação da enzima lisil-oxidase (SMITH & RENNIE, 2007).

Um número de evidências sugere que possam existir duas vias para a biossíntese de fibrilas de colágeno. As moléculas de colágeno secretadas podem ser formadas na matriz extracelular, porém existem evidências de que a formação possa ser iniciada na via secretora e na membrana plasmática, ou seja, através do lúmen do retículo endoplasmático rugoso e vesículas secretoras do aparelho de Golgi, e através do espaço intersticial do citoplasma onde os primeiros filamentos de

procolágeno podem ser observados (SANTANDER *et al.*, 1999; CANTY & KADLER, 2005). A síntese intracelular é mais evidente em fibroblastos ativos como, por exemplo, em situações de regeneração tecidual em que ocorre uma síntese rápida de procolágeno e a formação de fibrilas de colágeno, onde a formação de colágeno excede a sua excreção pelos fibroblastos. Durante uma lesão, a produção massiva de colágeno pode exceder a capacidade de transporte da membrana plasmática, tendo como conseqüência o bloqueio de sua secreção para a matriz extracelular, o que faz com que os precursores de colágeno reúnam-se dentro da célula (SANTANDER *et al.*, 1999).

Um feixe de fibrilas de colágeno forma uma fibra, que é a unidade básica do tendão, visível ao microscópio óptico, e representa a menor unidade do tendão que pode ser testada mecanicamente (O'BRIEN, 1997; KANNUS, 2000).

A formação de tropocolágeno e da matriz extracelular estão intimamente relacionadas. Proteoglicanas da substância fundamental regulam a formação de fibrilas. Quando o tropocolágeno atinge seu tamanho final, o conteúdo de proteoglicanas diminui nos tendões. Uma quantidade adequada de substância fundamental é necessária para a agregação de proteínas colágenas dentro da formação das fibrilas (O'BRIEN, 1997). A interação do colágeno com as proteoglicanas durante a formação de fibrilas de colágeno pode explicar como as células coordenam a montagem fibrilar na matriz extracelular durante a morfogênese do tendão (GRAHAM *et al.*, 2000).

O desenvolvimento sistemático do processo de formação da fibra de colágeno é requerido para a sua integridade estrutural. A arquitetura e estabilidade do tecido, assim como seus atributos mecânicos, são determinados de acordo com a organização das fibrilas de colágeno e com suas interações com a matriz. Durante a maturação do tecido, os segmentos de fibrila podem tornar-se mais longos e espessos, através da incorporação de segmentos de colágeno em suas extremidades, associado à interação com outros componentes da matriz, o que confere a integridade estrutural necessária para a função mecânica (BIRK *et al.*, 1997).

Além disso, é observado que, ao passo que as fibrilas maturam, o crescimento em comprimento da fibrila de colágeno pode ocorrer independentemente do seu diâmetro (HOLMES *et al.*, 1998) e envolve um crescimento regulado e sincronizado de suas extremidades através de um controle celular rigoroso (KADLER *et al.*, 1996). Os pro-peptídeos C e N das moléculas de procolágeno são enzimaticamente clivados por proteinases na matriz extracelular, onde se auto-organizam por meio da polimerização na porção N-terminal e de ligações cruzadas entre os aminoácidos.

Tem sido demonstrado que as moléculas de colágeno dentro das fibrilas podem ser organizadas em uma de duas orientações moleculares. As fibrilas jovens em desenvolvimento podem ser unipolares, ou seja, com um terminal N e um terminal C, em que as moléculas são

orientadas em uma direção ao longo do eixo da fibrila, ou bipolares, ou seja, com duas terminações N (KADLER *et al.*, 1996, HOLMES *et al.*, 1998; GRAHAM *et al.*, 2000). O crescimento da fibrila de colágeno pode ocorrer pela adição, assim como pela fusão ponta a ponta de fibrilas de colágeno na matriz extracelular (GRAHAM *et al.*, 2000).

As fibrilas de colágeno são estruturas filamentosas, longas e quase cristalinas, que estabilizam os tecidos. As fibras de colágeno compreendem fibrilas finas, onde os fibroblastos encontram-se localizados centralmente. Os grupos de fibras são arranjados em um fascículo e cada tendão é então composto por múltiplos fascículos (KIRKENDALL, 1997; KANNUS 2000). O colágeno é organizado em níveis hierárquicos de complexidade crescente a iniciar por: moléculas solúveis de procolágeno que, através de ligações cruzadas, formam as moléculas de tropocolágeno insolúveis, que então se agregam progressivamente para formar microfibrilas de colágeno e, posteriormente, fibrilas de colágeno. Um feixe de fibrilas de colágeno forma uma fibra de colágeno que é a unidade básica do tendão. Um feixe de fibras de colágeno forma o feixe de fibras primário (subfascículo). Um grupo de feixes primários forma um feixe de fibras secundário (fascículo) e um grupo de fascículos secundários, por sua vez, forma um feixe terciário, e os feixes terciários compõem o tendão propriamente dito, envolto pelo epitendão (JOSZA & KANNUS, 1991; KANNUS, 2000) (Figuras 1 e 2).

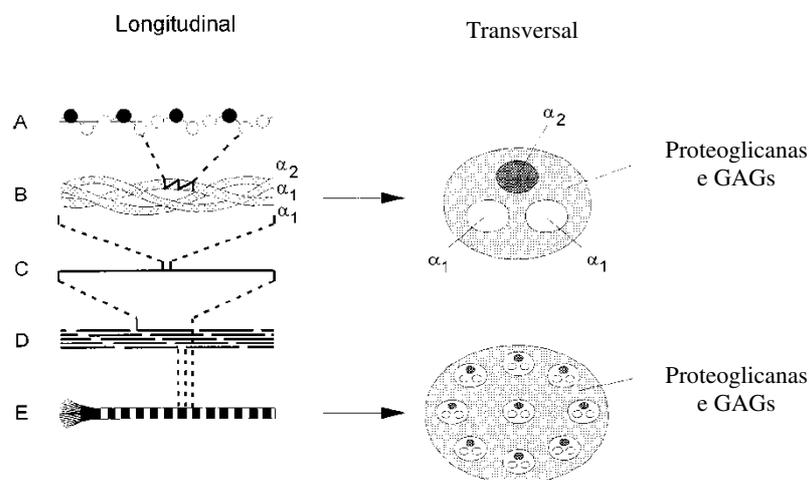


Figura 2: Formação da fibrila de colágeno tipo I. A = Aminoácidos se unem para formar uma cadeia α . A glicina ocupa toda terceira posição (círculos pretos). B e C = Três cadeias α para formar a tripla hélice de uma molécula de colágeno. As cadeias α são envoltas por uma fina camada de proteoglicanas e glicosaminoglicanas. D = As moléculas de colágeno se ligam para formar a molécula de tropocolágeno ou microfibrila. Dentro da microfibrila, as moléculas de colágeno se agrupam em uma orientação seqüencial, o que produz o padrão estriado característico da fibrila de colágeno. E = A fibrila estriada de colágeno. (fonte: KANNUS, 2000)

No tendão, embora as fibras de colágeno sejam orientadas principalmente longitudinalmente em relação ao maior eixo, as fibras também podem percorrer o tendão transversalmente e horizontalmente, de maneira a formar espirais e dobras (JOSZA & KANNUS, 1991).

1.5 SUPORTE VASCULAR DO TENDÃO

O tendão patelar é circundado por tecidos epitendinosos bem vascularizados e por tecidos retinaculares (DOSCHAK *et al.*, 2001). Os tendões maduros são pobremente vascularizados, enquanto que, durante o desenvolvimento, apresentam-se altamente celulares e metabolicamente ativos e são deste modo, supridos por uma rica rede capilar (DOSCHAK *et al.*, 2001; FENWICK *et al.*, 2002). Como qualquer outro tecido conjuntivo, o tendão não é submetido a uma neovascularização sob circunstâncias normais (FENWICK *et al.*, 2002).

O suprimento vascular do tendão tem demonstrado emergir de três áreas distintas: junção miotendínea; junção ósteo-tendínea e vasos de vários tecidos circunvizinhos como paratendão. Os vasos sanguíneos são geralmente arranjados longitudinalmente dentro do tendão e passam ao redor dos feixes de fibras de colágeno no endotendão (KIRKENDALL, 1997; O'BRIEN, 1997; FENWICK *et al.*, 2002). O principal suprimento sanguíneo da porção média do tendão é através do paratendão. Os pequenos vasos sanguíneos no paratendão correm transversalmente em direção ao tendão e se ramificam por diversas vezes. Os vasos penetram no tendão ao longo do endotendão (O'BRIEN, 1997).

Os diferentes tendões existentes podem apresentar diferenças significativas entre o padrão de suprimento vascular dos mesmos. Existem também diferenças entre os tendões 'cilíndricos', como o tendão de Aquiles e manguito rotador, e os tendões 'planos', como o tendão patelar. Um número de tendões como o supraespinhoso, o bíceps, o tibial posterior, o tendão de Aquiles e o tendão patelar parecem ter regiões de vascularidade reduzida (FENWICK *et al.*, 2002).

As zonas mais avasculares podem estar comumente associadas com a degeneração e a ruptura, embora não exista uma evidência direta que possa sugerir a hipovascularidade como uma causa primária de ruptura de tendões. A falta de penetração de vasos para estas áreas pode ser devido a fatores extrínsecos como, por exemplo, as regiões submetidas a compressão. Provavelmente, uma combinação de fatores é responsável pela predisposição de um tendão à degeneração e/ou ruptura (FENWICK *et al.*, 2002).

1.6 LESÃO E REPARO DE TENDÃO PATELAR

Os tendões são estruturas comumente susceptíveis a lesões (KHAN *et al.*, 1999; KOOB, 2002). Como os tendões estão sujeitos a movimentações repetitivas que podem induzir a degeneração ao longo do tempo, uma predisposição a lesões agudas e crônicas é muito comum (KHAN *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2004). Estas lesões não são apenas responsáveis pelos altos custos com a saúde, mas também, resultam em perda de tempo no trabalho e em morbidade individual. As medicinas humana e veterinária têm mostrado que a maior incidência de lesão ocorre durante atividades esportivas pela carga excessiva sobre tendões e ligamentos. Contudo, antes que técnicas de reparo e reposições protéticas possam ser aperfeiçoadas, é essencial que a mecânica funcional e morfologia dos tecidos sejam avaliadas (GOODSHIP *et al.*, 1985).

As lesões que afetam os tendões variam entre inflamações ou tendinites relativamente suaves ou agudas, inflamações crônicas e repetitivas, até mesmo a uma transecção ou laceração completa. As desordens tendíneas geralmente são tratadas pela redução da inflamação, através da restauração da flexibilidade e, se necessário, um reparo cirúrgico. Embora existam tratamentos médicos para a maioria destas condições, esforços contínuos são realizados com o objetivo de melhorar a efetividade dos tratamentos e posterior reabilitação. As rupturas ocorrem devido a elevadas cargas instantâneas, especialmente em ‘atletas de fim de semana’ com treinamento insuficiente, ou a movimentos intensos exercidos em longo prazo. Dor, edema e perda de função geralmente seguem para uma ruptura. Se não reparado pela restrição à mobilização ou cirurgia, perdas permanentes e debilitantes da função são inevitáveis (KOOB, 2002).

Após o aparecimento da lesão, o processo de cicatrização nos tendões resulta na formação de uma cicatriz fibrótica desorganizada que é distinguível por picos específicos em uma cascata de eventos celulares e bioquímicos. Geralmente, o conteúdo da matriz extracelular, bem como a fisiologia e a ultraestrutura dos tenócitos são alterados nestas lesões. As propriedades estruturais e mecânicas do tendão cicatrizado são inferiores às do tendão normal, o que acarreta em baixo rendimento de resposta às forças de tensão e compressão. Embora tais propriedades melhorem com o tempo, não retornam aos níveis normais mesmo após longos períodos, e estes locais podem se tornar mais frágeis, com possibilidade de nova lesão (LIN *et al.*, 2004).

A reconstrução do ligamento cruzado anterior com enxerto autólogo de tendão patelar, por exemplo, geralmente produz efeitos satisfatórios em termos de estabilidade e recuperação funcional. Contudo, não pode ser negado que a técnica cirúrgica envolva morbidade no sítio de coleta e cause alterações funcionais do mecanismo extensor do joelho, o que pode ocasionar fraqueza de quadríceps e dor patelo-femoral. A remoção do terço central do tendão patelar pode reduzir as suas propriedades mecânicas em quase a metade (MILANO *et al.*, 2001).

Existem evidências de que o reparo do tendão pode ocorrer tanto através de uma via intrínseca através de tenócitos do epitendão e endotendão, quanto de uma via extrínseca pela invasão de células da bainha circunvizinha e sinóvia (FENWICK *et al.*, 2002).

Como resultado de uma lesão no tendão, geralmente há uma dificuldade em se restabelecer a continuidade das fibras de colágeno e restaurar a superfície de deslizamento do tendão. O obstáculo se dá ao se tentar restaurar a força normal e a extensão de movimento ao mesmo tempo em que adesões são minimizadas e a cicatriz protegida de rupturas e lacunas no sítio de reparo do tendão. Enquanto as adesões podem contribuir para o reparo, cicatrização excessiva pode levar a uma ruptura prematura do sítio de lesão. Sendo assim, uma combinação de fatores devem ser simultaneamente balanceados a fim de se alcançar um tendão reparado funcionalmente (LIN *et al.*, 2004).

1.7 BIOMATERIAIS

O termo biomaterial pode ser caracterizado por materiais derivados de fontes biológicas ou sintéticas, que podem ser utilizados para terapias em humanos ou animais para a reconstrução, substituição ou reparação de tecidos lesionados (PEPPAS & LANGER, 1994; GRIFFITH, 2000; ALSBERG *et al.*, 2002; SHIN *et al.*, 2003). A escolha do biomaterial ideal é de fundamental importância para o sucesso do tratamento. Fatores como a composição química, biocompatibilidade, mecanismo, produto e tempo de degradação, propriedades mecânicas e forma de apresentação (gel, membrana ou arcabouço) devem ser previamente conhecidos para escolha do biomaterial adequado a cada tipo de tecido. De maneira geral, os biomateriais devem ser mais do que biocompatíveis – devem idealmente induzir uma resposta celular adequada. Por isso, o biomaterial deve estimular a adesão e proliferação celular bem como a produção de moléculas específicas do tecido em questão.

Através da utilização de polímeros ou a combinação destes com células, existe a possibilidade do seu uso em pesquisas e ensaios clínicos para o tratamento de pacientes com queimaduras ou úlceras de pele, além da sua utilização em córneas, cartilagens, ossos, implantes dentários, suturas, liberação controlada de fármacos e demais dispositivos médicos (PIETRZAK *et al.*, 1996; GRIFFITH 2000; ALSBERG *et al.*, 2002). Um dos objetivos de tais estudos é a possibilidade de tratar os pacientes de forma minimamente invasiva e com menos dor (SHIN *et al.*, 2003).

Grande número de dispositivos protéticos sintéticos está disponível para a reposição ou substituição de articulações, válvulas aórticas, vasos sanguíneos, ossos, mamas e outros. Entretanto, são poucos os que estão hábeis a recompor completamente todas as complexas funções biológicas

inerentes ao tecido ao longo do tempo (GRIFFITH, 2000). Outras vantagens sobre as técnicas médicas empregadas que reconstituem órgãos ou tecidos lesados resultantes de acidente, trauma ou câncer, como, o transplante autólogo, podem ser limitadas por conta de morbidade do sítio doador e infecção ou dor para os pacientes devido a uma cirurgia secundária (SHIN *et al.*, 2003). Sendo assim, quando a estrutura de um determinado órgão ou tecido não pode ser reparada naturalmente ou por técnicas correntes, uma alternativa que tem se mostrado viável para o restabelecimento das funções normais do paciente é o implante de um biomaterial.

O critério geral para a seleção de um polímero para o uso como biomaterial é equiparar as suas propriedades mecânicas e o tempo de degradação com as necessidades da aplicação. O polímero ideal para uma aplicação deve seguir as seguintes propriedades: não provocar resposta inflamatória drástica; ser metabolizado e absorvido pelo corpo humano; ser processado de forma fácil e ser facilmente esterilizável (MIDDLETON & TIPTON, 2000).

O desenvolvimento de polímeros sintéticos como biomateriais tem contribuído para o sucesso de implantes nos tecidos moles. Estes são confeccionados sob medida devido à moldabilidade, e podem ter forma física variada, como gel para preencher espaços ou cavidades, fibra para materiais de sutura, filme ou membranas, e sólida ou compacta para aplicações em cosmética e ortopedia (GRIFFITH, 2000). Atualmente, existem diversos tipos de implantes ortopédicos disponíveis. Estes dispositivos são produzidos em forma de pinos, parafusos, lâminas, hastes, tachas e suturas e são mais frequentemente produzidos através do uso de PLLA (ácido poli-L-láctico), PGA (ácido poli-glicólico), PDO (ácido poli-dioxanona) ou copolímeros de PLLA ou PGA (AMBROSE & CLANTON, 2004).

Informações sobre a biocompatibilidade, propriedades mecânicas, degradação, receptividade tecidual, especificidade química e outras são de fundamental importância para o desempenho e integração de biomateriais com novos critérios emergentes de estudo, como as interações célula-matriz, os processos de sinalização celular e a biologia de sistemas e desenvolvimento (LANGER & TIRRELL, 2004).

Os polímeros bioabsorvíveis vêm se tornando cada vez mais utilizados como materiais de implante (AMBROSE & CLANTON, 2004). Os polímeros degradáveis são submetidos a uma cisão extensiva da cadeia com o objetivo de formar oligômeros ou monômeros solúveis. A degradação deve prosseguir por um processo biologicamente ativo ou por clivagem hidrolítica passiva com posterior eliminação através dos rins ou outros meios (GRIFFITH, 2000). As vantagens desses implantes sobre os metálicos incluem o estresse reduzido a partir do momento em que a carga é transferida gradualmente ao tecido ao passo que eles degradam (AMBROSE & CLANTON, 2004) e, por conta disso, podem ser removidos do corpo naturalmente durante o processo de cicatrização

normal, não sendo necessária uma segunda cirurgia de remoção (KOH *et al.*, 2002). As desvantagens podem incluir a propriedade mecânica reduzida ou não adequada pelo tempo da reparação, o alto custo e, em alguns casos, uma resposta biológica indesejada (AMBROSE & CLANTON, 2004).

1.7.1 Poliésteres

Os polímeros bioreabsorvíveis são distintos de outros polímeros médicos devido ao fato de serem “programados” a exibir um padrão particular de degradação no corpo (PIETRZAK *et al.*, 1996). Os biomateriais degradáveis mais comumente utilizados são os poliésteres alifáticos que são derivados dos então chamados poli (α -hidroxi ácidos) que são polímeros sintéticos e biodegradáveis como, por exemplo, o ácido poli-láctico e o ácido poli-glicólico (HOLLINGER & LEONG, 1996; GRIFFITH, 2000; MIDDLETON & TIPTON, 2000; AMBROSE & CLANTON, 2004; WUISMAN & SMIT, 2006). A maioria dos dispositivos biodegradáveis são poliésteres compostos de homopolímeros ou copolímeros de lactídeo e glicolídeo (MIDDLETON & TIPTON, 2000).

O que torna os poli α -hidróxi ácidos vantajosos e promissores para a sua aplicação é o fato de serem biocompatíveis e também serem degradados pelo organismo através de vias metabólicas comuns. Esta degradação, por sua vez, se dá pela hidrólise de suas ligações ésteres, o que os tornam instáveis, e os seus subprodutos são absorvidos pelo organismo (WUISMAN & SMIT, 2006).

O padrão de degradação dos polímeros vai depender de muitos fatores que podem afetar o desempenho mecânico e incluem a sua identidade química, estrutura (cristalina ou amorfa) e a natureza do processamento do polímero, além de fatores como a geometria, o sítio de implantação e o método de esterilização, a seleção do monômero, as condições do processo e a presença de aditivos, a solitação mecânica, a massa molar, a morfologia, a porosidade, o pH e outros (PIETRZAK *et al.*, 1996; GRIFFITH, 2000; MIDDLETON & TIPTON, 2000; AMBROSE & CLANTON, 2004).

1.7.2 PLLA

Atualmente, os dispositivos de implantação absorvíveis mais utilizados e atrativos para as aplicações temporárias no campo biomédico são os fabricados com PLLA, devido a sua biocompatibilidade, degradabilidade, propriedades mecânicas, excelente durabilidade em longo prazo e metabolização de seus subprodutos pelo organismo (ATHANASIOU *et al.*, 1996; WUISMAN & SMIT, 2006; WALTON & COTTON, 2007). O PLLA possui autorização do FDA (*Food and Drug Administration*) órgão regulador americano de produtos para saúde, e por esse

motivo pode ser comercializado e utilizado na prática clínica nos Estados Unidos, além também de ser permitido em vários outros países. Em função disto, este polímero tem sido amplamente utilizado na área médica, especialmente a ortopédica, o que inclui parafusos de fixações de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem e menisco e fixação de tendões e ligamentos (SCHWACH & VERT, 1999; ROKKANEN *et al.*, 2000; WALTON & COTTON, 2007).

O ácido poli-láctico foi inicialmente sintetizado em 1932 por CAROTHERS *et al.*, porém somente a partir de 1966 foi demonstrado que o mesmo poderia ser degradado *in vivo*, o que veio a despertar grande interesse para aplicações na área médica (KULKARNI *et al.*, 1966).

A composição básica para a produção de poli-lactídeos é o ácido láctico, uma molécula manufaturada através da fermentação de açúcares (WUISMAN & SMIT, 2006). Um polímero é geralmente nomeado baseado no monômero em que é derivado. Para a síntese do ácido láctico, um dímero cíclico chamado lactídeo é preparado e purificado antes da polimerização (MIDDLETON & TIPTON, 2000). O ácido láctico é caracterizado por ser uma molécula quiral capaz de polarizar a luz para a esquerda (levo) ou para a direita (destro). O ácido láctico, então, pode existir como dois isômeros ópticos denominados de D ou L, para destrógiro (D) e levógiro (L) rotatório, ou por DL para uma mistura racêmica (HOLLINGER & LEONG, 1996). O L-lactídeo é o isômero que ocorre naturalmente, e o DL-lactídeo é a mistura sintética do L-lactídeo e o D-lactídeo (MIDDLETON & TIPTON, 2000). Os seus polímeros são referidos usualmente como PLLA (ácido poli-L-láctico) e PDLA (ácido poli-D-láctico). Quando L-isômeros e D-isômeros são co-polimerizados em proporções equivalentes, um polilactídeo racêmico é formado (WUISMAN & SMIT, 2006). O PLLA é o mais comumente utilizado pelo fato de sua molécula básica estar naturalmente mais disponível (GRIFFITH, 2000; WUISMAN & SMIT, 2006).

Os ácidos lácticos em dímeros cíclicos são unidos por duas cadeias éster; uma é quebrada com o catalizador, que estabiliza a outra. As moléculas resultantes são cadeias de dímeros que posteriormente se unem para formar os polilactídeos ou ácido poli-láctico (Figura 3) (MIDDLETON & TIPTON, 2000; WUISMAN & SMIT, 2006).

Os polímeros podem ser produzidos tanto pela condensação direta do ácido láctico, que gera um produto de baixa massa molar, ou através da reação de polimerização por abertura do anel do dímero cíclico do ácido láctico, técnica mais comum, que gera um polímero de alta massa molar (Figura 4) (MIDDLETON & TIPTON, 2000).

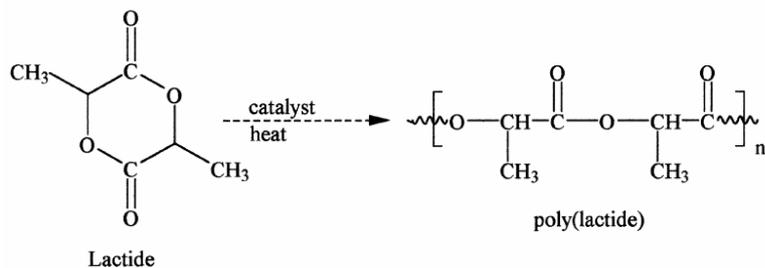


Figura 3: Síntese do ácido poli-láctico.

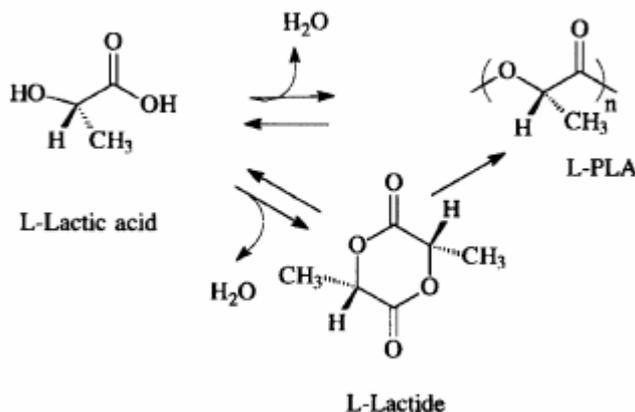


Figura 4: Rotas de polimerização do ácido poli-láctico.

O PLLA é degradado por hidrólise e seus produtos da degradação podem ser metabolizados pelo organismo. O PLLA degrada-se em ácido láctico através da via de-esterificação hidrolítica. O ácido láctico, conseqüentemente, forma o piruvato pela desidrogenase láctica. O piruvato é um produto intermediário das vias metabólicas e pode gerar glicose via glicogênese ou ser metabolizado para formar o CO₂ e água pelo ciclo do ácido cítrico (MAINIL-VARLET *et al.*, 1997).

O PLLA é um polímero semi-cristalino com um ponto de fusão de 175-178°C e uma temperatura de transição vítrea de 60-65°C (MIDDLETON & TIPTON, 2000). Os polímeros como o PLLA cristalizam facilmente devido às suas unidades repetidas simetricamente e devido à sua flexibilidade ao longo da cadeia. A cristalização se inicia em múltiplos pontos ao longo da cadeia ou em impurezas dentro do polímero. As regiões cristalinas em um polímero possuem ligações secundárias mais resistentes entre as cadeias, que dificulta a penetração da água, o que faz com que essas regiões degradem mais lentamente (WUISMAN & SMIT, 2006). A degradação do PLLA tende a ocorrer de forma heterogênea, mais rápida nas regiões amorfas do que nas cristalinas e mais rápida no seu interior do que na sua superfície, devido a uma auto-catálise ácida (MIDDLETON & TIPTON, 2000).

Com exceção do ácido poli-glicólico (PGA), os polímeros, na família dos poliésteres degradáveis, são solúveis em solventes orgânicos comuns e conseqüentemente, podem ser

processados por uma variedade de métodos térmicos e solventes (GRIFFITH, 2000). Um polímero com alta cristalinidade, com todos os outros parâmetros constantes, pode ser mais duro e mais resistente e, conseqüentemente, degradar-se de forma mais lenta. A resistência aumenta com o peso molecular, através da formação de ligações secundárias entre as cadeias e pelos entrelaçamentos na estrutura. A degradação ocorre mais lentamente, porque mais ligações secundárias por cadeia devem ser quebradas (WUISMAN & SMIT, 2006).

A busca pela reabilitação física, assim como pela garantia da qualidade de vida da população, no que diz respeito aos pacientes mais expostos a lesões de tendões, principalmente idosos e jovens que desempenham atividades físicas de grande impacto, tem se tornando cada vez mais crescente. Com este interesse, foi desenvolvido neste trabalho o estudo da aplicação de um biomaterial polimérico, o PLLA, no reparo de lesão parcial tendínea em ratos com o objetivo de diminuir os tempos de regeneração tecidual e acelerar o processo de cicatrização, assim como possibilitar o seu uso no tratamento de lesões tendíneas.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a implantação do poliéster ácido poli-l-láctico como biomaterial para guiar a regeneração de lesão tendínea em ratos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Testar *in vivo* o poliéster ácido poli-l-láctico no processo de reparação de lesão artificial do tipo janela em tendão patelar de ratos jovens.
- Acompanhar os eventos de regeneração tecidual tendínea na presença de PLLA ao longo de 12 semanas sendo permitida a mobilidade do animal modelo.
- Observar os tipos celulares que se aderem ao biomaterial.
- Verificar se existe degradação do PLLA inserido no tendão ao longo de 12 semanas experimentais.

- Caracterizar morfológicamente o processo regenerativo do tendão utilizando a microscopia óptica de campo claro, microscopia de polarização, imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura como ferramentas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BIOMATERIAL - ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO

O poli-éster ácido poli-L-láctico (Sigma) com peso molecular 250 kDa e 70 denier de cristalinidade foi o utilizado. Todo o material foi previamente esterilizado com óxido de etileno e manipulado posteriormente em capela de fluxo laminar. Cada grão do biomaterial foi pesado e dissolvido dentro de microtubos Eppendorf® em solução de 50 µl de clorofórmio P.A. (Merck). Em seguida a solução foi transferida com pipetas Pasteur de vidro para lamínulas de vidro estéreis de 20 mm X 20 mm, e após a evaporação completa do solvente, as membranas foram cortadas com bisturi estéril nas dimensões de 10 mm X 10 mm. Estas foram utilizadas para preenchimento e estabilização da ferida cirúrgica. A espessura se manteve em torno de 0,5 mm de espessura, sendo visualizada por MEV. O PLLA foi mantido aderido a uma lamínula que ficou exposta ao ar por 12 semanas e em seguida foi submetida ao processo de secagem pelo ponto-crítico para verificar se o tempo e/ou a secagem afetariam o aspecto geral do polímero, para poder ser comparado com o polímero que foi mantido no interior da lesão.

3.2 ANIMAIS

Para o desenho experimental, foram utilizados 41 ratos machos da raça *Rattus norvegicus albinus* linhagem Wistar, com idade de 03 meses e peso de 200 ± 50 gramas, com regime de alimentação padrão (ração Purina-Labina) e água *ad libitum*, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Todos os animais foram submetidos a um período de aclimação de 15 dias. Neste período e durante a realização do experimento, foi mantido um regime de luz de 12 horas luz/ 12 horas escuro, com iluminação artificial de lâmpadas fluorescentes, modelo luz do dia, de 40 watts, considerando o período de luz das 7:00 às 19:00 horas. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de 15 X 30 X 45 cm.

3.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram escolhidos de forma aleatória e distribuídos 05 animais para cada grupo, sendo um indivíduo utilizado para o controle geral sem qualquer intervenção (Quadro 2). Os animais do grupo experimental que foram implantados o PLLA foram avaliados em tempos de 2, 4, 8 e 12 semanas, sendo que nos controles respectivos de cada tempo, foram realizadas as lesões em janela, porém não foram implantados os materiais.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 40 mg/Kg de solução de tiopental sódico (Tiopentax®), imobilizados em uma posição de decúbito dorsal, em uma mesa padrão de 40 X 45 cm. Após imobilização, foi realizada a tricotomia em toda a pata posterior esquerda, seguida de antissepsia local com solução aquosa de polivinilpirrolidona a 10%.

O tendão patelar da pata posterior esquerda foi exposto cirurgicamente através de uma incisão longitudinal de aproximadamente 02 cm na região interna da pata. Foi realizada dissecação do tecido subcutâneo. O tendão patelar foi exposto e isolado através de divulsão das estruturas adjacentes. Em seguida, foi realizada uma lesão do tipo janela (marcação prévia em forma de retângulo de 03 mm de comprimento por 02 mm de largura) na porção central do tendão, de maneira que as margens da lesão permanecessem íntegras. Para cada lesão foram utilizadas duas membranas de PLLA. Uma foi inserida para o preenchimento da lesão em janela, e outra envolvendo o tendão na região da lesão de modo a evitar o deslocamento do PLLA de preenchimento. A membrana envolvendo a lesão foi estabilizada com ponto simples com fio de sutura sintético não absorvível tipo nylon 6.0 (Mononylon®). A pele foi suturada com pontos simples com fio de sutura sintético não absorvível tipo nylon 5.0. Após a cirurgia, os animais foram reconduzidos às gaiolas e foi permitida a mobilização livre imediatamente após as cirurgias.

Ao final de 02, 04, 08 e 12 semanas, os tendões com os sítios de lesão foram cirurgicamente retirados, mantendo parte do tecido nativo. Cada tendão foi então dividido com auxílio de uma lâmina de bisturi n° 22, sendo que uma metade foi preparada para microscopia óptica e a outra para eletrônica. Em seguida os animais foram sacrificados através de injeção de dose letal de anestésico.

| | 02 semanas | 04 semanas | 08 semanas | 12 semanas |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Controle com lesão | 05 ratos | 05 ratos | 05 ratos | 05 ratos |
| PLLA | 05 ratos | 05 ratos | 05 ratos | 05 ratos |
| Controle sem lesão | - | - | - | 01 rato |

Quadro 2: Desenho experimental.

3.4 MICROSCOPIA ÓPTICA

As amostras específicas dos tendões com os sítios de lesão foram cirurgicamente e cuidadosamente retiradas, lavadas com soro fisiológico e mantidas esticadas com alfinetes fixando as extremidades do tendão sobre pequena prancha de isopor. As amostras dos grupos controle e os ratos de 12 semanas foram fixados em formol a 10% tamponado, desidratados em etanol e, posteriormente, processados para inclusão em parafina no Laboratório de Histopatologia da FIOCRUZ-BA. Os cortes histológicos com espessura de 6 μm foram feitos com navalha de aço em micrótomo (Leica) e coradas com hematoxilina e eosina (HE). As demais amostras de PLLA mantidas por 02, 04 e 08 semanas foram retiradas e imediatamente imersas em solução de 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ-BA. As amostras foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio tamponado por 40 minutos, seguida por desidratação em séries crescentes de acetona até 100% e infiltradas em resina Polybed 812 para a formação dos blocos.

Os blocos obtidos foram trimados adequadamente e posteriormente levados ao micrótomo (LKB) para a obtenção de cortes semifinos com o auxílio de faca de vidro. Cortes de 0,5 a 2 μm de espessura foram obtidos, depositados sobre as lâminas de vidro, secos em placas aquecedoras e coradas por azul de toluidina a 2 % em ácido acético por cerca de 3 minutos. Depois de secas, as lâminas foram seladas com Entellan (Merck) e observadas ao microscópio óptico Zeiss Axioplan equipado com sistema digital de captura de imagens com câmera CCD Evolution MP Color (Media Cybernetics), adquiridas na resolução de 1024 X 1024 pixels.

3.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Foram utilizados anticorpos primários específicos para elastina (Santa Cruz) e decorina (Santa Cruz) para verificação da expressão destas moléculas nas regiões da lesão com e sem o polímero. As amostras foram removidas dos animais nos períodos estudados e fixadas com 4 % de formaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 2 horas, lavadas no mesmo tampão, infiltradas com sacarose 10 e 20 % por 12 horas cada concentração, transferidas para formas de alumínio preenchidas com OCT (Tissue-TEK) e imersas em nitrogênio líquido para congelamento rápido. Foram feitos crio-cortes em aparelho criostato (Leica) de 10 μm de espessura e transferidos para lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de tampão fosfato salino (PBS) adicionado de albumina 3 % e cloreto de amônio 50 mM por 20 minutos, lavados 2 X de 10 minutos com PBS, incubados com anticorpo primário adicionado de albumina 1 % por 12 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida foram lavados 3 X de 10

minutos com PBS e incubados com anticorpo secundário conjugados com moléculas fluorescentes (FITC para a elastina e TRITC para a decorina) por 2 horas em temperatura ambiente, lavados 3 X de 10 minutos em PBS, e finalmente 2 X de 5 minutos em água destilada. Os cortes foram selados com n-propil-galato e mantidos no freezer até a observação. Os cortes foram observados em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan II equipado com câmera CCD Hamamatsu, com os filtros dicróticos adequados para os fluorocromos. As imagens foram adquiridas na mesma resolução (1024 X 1024 pixels) e nos mesmos tempos de exposição para melhor comparação dos resultados.

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As amostras específicas dos tendões com os sítios de lesão foram cirurgicamente retiradas da mesma forma que o descrito acima nos períodos citados. As amostras foram cuidadosamente lavadas com soro fisiológico e imediatamente imersas em solução de 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio tamponado por 40 minutos, seguida por desidratação em séries crescentes de acetona até 100% e infiltradas em resina do tipo Epon. Os blocos foram trimados e seccionados em ultramicrotomo (RMC) utilizando navalha de diamante (Drukker), sendo os cortes ultra-finos, com espessura de 60 nm, depositados em grades de cobre (300 mesh) e contrastados com 1% de acetato de uranila por 30 minutos e 2% de citrato de chumbo por 1 minuto. As amostras foram observadas no MET Jeol 1200 EX e Zeiss 900, operados a 80 kV.

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras foram cuidadosamente retiradas e lavadas com soro fisiológico e imediatamente imersas em solução de 2,5 % glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 2 horas, foram, então, lavadas 2 X com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 10 minutos, desidratadas em banhos seriados de etanol até 100% e secas em aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 050). Os fragmentos foram transferidos para fita condutora de carbono sobre suportes de alumínio, metalizados com uma fina camada de ouro (20 nm) (Bal-Tec), e observados no Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol 5310, operado a 15 kV.

4. RESULTADOS

Em relação às condições gerais dos animais, todos sobreviveram durante o período experimental de 12 semanas. Além disso, as funções vitais e atividades motoras foram mantidas. Os animais permaneceram em gaiolas individuais, sem imobilização da pata esquerda. Não foram observadas infecções no local da cirurgia no período pós-operatório. Foi observada uma boa reação clínica, com deambulação precoce, limitada apenas por marcha antálgica em média por dois dias, sendo a movimentação normal posteriormente.

Inicialmente, foram realizadas análises por microscopia óptica em parafina no grupo controle, no qual foi apenas feita a lesão em janela sem implantação do polímero PLLA. Os períodos 02, 04 e 08 semanas seguiram os padrões normais de cicatrização já descritas na literatura (dados não mostrados), e preferiu-se nesta dissertação ilustrar apenas o período de 12 semanas da amostra controle. Pôde-se observar nítida diferença histológica entre a região da lesão em janela e o remanescente do tendão intacto (Figs. 5 e 6). A reparação natural do tecido foi evidenciada na região da lesão pela distribuição irregular de células (Fig. 7), diferentemente do tendão intacto. Esta região muito celularizada não possuía organização definida da matriz, isto é, com fibrilas de colágenos em várias direções. Também foi visto tecido adjacente à região da lesão formado por células que variaram de redondas a ovaladas semelhantes à condrócitos, residindo dentro de lacunas com espaço pericelular translúcido e envolto por matriz fibrosa bem corada (Fig. 8). Não foram vistos infiltrados inflamatórios nem tecidos com granulação evidentes.

Nos ratos que receberam os implantes do polímero poli-L-láctico por período de 02 semanas, já se podia observar presença de células aderidas à superfície do mesmo e distribuídas ao longo de toda a lesão em janela. Não foram encontrados infiltrados inflamatórios evidentes, assim como vasos na periferia do polímero nos cortes analisados (Figs. 9, 10 e 11). Além disso, as células que preencheram os espaços entre os polímeros possuíam formatos diversos que variaram desde um aspecto poligonal, fibroblastóide, até o achatado ou ovalado (Figs. 13 e 15). Os núcleos acompanham o formato da célula e puderam indicar o formato das mesmas, já que os limites citoplasmáticos são de difícil visualização pela microscopia óptica. Estas células possivelmente são macrófagos, outras células do sangue e fibroblastos jovens. Também foram observadas células gigantes de corpo estranho aderidas à superfície do polímero (Fig. 15). Os mesmos campos que foram observados e descritos anteriormente foram também visualizados por microscopia de polarização, pois o polímero poli-L-láctico possui propriedade da bi-refringência, o que indicou a localização do mesmo no tecido cicatricial (Figs. 12 e 14).

Após o período de 04 semanas de implantação do biomaterial, houve um aumento relativo do número das células gigantes na periferia dos polímeros nos cortes que foram visualizados (Fig. 16). Observou-se também uma tendência das células em se orientarem mais paralelamente em relação ao eixo mais longo do polímero (Fig. 17).

A análise da região da lesão em janela com o implante do polímero após 12 semanas demonstrou uma tendência à diminuição do número de células de múltiplos formatos na matriz extracelular, assim como à orientação das células remanescentes de forma paralela e alongada em relação à superfície dos polímeros (Fig. 18). Foram encontrados polímeros circundados por um grande número de células de morfologia achatada, fibroblastóide ou fusiforme (Fig. 20 e 22). Foram observadas células paralelas entre si, na mesma direção que a orientação das células do tecido intacto. Observou-se também a presença de vasos sanguíneos e células gigantes na periferia do polímero. As mesmas regiões foram observadas por microscopia de polarização para identificar a presença do polímero (Figs. 19, 21 e 23). Em maior aumento, as células apresentavam-se em íntimo contato com a superfície do polímero (Fig. 24). Em outros cortes semi-finos estudados do período de 12 semanas, a orientação dos fibroblastos encontrados entre os polímeros no tecido cicatricial foi a mesma das células do tecido intacto (Fig. 25). Estes fibroblastos possuíam núcleos bem achatados ou pavimentosos, e eram mais semelhantes a células maduras do tendão do que aquelas encontradas nos períodos iniciais de regeneração (Fig. 26). Células com morfologia poligonal e núcleos arredondados semelhantes a macrófagos, assim como células gigantes de corpo estranho aderidas aos polímeros, estavam presentes (Fig. 26 e 27). Foram observadas estruturas elipsóides coradas pela eosina localizadas entre as células e a superfície do polímero, como se fossem grandes vesículas liberadas na direção do polímero (Fig. 27).

Decorina e elastina, moléculas importantes na fisiologia do tendão, foram estudadas por imunofluorescência nos ratos controle submetidos à lesão em janela, mas sem a implantação do polímero, além dos ratos com a lesão artificial preenchida com o polímero. Após 08 semanas, em ratos lesionados sem a implantação do polímero, foram observadas grandes quantidade de células, com seus núcleos marcados com DAPI, agrupadas sem organização, como visto anteriormente no campo claro, e com marcação para decorina difusa e de baixa intensidade (Figs. 28 e 29). Para elastina em tendão sem o polímero, a marcação também foi difusa e fraca (Figs. 30 e 31). No tendão intacto, a marcação para decorina foi dispersa e fraca entre as fibras de colágeno (Figs. 32 e 33), e para elastina, mesmo fraca, percebe-se uma marcação paralela às fibras de colágeno (Figs. 34 e 35).

Já nas amostras de tecidos removidos dos ratos com lesão preenchida com polímero de PLLA, a microscopia de fluorescência mostrou que, após 08 semanas, a marcação para decorina foi positiva e se mostrou mais intensa do que a da amostra controle (Figs. 36 e 37). O estudo para localização da elastina mostrou que esta foi mais intensa do que no controle sem polímero (Figs. 38,

39 e 40). Todos os controles de reação da marcação com os anticorpos utilizando somente o anticorpo secundário foram negativos (dados não mostrados).

Com o objetivo de acompanhar o processo de degradação, o polímero recém preparado sobre lamínulas foi avaliado por MEV antes da implantação *in vivo*. A membrana de PLLA possuía uma superfície com rugosidade homogênea e pouco evidente (Figs. 41 e 42). Não foram observados poros ou buracos na membrana, nem grânulos que indicassem uma dissolução incompleta do polímero pelo clorofórmio. O PLLA foi deixado aderido a uma lamínula que ficou exposta ao ar por 12 semanas e em seguida foi submetida ao processo de secagem pelo ponto-crítico para verificar se o tempo e/ou a secagem afetariam o aspecto geral do polímero. Não foi observada diferença para a amostra inicial na lamínula (Fig. 43).

Após 4 semanas de permanência dos polímeros *in vivo*, ao serem avaliados por MEV, foram observadas células aderidas ao polímero em meio a material de matriz extracelular, tais como aquelas descritas anteriormente pela microscopia óptica, com a presença de matriz caracteristicamente fibrilar (Figs. 44 e 45). Poros na superfície exposta indicando sinais de início de degradação foram observados, quando comparado com o polímero íntegro que possuía superfície mais compacta (Figs. 46 e 47). Mas em outras regiões, o PLLA apresentou uma rugosidade suave e menor quantidade de poros, com regiões praticamente intactas, além de alguns indícios de formação de concavidades (Fig. 48). A Figura 49 mostra uma imagem de MEV em maior aumento mostrando denso material fibroso entrelaçado próximo à superfície do polímero, possivelmente colágeno.

Após o período de 8 semanas de implantação do polímero, pôde-se observar por MEV a presença de tecido cicatricial recobrando o mesmo (Figs. 50 e 51). Células na superfície com presença de preenchimento de material de matriz também foram encontradas adjacentes ao polímero (Fig. 52). Em relação à degradação, foi visto que a superfície manteve as suas porosidades, porém com uma rugosidade superficial aumentada, quando comparada ao período de 4 semanas (Fig. 53).

Quando as amostras experimentais de tendão patelar foram estudadas por microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar com mais detalhes a ultraestrutura das células aderidas ao polímero e nas adjacências. Após 2 semanas de implantação, foram observadas algumas camadas de células alongadas com núcleos achatados (Fig. 54). Estas células possuíam retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e núcleos eucromáticos. Numerosas estruturas esféricas eletrondensas foram observadas na interface entre o polímero e a primeira camada de células, como se fossem liberados por estas células (Fig. 55). Quando regiões mais internas foram observadas, uma maior diversidade de células com matriz extracelular intercalada com delicadas fibrilas de colágeno estava presente (Fig. 56). A Figura 57 é referente à outra região mais interna da lesão que mostra células com diversos pseudópodos, provavelmente macrófagos, além de célula com diversos

grânulos citoplasmáticos densos semelhantes a um mastócito. Estes macrófagos com numerosos lisossomos e projeções da membrana plasmática foram observados com maior frequência próximos ao PLLA implantado por 2 semanas (Figs. 58 e 59).

As imagens de MET de cortes ultra-finos do material de 04 semanas mostraram que o polímero tinha um aspecto de rede, com camadas de fibroblastos aderidos à sua superfície e intercalados por matriz extracelular (Fig. 60). Também foram observadas células com outras morfologias e com núcleos arredondados (Fig. 61). Grande quantidade de material esférico ou globoso eletrondenso de diferentes diâmetros foi observado adjacente à superfície do PLLA (Fig. 62), material que poderia corresponder às estruturas observadas nas Figuras 26 e 27. A Figura 63 mostra células encontradas numa região mais interna à lesão, distante do polímero, com a presença de um eosinófilo com seus grânulos característicos. Já a Figura 64 mostra um detalhe de um fibroblasto próximo ao polímero (não visualizado) com retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, núcleo eucromático e pequenas vesículas exocitadas possivelmente com pró-colágeno.

Após 8 semanas de implantação do polímero, as células aderidas apresentavam formato bem alongado, correspondendo possivelmente a fibroblastos mais maduros, intercalados com matriz extracelular (Fig. 65). Mesmo não estando o polímero em estágio avançado de degradação, algumas células aderidas à superfície tiveram parte de seu citoplasma invadindo o polímero (Fig. 66). Macrófagos (Fig. 67) e fibroblastos com estruturas esféricas nas imediações foram observados por MET em 8 semanas (Fig. 68). A Figura 69 mostra uma vênula, com células do sangue em seu interior, em meio à matriz fibrosa com células alongadas numa região próxima ao polímero. Células gigantes de corpo estranho, com vários núcleos e rico material citoplasmático, principalmente retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, foram também visualizadas na periferia do polímero (Fig. 70).

4.1 PRANCHAS

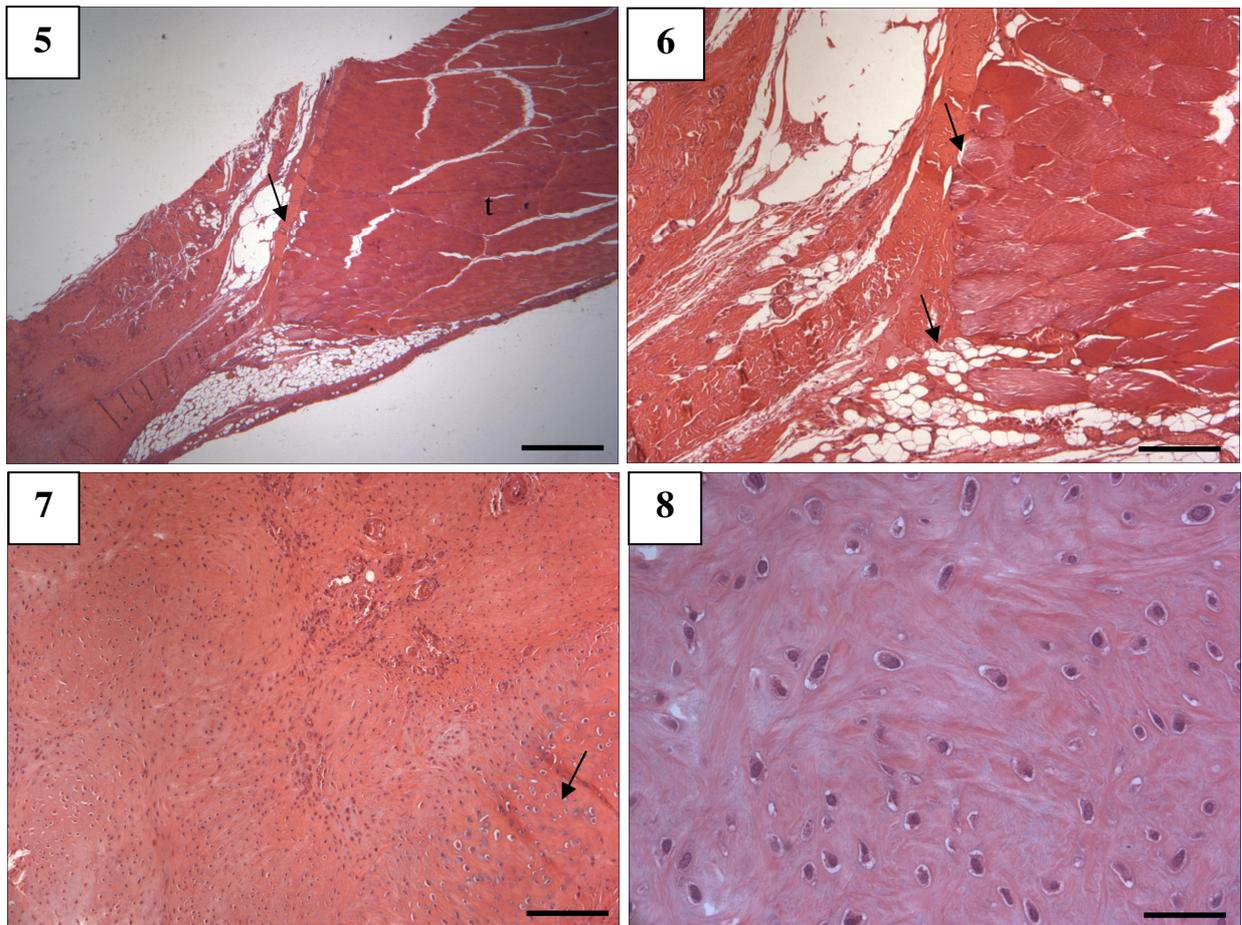


Figura 5: Baixo aumento da região de interface (seta) entre lesão do tendão e tecido intacto (t).
Barra = 100 μ m.

Figura 6: Maior aumento da região de interface (setas) da lesão com tendão intacto após 12 semanas. Barra = 100 μ m.

Figura 7: Imagem do tecido cicatricial formado na região da lesão em janela. Grande número de células com distribuição irregular não acompanhando a orientação das fibras de colágeno do tendão intacto. Parte da imagem possui tecido distinto (seta) da maioria semelhante à fibrocartilagem. Barra = 100 μ m.

Figura 8: Presença de tecido diferenciado com células arredondadas dentro de lacunas com pequeno espaço pericelular, sugerindo uma cartilagem fibrosa. Matriz não organizada rica em fibras de colágeno bem coradas. Barra = 50 μ m.

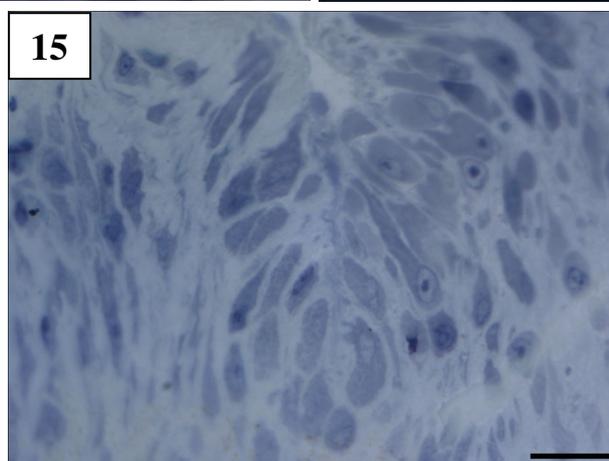
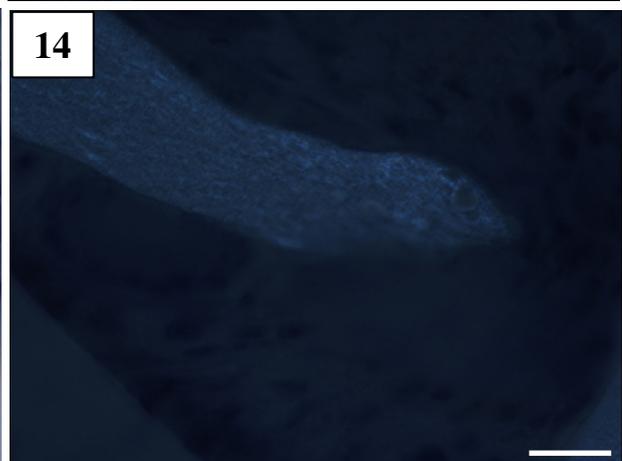
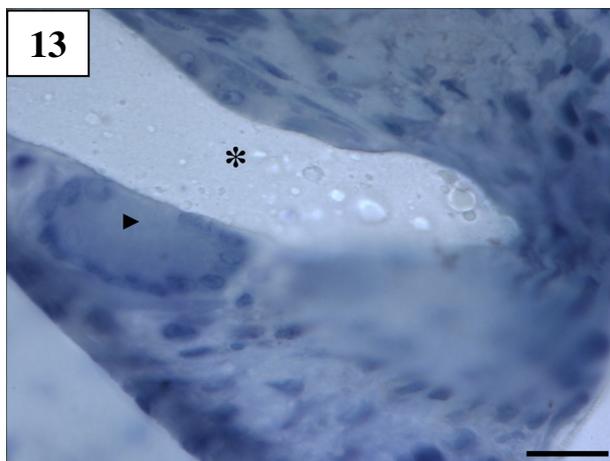
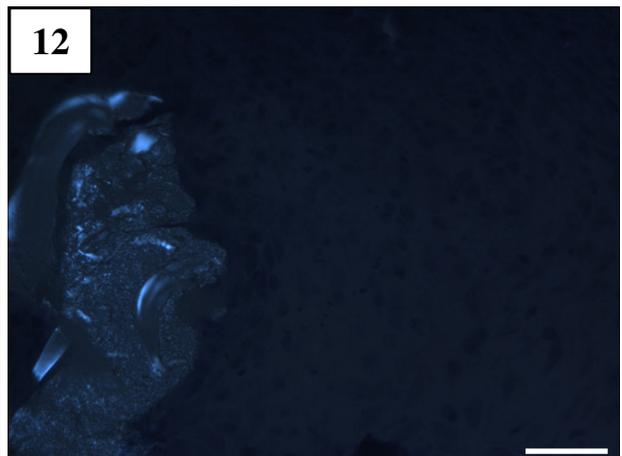
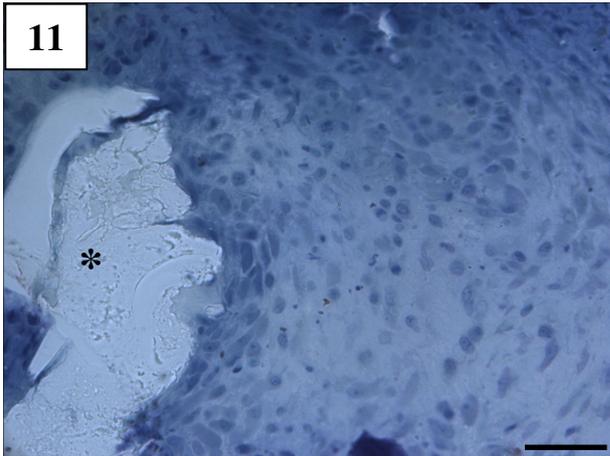
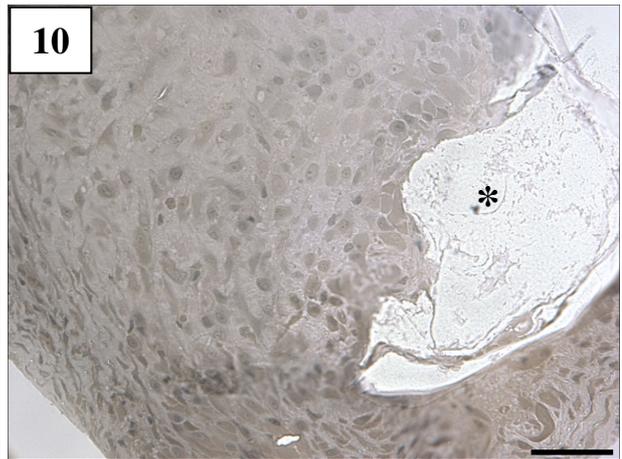
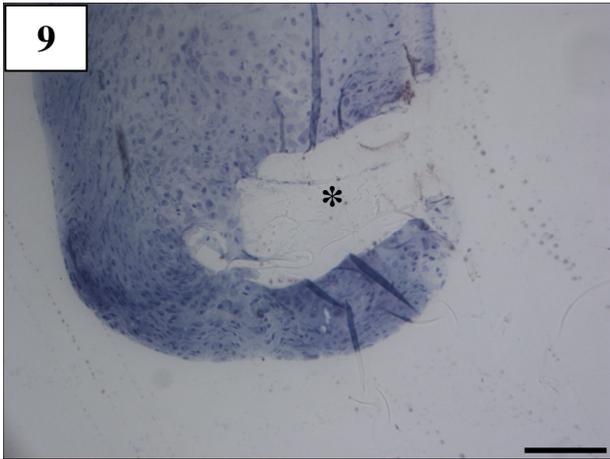


Figura 9: Baixo aumento. Presença de células preenchendo a área na lesão envolta do PLLA (*). Ausência de vasos e infiltrados inflamatórios na periferia do polímero. Formatos dos núcleos variando de achatados a arredondados e ovalados, acompanhando a morfologia da célula. Coloração azul de toluidina. Barra = 200 μm .

Figuras 10: As células adjacentes ao polímero (*) possuem formato poligonal, possivelmente macrófagos, células do sangue e fibroblastos jovens recrutados para participar da cicatrização. Coloração azul de toluidina. Barra = 100 μm .

Figura 11: Região com presença de polímero (*) com células em sua periferia e preenchendo outras regiões. Ausência de infiltrado inflamatório. Coloração azul de toluidina. Barra = 100 μm .

Figura 12: Mesma região da imagem da figura 7 observada por microscopia de polarização (o material refringente indica a localização do polímero).

Figura 13: Célula gigante multinucleada (cabeça de seta) na superfície do polímero (*). 02 semanas. Coloração azul de toluidina. Barra = 30 μm .

Figura 14: Mesma imagem anterior observada por microscopia de polarização.

Figura 15: Região mais distante do polímero onde se observam células com diferentes formatos, que variaram de fibroblastóides a arredondadas. Coloração azul de toluidina. Barra = 30 μm .

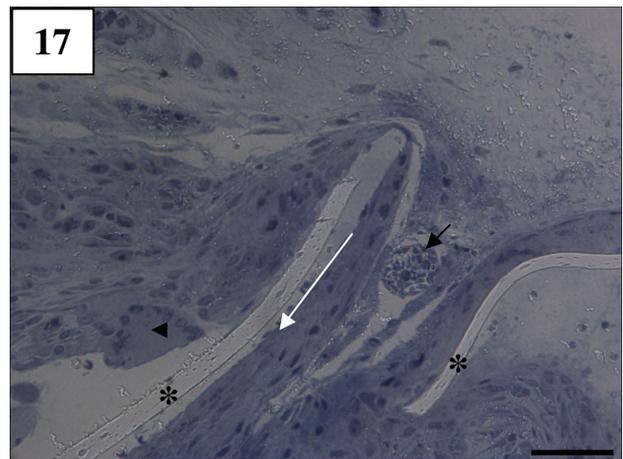
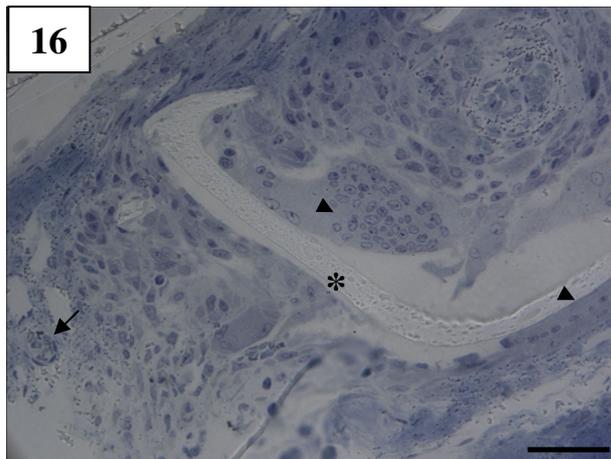


Figura 16: Vista da região da lesão com o PLLA após 04 semanas. Observam-se células gigantes (cabeças de setas) com numerosos núcleos e um volume celular grande, sempre na periferia dos polímeros (*). As células não possuem uma organização bem definida. Presença de vasos sanguíneos (setas). Coloração azul de toluidina. Barra = 100 μ m.

Figura 17: Polímero com células fibroblastóides aderidas onde o formato da célula e os núcleos acompanham paralelamente a direção do eixo mais longo do PLLA (seta branca). Um vaso pode ser visto (seta escura). Coloração azul de toluidina. Barra = 100 μ m.

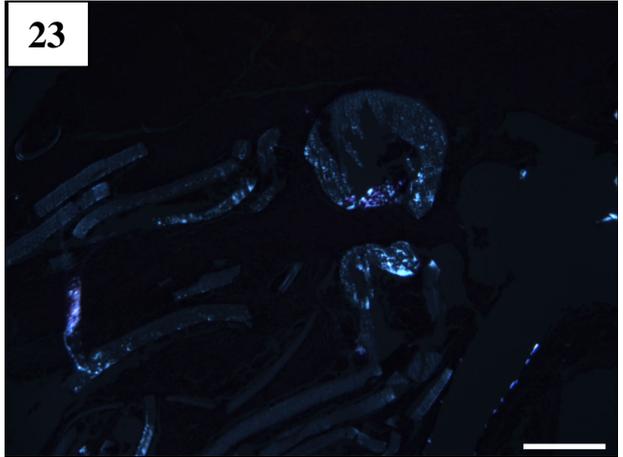
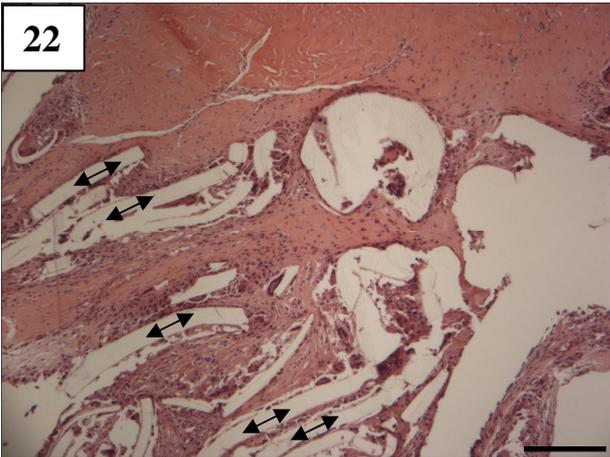
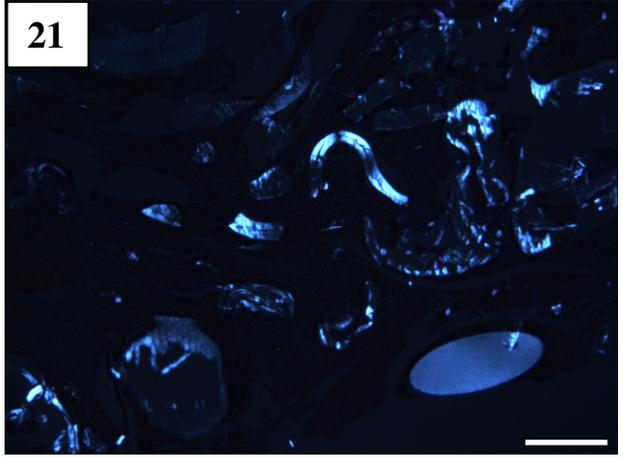
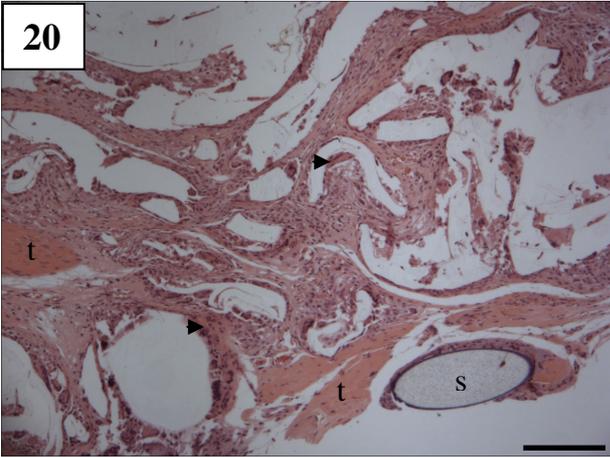
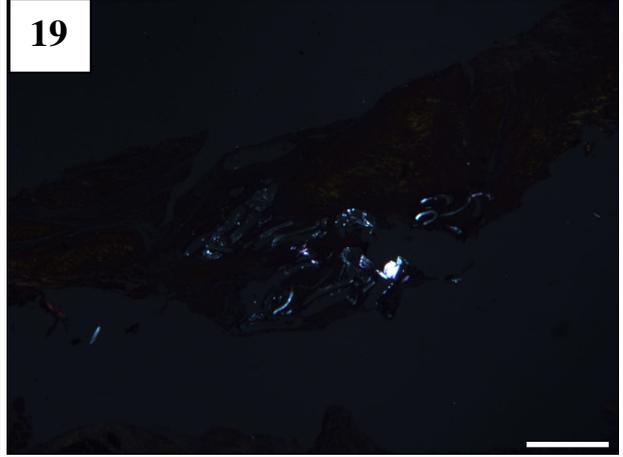
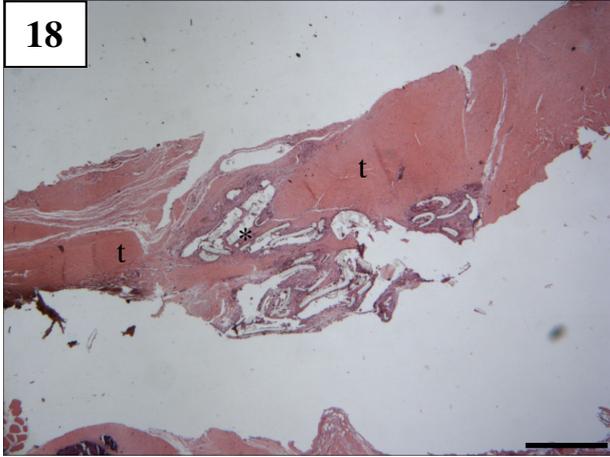


Figura 18: Baixo aumento da região da lesão preenchida com o PLLA após 12 semanas mostrando a lesão em janela, e a interface do tecido intacto (t) e a lesão propriamente dita com o polímero (*). Foram encontrados fragmentos de polímeros circundados por um grande número de células. Coloração HE. Barra = 200 μm .

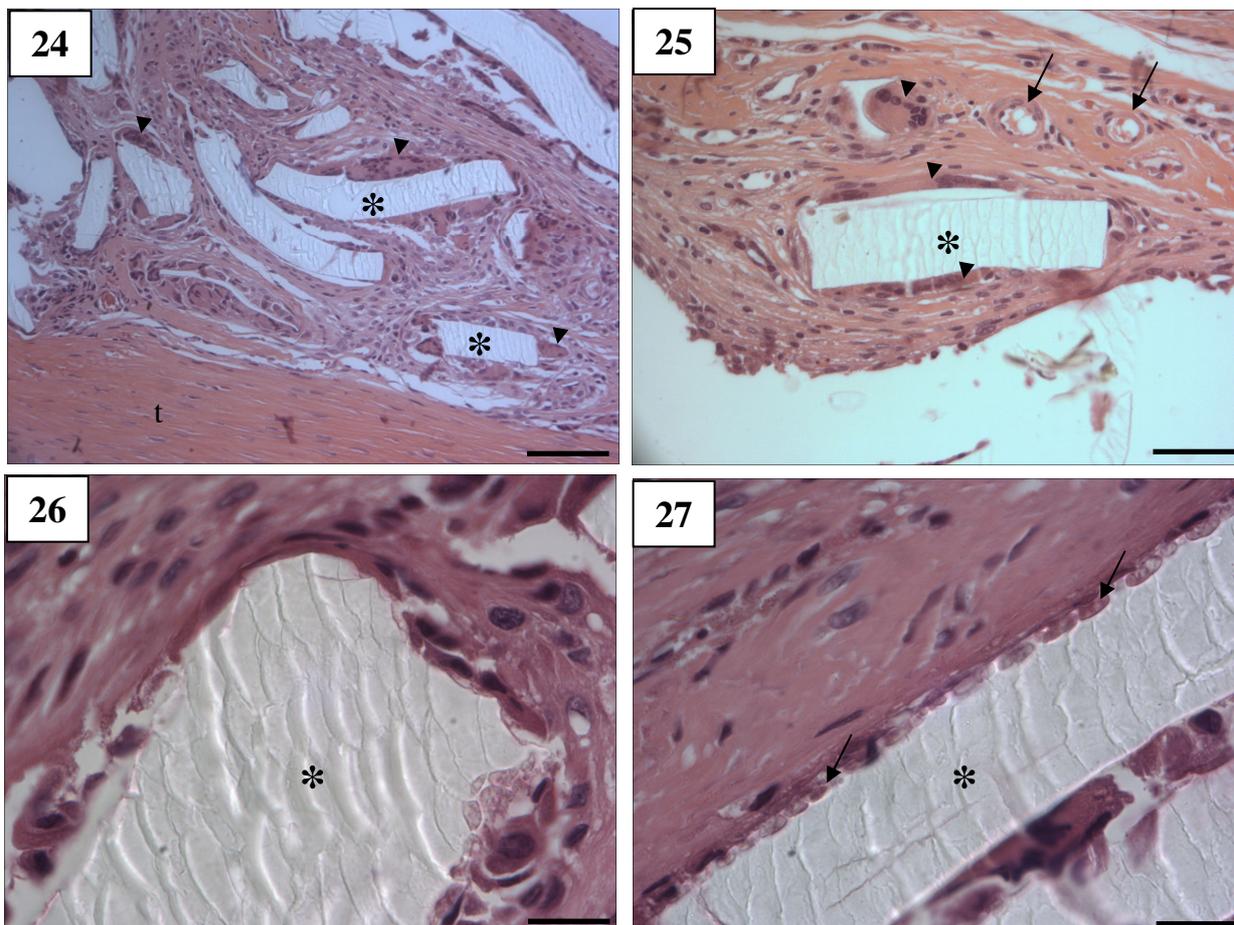
Figura 19: Mesma região anterior observada por microscopia de polarização para identificação do polímero.

Figura 20: Região da lesão artificial em janela com uma borda de tendão (t) intacto com fio de sutura (s) após 12 semanas. Presença de numerosas células fibroblastóides com alinhamento paralelo com a matriz extracelular, células gigantes de corpo estranho (cabeças de setas), mas nenhum infiltrado inflamatório. Coloração HE. Barra = 100 μm .

Figuras 21: Mesma região anterior observada por microscopia de polarização para identificar a presença do polímero.

Figura 22: Outra região da lesão mostrando a organização do tecido cicatricial, com os polímeros alinhados paralelamente, acompanhando a direção da movimentação das fibras do tendão (setas duplas). Coloração HE. Barra = 100 μm .

Figura 23: Mesma imagem anterior observada por microscopia de polarização para identificar a presença do polímero.



Figuras 24: Corte semi-fino de amostra de 12 semanas mostrando parte do tendão nativo (t), mantido na região da lesão em janela, com vários fragmentos de PLLA (*) dentro da região da lesão. Entre os polímeros, a orientação dos fibroblastos foi na mesma direção da orientação das células do tecido intacto. Presença de células gigantes de corpo estranho (cabeças de setas) aderidas aos polímeros. Coloração HE. Barra = 100 μ m.

Figura 25: Polímero (*) envolto por células fibroblastóides em orientação paralela após 12 semanas. Observa-se também presença de vasos sanguíneos (setas) e células gigantes (cabeças de setas) mais alongadas na periferia do polímero, porém com menor volume celular e número de núcleos em relação ao visto nas 02 primeiras semanas. Coloração HE. Barra = 100 μ m.

Figuras 26: Maior aumento mostrando as células com morfologia fibroblastóide e núcleos achatados, e outras células mais arredondadas, possivelmente macrófagos aderidos ao polímero. Coloração HE. Barra = 20 μ m.

Figura 27: Ainda em maior aumento, foi possível observar estruturas elipsóides (setas) coradas entre as células e a superfície do polímero. Coloração HE. Barra = 20 μ m.

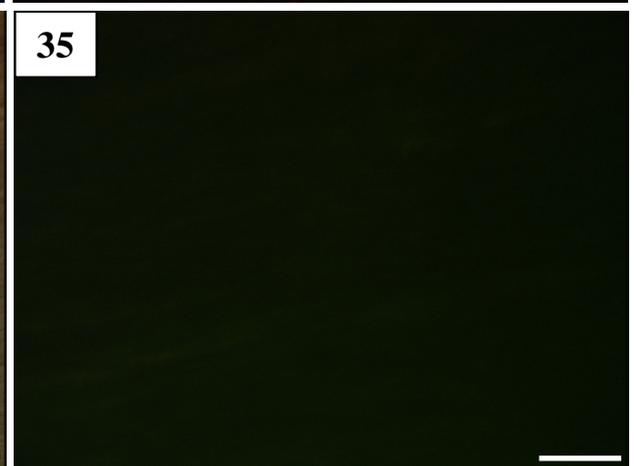
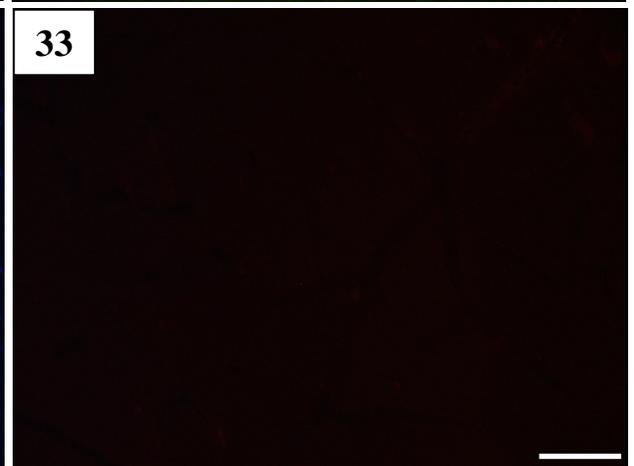
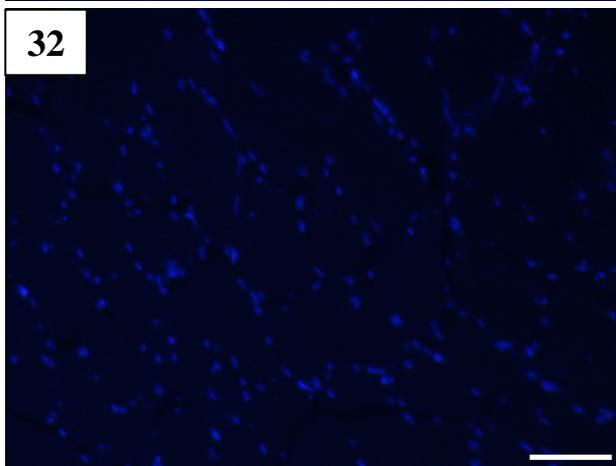
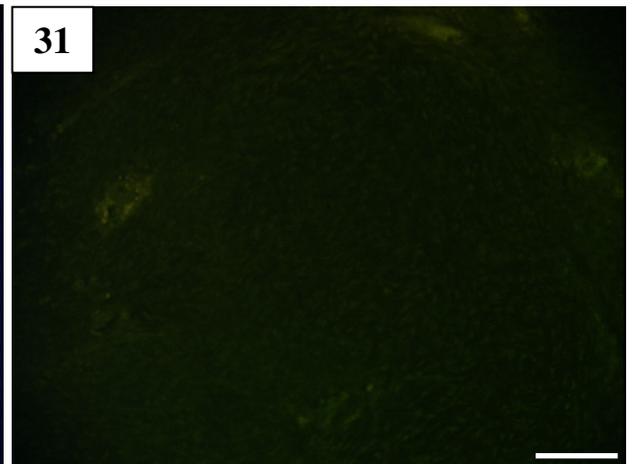
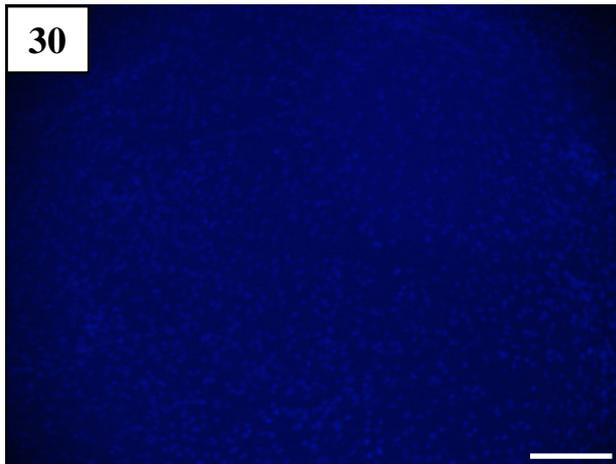
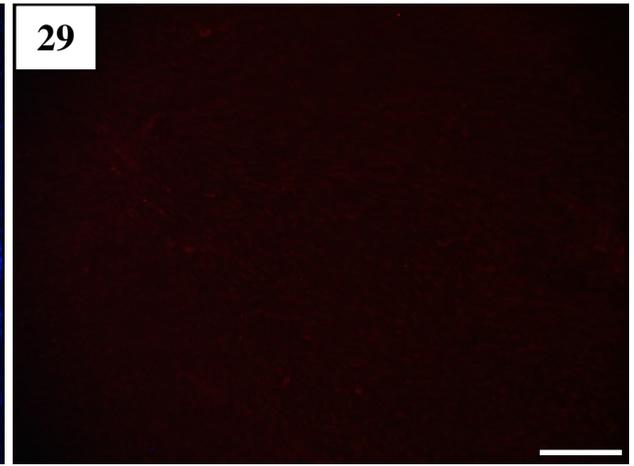
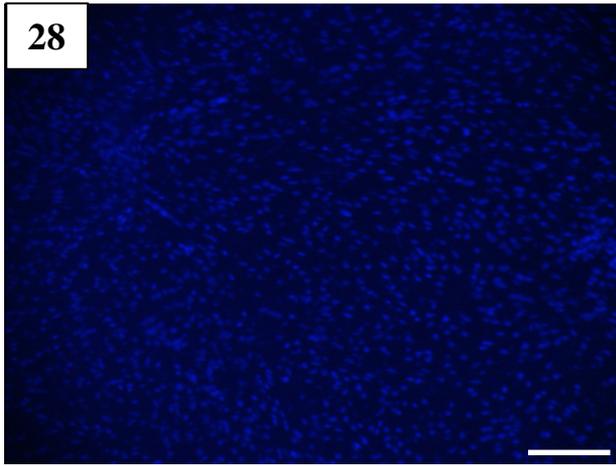


Figura 28: Imagem de microscopia de fluorescência mostrando os núcleos marcados com DAPI de células localizadas numa região central da lesão em janela em tendão patelar sem a implantação do polímero após 08 semanas. Barra = 100 μm .

Figura 29: Corte da mesma região da Figura 25 incubado com anticorpo contra decorina e secundário conjugado com TRITC. A marcação para decorina se mostrou difusa e de baixa intensidade. Barra = 100 μm .

Figura 30: Imagem de microscopia de fluorescência mostrando os núcleos marcados com DAPI de células localizadas numa região central da lesão em janela em tendão patelar sem a implantação do polímero após 08 semanas. Barra = 100 μm .

Figura 31: Corte da mesma região da Figura 27 incubado com anticorpo contra elastina e secundário conjugado com FITC. A marcação para elastina se mostrou difusa e de baixa intensidade. Barra = 100 μm .

Figura 32: Imagem de microscopia de fluorescência de corte transversal de tendão intacto mostrando núcleos marcados com DAPI. Barra = 50 μm .

Figura 33: Mesma região da Figura 29 mostrando a marcação muito fraca para decorina. Barra = 50 μm .

Figura 34: Microscopia de contraste interferencial (DIC) de outra região de tendão intacto em orientação longitudinal. Barra = 50 μm .

Figura 35: Mesma região da figura anterior mostrando a marcação para elastina. Mesmo fraca, percebe-se uma marcação paralela às fibras de colágeno. Barra = 50 μm .

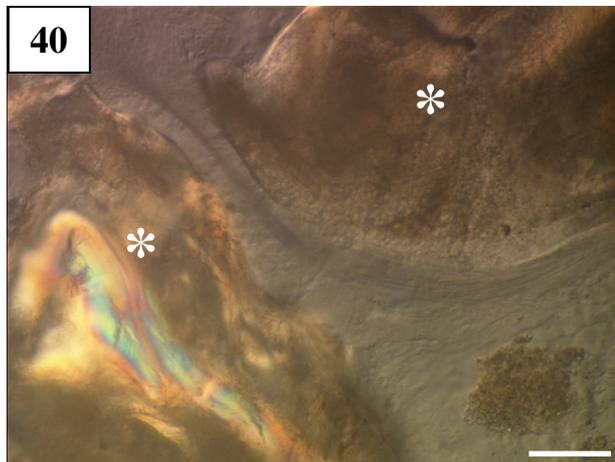
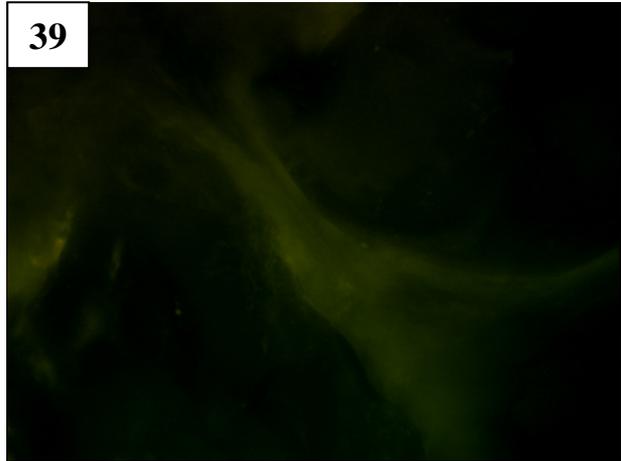
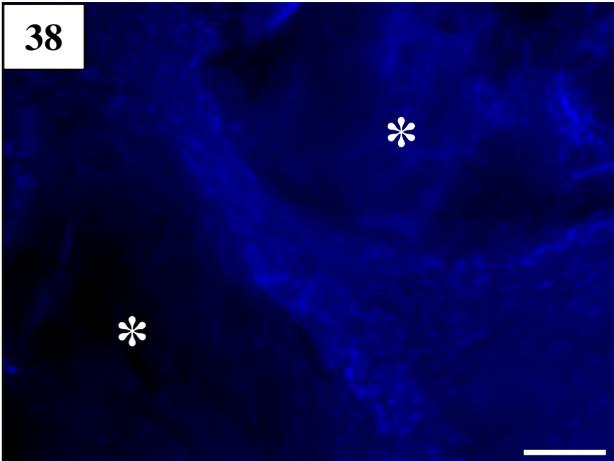
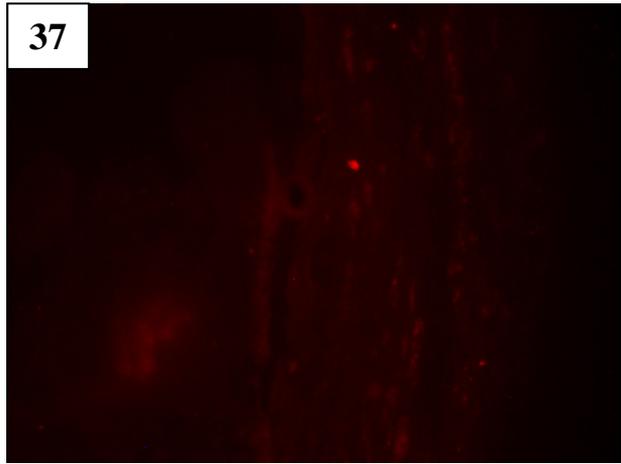
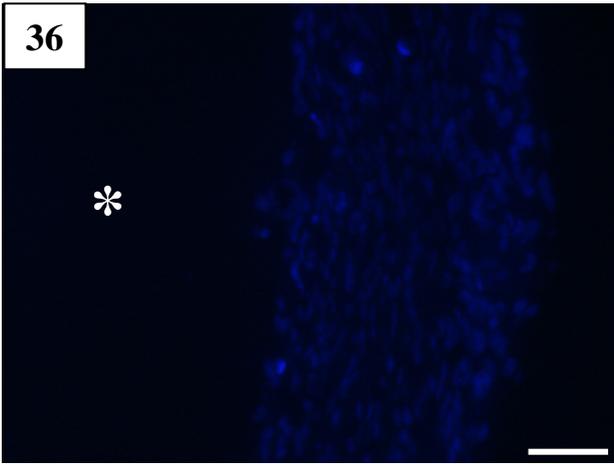


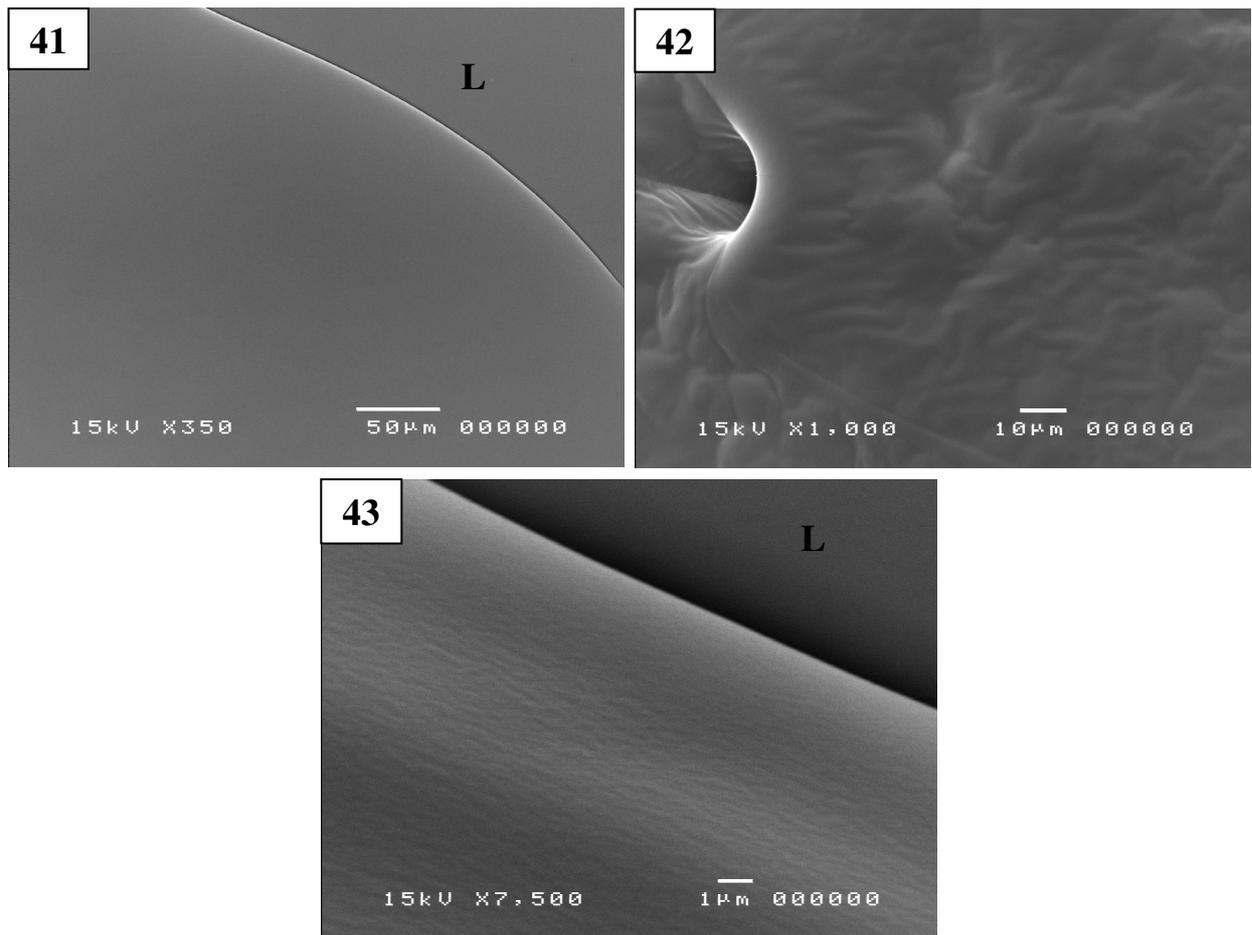
Figura 36: Imagem de microscopia de fluorescência mostrando os núcleos (DAPI) ovais ou alongados de células presentes na região da lesão em tendão patelar com a implantação do polímero (*) após 08 semanas. Barra = 100 μ .m.

Figura 37: Corte da mesma região da Figura 36 submetido à incubação com anticorpo contra decorina e secundário conjugado com TRITC. A marcação para decorina foi positiva e se mostrou mais intensa do que a da amostra controle. Barra = 100 μ m.

Figura 38: Imagem de microscopia de fluorescência mostrando os núcleos marcados com DAPI em células localizadas numa região dentro da lesão em janela com a implantação do polímero (*) após 08 semanas. As células se concentraram entre duas regiões preenchidas por polímero (*). Barra = 100 μ m.

Figura 39: Corte da mesma região da Figura 35 incubado com anticorpo contra elastina e secundário conjugado com TRITC. A marcação para elastina foi mais intensa do que no controle sem polímero. Barra = 100 μ m.

Figura 40: Microscopia de polarização do mesmo corte acima mostrando a localização dos polímeros (*) pela birrefringência. Barra = 100 μ m.



Figuras 41: Microscopia eletrônica de varredura em baixo aumento da membrana de PLLA seca sobre lamínula de vidro (L), antes da implantação. A superfície do filme é homogênea e não apresenta grânulos ou resíduos não dissolvidos de PLLA.

Figura 42: MEV do PLLA seco sobre lamínula de vidro (L). A superfície apresenta uma pequena rugosidade, que é praticamente homogênea.

Figura 43: MEV em maior aumento do PLLA sobre o vidro (L) mantido por 12 semanas expostas ao ar e seco pelo método do ponto-crítico. Não houve diferença entre a rugosidade desta amostra e das amostras anteriores.

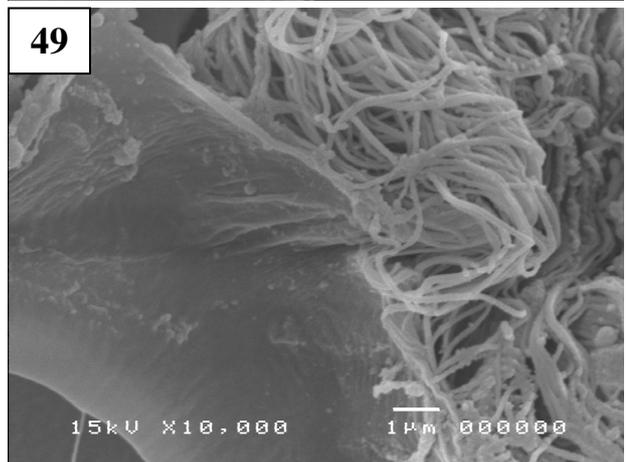
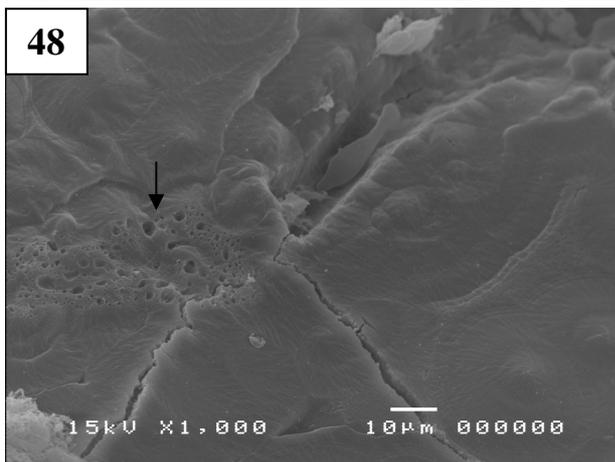
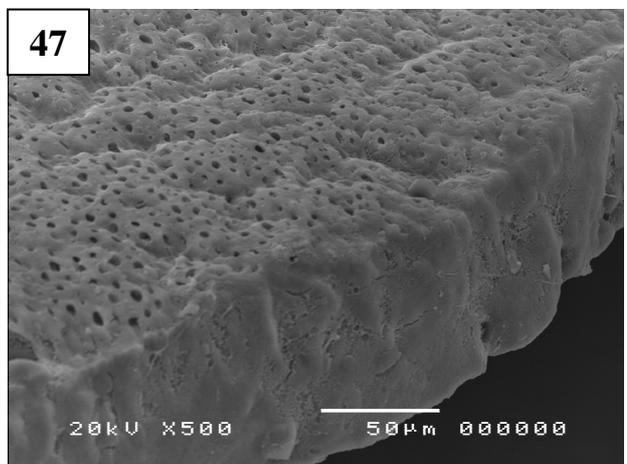
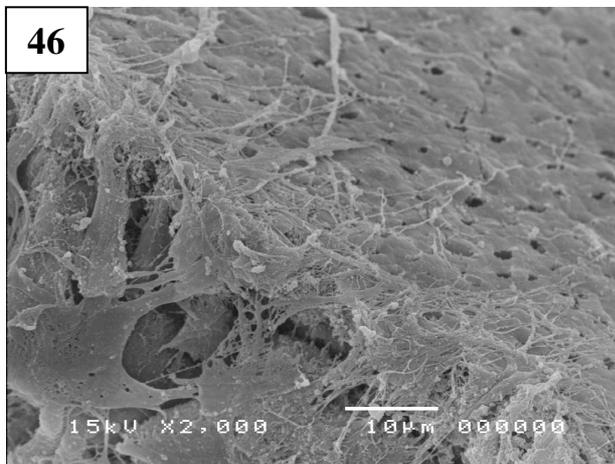
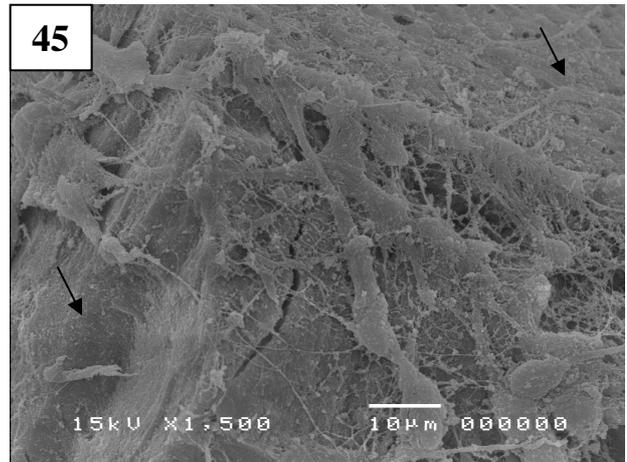
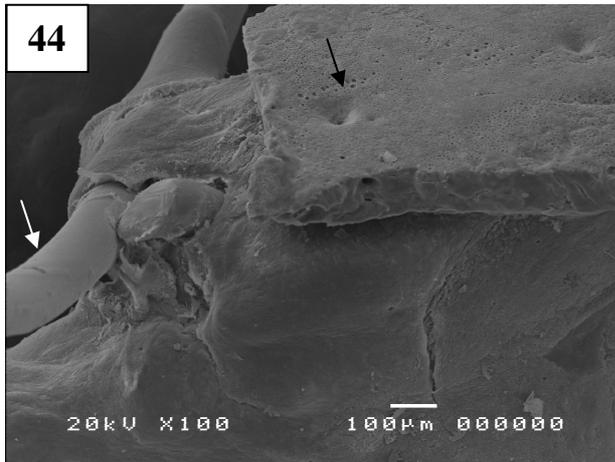


Figura 44: MEV em baixo aumento mostrando uma amostra de tecido removido após 04 semanas onde se observa o fio de sutura (seta branca) na parte do tecido nativo próximo do polímero (seta escura) onde as células foram destacadas durante a preparação do material.

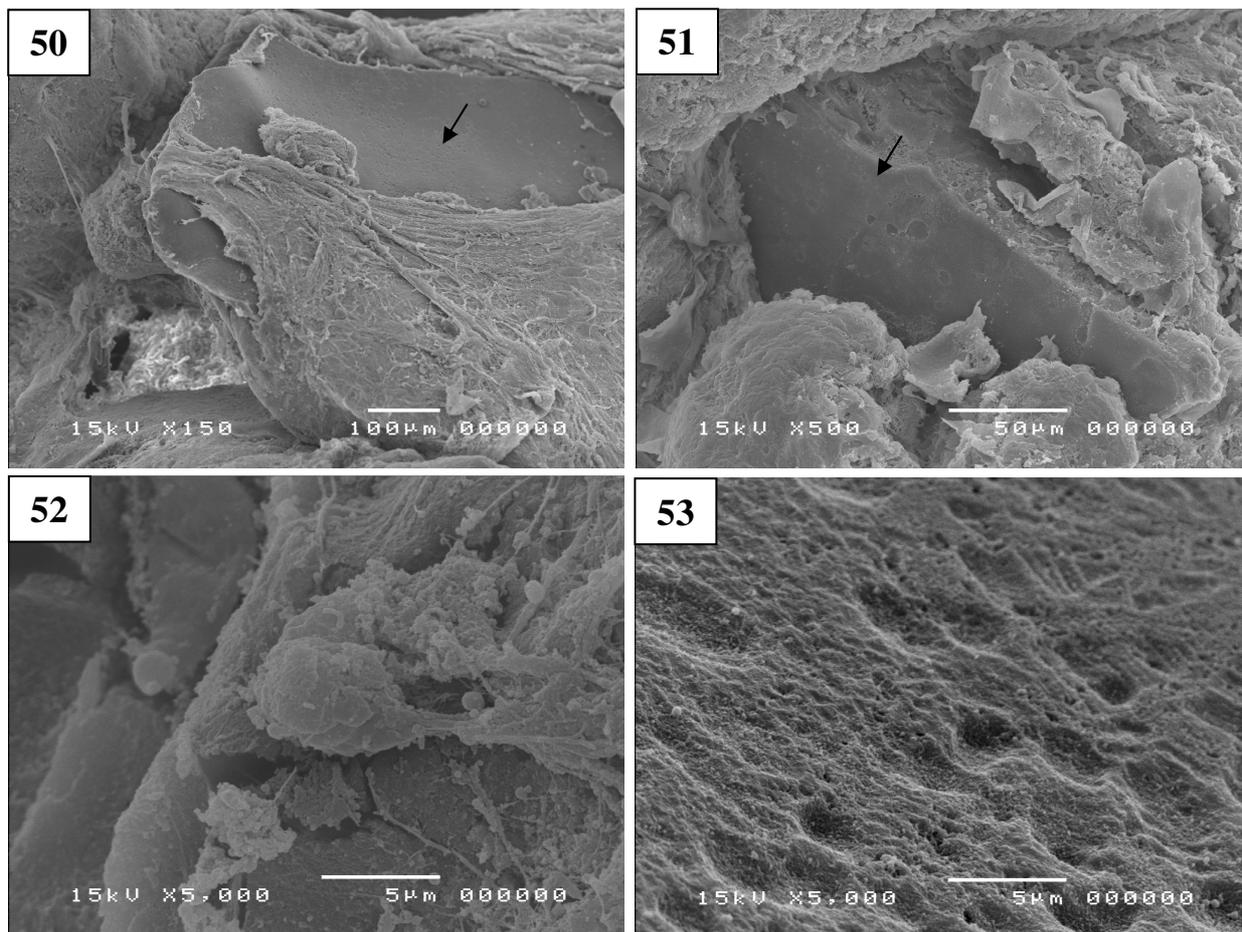
Figura 45: Imagem do polímero (setas escuras) com presença de células com formatos diferentes aderidas à sua superfície após 04 semanas.

Figura 46: Outra região mostrando parte do polímero recoberto com células e material de matriz extracelular após 04 semanas.

Figura 47: Presença de numerosos poros superficiais indicando um início de degradação do PLLA após 04 semanas. As células foram destacadas durante o processamento o que permitiu a visualização da superfície.

Figura 48: MEV de parte da superfície do PLLA implantado por 04 semanas em rato. Outra região do polímero bem preservada. Pequena indicação de degradação pela formação de concavidades (seta).

Figura 49: Imagem em maior aumento mostrando denso material fibroso entrelaçado próximo à superfície do polímero, possivelmente colágeno.



Figuras 50: MEV em baixo aumento de amostra contendo o polímero (seta) implantado na lesão em janela após 08 semanas *in vivo* mostrando tecido cicatricial recobrando o PLLA.

Figura 51: MEV após 08 semanas de permanência no polímero *in vivo* mostrando fragmento do polímero (seta) recoberto por tecido cicatricial.

Figura 52: Maior aumento mostrando a presença de células na superfície no polímero e material de matriz em 08 semanas.

Figura 53: Imagem da superfície do PLLA após 08 semanas com uma rugosidade irregular e concavidades mais profundas quando comparadas ao material de 04 semanas.

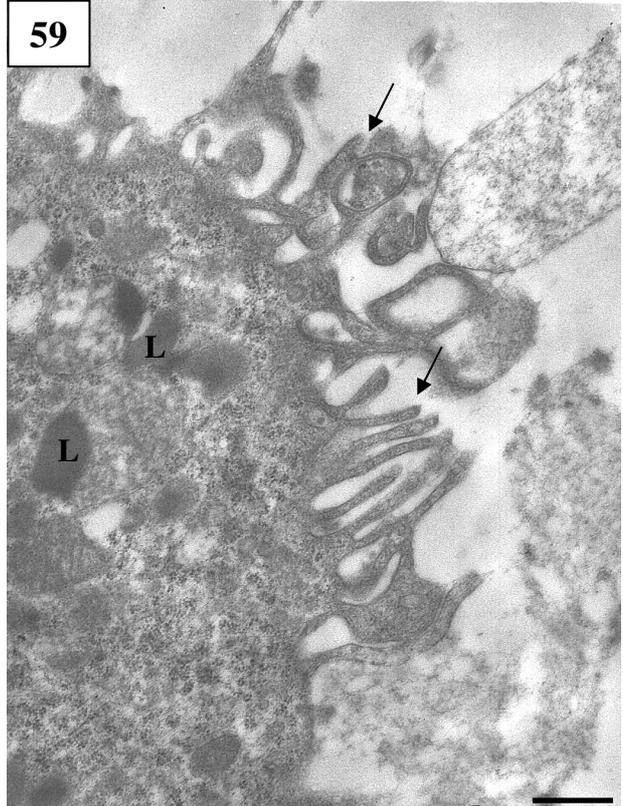
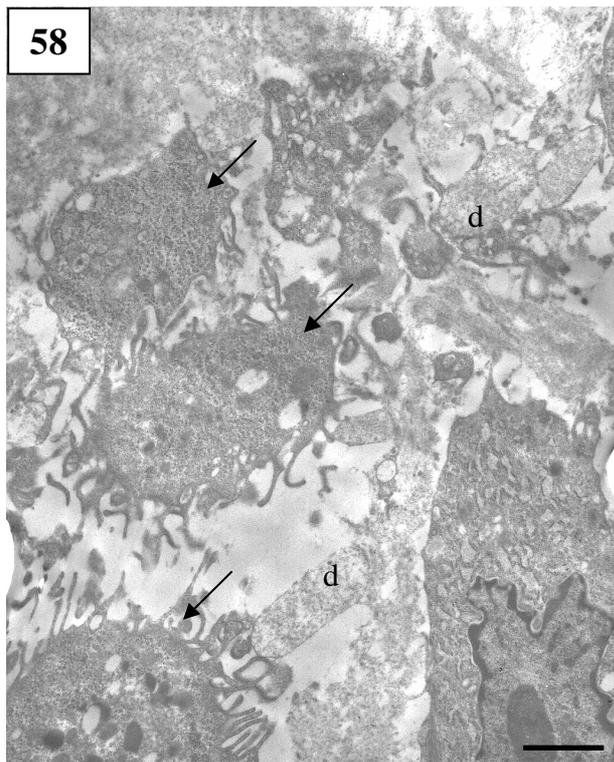
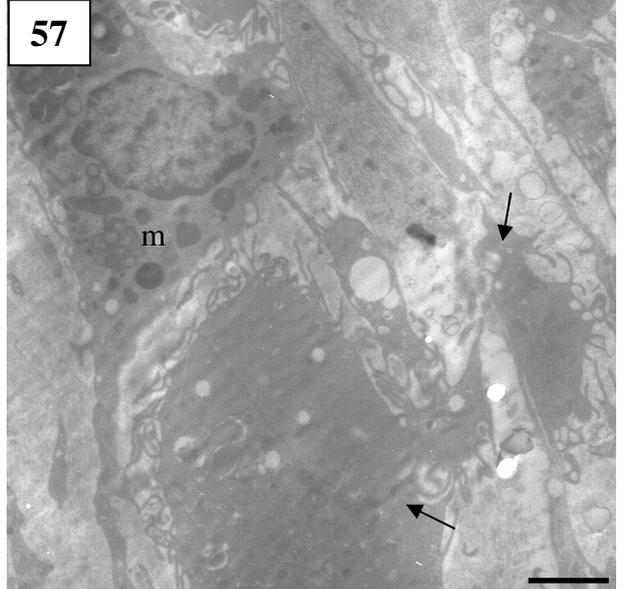
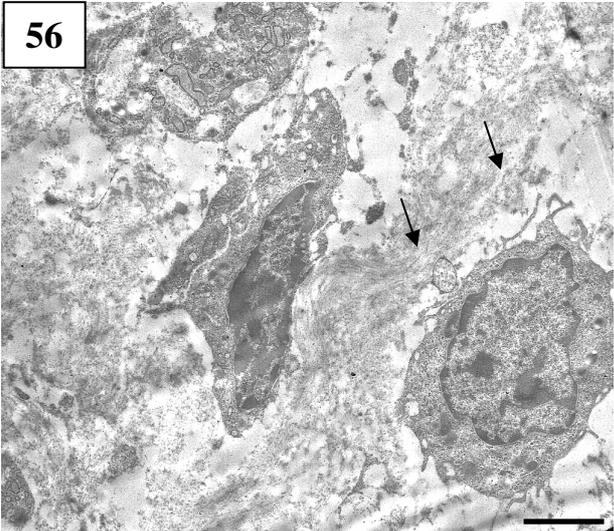
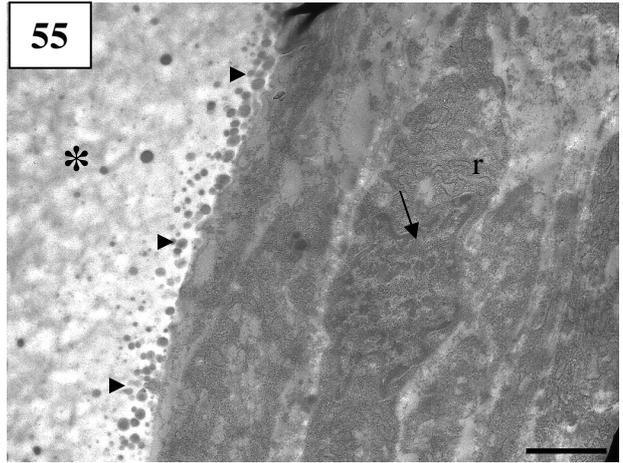
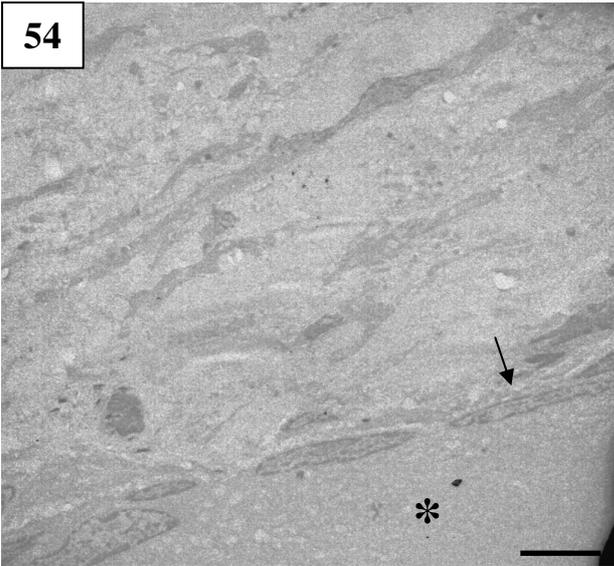


Figura 54: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão em baixo aumento de um corte ultrafino de tendão após 02 semanas de implante do polímero. Presença do polímero (*) com algumas camadas de células aderidas alongadas com núcleos ovais achatados acompanhando o formato da célula (seta). Barra = 10 μm .

Figura 55: MET mostrando fibroblastos alongados em meio à matriz extracelular com orientação paralela em relação ao polímero (*). Estas células são típicas produtoras de proteínas, pois possuem retículo endoplasmático rugoso (r) bem desenvolvido e núcleo eucromático (seta). Presença de numerosos materiais esféricos eletrondensos (cabeça de seta) na interface entre o polímero e a primeira camada de células, como se fossem liberados por estas células. 02 semanas. Barra = 5 μm .

Figura 56: Região mais interna da lesão mostrando a diversidade de células com matriz extracelular intercalada com delicadas fibrilas de colágeno (setas). 02 semanas. Barra = 3 μm .

Figura 57: Outra região mais interna da lesão mostrando células com diversos pseudópodos, provavelmente macrófagos (setas). Célula com diversos grânulos citoplasmáticos densos semelhantes aos mastócitos (m). 02 semanas. Barra = 2 μm .

Figura 58: Região próxima ao polímero (ausente na imagem) mostrando grande número de macrófagos com pseudópodos em meio a debris (d) celulares. Período de 02 semanas de implante do polímero. Barra = 2 μm .

Figura 59: Detalhe em maior aumento de parte do citoplasma de um macrófago mostrando algumas organelas típicas como os lisossomos (L) envolvidos no processo de digestão intracelular, e a grande quantidade de projeções da membrana plasmática formando os pseudópodos (setas). 02 semanas. Barra = 1 μm .

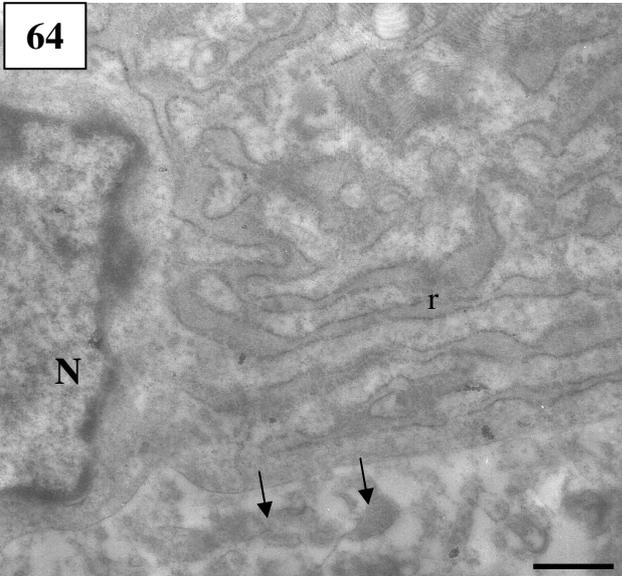
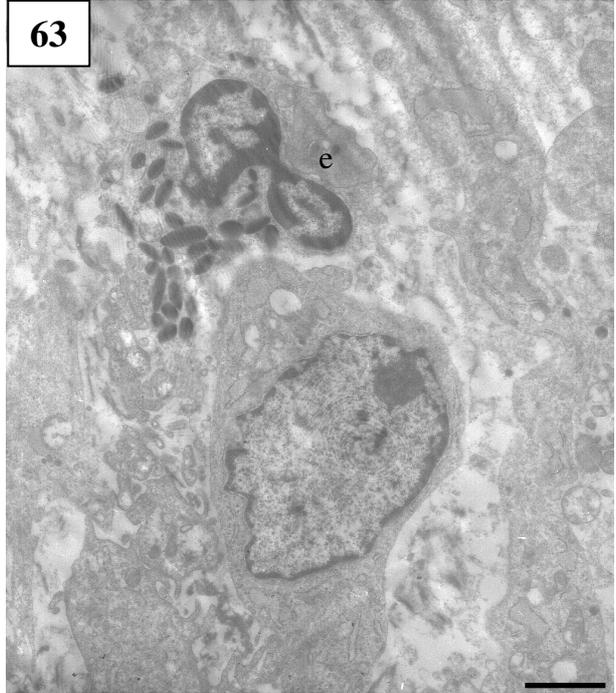
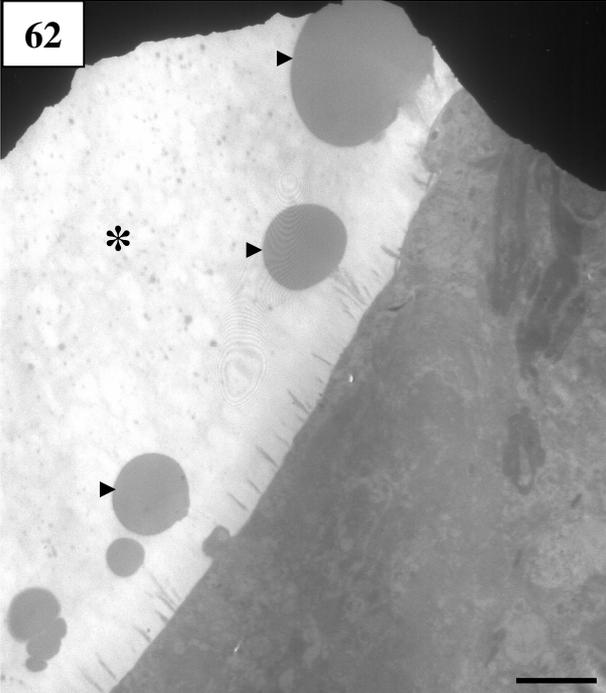
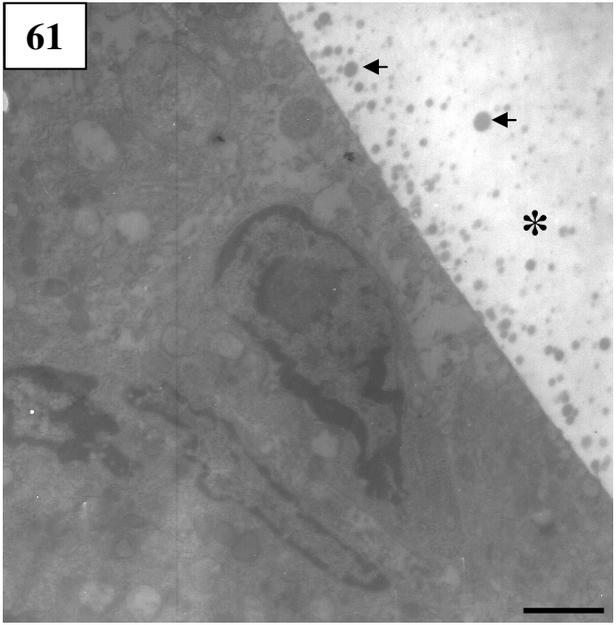
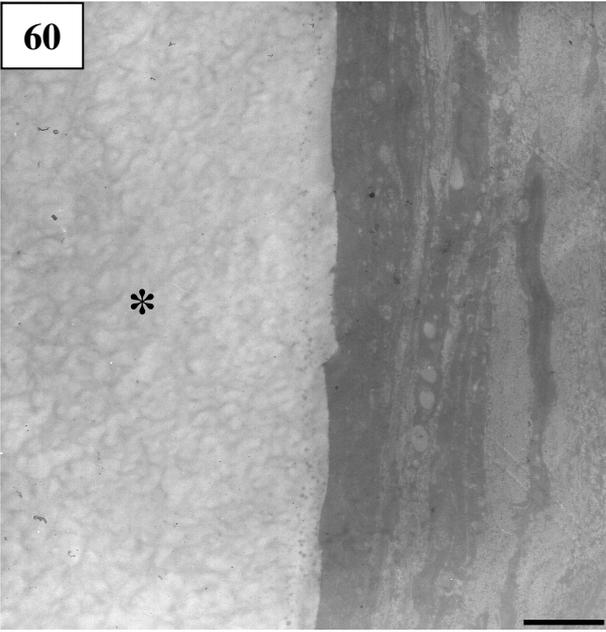


Figura 60: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de um corte ultra-fino de tendão após 04 semanas de implante do polímero. Presença do polímero (*) na parte esquerda da imagem com aspecto de rede. Adjacente a este, fileiras de células alongadas, possivelmente fibroblastos, intercalados com matriz extracelular. Barra = 10 μm .

Figura 61: Imagem de MET da região de lesão após 04 semanas mostrando células com núcleos diferentes. Grande quantidade de material eletrondenso (cabeças de setas) adjacente a superfície do PLLA (*). Barra = 5 μm .

Figura 62: Detalhe das estruturas globosas eletrondensas (cabeças de setas) adjacentes a material em forma de agulhas liberadas pelas células localizadas próximas à superfície do polímero (*) após 04 semanas de implantação. Estas poderiam ser as mesmas estruturas visualizadas nas Figuras 23 e 24. Barra = 2 μm .

Figura 63: Células encontradas numa região mais interna à lesão, distante do polímero. Presença de um eosinófilo (e) com seus grânulos característicos. 04 semanas. Barra = 1 μm .

Figura 64: Detalhe de um fibroblasto próximo ao polímero (não visualizado) com retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido (r) e núcleo (N) eucromático e pequenas vesículas (setas) exocitadas possivelmente com pró-colágeno. 04 semanas. Barra = 1 μm .

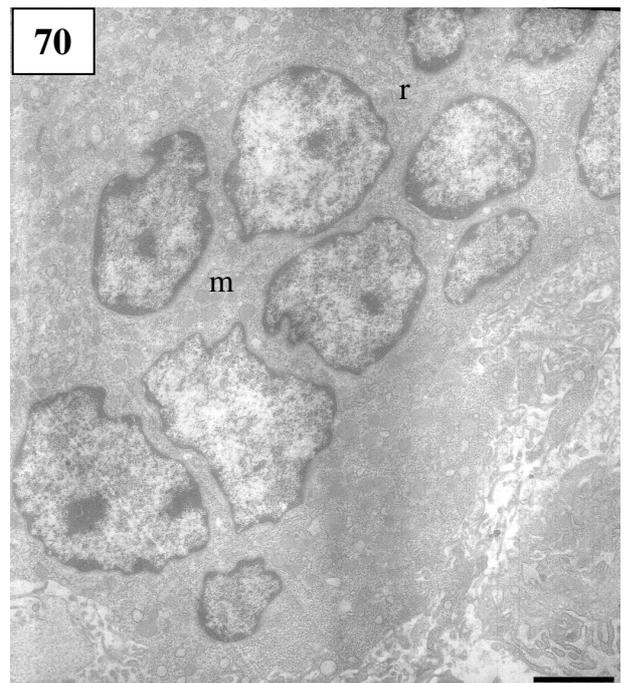
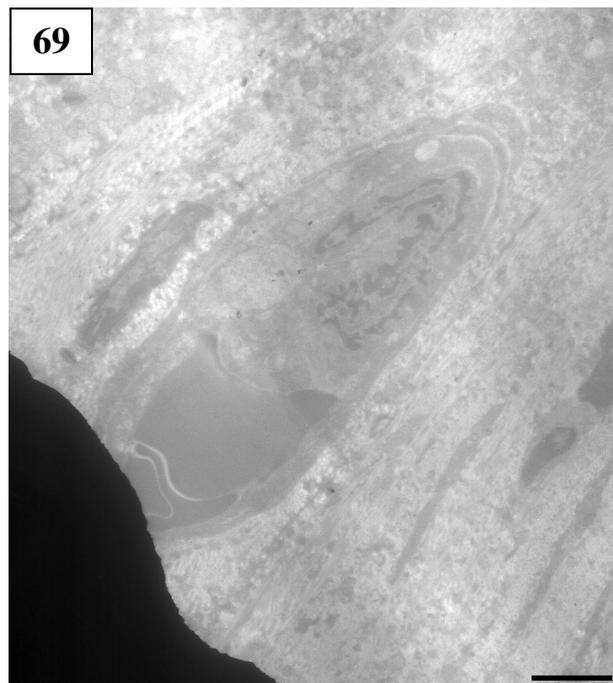
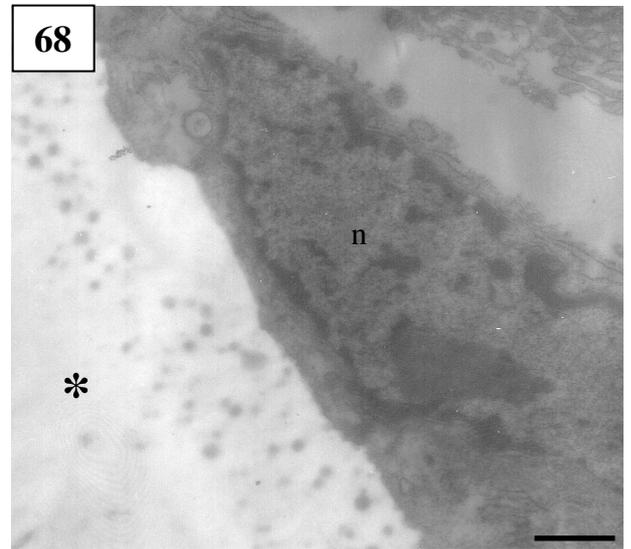
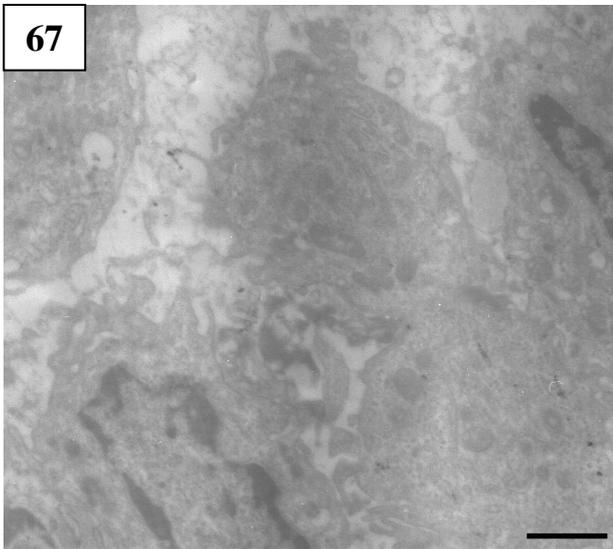
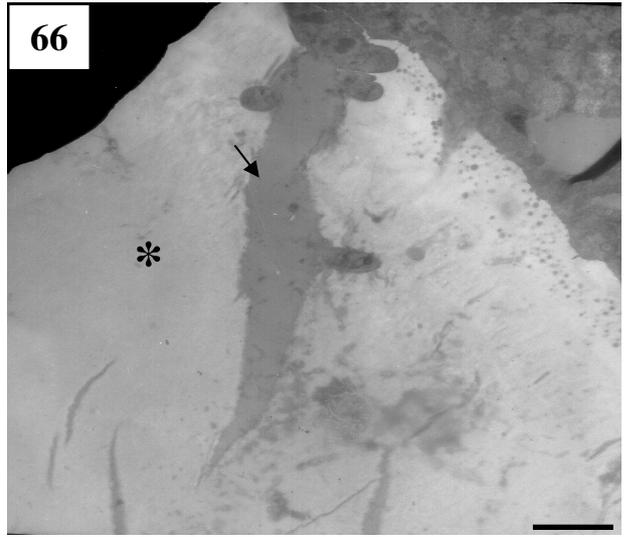
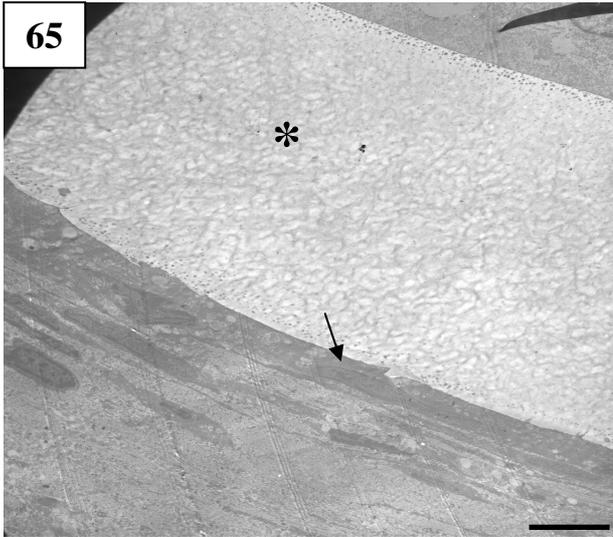


Figura 65: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de um corte ultra-fino de tendão após 08 semanas de implante do polímero. Presença do polímero (*) entre duas fileiras de células alongadas (seta). Adjacente a este, fileiras de células alongadas, possivelmente fibroblastos, intercalados com matriz extracelular. Barra = 10 μm .

Figura 66: Detalhe de uma região periférica ao polímero (*) com parte do citoplasma de um fibroblasto invadindo o interior do polímero (seta) indicando um início de fragilidade na estrutura do PLLA. Barra = 2 μm .

Figura 67: Região próxima ao polímero com presença de macrófagos. Barra = 3,5 μm .

Figura 68: Fibroblasto com núcleo (n) bem evidente adjacente a uma região de PLLA. Pequenas estruturas esféricas imersas polímero parecem associadas à célula (*). Barra = 100 μm .

Figura 69: Imagem de MET mostrando uma vênula, com células do sangue em seu interior, em meio à matriz fibrosa com células alongadas numa região próxima ao polímero (não visualizado). Barra = 5 μm .

Figura 70: Célula gigante de corpo estranho visualizada na periferia do polímero (não mostrado) com vários núcleos e rico material citoplasmático, principalmente retículo endoplasmático rugoso (r) e mitocôndrias (m). Barra = 5 μm .

5. DISCUSSÃO

A engenharia tecidual é uma área em desenvolvimento que procura reparar, substituir e diminuir os tempos de regeneração de tecidos ou órgãos específicos e combina conhecimentos fundamentais da física, química e biologia em materiais práticos e eficazes, em dispositivos, sistemas e em estratégias clínicas. Isto envolve cada vez mais estratégias que combinam células, biomateriais, estímulos químicos e físicos indutores, além do uso de técnicas que aumentam a sobrevivência e o desempenho de células progenitoras locais ou transplantados para o tecido em questão (MUSCHLER *et al.*, 2004). Nas últimas décadas, dispositivos bioabsorvíveis têm sido utilizados e experimentados em diversos aspectos das cirurgias ortopédicas, incluindo fixação de fraturas, reposição óssea, reparo da cartilagem, reparo do menisco e fixação de ligamentos. Esses materiais têm sido utilizados na forma de parafusos, pinos e placas nas aplicações ortopédicas e cirurgias orais em humanos e animais (WUISMAN, 2006).

Existem diferentes materiais que estão sendo testados em ortopedia ou utilizados como carreadores de células, mas apenas um pequeno grupo de materiais. Os ácidos poli-L-láctico (PLA) e poli-L-glicólico (PLG) são poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, já que os produtos de degradação destes são encontrados normalmente no plasma sanguíneo e nos tecidos. Dependendo da combinação dos componentes, podem-se elaborar materiais mais ou menos flexíveis e com taxas de degradação variáveis, dependendo da finalidade. Estes materiais co-polimerizados são amplamente utilizados em bioengenharia principalmente ortopédica e odontológica, na forma de micro-implantes de fixação temporária (DE TAYRAC *et al.*, 2007). Este trabalho foi o primeiro a utilizar o PLLA na forma de material de preenchimento de lesão tendínea, já que nos outros trabalhos da literatura, os autores utilizaram este polímero na forma de parafusos como meio de ancoragem do tendão rompido ao osso, ou como fios de suturas biodegradáveis (REFS).

Uma vez que a função primária de tendões e ligamentos é transferir cargas, lesões a essas estruturas resultam em uma interrupção nesta transferência e conseqüente perda de função. Como os tendões estão sujeitos a movimentações repetitivas que podem induzir a degeneração ao longo do tempo, uma predisposição a lesões agudas e crônicas é muito comum. Estas lesões não são apenas responsáveis pelos altos custos com a saúde, mas também, resultam em perda de tempo no trabalho e morbidade individual (CARPENTER, 2004).

Os vários métodos de tratamento de lesões tendíneas refletem a necessidade de uma técnica que permita o retorno morfológico e funcional do tendão (GOODSHIP *et al.*, 1985). Na tentativa de contornar problemas diversos como antigenicidade, estocagem e disponibilidade de implantes têm-se desenvolvido novos biomateriais para substituição de tecidos (OHARA *et al.*, 1995). As diversas

modalidades de tratamento para lesão de tendões e ligamentos indicam que não há uma técnica particular que alcance sucesso absoluto (GOODSHIP *et al.*, 1985).

A maior parte das pesquisas experimentais em lesões tendíneas tem sido realizada em modelos animais, primeiro por motivos éticos, mas também por possuir algumas vantagens como baixo custo, menor variabilidade e grande disponibilidade quando comparadas aos ensaios clínicos. Algumas desvantagens incluem variabilidade biológica inata, diferenças metabólicas e hormonais em relação aos humanos e potenciais dificuldades na manipulação dos animais (LIN, 2004). Para o estudo de mecanismos para cicatrização de tendões, os modelos animais são importantes no desenvolvimento e teste de métodos de engenharia tecidual para acelerar o processo de cicatrização do tendão e restabelecer a função mecânica (BUTLER *et al.*, 2000, LIN *et al.*, 2004). Utilizamos no presente estudo um modelo de transecção parcial realizada na região mediana do tendão patelar de ratos por ser técnica mais simples que outras lesões artificiais. Embora sejam incomuns clinicamente, estas lesões parciais mantêm parte das fibras intactas, o que exclui a necessidade da reparação por suturas, e permite a imediata mobilização pós-cirúrgica do tendão (KUBOTA *et al.*, 1996; CHAN *et al.*, 1998). Essas lacerações parciais possibilitam ainda que se acompanhe a resposta do tecido no que tange à sua regeneração na presença de biomateriais celularizados ou não, pois sempre existirá tecido nativo em contato com o material, já que a lesão em janela preserva consideravelmente o tecido. Em nosso desenho experimental, as patas dos animais não foram imobilizadas após a cirurgia, pois a resposta regenerativa adequada está relacionada com a organização das células competentes que produzem matriz extracelular colagenosa na direção das tensões a que estão submetidas o tendão, e a imobilização limitaria as propriedades mecânicas do tecido (PALMES *et al.*, 2002).

A análise histopatológica das lesões produzidas em nosso estudo evidenciou presença de vasos sanguíneos na periferia do polímero implantado mesmo após 12 semanas de implantação, porém em menor quantidade quando comparados ao período das 02 primeiras semanas. DOSCHAK *et al.* (2000), ao avaliarem as respostas vasculares em 3, 10 e 42 dias após incisão cirúrgica no tendão patelar de coelhos, observaram alterações no fluxo sanguíneo e volume microvascular que demonstraram vasos periféricos dilatados e um recrutamento abundante de vasos sanguíneos pré-existentes aos 3 dias de lesão. Aos 42 dias pós-lesão, contudo, tanto o volume vascular quanto o fluxo sanguíneo do tendão patelar diminuíram, implicando em remodelação vascular dinâmica. KAKAR *et al.* (1998) observaram neovascularização na bainha tendínea e epitendão do flexor profundo dos dedos em coelhos após a laceração plantar parcial, embora não houvesse menção de nenhuma vascularização dentro do endotendão.

Em geral, a cicatrização do tendão é relativamente mais lenta do que outros tecidos conjuntivos, como por exemplo, o osso, mesmo que geralmente sejam submetidos a estágios similares durante a cicatrização. A cicatrização inicial inclui infiltração inflamatória, proliferação celular e alteração nos fenótipos de colágeno. O tendão, então, passa para uma fase de síntese, em que a deposição de matriz extracelular se inicia. Isto é acompanhado pelas fases de remodelamento e maturação, em que as forças de tensão dos tendões lesados são restauradas. A restauração da força mecânica é o objetivo principal na cicatrização tendínea (CHAN, 2000).

Em análise por microscopia de fluorescência evidenciamos uma marcação mais intensa para a decorina na região da lesão com PLLA do que sem PLLA, não tão evidente quanto para a elastina, o que já era esperado, por conta do processo natural de reparação. A decorina atua com um papel importante na regulação da proliferação celular, atividade do fator de crescimento, organização do colágeno, sua expressão e padrão de distribuição. GRAHAM *et al.* (2000) sugerem, por exemplo, que a decorina está ligada ao colágeno antes mesmo da formação de fibrilas, enquanto que muito pouca elastina é encontrada em feridas em cicatrização (O'BRIEN, 1997). A elastina é mais abundante em tendões que precisam de mais mobilidade, como os da coluna vertebral, e menos abundante em tendões que suportam maiores tensões, como os tendões patelares; entretanto a elastina, em nosso estudo, foi relativamente mais abundante em regiões adjacentes aos polímeros do que nas regiões distantes, como se as células fossem estimuladas a produzir elastina em resposta a adesão ao polímero.

Os tendões se comportam como uma estrutura heterogênea, que pode ser responsável pela ruptura frequentemente parcial vista nesses tecidos. Após a lesão tendínea, a estrutura passa por uma fibrose durante o reparo quando visualizado pela microscopia eletrônica. O tendão normal apresenta-se como um conjunto paralelo de fibras. Após a lesão, a cicatriz se assemelha a uma rede de fibras, inicialmente sem uma orientação preferencial, como visualizado em nossas análises microscópicas. O processo de maturação se assemelha ao visto no desenvolvimento normal do colágeno (GOODSHIP *et al.*, 1985; ERLICH *et al.*, 2005).

No presente estudo, pudemos observar inicialmente uma região bastante celularizada e sem organização da matriz. Foi evidenciado que, ao passo que a cicatriz é submetida ao aumento do estresse tênsil, as fibras de colágeno assumem gradualmente uma orientação paralela ordenada e na mesma direção de orientação das células do tecido intacto. Os fibroblastos aumentam em número durante o reparo de uma ferida e depositam fibras colágenas em uma matriz rica em fibronectina. Durante o crescimento ou no seguimento da lesão, os fibroblastos depositam um gel como uma substância fundamental e produz tropocolágeno. Inicialmente, o colágeno tipo III é rapidamente depositado pelos fibroblastos, sendo repostado posteriormente por fibrilas do tipo I (O'BRIEN, 1997).

À medida que o colágeno matura, há um decréscimo no conteúdo de água e na solubilidade, um aumento na cristalinidade e na densidade. Há também um incremento na resistência tênsil e na firmeza e resistência à degradação pela colagenase, com um incremento na capacidade de união do cálcio e contratilidade térmica (O'BRIEN, 1997).

A reação biológica aos implantes bioabsorvíveis se apresenta em vários níveis de severidade, desde um acúmulo discreto de fluido até mesmo a formação de lesão tecidual irreversível. Em muitos estudos clínicos, a incidência de reações inflamatórias tem sido pequena e as reações parecem ser suaves o bastante para não causarem efeitos nos resultados em longo prazo. Contudo, em alguns estudos, as reações foram de moderada a severa, com necessidade de cirurgias secundárias corretivas (AMBROSE & CLANTON, 2004). Não foram observados infiltrados inflamatórios em nosso estudo, em acordo com experimentos realizados em animais por outros autores (SCHWACH, 1999; ROKKANEN, 2000). Contudo, é possível que implantes possam induzir algum tipo de resposta tecidual não-específica de corpo estranho histopatologicamente reconhecível. Isto parece ser um fenômeno inerente ao processo de degradação e absorção desses polímeros nos tecidos. Ao se considerar a capacidade fagocítica e de limpeza desses tecidos, a fase mais exigente é o estágio de decomposição, quando a geometria principal do implante é rapidamente perdida. Neste momento, a razão de produção de fragmentos poliméricos pode exceder os limites críticos da tolerância do tecido e induzir potencial resposta do tecido em questão (ROKKANEN, 2000).

Alguns experimentos *in vivo* têm demonstrado que implantes de PLA, PGA e seus copolímeros podem causar reações inflamatórias pelo fato de atuarem como corpos estranhos (WALTON & COTTON, 2007), além do tipo e intensidade da resposta inflamatória serem fortemente influenciadas pela liberação de partículas poli, oligo e monoméricas durante a degradação (MAINIL-VARLET, 1997). É possível que fragmentos amorfos e cristalinos gerados durante degradação rápida ou prolongada provoquem estas reações inflamatórias pela liberação de subprodutos ácidos em quantidades excessivas (DUEK, 1999).

Em estudo realizado por SCHWACH (1999), parafusos intra-articulares derivados de PLA e PGA foram implantados em 12 ovelhas adultas, e avaliados por períodos de 06 a 60 meses. Foi observada uma visível diferença de degradação do material entre a superfície e o corpo do mesmo em um ano pós-implantação. Nenhum efeito adverso foi observado em um período de avaliação de 02 anos.

Em nosso estudo, que teve duração máxima de 12 semanas, foi observado um início de degradação na superfície do PLLA, em observações por MEV. Os implantes de PLLA levam um tempo maior para degradação total *in vivo* (AMBROSE & CLANTON, 2004). Entre os polímeros

absorvíveis mais estudados, o PLLA é um dos que requerem maior período para sua degradação, mais do que para o PGA, polidioxanona e os copolímeros, já que eles podem ser encontrados no organismo até 05 anos depois da implantação (MAINIL-VARLET, 1997). Experimentos em animais utilizando implantes de PLLA têm mostrado tempos de degradação de no mínimo 03 anos (JUKKALA-PARTIO *et al.*, 2002; AMBROSE & CLANTON, 2004). No estudo realizado por SCHWACH (1999), foram necessários 60 meses para a completa degradação dos polímeros implantados.

A hidrólise das ligações éster começa homoganeamente até que oligômeros solúveis sejam formados. Os oligômeros solúveis que estão próximos à superfície podem ser removidos antes da degradação total enquanto que aqueles localizados no interior da matriz permanecem presos e contribuem totalmente para o efeito autocatalítico. Esta diferença de concentração em grupos ácidos resulta na formação de uma membrana composta por polímero que degrada menos rapidamente do que o polímero localizado afastado da superfície (SCHWACH, 1999).

Em experimento realizado por DUEK *et al.* (1999) para avaliar a degradação *in vitro* de pinos de PLLA, puderam-se observar várias regiões com evidência de erosão, não apenas ao longo da superfície, mas também na região interna após 02 meses de degradação. Após 08 semanas de degradação, não foram encontradas alterações morfológicas significantes, embora após 12 semanas, alterações distintas tais como surgimento de fendas, com diferenças visíveis entre as porções periféricas e centrais. Após 24 semanas, um aumento no número de fendas e pontos de erosão foi observado.

A análise morfológica do polímero realizada por MEV no presente estudo mostrou que, após 04 semanas de permanência do polímero *in vivo*, já se observavam numerosos poros superficiais indicando sinais de início de degradação e que se tornaram mais evidentes em 08 semanas, quando comparados com o polímero íntegro. Vale ressaltar também a presença de grande parte do polímero ainda intacto no período de 12 semanas, o que está em acordo com os estudos anteriores que apontam tempo mais prolongado para a degradação do mesmo.

O incremento do grau de cristalinidade do PLLA é esperado durante o período de degradação, pois está relacionado ao fato de os polímeros semi-cristalinos sofrerem ataque preferencial de suas áreas amorfas, por conta de maior susceptibilidade de penetração de água nessas regiões. Além disso, pode estar associado à quebra hidrolítica e conseqüente formação de cadeias poliméricas de massa molar menor (DUEK, 1999).

In vivo, PLLA pode persistir por 03 anos no corpo mesmo após seu papel funcional ter sido concluído, foi o que constatou estudo em ovelhas que receberam a implantação de parafusos e hastes de PLLA (WALTON, 2007). Observou-se que a reação tecidual inicial é a apreensão do

implante dentro do novo tecido durante os primeiros meses. Após um período não-reativo, uma segunda reação está associada com os sinais precoces da desintegração estrutural do PLLA, que pode ser evidenciado em até um ano. Posteriormente, ao passo que a massa do polímero reduz este é substituído por um tecido relativamente fibroso avascular contendo macrófagos e células multinucleadas gigantes de corpo estranho (CGCE) ocasionais na superfície do implante (WALTON, 2007). As CGCE são formadas pela fusão de macrófagos derivados de monócitos que podem se aderir à superfície do biomaterial. A fusão célula-célula pode ser induzida por IL-4 (McNALLY e ANDERSON, 1995) e IL-13 (DeFIFE *et al.*, 1997), que regulam a expressão do receptor de manose, que possui localização na região de fusão das membranas nos macrófagos. Entretanto, o mecanismo exato que induz a fusão de macrófagos ainda não está totalmente elucidado.

Macrófagos são capazes de fagocitar partículas muito pequenas, menores que 5 μm , enquanto que partículas maiores que 10 μm induzem a formação de CGCE. Diferentes tipos de biomateriais podem induzir diferentes respostas teciduais. Os tecidos que revestem próteses totais de articulações são expostos a partículas micrométricas de polietileno, cimento acrílico, metais originadas do desgaste do material pela movimentação articular, e podem induzir a reação de corpo estranho. Em ambientes de tecidos moles, as próteses são submetidas a forças mínimas e sofrem menos desgaste, tendendo a se manter intactas, e macrófagos e CGCE aderem e respondem à superfície do material de modo mais brando. A adesão destas células fagocíticas ao biomaterial produz um microambiente funcional entre a membrana plasmática e a superfície do material. Em processo descrito por Henson (1971) como fagocitose frustrada, estas células liberam substâncias de degradação como radicais livres de oxigênio, enzimas degradativas e ácidos que levam o pH a 4 neste microambiente enclausurado, reduzindo a ação de processos teciduais naturais de inibição enzimática ou tamponamento. As superfícies dos biomateriais que estão seladas pelas membranas plasmáticas estão expostas a elevadas concentrações daqueles agentes de degradação, e o tipo químico do biomaterial irá responder de forma diferente a esta degradação. Entretanto, a química de superfície do biomaterial indicará sua susceptibilidade para degradação. Polímeros como os polipropilenos e poliésteres usados em materiais de suturas podem sofrer processos de oxidação por moléculas oxigênio-reativas, como forma de degradação e a completa reabsorção dos monômeros, que são degradados em seguida pelo ciclo de Krebs. Exemplos destes polímeros estão os ácidos lácticos e glicólicos, policaprolactona e outros. A degradação enzimática também tem sido envolvida na via de degradação de biomateriais poliésteres, mas o tempo de degradação dependerá da cristalinidade do polímero (ANDERSON *et al.*, no prelo).

Segundo Walton *et al.* (2007), embora biocompatível, a excessiva longevidade do PLLA pode indicar que, apesar de clinicamente satisfatório, não é um material de implante ideal. Por outro lado, Barber *et al.* (2000), sugerem que, apesar do tempo prolongado para a degradação, fixações de autoenxertos de tendão patelar com bioparafusos de PLLA funcionam seguramente como uma fixação de intervenção. De Tayrac *et al.* (2007), ao avaliarem a implantação de malhas de PLLA, PGA e polipropileno no reparo de tecido mole em ratos, observaram que as malhas de PLLA induziram a uma resposta inflamatória mais branda, maior depósito ordenado de colágeno e resistência tênsil preservada após 90 dias de implantação.

A degradação hidrolítica é lenta no PLLA devido ao impedimento estérico das moléculas de água pelos grupos metil do PLLA e pelos baixos níveis de acidez que são requeridos para catalizar a reação hidrolítica, o que não ocorre com o PLLA, já que a acidez é em torno de 4. Com a formação de mais cadeias, porém menores, há um aumento na formação de grupos ácidos terminais que, por sua vez, aceleram o potencial de catalizar a reação hidrolítica adicional. Contudo, contrariando esta hidrólise aumentada, as pequenas cadeias de polímero se tornam mais móveis e têm uma tendência a se alinharem umas com as outras em uma forma cristalina, conseqüentemente diminuindo a rota de degradação. O resultado global é que, nos primeiros meses de degradação hidrolítica, existe uma diminuição gradual no peso molecular das cadeias localizadas na região amorfa e um aumento na cristalinidade, ainda que em um padrão relativamente constante de hidrólise. Como essas mudanças são internas ao polímero, não são detectáveis pelos tecidos circunvizinhos, que continuam em sua típica reação a um corpo estranho inerte (WALTON, 2007). Este mesmo autor descreve ainda que foram evidenciadas duas fases distintas da reação de tecidos aos implantes de PLLA: a primeira foi uma resposta padrão de pouca intensidade a um corpo estranho inerte e a segunda foi uma reação aos estágios posteriores de dissolução química do polímero.

Durante a primeira fase, o tecido é recoberto pela ferida cirúrgica e acomodado pela presença do implante. A resposta é a formação de um tecido novo que envolve o implante. Este período coincide com uma degradação hidrolítica inicial lenta do polímero que ocorre predominantemente no componente amorfo, quando relacionado ao componente cristalino. Uma vez em um meio aquoso aquecido, a difusão da água ocorre em alguns dias dentro do polímero para iniciar a hidrólise. Este processo envolve a clivagem das cadeias de polímero resultando em um maior número, porém em cadeias de peso molecular menor (WALTON, 2007).

A segunda fase da reação tecidual está associada com a desintegração física do PLLA vista em seus estágios iniciais e que podem ser evidenciadas em 01 ano e até mesmo 03 anos após o implante. Esta segunda fase é estimulada pela hidrólise autocatalítica das porções amorfas do polímero devido à formação de grupos de terminações ácidas. Conseqüentemente, após o início

lento, a hidrólise aumenta exponencialmente. Eventualmente, as cadeias curtas de polímero nas regiões amorfas são pequenas o bastante para se dispersarem da massa do polímero. Isto inicia a ocorrência de macrófagos e células gigantes de corpo estranho na superfície do implante. Estas células não podem degradar ativamente o polímero, logo são incapazes de invadir o material, porém repousam na sua superfície para ingerir os produtos das partículas finas e solubilizadas da hidrólise do PLLA. A perda parcial da fração amorfa do polímero causa uma descontinuidade entre as regiões cristalinas. Conseqüentemente, o implante começa a perder integridade física com a formação de fendas e lacunas. O alargamento subsequente das fissuras permite invasão celular seguido de aumento da fibrose. Em longo prazo, o tecido fibroso aumenta em volume para repor o volume diminuído do PLLA (WALTON, 2007).

Alguns estudos em humanos que relatam reações adversas a implantes de PLLA sugerem que esta segunda fase pode ocasionalmente levar a complicações clínicas. Contudo, observa-se que dispositivos vêm sendo fabricados em larga escala e implantados em humanos e ainda existem poucos trabalhos publicados sobre reações adversas que possam estar diretamente relacionadas ao polímero. Quando clinicamente sintomáticas, as reações ao PLLA têm sido atribuídas aos cristalitos dentro do material (WALTON, 2007).

Em estudo prospectivo e randomizado com 204 pacientes realizado por MCGUIRE *et al.* (1999) comparando um parafuso de PLLA com um de metal utilizando avaliação radiográfica, foi observado que os parafusos de PLLA ainda estavam presentes após 68 meses porém sem evidência de infiltração tecidual. As propriedades físicas que tornam o PLLA atrativo para o reparo de tendões são: a alta resistência tênsil, a indução de uma cicatrização tecidual rápida e a possibilidade de absorção (LIEM *et al.*, 1991).

Imagens de TEM obtidas em nosso trabalho mostram fibroblastos de tendão com vesículas extracelulares próximas à superfície celular contendo segmentos de colágeno arranjados em fibras paralelas. É proposto que estas vesículas sejam os sítios para a formação de colágeno em segmentos de fibrilas. Os segmentos de fibrilas de colágeno contidos nestes vacúolos são liberados no espaço extracelular, onde eles se unem lateralmente e ou linearmente para formar as fibras colágenas de tendão que formam os fascículos/ feixes de tendões (BIRK, 97; ERLICH, 2005).

Em estudo realizado por Liem *et al.* (1991) com dispositivos de PLA para o reparo de rupturas do tendão de Aquiles em adultos e avaliados com ressonância magnética após 3-35 meses, foi constatado que todos os tendões reparados com os dispositivos com PLA estavam hipertrofiados quando comparados com o lado contralateral, o que sugere ser provavelmente um reflexo do crescimento colagenoso interno induzido ao redor da extensão do dispositivo de PLA e que pode ser um fator significativo na resistência e integridade deste tipo de reparo. O reparo com o dispositivo de

PLA resulta em uma imobilização mais curta e com deambulação mais rápida quando comparados a métodos cirúrgicos convencionais de sutura de tendões (LIEM *et al.*, 1991).

A partir dos resultados obtidos nas análises morfológicas do nosso estudo, foram observadas células com morfologia fibroblastóide na região adjacente ao polímero o que poderia explicar a possível síntese de material de matriz abundante, bem como a presença de material fibroso entrelaçado próximo à superfície do polímero, provavelmente colágeno. Além disso, evidenciamos uma orientação paralela das células em relação à superfície do polímero, assim como uma maior organização das fibras de colágeno quando comparadas ao grupo controle. Com os dados obtidos, pôde-se concluir que ocorreram resultados positivos no que diz respeito à interação tendão/implante de PPLA como, por exemplo, o estímulo à adesão e proliferação celular, bem como a produção de moléculas específicas do tecido em questão, estresse reduzido, devido à possível transferência de carga gradual ao passo que ocorre a degradação, além de ausência de resposta inflamatória ou tóxica grave, caracterizando, assim, a biocompatibilidade do polímero em questão e a possibilidade de seu uso como alternativa viável no tratamento de lesões tendíneas.

6. CONCLUSÕES

- O modelo de lesão do tipo janela em tendão patelar de ratos foi adequado para o estudo do processo de reparação utilizando o poliéster ácido poli-láctico.
- A mobilidade imediata pós-cirurgia dos ratos não induziu a perda de polímero inserido na lesão, nem o agravamento da lesão no tendão.
- Fibroblastos alongados semelhantes à tenócitos se aderiram ao polímero e se organizaram de modo paralelo a direção do tendão nativo.
- O PLLA inserido no tendão durante 12 semanas experimentais apresentou sinais iniciais de degradação em sua superfície.
- O PLLA causou reação de corpo estranho, já que numerosas células gigantes multinucleadas de corpo estranho e macrófagos foram observados aderidos ao polímero, mas não foi observada cápsula fibrótica ao redor do mesmo.
- As técnicas morfológicas utilizadas em combinação foram adequadas para o acompanhamento das etapas de regeneração tecidual.

- O PLLA, um tipo de poliéster sintético e biodegradável, mostrou grande potencialidade como biomaterial para preenchimento de lesão tendínea e auxiliar no processo de regeneração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alsberg, E., Anderson, K.W., Albeiruti, A., Rowley, J.A. and Mooney, D.J. (2002). Engineering growing tissues. *Applied biological sciences*, 99 (19): 12025-12030.
- Ambrose, C.G. & Clanton, T.O. (2004). Bioabsorbable implants: review of clinical experience in orthopedic surgery. *Annals of biomedical engineering*, 32 (1): 171-177.
- Anderson J.M., Rodriguez A. and Chang D.T. (in press). Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, doi:10.1016/j.smim.2007.11.004
- Athanasiou, K.A., Niederauer, G.G. and Agrawal, C.M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17: 93-102.
- Barber, F.A., Elrod, B.F., McGuire, D.A. and Paulos, L.E. (2000). Bioscrew fixation of patellar tendon autografts. *Biomaterials*, 21: 2623-2629.
- Benjamin, M., Kumai, T., Milz, S., Boszczyk, B.M., Boszczyk, A.A. and Ralphs, J.R. (2002). The skeletal attachment of tendons—tendon ‘entheses’. *Comparative biochemistry and physiology*, 133A: 931–945.
- Birk, D.E., Zycband, E.I., Woodruff, S., Winkelmann, D.A. and Trelstad, R.L. (1997). Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Developmental dynamics*, 208: 291-298.
- Canty, E.G. & Kadler, K.E. (2002). Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. *Comparative biochemistry and physiology*. 133A: 979–985.
- Canty, E.G. & Kadler, K.E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of cell science*, 118: 1341-1353.
- Carothers, W. H., Dorough, G. L. and Natta, F. J. V. (1932). Studies of polymerization and ring formation X the reversible polymerization of six- membered cyclic esters. *Journal of the American Chemical Society*, 54: 761.

- Carpenter, J.E. & Hankenson, K.D. (2004). Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 25: 1715-1722.
- Chan, B.P., Fu, S.C., Qin, L., Rolf, C. and Chan, K.M. (1998). Pyridinoline in relation to ultimate stress of the patellar tendon during healing: an animal study. *Journal of Orthopaedic Research* 16: 597–603.
- Chan, B. P., Fu, S. C., Qin, L., Lee, K., Rolf, C.G. and Chan, K. (2000). Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 71(5): 513-518.
- DeFife, K.M., Jenney, C.R., McNally, A.K., Colton, E., Anderson, J.M . (1997). Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *Journal of immunology*, 158(7): 3385–90.
- De Tayrac, R., Olivia-Lauraire, MC., Guiraund, I. Henry, L. Vert, M. and Mares, P. (2007). Long-lasting bioresorbable poly (lactic acid) (PLA94) mesh: a new approach for soft tissue reinforcement base don experimental pilot study. *International Urogynecology Journal*, 18(9): 1007-1014.
- Doschak, M.R., Matyas, J.R., Hart, D.A. and Bray, R.C. (2001). Vascular alterations in the rabbit patellar tendon after surgical incision. *Journal of anatomy*, 198: 513-523.
- Duek, E.A.R., Zavaglia, C.A.C. and Belangero, W.D. (1999). In vitro study of poly (lactic acid) pin degradation. *Polymer*, 540: 6465- 6473.
- Erlich, H.P., Lambert, P.A., Saggars, G.C., Myers, R.L. and Hauck, R.M. (2005). Dynamic changes appearing in collagen fibres during intrinsic tendon repair. *Annals of plastic surgery*, 54 (2): 201-206.
- Fenwick, S.A., Hazleman, B.L. and Riley, G.P. (2002). The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Research*, 4 (4): 252-260.
- Goodship, A.E., Wilcock, S.A. and Shah, J.S. (1985). The development of tissue around various prosthetic implants used as replacements for ligaments and tendons. *Clinical orthopaedics and related research*, 196: 61-68.
- Graham, H.K., Holmes, D.F., Watson, R.B. and Kadler, K.E. (2000). Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis- the process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen proteoglycan interaction. *Journal of molecular biology*, 295: 891-902.
- Griffith, L.G. (2000). Polymeric biomaterials. *Acta materialia*, 48: 263-277.

- Henson, P.M. (1971). The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. *Journal of immunology*, 107(6): 1535–46.
- Hollinger, J.O. & Leong, K. (1996). Poly (α - hydroxyl acids): carriers for bone morphogenetic protein. *Biomaterials*, 17: 187-194.
- Holmes, D.F., Graham, H.K. and Kadler, K.E. (1998). Collagen fibrils forming in developing tendon show an early and abrupt limitation in diameter at the growing tips. *Journal of molecular biology*, 283: 1049-1058.
- Jukkala-Partio, K., Laitinen, O., Vasenius, J., Partio, E.K., Toivonen, T., Tervahartiala, P., Kinnunen, J. and Rokkanen, P. (2002). *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 122: 360-364.
- Jozsa, L., Kannus, P., Balint, J.B. and Reffy, A. (1991). Three–dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta anatomica*, 142: 306-312.
- Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A. and Chapman, J.A. (1996). Collagen fibril formation. *Biochemical journal*, 316: 1-11.
- Kakar, S.; KHAN, U. and McGrouther, D.A. (1998). Differential cellular response within the rabbit tendon unit following tendon injury. *Journal of hand surgery*, 23B (5): 627-632.
- Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 10: 312-320.
- Kannus, P. & Jozsa, L. (1991). Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 73:1507-1525.
- Khan, K.M.; Cook, J.L., Bonar, F., Harcourt, P. and Astrom, M. (1999). Histopathology of common tendinopathies - Update and Implications for Clinical Management. . *Sports medicine*, 27 (6): 393-408.
- Kirkendall, G. (1997). Function and biomechanics of tendons. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 7: 62-66.
- Koh , J.L., Szomor, Z., Murrel, G. and Warren, R.F. (2002). Supplementation of rotator cuff repair with a bioresorbable scaffold. *The American orthopaedic society for sports medicine*, 30 (3): 410-413.
- Koob, T.J. (2002). Biomimetic approaches to tendon repair. *Comparative biochemistry and physiology*, 133A: 1171-1192.

- Kubota, H., Manske, P.R., Aoki, M., Pruitt, D.L. and Larson, B.J. (1996). Effect of motion and tension on injured flexor tendons in chickens. *Journal of Hand Surgery*, 21A (3): 456–463.
- Kulkarni, R.K., Pani, K. C., Neuman, C. and Leonard, F. (1966). Polylactid Acid For Surgical Implants. *Archives of surgery*, 93: 839-843.
- Langer, R. & Tirrell, D. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428: 487-492.
- Liem, M.D., Zegel, H.G., Balduini, F.C., Turner, M.L., Becker, J.M. and Caballero-Saez, A. (1991). Repair of achilles tendon ruptures with a polylactic acid implant: assessment with MR imaging. *American journal of Roentgenology*, 156: 769-773.
- Lin, T.W., Cardenas, L. and Soslowky, L.J. (2004). Biomechanics of tendon injury and repair. *Journal of biomechanics*, 37: 865-877.
- Lu, H.H., Cooper, J.A.Jr., Manuel, S., Freeman, J.W., Attawia, M.A., Ko, F.K. and Laurencin, C.T. (2005). Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials*, 26(23): 4805-16.
- Mainil-Varlet, P., Rahn, B. and Gogolewski, S. (1997). Long-term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides: one year results. *Biomaterials*, 18: 257-266.
- McGuire, D.A., Barber, F.A., Milchgrub, S. and Wolchok, J.C. (2001). A postmortem examination of poly-l lactic acid interference screws 4 months after implantation during anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy: the journal of arthroscopy and related surgery*, 17 (9): 988-992.
- McNally, A.K. & Anderson, J.M. (1995). Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *The American journal of pathology*, 147(5):1487–99.
- Middleton, J.C. & Tipton, A.J. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, 21: 2335-2346.
- Milano, G., Gigante, A., Panni, A.S., Mulas, P.D. and Fabbriani, C. (2001). Patellar tendon healing after removal of its central third. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*, 9: 92-101.
- O'Brien, M. (1997). Structure and metabolism of tendons. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 7: 55-61.

- Palmes, D., Spiegel, H.U., Schneider, T.O., Langer, M., Stratmann, U., Budny, T. and Probst, A. (2002). Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *Journal of Orthopaedic Research*, 20: 939–946.
- Peppas, N. & Langer, R. (1994). New challenges in biomaterials. *Science*, 263: 1715-1720.
- Pietrzak, W. Sarver, D. and Verstynen, M. (1996). Bioabsorbable implants: practical considerations. *Bone*, 19: 109S-119S.
- Rokkanen, P.U., Bostman, O., Hirvensalo, E., Makela, A.E., Partio, E.K., Patiala, H., Vainiopaa, S., Vihtonen, K. and Tormala, P. (2000). Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*, 21: 2607-2613.
- Santander, R.G., Arriba, M.A.P. Cuadrado, G.M, Alonso, A.L, Martinez, M.G, Martinez Alonso, F.G., Monteagudo, M. and Lobo, M.V.T. (1999). Intracellular biogenesis of collagen fibrils in ‘activated fibroblasts’ of tendo Achillis.: An ultrastructural study in the New Zealand rabbit. *The journal of bone and joint surgery*, 81-B (3): 522-529.
- Schwach, G. & Vert, M. (1999) *In vitro* and *in vivo* degradation of lactic acid- based interference screws used in cruciate ligament reconstruction. *International journal of biological macromolecules*, 25: 283-291.
- Scott, J.E. (2003). Elasticity in extracellular matrix ‘shape modules’ of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *Journal of Physiology*, 553. (2): 335-343.
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:242–247.
- Sittinger, M., Hutmacher, D.W. and Risbud, MV.(2004). Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. *Current opinion in biotechnology*, 15(5):411-8.
- Shin, H., Jo, S. and Mikos, A.G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24: 4353-4364.
- Smith, K. and Rennie, M. (2007). New approaches and recent results concerning human-tissue collagen synthesis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 10: 582-590.
- Smith, R.K.W., Birch, H.L., Goodman, S., Heinegard, D. and Goodship, A.E. (2002). The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration-hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies. *Comparative biochemistry and physiology*. 133A: 1039–1050.
- Temenoff, J.S. and Mikos, A.G. (2000). Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials*, 21 (23): 2405-2412.

- Tuite, D.J., Renstrom, P.A.F.H. and O'Brien, M. (1997). The aging tendon. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 7: 72 -77.
- Walton, M. & Cotton, N.J. (2007). Long term *in vivo* degradation of poly-L-lactide (PLLA) in bone. *Journal of biomaterials applications*, 21 (4): 395-411.
- Wuisman, P.I.J.M. & Smit, T.H. (2006). Bioresorbable polymers: healing for a new generation of spinal cages. *European spine journal*, 15: 133-148.
- Yoon, J.H. & Halper, J. (2005). Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 5 (1): 22-34.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)