

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**KAMILLA DINAH SANTOS DE LIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO TENDÍNEO E DO TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO APÓS O USO DO BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR COMO COADJUVANTE NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA  
LESÃO COMPLETA DO TENDÃO DO CALCÂNEO**

**Recife**

**2017**

**KAMILLA DINAH SANTOS DE LIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO TENDÍNEO E DO TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO APÓS O USO DO BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR COMO COADJUVANTE NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA  
LESÃO COMPLETA DO TENDÃO DO CALCÂNEO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Ponto Focal: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Sílvia Regina Arruda de Moraes.

**Recife**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Lira, Kamilla Dinah Santos de

Caracterização do tecido tendíneo e do tecido muscular esquelético após o uso do biopolímero extraído da cana-de-açúcar como coadjuvante no processo de cicatrização da lesão completa do tendão do calcâneo/ Kamilla Dinah Santos de Lira - 2017.

83 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Sílvia Regina Arruda de Moraes

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. Biopolímeros 2. Músculos esqueléticos 3. Tendão de Aquiles I. Moraes, Sílvia Regina Arruda de (orient.) II. Título

572.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-155

**CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO TENDÍNEO E DO TECIDO MUSCULAR  
ESQUELÉTICO APÓS O USO DO BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR COMO COADJUVANTE NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA  
LESÃO COMPLETA DO TENDÃO DO CALCÂNEO**

**KAMILLA DINAH SANTOS DE LIRA**

**APROVADA EM: 27/09/2017**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup>. SILVIA REGINA ARRUDA DE MORAES

---

PROF. DR. MOACYR JESUS BARRETO DE MELO RÊGO

---

PROF. DR. JOSE LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR

---

PROF. DR. VITOR CAIAFFO BRITO

---

PROF.<sup>A</sup> DR<sup>a</sup>. MARIA DAS GRAÇAS WANDERLEY DE SALES CORIOLANO

Aos meus pais, *DAVI QUINTINO DE LIRA* e *RISONETE SANTOS DE LIRA*, que estão e sempre estiveram ao meu lado, sempre acreditaram em mim e me incentivaram. Eu não teria chegado até aqui sem eles!

## AGRADECIMENTOS

**A Deus**, pelo seu infinito amor, sua misericórdia e sua bondade, por estar sempre presente me guiando em cada momento, me amparando nas dificuldades, e me dando força;

**Aos meus pais**, *Davi Quintino de Lira e Risonete Santos de Lira*, pelo amor, pela dedicação, pela perseverança e por acreditarem no meu potencial;

**Ao meu irmão**, *Kaio Danillo Santos de Lira*, pelo carinho e pela confiança depositada em mim;

**Ao marido**, *Alexandre Nascimento dos Santos*, pela paciência, pelo amor, pelo apoio, pela calma para me confortar nos momentos de angústia;

**À minha família**, pela compreensão e incentivo.

**À minha orientadora**, *Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Regina Arruda de Moraes*, por me “adotar” cientificamente desde a graduação, me ensinando, incentivando, acreditando no meu potencial, me corrigindo sempre que necessário, e tendo muita paciência;

**Aos professores Membros das Bancas de Qualificação e de Defesa da Tese**, pela compreensão e considerações sempre pertinentes.

**À Coordenação do RENORBIO**, pelo auxílio;

**Aos Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UFPE, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE), Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e Laboratório de Morfometria (UFPE)**, pela disponibilidade para a execução de várias etapas experimentais do meu projeto de doutorado;

**À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE),** pelo apoio financeiro;

**Aos meus amigos do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (LAPLAN),** *Ana Cristina Esteves, Márcio Bezerra, Deniele Lós, Cybelle Nery, Camilla Rodrigues, Ana Camila Brito, Waydja Marinho, Kelly Oliveira, Diogo Lima, Elvis Freitas, Laila Bezerra, Marina Gomes, Marina Cavalcante, Paula Alves, Paulo Queiroz, Sara Santos, Silvia Marques, Tamires Nascimento, Wenddy Sougey, Wilayane Martins,* pelo empenho, dedicação e apoio ao longo desses anos;

**Aos meus amigos que foram do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (LAPLAN),** são tantos que não consigo listar! Muito obrigada pelos ensinamentos, carinho e apoio desde o início da minha iniciação científica;

**Aos amigos que ganhei desde a graduação,** *Danielle Tavares, Camilla Sarah, Olávio Campos, Anne Gabrielle Oliveira, Danielle Val, Anderson Silva, Mário Albuquerque,* pelas conversas, incentivo, apoio e ajuda;

**Aos funcionários do Departamento de Anatomia da UFPE,** pelo incentivo e amizade.

*“não temas, porque Eu sou contigo; não te assombres,  
porque Eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e  
te sustento com a minha destra fiel.”*

Isaías 41:10 (Bíblia Sagrada)

## RESUMO

O tendão do Calcâneo é uma estrutura resistente a altas forças de tensão. Sua ruptura é uma lesão grave e gera uma série de alterações em sua biomecânica, além de atrofia muscular, porém com tratamento ainda controverso. Nos últimos anos, o biopolímero da cana-de-açúcar tem sido estudado em diversas áreas da cirurgia experimental e apresenta entre outras características elasticidade, resistência à tração e flexibilidade. No presente estudo, buscou-se avaliar, no tecido tendíneo e no tecido muscular, o efeito do uso do filme de biopolímero da cana-de-açúcar como coadjuvante na cicatrização de uma lesão total do tendão do Calcâneo. Foram utilizados 110 ratos, albinos, da linhagem *Wistar*, mantidos sob condições padrão de biotério, ciclo claro/escuro invertido, água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: Grupo Controle (GC, n=34), sem lesão do tendão; Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB, n=38) - com lesão e reconstituição do tendão; Grupo Lesão + Biopolímero (GLB, n=38) - com lesão e reconstituição do tendão com o biopolímero. O Índice Funcional do Aquiles (IFA) dos animais de todos os grupos foi avaliado na semana pré-cirurgia, nos 3º, 10º, 20º e 30º dias pós-cirúrgicos. A tenotomia foi realizada nos grupos experimentais, exceto no GC, porém apenas no GLB era realizada a reconstituição da lesão com o filme de biopolímero da cana-de-açúcar, no GLSB era realizada a reconstituição sem o filme de biopolímero da cana-de-açúcar. Após a tenotomia, uma parte dos animais de cada grupo foram eutanasiados nos 3º, 10º, 20º e 30º dias pós-cirúrgicos para ser realizada a coleta do tendão do Calcâneo e encaminhamento para a análise histológica e imunohistoquímica. Trinta dias após a injúria, foram coletados os músculos Sóleo, Gastrocnêmios Medial e Lateral de animais dos três grupos para pesagem e cálculo da massa muscular relativa. Os dados foram submetidos à análise estatística, adotou-se uma margem de segurança de 95% de confiabilidade, e os valores foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Foi observado que os grupos lesionados (GLSB e GLB) apresentaram redução do IFA durante todo o experimento e um aumento na quantidade de tenoblastos em relação ao GC no 30º dia pós-cirúrgico. No GLB observou-se um aumento na quantidade de macrófagos até o final do experimento, alteração na expressão de algumas proteínas e presença de células

inflamatórias em volta do biopolímero. Pode-se concluir que o biopolímero da cana-de-açúcar não interferiu na deambulação dos animais, que mesmo gerando uma reação inflamatória crônica no tecido tendíneo, essa reação não retardou o processo de cicatrização.

**Palavras-chave:** Biopolímeros. Músculo Esquelético. Tendão do Calcâneo.

## ABSTRACT

The Achilles tendon is a structure resistant to high forces of tension. Its rupture is a serious injury and generates a series of changes in their biomechanics, and muscle atrophy, but with still controversial treatment. In recent years, the biopolymer of sugarcane has been studied in various areas of experimental surgery and offers among other features elasticity, tensile strength and flexibility. The aim of this study was to evaluate the effect of sugarcane biopolymer film on tendon tissue and muscle tissue as a coadjuvant in the healing of a total Aquilles tendon injury. 110 male rats, albino, *Wistar*, were kept under standard conditions vivarium, light/dark reversed cycle, with *ad libitum* ration and water. The animals were divided into 3 groups: Control Group (CG, n = 34), without tendon injury; Injury without Biopolymer Group (IWBG, n = 38), with injury and reconstruction of the tendon; Injury + Biopolymer Group (IBG, n = 38), with injury and reconstruction of tendon with the biopolymer. The Achilles Functional Index (AFI) of the animals of all groups was evaluated in pre-surgery week, at the 3rd, 10th, 20th and 30th postoperative days. The tenotomy was performed in the experimental groups, except in the CG, but only in the IBG was performed the reconstitution of the lesion with the biopolymer film of the sugarcane, in the IWBG was performed the reconstitution without the biopolymer film of the sugarcane. After the tenotomy, a fraction of animals from each group were euthanized at the 3rd, 10th, 20th and 30th postoperative days to collect the Achilles tendon and refer to the histological and immunohistochemical analysis. Thirty days after injury, the soleus, medial and lateral gastrocnemius muscles of the three groups were collected for weighing and calculation of relative muscle mass. Data were submitted to statistical analysis, a safety margin of 95% was adopted, and values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. It was observed that the lesioned groups (IWBG and IBG) presented reduction of the AFI throughout the experiment and an increase in the amount of tenoblasts in relation to the CG on the 30th postoperative day. In IBG was observed an increase in the amount of macrophages until the end of the experiment, alteration in the expression of some proteins and presence of inflammatory cells around the biopolymer. It can be concluded that the sugarcane biopolymer did not interfere in the ambulation of the animals, which, even

generating a chronic inflammatory reaction in the tendinous tissue, this reaction did not delay the cicatrization process.

Keywords: Biopolymers. Skeletal muscle. Achilles Tendon.

## SUMÁRIO

	Pág
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 14
1.1	REVISÃO DE LITERATURA ..... 15
<b>1.1.1</b>	<b>Tendão</b> ..... 15
1.1.1.1	Estrutura dos Tendões ..... 15
1.1.1.2	Lesão em Tendões ..... 16
1.1.1.3	Cicatrização dos Tendões ..... 17
<b>1.1.2</b>	<b>Tecido Muscular Esquelético</b> ..... 20
1.1.2.1	Estrutura dos Músculos Esqueléticos ..... 20
1.1.2.2	Consequências de Lesões Tendíneas sobre os Músculos Esqueléticos. 21
<b>1.1.3</b>	<b>Biopolímero da Cana-de-Açúcar</b> ..... 23
1.1.3.1	Histórico ..... 23
1.2	HIPÓTESES ..... 25
1.3	OBJETIVOS ..... 25
<b>1.3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> ..... 25
<b>1.3.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> ..... 25
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> ..... 26
2.1	LOCAL DO ESTUDO ..... 26
2.2	TIPO DE ESTUDO ..... 26
2.3	ASPECTOS ÉTICOS ..... 26
2.4	AMOSTRA ..... 26
2.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS ..... 27
<b>2.5.1</b>	<b>Modelos Experimentais</b> ..... 27
<b>2.5.2</b>	<b>Obtenção do Filme de Biopolímero de Cana-de-Açúcar</b> ..... 27
<b>2.5.3</b>	<b>Procedimento Cirúrgico</b> ..... 28
<b>2.5.4</b>	<b>Análise Funcional da Marcha</b> ..... 29
<b>2.5.5</b>	<b>Mensuração do Peso Corpóreo e Preparo para Coleta do Material..</b> 31
<b>2.5.6</b>	<b>Coleta do Tendão Direito</b> ..... 31
<b>2.5.7</b>	<b>Coleta do Tecido Muscular Direito</b> ..... 31
<b>2.5.8</b>	<b>Cegamento do Estudo</b> ..... 31
2.6	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS ..... 32

2.7	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DO TECIDO TENDÍNEO COLETADO	32
2.7.1	<b>Histologia do Tecido Tendíneo</b> .....	32
2.7.2	<b>Imunohistoquímica do Tecido Tendíneo</b> .....	34
2.8	ANÁLISE DO TECIDO MUSCULAR COLETADO .....	35
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	35
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
3.1	ARTIGO 1: AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO USO DE UM FILME DE BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO COADJUVANTE NA REPARAÇÃO DO TENDÃO DO CALCÂNEO .....	36
3.2	ARTIGO 2: CICATRIZAÇÃO DA TENOTOMIA COMPLETA DO TENDÃO DE AQUILES COM USO DE UM BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	50
3.3	ARTIGO 3: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE MIP-1 $\alpha$ , TGF 1 $\beta$ E VIMENTINA DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO DO CALCÂNEO .....	64
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>75</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>76</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</b> .....	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Esta tese faz parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - LAPLAN do Departamento de Anatomia da UFPE, que tem como objetivo estudar as repercussões do uso do filme de Biopolímero da cana-de-açúcar como coadjuvante no reparo de alguns tecidos em modelos animais.

Em outro estudo realizado pelo grupo de pesquisa, foi observado uma resposta favorável da reparação do tecido tendíneo aos 30 dias após uma tenotomia total com o uso desse biopolímero. A partir desses resultados, foi utilizado o mesmo modelo de lesão total do tendão, a fim de avaliar o processo de cicatrização do tendão e as repercussões sobre o tecido muscular esquelético num modelo de lesão tendínea.

Inicialmente foi aplicado um protocolo experimental em ratos da linhagem *Wistar* com a finalidade de provocar a lesão do tendão do Calcâneo e, posteriormente foi realizado seu reparo com adição do filme de Biopolímero da cana-de-açúcar.

Dos dados obtidos, resultaram três artigos originais:

- Avaliação funcional do uso de um filme de biopolímero extraído da cana-de-açúcar como coadjuvante na reparação do tendão do Calcâneo (submetido para publicação na *Disability and Rehabilitation* – Conceito B1 para Biotecnologia).
- Cicatrização da tenotomia completa do tendão de Aquiles com uso de um biopolímero extraído da cana-de-açúcar (submetido para publicação na *Journal of Inflammation* – Conceito B1 para Biotecnologia).
- Análise da expressão proteica de MIP-1 $\alpha$ , TGF 1 $\beta$  e Vimentina durante o processo de cicatrização do tendão do calcâneo.

O presente exemplar está estruturado da seguinte maneira:

1. Introdução
  2. Material e Métodos
  3. Resultados e Discussão
  4. Considerações Finais
- Referências
- Anexos

## 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1 Tendão

#### 1.1.1.1 Estrutura dos Tendões

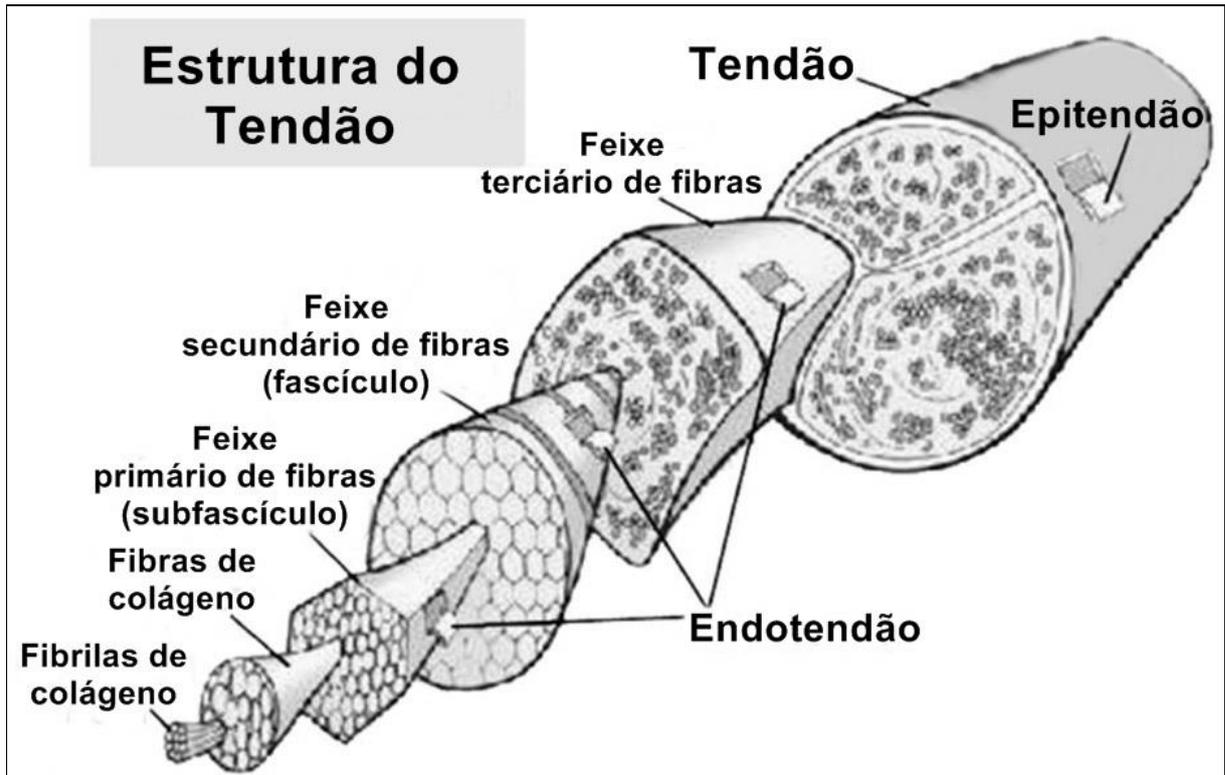
O tendão é um tecido conjuntivo denso (CRIBB; SCOTT, 1995) que compõe uma unidade do tecido músculo esquelético, que é flexível e ligeiramente extensível (JAMES *et al.*, 2008). Transmite força do músculo ao osso fornecendo a função articular (MAQUIRRIAIN, 2011; MOSHIRI; ORYAN, 2013; GUO *et al.*, 2016) ao provocar o movimento sem perda de energia contrátil (JAMES *et al.*, 2008). Sua massa seca nos humanos é aproximadamente 30% da massa total do tendão (SHARMA; MAFFULLI, 2005a).

O tecido conjuntivo é formado por matriz extracelular, cuja composição é: substância fundamental (glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas de adesão); fibras de colágeno e fibras elásticas (elastina e microfibrilas); e outros tipos de células, como os fibroblastos (GARTNER; HIATT, 2003). Tais fibroblastos dispõem-se entre as fibras de colágeno nos tendões, e sintetizam e mantêm a matriz extracelular (JAMES *et al.*, 2008).

Os tendões têm cor branca brilhante e textura fibroelástica (SHARMA; MAFFULLI, 2005b), são compostos por feixes de fibras de colágeno alinhados paralelamente ao eixo longitudinal do tendão (CRIBB; SCOTT, 1995), e rodeados por uma bainha tendínea também constituída por componentes da matriz extracelular (JAMES *et al.*, 2008). São revestidos pelo epitendão, uma bainha de tecido conjuntivo fino e frouxo, com suprimento vascular, linfático e nervoso para o tendão, e se estende profundamente com o endotendão entre os feixes (SHARMA; MAFFULLI, 2005a; SHARMA; MAFFULLI, 2005b) (Figura 1).

O colágeno sintetizado constitui a unidade estrutural básica do tendão, sendo predominante o colágeno tipo I, já o colágeno tipo III está presente no endotendão e epitendão, e as fibras de elastina e as glicoproteínas proporcionam estabilidade funcional para esse colágeno (JAMES *et al.*, 2008).

Figura 1. Estrutura de um tendão.



Fonte: SHARMA e MAFFULLI (2005b) (adaptado)

#### 1.1.1.2 Lesão em Tendões

O tendão do Calcâneo é o tendão mais forte e mais espesso no corpo humano (MAQUIRRIAIN, 2011), e pode suportar altas forças de tensão até sofrer lesões (TOMIOSSO *et al.*, 2009). Tais lesões podem ser parciais ou totais (DAHER *et al.*, 2011), como as rupturas, que estão constantemente aumentando sua frequência devido ao aumento de atividades esportivas das sociedades modernas (GEBAUER *et al.*, 2007), e tendem a ser locais, podendo ocorrer por mecanismos diretos ou indiretos (WOO *et al.*, 1999).

Tanto as lesões tendíneas parciais quanto as lesões totais podem gerar incapacidade e disfunção significativas para ambos os atletas profissionais e amadores (DAHER *et al.*, 2011), uma vez que podem causar uma instabilidade articular significativa, levando a lesões de tecidos adjacentes e ao desenvolvimento de doenças articulares degenerativas (WOO *et al.*, 1999).

No momento que ocorre a lesão, vários eventos de sinalização são iniciados, os quais recrutam fibroblastos e estimulam os tenócitos locais a sintetizar o colágeno e outros componentes extracelulares, estabelecendo continuidade física no local

(JAMES *et al.*, 2008). Porém, atualmente métodos para melhorar o tempo de reparação do tendão, bem como a qualidade de reparação são uma necessidade clínica não atendida (DAHER *et al.*, 2011), pois a organização e as propriedades mecânicas de um tendão reparado são inferiores às de um tendão saudável (TOMIOSSO *et al.*, 2009; DAHER *et al.*, 2011). Diante disso, o principal objetivo desse tratamento deve ser o de restaurar o comprimento normal e tensão, obtendo assim uma função ótima, porém o melhor tratamento ainda é controverso (MAQUIRRIAIN, 2011).

A imobilização tem um efeito prejudicial sobre a cicatrização de tendões (MURRELL *et al.*, 1998), como também prejudica as propriedades biomecânicas do tendão (PALMES *et al.*, 2002). Outros métodos conservadores mais recentes mostraram benefícios na reparação desse tipo de lesão: Terapias com Ultrassom (FRASSON; TACIRO; PARIZOTTO, 2009), Laser (NG; FUNG, 2008) e Células-Tronco (DAHER *et al.*, 2011).

O tendão uma vez lesionado fica mais longo (MULLANEY *et al.*, 2006). Porém, esse alongamento pode produzir comprometimento funcional permanente (MAQUIRRIAIN, 2011), e a reparação cirúrgica, proporciona maior estabilidade (GEBAUER *et al.*, 2007), e ótima restauração do comprimento, tensão e *stiffnes* do tendão (MAQUIRRIAIN, 2011). Sendo assim, uma vez selecionados corretamente o material da sutura (GEBAUER *et al.*, 2007) e a técnica a ser utilizada para prevenir o afastamento do tendão reparado (MAQUIRRIAIN, 2011), a reparação cirúrgica pode ser uma ótima opção de tratamento.

#### 1.1.1.3 Cicatrização dos Tendões

O reparo do tendão começa com o reestabelecimento da continuidade das fibras tendíneas e do mecanismo de deslizamento (JAMES *et al.*, 2008). Logo, após a lesão tendínea, é iniciado o processo de cicatrização (CUI *et al.*, 2011) através de uma resposta inflamatória que passa por fases celulares sobrepostas (SHARMA; MAFFULLI, 2005a; SHARMA; MAFFULLI, 2005b; HOPE; SAXBY, 2007). Geralmente essas fases da cicatrização são denominadas como: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação (SHARMA; MAFFULLI, 2005a; SHARMA; MAFFULLI, 2005b; HOPE; SAXBY, 2007; JAMES *et al.*, 2008). Porém o período considerado para de cada uma pode variar de acordo na literatura.

*Fase Inflamatória:* Inicia quase imediatamente após a lesão do tendão e, devido aos danos nos vasos sanguíneos situados na bainha tendínea, há a formação de um hematoma (HOPE; SAXBY, 2007; JAMES *et al.*, 2008). Woo e colaboradores (1999) consideraram esse primeiro momento como uma fase anterior à fase inflamatória, denominada de fase hemorrágica. A agregação das plaquetas e formação do coágulo ativa a liberação de vasodilatadores (JAMES *et al.*, 2008) e de citocinas (mediadores pró-inflamatórios), e provoca a atração de leucócitos polimorfonucleares e linfócitos em algumas horas (WOO *et al.*, 1999; ROSENBAUM *et al.*, 2010; STÅLMAN; BRING; ACKERMANN, 2015). A MIP-1 $\alpha$  [CCL3] e outras quimiocinas são expressas e atraem células inflamatórias (STÅLMAN; BRING; ACKERMANN, 2015). Nas primeiras 24h, os monócitos e os macrófagos predominam (SHARMA; MAFFULLI, 2005a; SHARMA; MAFFULLI, 2005b). Os macrófagos são os responsáveis pela fagocitose dos tecidos necróticos, pela quebra do coágulo de sangue (HOPE; SAXBY, 2007), e por secretar fatores de crescimento que induzem a neovascularização e a formação de tecido de granulação (WOO *et al.*, 1999; ROSENBAUM *et al.*, 2010). As células inflamatórias produzem e liberam TGF  $\beta$ 1 (INOUE *et al.*, 2015) que promove uma maior migração celular e sintetiza fibras de colágeno (OTOSHI *et al.*, 2011).

- *Fase Proliferativa:* Inicia depois de alguns dias (SHARMA; MAFFULLI, 2005b), porém funde-se com a fase inflamatória e está caracterizada pela proliferação de fibroblastos de forma que, no local, o epitendão atinge uma espessura de 15 a 20 células (HOPE; SAXBY, 2007). Os fibroblastos são o último tipo de células a chegar dentro da ferida (WOO *et al.*, 1999), e o seu recrutamento continuado e a sua proliferação rápida no local da ferida são responsáveis pela síntese de colágeno, proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular (JAMES *et al.*, 2008), e expressam muito marcadores, entre eles a vimentina (XU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). Nessa fase, a expressão do gene para o colágeno tipo I diminui, porém retorna à sua normalidade após algumas semanas (HOPE; SAXBY, 2007), a produção de colágeno tipo III se mantém bastante elevada (SHARMA; MAFFULLI, 2005b), os brotos capilares começam a se formar (WOO *et al.*, 1999), e o tecido em reparação contém grandes quantidades de água e de componentes da matriz extracelular (JAMES *et al.*, 2008). Durante as primeiras semanas após a reparação, a força do tendão aumenta significativamente. (HOPE; SAXBY, 2007).

- *Fase de Remodelação*: Começa geralmente cerca de seis semanas depois da lesão (SHARMA; MAFFULLI, 2005a; JAMES *et al.*, 2008), no pico da fase proliferativa, e sua importância se dá pelo fato do resultado final ser uma cicatriz funcional, cujas propriedades se assemelham ao tecido normal (HOPE; SAXBY, 2007). Se caracteriza por uma redução da celularidade (WOO *et al.*, 1999), da síntese de matriz, da quantidade de colágeno tipo III, e por um aumento da síntese de colágeno tipo I (JAMES *et al.*, 2008). As fibrilas de colágeno tipo III, predominantemente, são reabsorvidas devido à ação de collagenases e são substituídas por colágeno tipo I, que tem mais ligações cruzadas (HOPE; SAXBY, 2007) e maior resistência à tração (JAMES *et al.*, 2008). A matriz extracelular torna-se mais densa e orientada longitudinalmente (WOO *et al.*, 1999). Durante esta fase, ocorre a mudança de um tecido celular para um tecido predominantemente fibroso (SHARMA; MAFFULLI, 2005a; HOPE; SAXBY, 2007). O tecido curado continua a amadurecer durante muitos meses, porém não alcança nem as características morfológicas nem as propriedades mecânicas de um tendão normal (WOO *et al.*, 1999; HOPE; SAXBY, 2007; TOMIOSSO *et al.*, 2009), além das propriedades bioquímicas (DAHER *et al.*, 2011). A parte final de remodelação é a maturação, que é um processo longo e que termina com a diminuição gradativa na vascularização do tendão e um aumento constante na espessura do feixe de colágeno (HOPE; SAXBY, 2007), além do retorno aos níveis normais de concentração do colágeno de 12 a 14 semanas (ROSENBAUM *et al.*, 2010).

Existem dois modelos distintos propostos para explicar o mecanismo de cicatrização do tendão: cicatrização extrínseca – considera que fibroblastos e células inflamatórias da periferia ou de outros tecidos invadem o local da cicatrização, iniciem, e depois promovam o reparo e o remodelamento; e cicatrização intrínseca – considera que há uma migração interna de células localizadas no endotendão e no epitendão para o local da cicatrização, e estabelecem uma matriz extracelular e uma rede neovascular interna; porém, na maioria das vezes, ambos os mecanismos estão envolvidos na cicatrização, o mecanismo extrínseco é o primeiro a ser ativado e é o responsável pela formação das adesões que ocorrem inicialmente, o mecanismo intrínseco é o responsável pela reorganização das fibras de colágeno e manutenção da continuidade das fibrilas (JAMES *et al.*, 2008).

## 1.1.2 Tecido Muscular Esquelético

### 1.1.2.1 Estrutura dos Músculos Esqueléticos

Os músculos esqueléticos são constituídos por elementos contráteis (JÓZSA *et al.*, 1990), compreendem 40-50% da massa corpórea, e são divididos em músculos lentos e músculos rápidos (MANN *et al.*, 2010). Essa classificação ocorre devido ao tipo de fibras musculares que possuem.

As fibras musculares originalmente foram divididas em fibras do tipo I (lentas) e fibras do tipo II (rápidas) a partir de uma análise histoquímica (SCOTT; STEVENS; BINDER-MACLEOD, 2001), porém observou-se que as fibras tipo II podiam ser divididas em fibras do tipo IIa e do tipo IIb. E, em termos gerais, os músculos esqueléticos lentos contêm principalmente as fibras do tipo I (oxidativas), enquanto que os músculos rápidos são ricos em fibras do tipo IIa (oxidativas/glicolíticas) e fibras do tipo IIb (glicolíticas) (TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008). Na tabela 1 estão listadas algumas diferenças entre essas fibras musculares.

Tabela 1. Tipos das fibras musculares esqueléticas

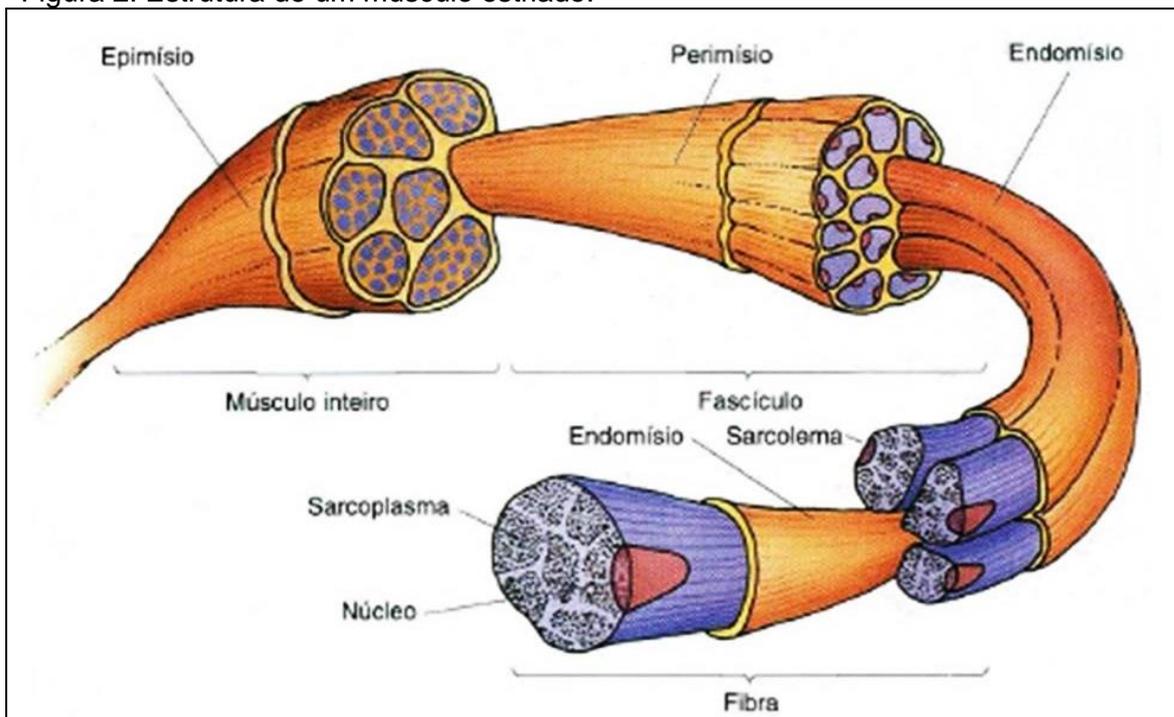
<b>Características</b>	<b>FIBRAS TIPO I</b>	<b>FIBRAS TIPO IIA</b>	<b>FIBRAS TIPO IIB</b>
	Oxidativas	Oxidativas/glicolíticas	Glicolíticas
<i>Tempo de contração</i>	Lenta e prolongada	Rápida	Rápida
<i>Fatigabilidade</i>	Muito resistentes à fadiga	Resistentes à fadiga	Propensos à fadiga
<i>Densidade mitocondrial</i>	Alta	Alta	Baixa
<i>Densidade de mioglobina</i>	Alta	Alta	Baixa
<i>Cor muscular</i>	Vermelha	Intermediária	Branca
<i>Densidade de capilar</i>	Alta	Intermediária	Baixa
<i>Capacidade oxidativa</i>	Alta	Alta	Baixa
<i>Capacidade glicolítica</i>	Baixa	Alta	Alta

Fonte: TOSCANO, MANHÃES-DE-CASTRO e CANON (2008); MANN *et al.* (2010); NHAMPOSSE (2012) (adaptados)

Exemplos de músculos com predominância de fibras do tipo I e do tipo II são o músculo Sóleo (com uma grande densidade de capilares sanguíneos e metabolismo oxidativo) e os músculos Gastrocnêmios (com poucos capilares por fibra muscular e metabolismo glicolítico), respectivamente (JÓZSA *et al.*, 1990).

O tecido muscular é revestido por envoltórios, de tecido conjuntivo, organizados em três níveis, exceto na junção miotendínea: *epimísio* ou fáscia, que rodeia músculos inteiros e é composta por tecido denso não modelado; *perimísio*, formado por um tecido conjuntivo menos denso derivado do epimísio, envolve as fibras musculares formando feixes ou fascículos; e *endomísio*, composto por fibras reticulares e por uma lâmina basal, envolve as células musculares individualmente (JÓZSA *et al.*, 1990; GARTNER; HIATT, 2003) (Figura 2).

Figura 2. Estrutura de um músculo estriado.



Fonte: GARTNER e HIATT (2003) (modificado)

#### 1.1.2.2 Consequências de Lesões Tendíneas sobre os Músculos Esqueléticos

O alongamento do tendão tenotomizado pode produzir comprometimento funcional permanente, uma vez que o músculo esquelético faz uma adaptação alterando o número de sarcômeros em série para redefinir seu comprimento ótimo e regular a geração de força (MAQUIRRIAIN, 2011).

Além disso, ocorre uma contratura muscular gerando atraso na reparação, e isto pode afetar a evolução clínica da cicatrização do tendão (KOH *et al.*, 2014).

Para o tecido muscular, o efeito fibrótico de uma tenotomia é semelhante ao efeito em uma imobilização, e as alterações clínicas encontradas incluem rigidez, fraqueza e atrofia muscular (JÓZSA *et al.*, 1990) acompanhadas de redução da área de secção transversa, do número de núcleos (BRITO; OLIVEIRA; MORAES, 2011), do número de sarcômeros, da síntese proteica (BOOTH; GOLLNICK, 1983), e da força muscular (BOOTH, 1987).

A inatividade da musculatura induz uma perda de proteína muscular esquelética causada por uma diferença na modulação dos sistemas proteolíticos e sintéticos (BAJOTTO; SHIMOMURA, 2006). Ou seja, em condições atroficas, existe uma maior degradação das proteínas do músculo esquelético do que sua síntese no tecido, havendo uma redução do teor de proteína responsável pela manutenção das propriedades intrínsecas do tecido muscular (BRITO; OLIVEIRA; MORAES, 2011). No músculo Sóleo a proporção da síntese proteica é reduzida a valores menores que 50%, e a proporção de degradação proteica aumenta para níveis maiores que 150% (BAJOTTO; SHIMOMURA, 2006).

Existe também uma alteração na proporção de fibras lenta e rápida musculares, com a alteração das características das fibras do tipo I, que passam a ter as características de fibras do tipo II (BOOTH, 1982), sugerindo uma degradação e/ou substituição das fibras tônicas (tipo I) pelas fibras fásicas (tipo II) (BRITO; OLIVEIRA; MORAES, 2011).

Após a tenotomia, há o aumento acentuado da quantidade de colágeno dentro do músculo (no endomísio e no perimísio) (KOH *et al.*, 2014) paralelamente com a diminuição da densidade capilar (JÓZSA *et al.*, 1990). Esse aumento na quantidade de colágeno dentro dos músculos pode estar relacionado com a incapacidade dos músculos de se recuperarem posteriormente a uma tenotomia (KOH *et al.*, 2014), uma vez que pode perturbar seriamente as propriedades de tração do músculo (JÓZSA *et al.*, 1990).

Diante disso, é importante entender as mudanças musculares patológicas após ruptura do tendão uma vez que isso irá influenciar tanto no tempo quanto na técnica de tratamento cirúrgico, ou seja, uma reparação direta, uma enxertia, ou uma transferência de tendão (KOH *et al.*, 2014).

### 1.1.3 Biopolímero da Cana-de-Açúcar

O biopolímero da cana-de-açúcar é um exopolissacarídeo (ou polissacarídeo extracelular) sintetizado do melaço da cana-de-açúcar pela bactéria *Zoogloea* sp (PATERSON-BEEDLE *et al.*, 2000). O termo exopolissacarídeo tem sido utilizado para descrever polissacarídeos encontrados na superfície externa da parede celular microbiana, e pode ser aplicado a polímeros de composições variadas (SUTHERLAND, 1990).

#### 1.1.3.1 Histórico

Foi isolado na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco, município de Carpina, região nordeste do Brasil, e a identificação do microorganismo (bactéria *Zoogloea* sp) foi realizada no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (PATERSON-BEEDLE *et al.*, 2000; COELHO *et al.*, 2002).

Paterson-Beedle e colaboradores (2000) observaram que os componentes desse polissacarídeo eram 12% solúveis em água e 88% insolúveis em água. E a partir da hidrólise, da fração insolúvel encontrada, com ácido trifluoroacético (CF<sub>3</sub>COOH), obtiveram um percentual total de 88% de componentes solúveis em água. Destes, os principais monossacarídeos presentes encontrados foram: glicose (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4%) e ácido glucurônico (0,8%).

Esse biopolímero apresenta elasticidade, resistência à tração, flexibilidade e ainda pode ser modelado em diferentes formas, características físico-químicas fundamentais para a confecção de implantes biológicos (LIMA *et al.*, 2005). Além disso, possui uma baixa citotoxicidade a um nível que permite a sua aplicação experimental com segurança (CASTRO *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2016), é biocompatível (DE LUCENA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017), absorvível (COELHO JÚNIOR *et al.*, 2015), pode servir como plataforma para adesão celular (FRAGOSO *et al.*, 2014) e tem baixo custo de obtenção (TEIXEIRA *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2016b), uma vez que é produzido a partir do melaço da cana-de-açúcar.

Devido a essas propriedades descritas, ele vem sendo utilizado em muitos estudos em diversas áreas da cirurgia experimental, sob diferentes formatos e

estados físicos, e em cultura de células, em animais e em humanos. A Tabela 2 lista alguns dos estudos.

Tabela 2. Estudos com o Biopolímero da Cana-de-açúcar

Artigos	Biopolímero da Cana-de-açúcar		
	Formato/Estado Físico	Tecido / Aplicação	Modelo experimental
COELHO <i>et al.</i> (2002)	película	feridas cutâneas	animais
MARQUES <i>et al.</i> (2007)	membrana	artéria femoral	animais
MONTEIRO <i>et al.</i> (2007)	película	feridas cutâneas	animais
MAYER <i>et al.</i> (2011)	membrana	membrana timpânica	animais
CORDEIRO-BARBOSA <i>et al.</i> (2012)	gel	olhos eviscerados	animais
MARTINS <i>et al.</i> (2013)	fita	pênis / curativo cirúrgico	humanos - estudo clínico fase I
ARAÚJO <i>et al.</i> (2014)	membrana	células tronco mesenquimais do cordão umbilical	cultura de células humanas
BUNZEN <i>et al.</i> (2014)	esponja	membrana timpânica	animais
FRAGOSO <i>et al.</i> (2014)	filme	células tronco mesenquimais do cordão umbilical	cultura de células humanas
LEÃO <i>et al.</i> (2014)	gel	pregas vocais	animais
SILVEIRA <i>et al.</i> (2014)	membrana	incontinência urinária	animais
TAVARES <i>et al.</i> (2014)	esponja	parênquima renal	animais
ALBUQUERQUE <i>et al.</i> (2015)	gel	cartilagem articular do joelho	animais
LIMA <i>et al.</i> (2015)	gel	incontinência urinária	animais
ABREU <i>et al.</i> (2016) -	grânulos	calota craniana	animais
IWANAGA <i>et al.</i> (2016)	fita e gel	cólon do intestino	animais
SILVEIRA <i>et al.</i> (2016a)	filme/membrana	aponeurose muscular	animais
SILVEIRA <i>et al.</i> (2016b)	membrana	membrana timpânica	humanos
VILAR <i>et al.</i> (2016)	fita	pênis / curativo cirúrgico	humanos - estudo clínico fase II
LIMA <i>et al.</i> (2017)	membrana	meninge	animais

Fonte: O Autor (2017).

## 1.2 HIPÓTESES

O biopolímero da cana-de-açúcar auxilia durante o processo de cicatrização do tendão do Calcâneo, servindo como “ponte” para o realinhamento das fibras de colágeno, e deixando o tendão lesionado com aspecto, estrutura e função semelhantes a um tendão normal.

A utilização do biopolímero da cana-de-açúcar no tecido em cicatrização pode diminuir a atrofia muscular sofrida pelo músculo esquelético após uma tenotomia.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar, no tecido tendíneo e no tecido muscular, o efeito do uso do filme de biopolímero da cana-de-açúcar como coadjuvante no processo de cicatrização do tendão do Calcâneo após tenotomia total.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a recuperação funcional da marcha dos animais através da análise do Índice Funcional do Aquiles (IFA).
- Analisar a estrutura do tendão durante o processo de cicatrização através de parâmetros histomorfométricos.
- Analisar a expressão das proteínas MIP-1 $\alpha$ , TGF 1 $\beta$  e Vimentina, no tecido tendíneo.
- Avaliar massa muscular relativa nos músculos sóleo, gatrocnêmio lateral e gastrocnêmio medial.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Plasticidade Neuromuscular (Departamento de Anatomia) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), e teve colaboração com o: Núcleo de Cirurgia Experimental (Departamento de Cirurgia) (UFPE); Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE); Laboratório de Morfometria (Departamento de Anatomia) (UFPE); e Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

### 2.2 TIPO DE ESTUDO

É um estudo qualitativo e quantitativo do tipo experimental.

### 2.3 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido à avaliação e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (processo nº 23076.035304/2013-32) (ANEXO A).

### 2.4 AMOSTRA

Foram utilizados 110 ratos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, com idade inicial de  $60 \pm 2$  dias, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição (UFPE), mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia (UFPE), em gaiolas de polipropileno em um total de 3 ou 4 animais por gaiola, em ciclo de luz invertido claro/escuro (12h/12h), e temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ração e água *ad libitum*.

## 2.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 2.5.1 Modelos Experimentais

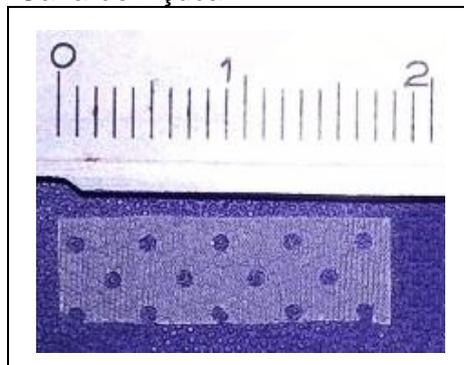
Os animais foram distribuídos em 3 grupos:

- Grupo Controle (GC, n=34), animais não submetidos à lesão do tendão estudado;
- Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB, n=38), animais submetidos à lesão do tendão seguida de reconstituição sem colocação do biopolímero da cana-de-açúcar;
- Grupo Lesão + Biopolímero (GLB, n=38), animais submetidos à lesão do tendão seguida de reconstituição com colocação do filme de biopolímero da cana-de-açúcar.

### 2.5.2 Obtenção do Filme de Biopolímero de Cana-de-Açúcar

O filme microperfurado de biopolímero ( $\varnothing=1\text{mm}$ ) (Figura 3) foi obtido a partir do melaço de cana-de-açúcar por síntese bacteriana da *Zoogloea* sp., na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foi proveniente do Laboratório de Polímeros (POLISA – Polímeros para a Saúde Ltda), após seu processamento e esterilização.

Figura 3. Filme de Biopolímero da Cana-de-Açúcar.



Fonte: O Autor (2017).

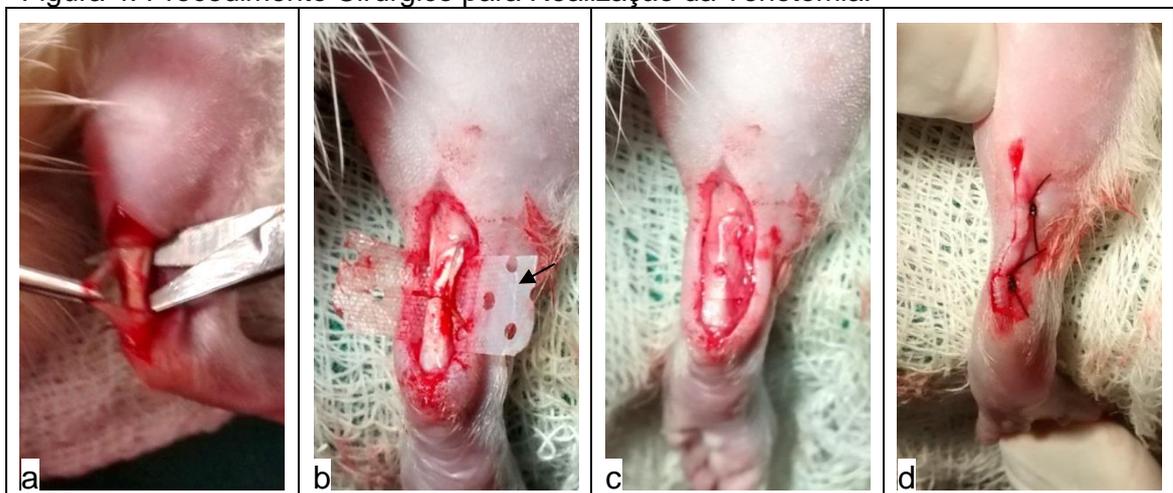
### 2.5.3 Procedimento Cirúrgico

Antes do procedimento cirúrgico para induzir lesão do tendão do Calcâneo, todos os animais eram pesados em uma balança eletrônica digital (Toledo do Brasil, Modelo 9094C/5, Série 10810526), e anestesiados com uma solução, via intramuscular, de cloridrato de xilazina (2%) e cloridrato de cetamina (10%) em uma quantidade de 0,2ml da solução para cada 100g de peso do animal [1:1] (MASSONE, 2008).

Foram realizadas a tricotomia e a antissepsia da região póstero-inferior do membro posterior direito até próximo ao osso calcâneo, seguidas de uma incisão longitudinal na pele desta região para visualização do tendão do Calcâneo e do tendão do músculo Plantar (Figura 4a).

Antes da realização da tenotomia, o tendão do músculo Plantar de todos os animais era retirado, uma vez que este músculo é mais desenvolvido em ratos e pode funcionar como uma “tala interna” (MURRELL *et al.*, 1992; LIANG *et al.*, 2012), interferindo assim na resposta da cicatrização.

Figura 4. Procedimento Cirúrgico para Realização da Tenotomia.



(a) Tendão do calcâneo exposto e tendão do músculo plantar pinçado; (b) Tendão do calcâneo suturado, biopolímero indicado na seta; (c) Tendão envolvido pelo biopolímero; (d) Pele suturada.

Fonte: O Autor (2017).

A tenotomia era realizada no ponto médio do tendão do Calcâneo dos animais dos GLSB e GLB, e a lesão era imediatamente reconstituída em ambos os grupos por meio de uma sutura com fio absorvível CATGUT Cromado 5-0 (ETHICON) (Figura 4b), porém, apenas no GLB, o tendão suturado era envolvido pelo filme de

biopolímero da cana-de-açúcar (dimensões: 0,6cm×1,8cm) (Figura 4c). Em seguida, era realizada a sutura da pele de todos os animais com fio CATGUT Nylon 4-0 (Somerville) (Figura 4d).

Ao final do procedimento cirúrgico, foram administrados por via intramuscular: analgésico (Dipirona Monoidratada – 500mg/ml), em dosagem única de 0,1ml para cada 100g de peso do animal; e antibiótico (Enrofloxacin – 10%), em dosagem única de 0,05ml para cada animal. Também foram administrados antibióticos tópicos no local da sutura: Rifamicina SV sódica (10mg/mL) em *spray*; e Sulfato de Neomicina + Bacitracina (5mg/g + 250UI/g) em pomada.

#### 2.5.4 Análise Funcional da Marcha

Para avaliar a marcha dos animais estudados, foi realizado o cálculo do Índice Funcional de Aquiles (IFA), sob o protocolo utilizado por Murrell e colaboradores (1992). Este índice era gerado a partir da equação descrita a seguir, que compara as medidas das patas posteriores, pata lesionada (*L*) e pata normal (*N*):

$$IFA = 74 \times [FCP] + 161 \times [FED] + 48 \times [FEDI] - 5$$

Para:  $FCP = (CPN - CPL) / CPL$ ;  $FED = (ATL - ATN) / ATN$ ;  $FEDI = (AIL - AIN) / AIN$ .

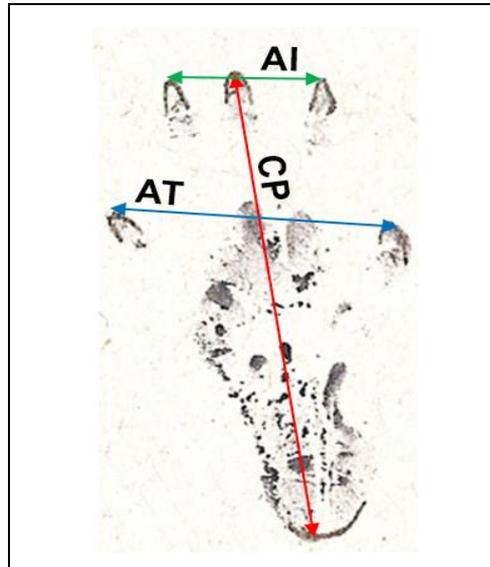
Sendo:

- *FCP*, o fator de comprimento da pegada;
- *FED*, o fator de espalhamento dos dedos;
- *FEDI*, o fator de espalhamento dos dedos intermediários;
- *CP*, a medida do comprimento total da pegada (do calcanhar ao 3º dedo);
- *AT*, a medida da abertura total dos dedos (do 1º ao 5º dedo);
- *AI*, a medida da abertura dos dedos intermediários (do 2º ao 4º dedo).

Quanto mais próximo de “0” o valor do IFA, mais funcional era a marcha do animal, e quanto mais negativo o valor do IFA, menos funcional era a marcha (MURRELL *et al.*, 1992).

Para obtenção das pegadas (Figura 5), os animais eram colocados para andar sobre papel sulfite em uma passarela de 10cm×60cm (largura×comprimento) (SEE *et al.*, 2004) (Figura 6), após terem suas patas posteriores molhadas com tinta de carimbo (com base aquosa).

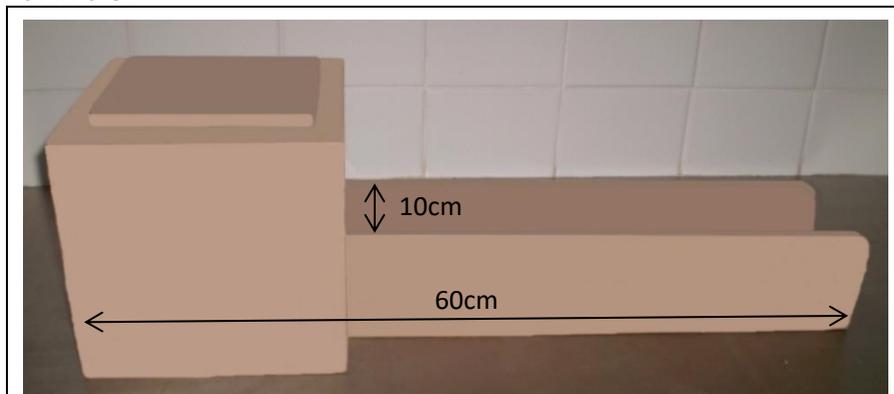
Figura 5. Pegada de um rato com identificação dos parâmetros utilizados.



(CP) comprimento total da pegada;  
(AT) abertura total dos dedos; (AI) abertura dos dedos intermediários.  
Fonte: O Autor (2017).

Na semana anterior ao início das medições, os animais passavam por uma adaptação à caminhada na passarela, consistindo em caminhada livre ao longo da passarela. As mensurações eram realizadas em todos os grupos estudados, em cinco dias diferentes: no dia pré-cirúrgico, nos 3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias pós-cirúrgicos. Em cada dia avaliado, foram escolhidos três pares de pegadas por animal e obtido o valor médio das medidas obtidas por animal. Dois avaliadores realizaram de forma independente as análises descritas, e ao final foi feita uma média dos valores do IFA obtidos pelos avaliadores.

Figura 6. Passarela utilizada para obtenção das pegadas dos animais.



Fonte: O Autor (2017).

### **2.5.5 Mensuração do Peso Corpóreo e Preparo para Coleta do Material**

Antes do procedimento cirúrgico para coleta do material, aos 3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após a tenotomia, todos os animais foram pesados em uma balança eletrônica digital (Toledo do Brasil, Modelo 9094C/5, Série 10810526), e anestesiados com uma solução, via intramuscular, de cloridrato de xilazina (2%) e cloridrato de cetamina (10%) em uma quantidade de 0,2ml da solução para cada 100g de peso do animal [1:1] (MASSONE, 2008). Após a anestesia, foi realizada uma incisão longitudinal na pele da região póstero-inferior do membro posterior direito para visualização e coleta das estruturas em estudo.

### **2.5.6 Coleta do Tendão Direito**

Nos animais destinados para coleta do tendão do Calcâneo (GC=22 animais; GLSB=22 animais; GLB=22 animais) aos 3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após a tenotomia, o tecido foi coletado imediatamente abaixo da junção miotendínea e imediatamente acima da junção osteotendínea. Os tendões eram rapidamente dissecados e fixados por imersão em uma solução de formaldeído 10% durante 48h, e posteriormente mantidos em álcool 70%, e encaminhados para a histologia.

### **2.5.7 Coleta do Tecido Muscular Direito**

Nos animais destinados para coleta do tendão dos músculos Gastrocnêmio Medial, Gastrocnêmio Lateral e Sóleo (GC=8 animais; GLSB=8 animais; GLB=6 animais) aos 30<sup>o</sup> dias após a tenotomia, os músculos foram rapidamente dissecados individualmente, pesados em balança analítica (Shimadzu; Modelo Auy-220; capacidade mínima 0,1mg).

### **2.5.8 Cegamento do Estudo**

Todos os animais foram identificados com uma numeração cuja aleatorização foi realizada no Software Microsoft Excel 2010. Dessa forma, durante as análises de

todos os parâmetros, o avaliador não teve acesso ao grupo a que pertencia o tecido estudado.

## 2.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após a retirada do material de estudo, e ainda sob o efeito da anestesia, os animais foram eutanasiados com uma injeção intracardíaca de cloreto de potássio a 19,1%, em uma dosagem única de 1ml para cada animal.

## 2.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DO TECIDO TENDÍNEO COLETADO

Os tendões coletados, após serem mantidos em álcool 70%, foram desidratados em banhos de concentrações crescentes de álcool (90%, 100% e 100% - 1h por concentração), diafanizados em 2 banhos de xilol (1h por banho), incluídos em parafina para histologia à 60°C (2 banhos – 1h por parafina), incluídos em parafina para histologia com cera de abelha à 56-58°C, seccionados longitudinalmente (5µm), e montados em lâminas silanizadas para microscopia.

### 2.7.1 Histomorfometria do Tecido Tendíneo

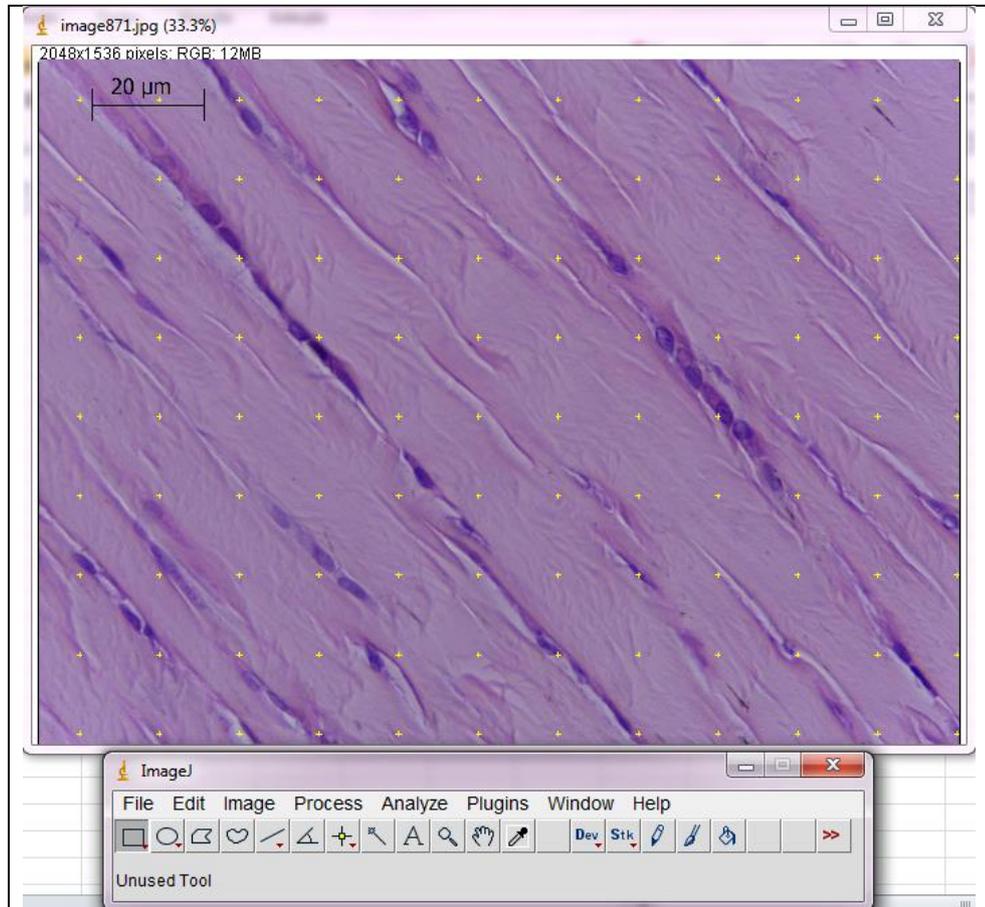
De cada animal, 1 lâmina foi encaminhada para ser corada com Hematoxilina/Eosina (HE). Para isto, o material foi desparafinado em 2 banhos de xilol, hidratado em banhos de concentrações decrescentes de álcool (100%, 100%, 90% e 70%) e água destilada, corado com hematoxilina e eosina, desidratado novamente em 2 banhos de álcool (100% e 100%), diafanizado em 2 banhos de xilol e montado entre lâmina e lamínula.

Foram realizadas imagens com aumento de 100x e de 400x, através de um microscópio óptico (Leica DM500) acoplado a um microcomputador com o Software LAS EZ (Versão 2.0.0 ICC50).

A partir de 3 imagens do maior aumento selecionadas, foi montada uma grade teste no Software ImageJ 1.45s para o cálculo do número mínimo de pontos necessários para se obter um resultado significativo (AMENÁBAR, *et al.*, 2003). A partir do cálculo citado, identificou-se a necessidade da contagem de 500 pontos no mínimo para se obter um nível de confiabilidade de 95%. Diante disso, 5 imagens

(400x) por lâmina foram aleatoriamente selecionadas (Software Microsoft Excel 2010), e em de cada imagem foi montada uma grade com 108 pontos no Software ImageJ 1.45s (Figura 7), totalizando 540 pontos por lâmina.

Figura 7. Imagem com os pontos gerados pelo Software ImageJ 1.45s



Fonte: O Autor (2017).

Foram avaliados os seguintes parâmetros, através do Software ImageJ 1.45s:

- Quantidade de tenócitos
- Quantidade de tenoblastos
- Quantidade de macrófagos

Além dos parâmetros citados, também foi realizada uma descrição (análise qualitativa) das lâminas quanto à:

- Presença de infiltrado inflamatório e de células gigantes multinucleares (CGMN)
- Integração tecidual
- Distribuição celular

- Neovascularização
- Localização do biopolímero

### 2.7.2 Imunohistoquímica do Tecido Tendíneo

Para a realização da imunohistoquímica, foram selecionadas aleatoriamente (Software Microsoft Excel 2010) as lâminas de 3 animais de cada grupo nos períodos estudados (3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após a tenotomia), totalizando 36 animais.

Tais lâminas foram desparafinizadas em 2 banhos de xilol, e hidratadas em banhos de concentrações decrescentes de álcool (100%, 95%, 80% e 70%) água corrente e PBS. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato 10mM, pH 6.0, em micro-ondas 300W por 15 min. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foi utilizado o kit Easylink One (Immunobioscience Corp., Immunobioscience - EUA) para: incubação das lâminas com bloqueador de peroxidase endógena por 30min; e posterior bloqueio das ligações inespecíficas com bloqueador proteico por 30min em temperatura ambiente.

O material foi incubado com anticorpos primários adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA) (Tabela 3) diluídos em PBS-BSA 5% (p/v) *overnight* a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram submetidas a 2 banhos de PBS, e incubadas com o sistema de amplificação do kit Easylink One (citado anteriormente) por 30min em temperatura ambiente. Em seguida, foram banhadas 2 vezes com PBS, e reveladas em cromógeno DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, o material foi corado com Hematoxilina por 15s, desidratado novamente em banhos de concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 95% e 100%), diafanizado em 2 banhos de xilol e montado entre lâmina e lamínula.

Os controles positivos utilizados (Tabela 3) foram selecionados segundo encontrado na literatura. Para a vimentina, não foi utilizado um controle positivo, uma vez que sua localização subcelular é nos filamentos intermediários do citoesqueleto de todas as células. Os controles negativos foram estabelecidos através da substituição do anticorpo primário por anti-IgG humana inespecífica (DAKO) diluído em PBS-BSA 5% (p/v).

Tabela 3. Anticorpos utilizados no estudo

Anticorpo (clone)	Número de referência	Diluição	Controle Positivo
<b>MIP-1<math>\alpha</math> (C-5)</b>	sc-365691	1:50	Baço
<b>TGF <math>\beta</math>1 (3C11)</b>	sc-130348	1:50	Estômago
<b>Vimentina (V9)</b>	sc-6260	1:100	-

*MIP-1 $\alpha$  = Proteína inflamatória de macrófagos-1 $\alpha$ ; TGF  $\beta$ 1= Fator transformador de crescimento beta1*

*Fonte: O Autor (2017).*

Foram realizadas imagens com aumentos de 100x e 400x, com auxílio de um microscópio óptico (Leica DM500) acoplado a um microcomputador com o Software LAS EZ (Versão 2.0.0 ICC50).

## 2.8 ANÁLISE DO TECIDO MUSCULAR COLETADO

As massas musculares relativas foram calculadas através do quociente entre a massa muscular absoluta e o peso corpóreo de cada animal no 30º dia após a tenotomia.

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de comparar as médias dos 3 grupos, os dados do estudo foram submetidos ao Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e as variáveis apresentaram distribuições normais. Logo, foram selecionados testes paramétricos.

Em relação ao IFA, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Análise de Variância – ANOVA (*one-way*), com Teste de Tukey como *Post Hoc*, para a análise intergrupos (amostras independentes); e Teste T (amostras pareadas), para a análise intragrupos.

Para as demais análises quantitativas, foram utilizados a Análise de Variância – ANOVA (*one-way*), com Teste de Tukey como *Post Hoc*.

Foi construído um banco de dados no Software Microsoft Excel 2010 e a análise estatística foi realizada pelo Software Statistical Package for the Social Science (SPSS) for Windows (versão 20). Foi adotada uma margem de segurança de 95% de confiabilidade, e os valores foram e expressos em média e o desvio padrão.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na tese foram dispostos em três artigos:

#### 3.1 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO USO DE UM FILME DE BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO COADJUVANTE NA REPARAÇÃO DO TENDÃO DO CALCÂNEO

Artigo submetido para publicação na *Disability and Rehabilitation* (ISSN 1464-5165) – Conceito B1 para Biotecnologia (ANEXO B).

Título do trabalho: **Avaliação funcional do uso de um filme de biopolímero extraído da cana-de-açúcar como coadjuvante na reparação do tendão do Calcâneo**

Título do trabalho (inglês): **Functional evaluation of use a biopolymer film extracted from sugarcane as an adjuvant in the repair of the Achilles tendon**

Título condensado: **Avaliação do uso do biopolímero no reparo do tendão**

Kamilla Dinah Santos de Lira<sup>1</sup>, Jose Lamartine de Andrade Aguiar<sup>2</sup>, Ana Cristina Falcão Esteves<sup>3</sup>, Marina Cerqueira Rosdaibida Gomes<sup>4</sup>, Marcela de Fatima Lemos Tavares<sup>5</sup>, Silvia Regina Arruda de Moraes<sup>6</sup>

Instituição que sediou o estudo: Laboratório de Plasticidade Neuromuscular, Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Doutoranda, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pós-graduação em Cirurgia (UFPE), Doutor, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Anatomia (UFPE), Doutora, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Graduanda, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Graduanda, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Anatomia (UFPE), Doutora, Recife, Pernambuco, Brasil.

Órgão financiador: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)

## Resumo

**Introdução:** A ruptura do tendão do calcâneo pode gerar disfunção e alterar a biomecânica da marcha. Para minimizar esses danos, busca-se avaliar o uso de materiais que otimize a cicatrização do tendão no reparo cirúrgico. **Objetivo:** Avaliar o efeito da utilização de um filme de biopolímero da cana-de-açúcar como coadjuvante na reparação do tendão do Calcâneo pós-tenotomia. **Metodologia:** Foram utilizados ratos, *Wistar*, distribuídos em: Grupo Controle (GC), sem tenotomia; Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB), com tenotomia e sem biopolímero; Grupo Lesão+Biopolímero (GLB), com tenotomia e com biopolímero. Aos 60 dias foi realizado o procedimento cirúrgico e nos dias pré-cirúrgico, 3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> pós-cirúrgicos, realizou-se as mensurações das pegadas para o cálculo do Índice Funcional de Aquiles (IFA). No 30<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, o Tríceps Sural de alguns animais foi coletado e pesado para o cálculo da massa muscular relativa. Para análise estatística foram usados: ANOVA (*one way*) com o Teste de Tukey; e Teste T (amostras pareadas). Os dados foram expressos em média±desvio padrão, e 95% de confiabilidade. **Resultados:** Houve redução dos IFA's dos GLSB e GLB em relação ao GC no 3<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico. A partir do 10<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico, observou-se uma diminuição da negatividade dos GLSB e GLB, porém não houve diferença entre esses grupos. A massa muscular relativa de GLSB e GLB foi menor que a do GC. **Conclusão:** Funcionalmente o biopolímero da cana-de-açúcar pareceu não interferir na recuperação estrutural do tendão do Calcâneo, porém se mostrou maleável e flexível a ponto de não dificultar a deambulação.

**Palavras-chave:** Cicatrização, Marcha, Tendão do Calcâneo

## Abstract

**Introduction:** Rupture of the Achilles tendon can cause dysfunction and change the biomechanic of gait. To minimize these damages, we intend to evaluate the use of materials that optimize tendon healing in surgical repair. **Objective:** To evaluate the effect of the use of sugarcane biopolymer film as a coadjuvant in the repair of the post-tenotomy Achilles tendon. **Methods:** *Wistar* male rats were distributed in: Control Group (CG), without tenotomy; Injury without Biopolymer Group (IWBG), with tenotomy and without biopolymer; Injury+Biopolymer Group (IBG), with tenotomy and with biopolymer. 60 days was carried out the surgery. In pre-surgical day, 3rd, 10th, 20th and 30th postoperative days was held measurements of footprints for calculating the Achilles Functional Index (AFI). On the 30th postoperative day, the Sural Triceps of some animals was collected and weighed for the calculation of relative muscle mass. Statistical analysis was used: ANOVA (one way) with Tukey test; and T test (paired samples). Data were expressed as mean±standard deviation, and 95% reliability. **Results:** There was a reduction of IFAs of IWBG and IBG compared to CG on the 3rd postoperative day. From the 10th postoperative day, there was decrease in the negativity of IWBG and IBG, but there was not difference between these groups. The relative muscle mass of IWBG and IBG was lower than that of CG. **Conclusion:** Functionally the sugarcane biopolymer did not seem to interfere in the structural recovery of the Achilles tendon, but proved to be enough malleable and flexible to not hinder ambulation.

**Keywords:** Achilles Tendon, Gait, Wound Healing

## Introdução:

A ruptura do tendão do Calcâneo é uma lesão grave (1) que pode resultar em significativa incapacidade ou disfunção, sendo um episódio sério para atletas profissionais e amadores (2). Após uma ruptura espontânea ou uma tenotomia, observa-se contratura muscular, que pode afetar a evolução clínica de reparação do tendão (3), reduzindo a quantidade de capilares sanguíneos e aumentando a quantidade de tecido conectivo intramuscular, logo interferindo diretamente nas propriedades contráteis do tecido muscular (4) e, conseqüentemente, na biomecânica da marcha.

Diante disso, a reparação cirúrgica é vista como uma boa conduta terapêutica por proporcionar estabilidade (5) e ótima restauração do comprimento, tensão e *stiffnes* do tendão (1), ao contrário da imobilização, que prejudica as propriedades biomecânicas do tendão (6). Dessa forma, busca-se por métodos que otimizem o tempo e a qualidade de reparação cirúrgica (2), havendo nos últimos anos uma intensificação de estudos sobre a utilização de polímeros biodegradáveis para aplicação na área médica (7).

Nesse contexto, um polímero obtido a partir do melaço de cana-de-açúcar foi sintetizado na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina – UFRPE (8-11) apresentou resultados favoráveis, em diversas áreas da cirurgia experimental, como na cicatrização de feridas cutâneas (11, 12), na reconstrução vascular (13), como substituto da membrana timpânica (14), na reconstrução do parênquima renal (15), na correção da incontinência urinária (16), na reconstrução da parede intestinal (17), como superfície de adesão celular (18), entre outras aplicações.

Assim, o presente estudo pretendeu, por meio das avaliações da funcionalidade da marcha e da massa muscular relativa de ratos, analisar o efeito do uso desse filme de biopolímero da cana-de-açúcar como elemento coadjuvante na reparação do tendão do Calcâneo pós-tenotomia total.

### **Metodologia:**

- Aspectos éticos: Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (processo nº 23076.035304/2013-32).
- Amostra: Foram utilizados 53 ratos machos albinos, *Wistar*, com peso inicial entre 210 e 320, mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia (UFPE), em ciclo de luz invertido claro/escuro (12h/12h), temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , e ração e água *ad libitum*.
- Grupos experimentais: Os animais foram distribuídos em três grupos: Grupo Controle (GC, n=15), animais não submetidos à tenotomia; Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB, n=19), animais submetidos à tenotomia seguida de reconstituição do tendão sem biopolímero; Grupo Lesão + Biopolímero (GLB, n=19), animais submetidos à tenotomia seguida de reconstituição do tendão com biopolímero.

- Procedimento cirúrgico: Aos  $60 \pm 2$  dias, todos os animais foram anestesiados, via intramuscular, com cloridrato de xilazina (2%) e cloridrato de cetamina (10%) (0,2ml da solução/100g de peso do animal) [1:1] (19). Nos animais dos GLSB e GLB, foi realizada uma tenotomia total no ponto médio do tendão do Calcâneo seguida de sutura com fio CATGUT Cromado 5-0 (ETHICON), porém, apenas no GLB, o tendão suturado foi envolvido com um filme microperfurado de biopolímero da cana-de-açúcar ( $\varnothing=1\text{mm}$ ;  $0,6\text{cm} \times 1,8\text{cm}$ , altura  $\times$  comprimento) proveniente da POLISA (Polímeros para a Saúde Ltda). Em todos os animais, o tendão do músculo plantar foi retirado, para não servir como uma “tala interna” no processo de cicatrização (20, 21). Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a sutura da pele dos animais com fio CATGUT Nylon 4-0 (Somerville), e foram administrados analgésico e antibiótico, via intramuscular.

- Análise funcional da marcha: Foi realizado o cálculo do Índice Funcional de Aquiles (IFA), segundo protocolo de Murrell e colaboradores (20). Este índice é obtido a partir da equação descrita a seguir, que compara os valores das medidas das patas posteriores, pata lesionada (*L*) e pata normal (*N*):

$$IFA = 74 \times [FCP] + 161 \times [FED] + 48 \times [FEDI] - 5$$

Para:  $FCP = (CPN - CPL) / CPL$ ;  $FED = (ATL - ATN) / ATN$ ;  $FEDI = (AIL - AIN) / AIN$ .

Sendo: *FCP*, o fator de comprimento da pegada; *FED*, o fator de espalhamento dos dedos; *FEDI*, o fator de espalhamento dos dedos intermediários; *CP*, a medida do comprimento total da pegada (calcânhar ao 3º dedo); *AT*, a medida da abertura total dos dedos (1º ao 5º dedo); *AI*, a medida da abertura dos dedos intermediários (2º ao 4º dedo). Quanto mais próximo de “0” for o valor do IFA, mais funcional é a marcha do animal, e quanto mais negativo for o valor do IFA, menos funcional é a marcha (20). Para obtenção das pegadas, os animais foram colocados para andar sobre papel sulfite em uma passarela de  $10\text{cm} \times 60\text{cm}$  (largura  $\times$  comprimento) (22), após terem suas patas posteriores molhadas com tinta de carimbo (com base aquosa). As mensurações foram realizadas em todos os grupos estudados, em momentos dias diferentes: no dia pré-cirúrgico, nos 3º, 10º, 20º e 30º dias pós-cirúrgicos. Em cada dia avaliado, foram escolhidos três pares de pegadas por animal e obtido o valor médio das medidas obtidas por animal. Dois avaliadores, de forma independente, realizaram as análises descritas, e ao final foi feita uma média dos valores do IFA obtidos pelos avaliadores.

- Coleta do tecido muscular e cálculo das massas musculares relativas: Trinta dias após a tenotomia, todos os animais foram pesados em balança eletrônica digital (Toledo do Brasil, Modelo 9094C/5, Série 10810526), e anestesiados sob o mesmo protocolo utilizado no procedimento cirúrgico (19). Após a abertura da pele os músculos Gastrocnêmio Medial (Gm), Gastrocnêmio Lateral (Gl) e Sóleo (Sl) de 8 animais (GC), 8 animais (GLSB) e 6 animais (GLB) foram dissecados individualmente e pesados em balança analítica (Shimadzu; Modelo Auy-220; capacidade mínima 0,1mg). O cálculo das massas musculares relativas foi realizado através do quociente entre a massa muscular e o peso corpóreo de cada animal no 30º dia pós-cirurgia.
- Análise estatística: Utilizou-se o software SPSS (versão 20) para realização da análise estatística. Os valores obtidos foram submetidos ao teste de Normalidade Kolmogorov-Smirnov, em seguida, para comparação intergrupos utilizou-se a ANOVA (*one way*) com o Teste de Tukey como *post hoc*, e para comparação intragrupo utilizou-se o Teste T (amostras pareadas). Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, e foi adotada uma margem de segurança de 95% de confiabilidade.

## **Resultados:**

### - Índice Funcional de Aquiles (IFA):

Desde o 3º dia pós-cirúrgico até o final do experimento, houve uma redução nos valores dos IFA's nos grupos submetidos à lesão tendínea em comparação ao GC (Tabela 1). Entretanto, quando comparados os dois grupos experimentais (GLSB e GLB), não foi observada diferença em todos os dias avaliados (Tabela 1).

Quanto à avaliação intragrupo, o GC não apresentou alteração nos seus valores, ao passo que os demais grupos mostraram redução do IFA ao 3º dia pós-cirúrgico seguida de sucessivos aumentos até o final do experimento (Tabela 1 e Figura 1).

### - Massa Muscular Relativa:

Os músculos Gm e Gl (Figuras 2a e b) dos GLSB e GLB apresentaram massas musculares relativas menores em comparação ao GC ( $Gm_{GC}=0,00209\pm 0,00020$ ,  $Gm_{GLSB}=0,00166\pm 0,00023$ ,  $Gm_{GLB}=0,00164\pm 0,00022$ ,  $p_{GLSB\times GC}=0,002$ ,  $p_{GLB\times GC}=0,003$ ;  $Gl_{GC}=0,00253\pm 0,00018$ ,  $Gl_{GLSB}=0,00198\pm 0,00014$ ,  $Gl_{GLB}=0,00191\pm 0,00025$ ,  $p_{GLSB\times GC}<0,001$ ,  $p_{GLB\times GC}<0,001$ ).

Em relação ao músculo SI, foi observada uma redução do GLSB em comparação ao GC ( $SI_{GC}=0,00049\pm0,00004$ ,  $SI_{GLSB}=0,00039\pm0,00003$ ,  $p_{GLSB\times GC}=0,033$ ) (Figura 2c). O GLB obteve valores semelhantes ao GC ( $SI_{GLB}=0,00042\pm0,00014$ ,  $p_{GLB\times GC}=0,180$ ), porém apresentou uma maior dispersão dos seus valores, elevando assim seu desvio padrão (Figura 2d).

### **Discussão:**

Todos os animais submetidos à lesão tendínea completa apresentaram uma redução na qualidade da deambulação ao 3º dia pós-cirúrgico demonstrando a perda da função da pata do lado lesionado. Ao longo do experimento, ambos os grupos experimentais demonstraram um aumento gradual do valor do IFA, sem, entretanto, atingirem ao final do estudo, os valores de normalidade do grupo controle. Observou-se, também, redução das massas musculares relativas dos músculos Gastrocnêmios e Sóleo nos grupos submetidos à lesão.

A piora na qualidade da marcha, observada no 3º dia pós-cirúrgico, dos animais dos grupos submetidos à tenotomia total do tendão do Calcâneo já era esperada devido à severidade da lesão tendínea. Tal comportamento também já foi observado em outros estudos com lesão parcial (22) e total do tendão do calcâneo (21, 23).

O processo de reparação do tendão lesionado começa com o restabelecimento da continuidade da fibra tendínea, uma vez que a lesão inicia vários eventos de sinalização que recrutam fibroblastos e estimulam a síntese de colágeno e de outros componentes extracelulares, estabelecendo assim continuidade física do local (24). Entretanto, o, tendão cicatrizado não consegue alcançar as características morfológicas nem biomecânicas de um tendão normal (25, 26), e tampouco bioquímicas (2).

Apesar de não ter se equiparado aos valores do grupo controle, percebe-se uma melhora na funcionalidade da marcha dos animais dos GLSB e GLB no decorrer do experimento já que os valores médios do IFA foram cada vez menos negativos em ambos os grupos. Esses dados corroboram os resultados encontrados na literatura (20-23, 27,28), que também demonstraram melhora progressiva na marcha ao longo do experimento, independentemente do tipo de lesão realizada e/ou da terapêutica utilizada.

Neste estudo, entretanto, essa melhora na qualidade da marcha, não foi suficiente o bastante para que no 30º dia pós-cirúrgico os valores dos dois grupos submetidos à lesão fossem semelhantes aos valores do GC.

O tendão uma vez lesionado fica mais longo, gerando uma diminuição da força no final da flexão plantar (29). O músculo Tríceps Sural tende a se contrair para manter a tensão tendínea normal durante a marcha; e no momento em que há a necessidade de uma atividade muscular adicional (fase de impulsão), a contração pode ser menos efetiva (29, 30), uma vez que parte das fibras musculares já estavam ativadas.

A força e a massa muscular estão inter-relacionadas (31). Com o tempo, embora o músculo esteja contraindo mais, sua contração fica sem tensão durante a fase inicial da marcha, e a falta de tensão leva à atrofia muscular (30), e esta leva à uma fraqueza muscular

Um estudo, que avaliou a ativação muscular dos músculos Gm, GI e SI em pessoas com lesão tendínea, indicou que a perda da função é causada principalmente por alterações anatômicas no tendão e que o aparecimento da fraqueza muscular deve-se à redução da capacidade de transmissão de força em toda a articulação (30). Isso indica que os resultados obtidos na pesquisa atual são coerentes e estão correlacionados, uma vez que se observou redução da funcionalidade da marcha paralelamente à redução da massa muscular indicando uma possível atrofia muscular.

O uso do filme de biopolímero da cana-de-açúcar no GLB não proporcionou um menor tempo de recuperação da marcha dos animais, como esperado. Entretanto, ao se comparar os GLSB e GLB, observou-se que durante todo o experimento eles apresentaram valores médios semelhantes, ou seja, indicando que apesar desse biomaterial não ter otimizado a reparação, mostrou ser adequado por não interferir na deambulação dos animais.

### **Conclusão:**

Do ponto de vista funcional no protocolo adotado, o filme de biopolímero da cana-de-açúcar parece não ter otimizado a recuperação estrutural do tendão do Calcâneo a ponto de trazer benefícios na deambulação dos animais tenotomizados.

### **Agradecimentos:**

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro por meio da bolsa de pós-graduação.

Ao Laboratório de Polímeros (POLISA – Polímeros para a Saúde Ltda) e ao Núcleo de Cirurgia Experimental (Departamento de Cirurgia – UFPE) por fornecer o Biopolímero da Cana-de-Açúcar.

### **Referências:**

1. Maquirriain, MD. Achilles tendon rupture: avoiding tendon lengthening during surgical repair and rehabilitation. *Yale J Biol Med.* 2011;84:289-300.
2. Daher RJ, Chachine NO, Razzano P, Patwa SA, Sgaglione NJ, Grande DA. Tendon repair augmented with a novel circulating stem cell population. *Int J Clin Exp Med.* 2011; 4(3):214-9.
3. Koh IH, Kang HJ, Jeon SW, Park JH, Choi YR. Passive skeletal muscle excursion after tendon rupture correlates with increased collagen content in muscle. *Yonsei Med J.* 2014;55(5):1395-9.
4. Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone and Joint Surg [Br].* 1990;72B(2):293-7.
5. Gebauer M, Beil FT, Beckmann J, Sárváry AM, Ueblacker P, Ruecker AH, *et al.* Mechanical evaluation of different techniques for Achilles tendon repair. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007;127:795-9.
6. Palmes D, Spiegel HU, Schneider TO, Langer M, Stratmann U, Budny T, *et al.* Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. *J Orthop Res.* 2002;20(5):939-46.
7. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000;21(23):2335-46.
8. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota RA, Tenório Filho F. Bioplímero produzido a partir de cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras.* 2002;17(Suppl1):11-3. Portuguese
9. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marques E, Silva DB. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *An Fac Med Univ Fed Pernamb.* 2004;49(2):73-4. Portuguese

10. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Júnior MD, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernamb.* 2005;50(1):37-40. Portuguese
11. Monteiro VLC, Coelho MCOC, Carrazzoni PG, Mota RA, Melo FAD, Carvalho EC, *et al.* Cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas por segunda ou terceira intenção. *Medicina Veterinária (Recife).* 2007;1(1):1-8. Portuguese
12. De Lucena MT, Melo Júnior MR, Lira MMM, Castro CMMB, Cavalcanti LA, Menezes MA, *et al.* Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. *J Mater Sci: Mater Med.* 2015; 26(2):82.
13. Marques SRB, Lins EM, Aguiar JLA, Albuquerque MCS, Rossiter RO, Montenegro LT, *et al.* Um novo substituto vascular: arterioplastia femora em cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar – avaliação hemodinâmica e histopatológica. *J Vasc Bras.* 2007;6(4):309-15. Portuguese
14. Mayer DLB, Araújo JG, Leal MC, Caldas Neto SS, Ataíde RFA, Mello RJV. Sugarcane biopolymer membrane: experimental evaluation in the middle ear. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011;77(1):44-50. Portuguese
15. Tavares LHM, Vilar FO, Aguiar JLA, Paz AR, Melo FAD, Negromonte GRP. Biopolymer sponge for high grade renal trauma: an experimental study in rabbits. *J Urol.* 2014;4(1):1-6.
16. Silveira ABFN, Aguiar JLA, Campos Júnior O, Diniz GT, Lima SVC. Membrana de biopolímero da cana-de-açúcar: uma realidade como opção para correção da incontinência urinária. *Millenium.* 2014;46:81-95. Portuguese
17. Iwanaga TC, Aguiar JLA, Martins-Filho ED, Kreimer F, Silva-Filho FL, Albuquerque AV. Análise de parâmetros biomecânicos em anastomoses colônicas. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2016;29(2):90-92. Portuguese
18. Fragoso AS, Silva MB, Melo CP, Aguiar JLA, Rodrigues CG, Medeiros PL, *et al.* Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer. *J Mater Sci: Mater Med.* 2014; 25:229–237.
19. Massone F. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: Massone F. *Anestesiologia Veterinária: farmacologia e técnicas.* 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. cap.10. Portuguese

20. Murrell GAC, Lilly EG, Davies H, Best TM, Goldner RD, Seabar AV. The Achilles functional index. *J Orthop Res.* 1992;10(3):398-404.
21. Liang JI, Chen MY, Hsieh TH, Liu CY, Lam CF, Chen JJ, *et al.* Video-based gait analysis for functional evaluation of healing achilles tendon in rats. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(12):2532-40.
22. See EK, Ng GY, Ng CO, Fung D T. Running exercises improve the strength of a partially ruptured Achilles tendon. *Br J Sports Med.* 2004;38(5):597-600.
23. Murrell GAC, Jang D, Deng XH, Hannafin JA, Warren RF. Effects of exercise on Achilles tendon healing in a rat model. *Foot Ankle Int.* 1998;19(9):598-603.
24. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *Hand Surg.* 2008;33A:102–12.
25. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(Suppl367):S312-23.
26. Tomiosso TC, Nakagaki WR, Gomes L, Hyslop S, Pimentel ER. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. *Cell Tissue Res.* 2009;337:235-42.
27. Best TM, Collins A, Lilly EG, Seabar AV, Goldner R, Murrell GAC. Achilles tendon healing: a correlation between functional and mechanical performance in the rat. *J Orthop Res.* 1993;11(6):897-906.
28. Krivic A, Majerovic M, Jelic I, Seiwerth S, Sikiric P. Modulation of early functional recovery of Achilles tendon to bone unit after transection by BPC 157 and methylprednisolone. *Inflamm Res.* 2008;57(5):205-10.
29. Mullaney MJ, McHugh MP, Tyler TF, Nicholas SJ, Lee SJ. Weakness in end-range plantar flexion after Achilles tendon repair. *Am J Sports Med.* 2006;34(7):1120-5.
30. Suydam SM, Buchanan TS, Manal K, Silbernagel KG. Compensatory muscle activation caused by tendon lengthening post-Achilles tendon rupture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23(3):868-74.
31. Bai HJ, Sun JQ, Chen M, Xu DF, Xie H, Yu ZW, *et al.* Age-related decline in skeletal muscle mass and function among elderly men and women in Shanghai, China: a cross sectional study. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2016;25(2):326-32.

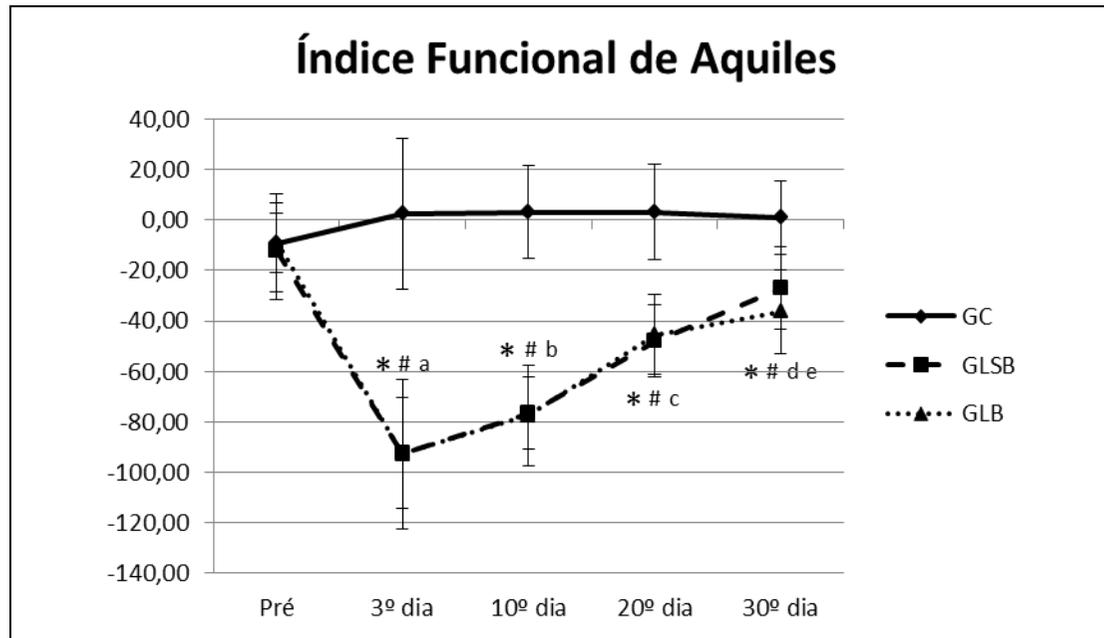
**Tabela 1.** Valores Médios do Índice Funcional de Aquiles

	GC	GLSB	GLB	p (ANOVA)
<b>Pré</b>	-9,05±11,94	-12,30±19,27	-9,00±19,27	0,854
<b>3º dia</b>	2,53±30,11	-92,43±22,12 <sup>*,a</sup>	-92,88±29,75 <sup>*,a</sup>	<0,001
<b>10º dia</b>	3,22±18,45	-76,70±14,34 <sup>*,b</sup>	-77,53±19,73 <sup>*,b</sup>	<0,001
<b>20º dia</b>	3,25±18,94	-47,97±14,25 <sup>*,c</sup>	-45,38±15,94 <sup>*,c</sup>	<0,001
<b>30º dia</b>	1,00±14,69	-26,99±16,25 <sup>*,d,e</sup>	-36,26±16,72 <sup>*,d,e</sup>	<0,001
<b>n</b>	13 animais	13 animais	13 animais	

GC= Grupo Controle; GLSB= Grupo Lesão sem Biopolímero; GLB= Grupo Lesão com Biopolímero; Pré= dia anterior à cirurgia; 3º dia= 3º dia pós-cirúrgico; 10º dia= 10º dia pós-cirúrgico; 20º dia= 20º dia pós-cirúrgico; 30º dia= 30º dia pós-cirúrgico; n= quantidade de animais utilizados. Valores expressos em média ± desvio padrão.

ANOVA (one way), post hoc Teste de Tukey: \*GCxGLSB,  $p_{\text{pré}}=0,880$ ,  $p_{3^\circ \text{dia}}<0,001$ ,  $p_{10^\circ \text{dia}}<0,001$ ,  $p_{20^\circ \text{dia}}<0,001$ ,  $p_{30^\circ \text{dia}}<0,001$ ; #GCxGLB,  $p_{\text{pré}}=1,000$ ,  $p_{3^\circ \text{dia}}<0,001$ ,  $p_{10^\circ \text{dia}}<0,001$ ,  $p_{20^\circ \text{dia}}<0,001$ ,  $p_{30^\circ \text{dia}}<0,001$ ; e †GLBxGLSB,  $p_{\text{pré}}=0,876$ ,  $p_{3^\circ \text{dia}}=0,999$ ,  $p_{10^\circ \text{dia}}=0,992$ ,  $p_{20^\circ \text{dia}}=0,915$ ,  $p_{30^\circ \text{dia}}=0,309$ .

Teste T (amostras pareadas): <sup>a</sup>3º dia x pré,  $p_{\text{GLSB}}<0,001$ ,  $p_{\text{GLB}}<0,001$ ; <sup>b</sup>10º dia x 3º dia,  $p_{\text{GLSB}}=0,012$ ,  $p_{\text{GLB}}=0,016$ ; <sup>c</sup>20º dia x 10º dia,  $p_{\text{GLSB}}<0,001$ ,  $p_{\text{GLB}}<0,001$ ; e <sup>d</sup>30º dia x 20º dia,  $p_{\text{GLSB}}=0,002$ ,  $p_{\text{GLB}}=0,034$ ; <sup>e</sup>30º dia x 3º dia,  $p_{\text{GLSB}}<0,001$ ,  $p_{\text{GLB}}=0,001$ .

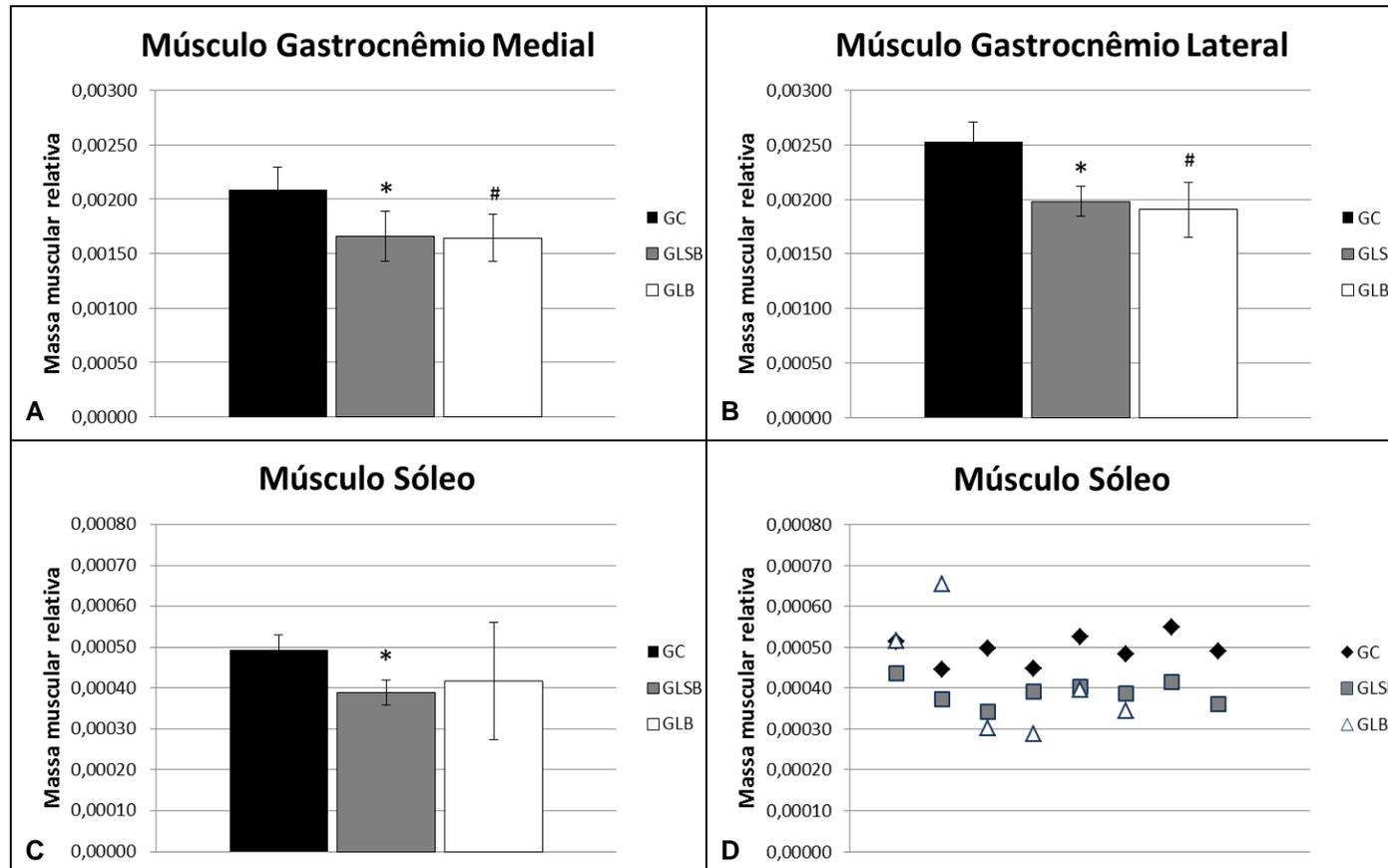


**Figura 1.** Evolução do Índice Funcional de Aquiles.

GC= Grupo Controle; GLSB= Grupo Lesão sem Biopolímero; GLB= Grupo Lesão com Biopolímero; Pré= dia anterior à cirurgia; 3º dia= 3º dia pós-cirúrgico; 10º dia= 10º dia pós-cirúrgico; 20º dia= 20º dia pós-cirúrgico; 30º dia= 30º dia pós-cirúrgico.

ANOVA (one way), post hoc Teste de Tukey,  $p < 0,05$ : \*GLSBxGC; #GLBxGC; †GLBxGLSB.

Teste T (amostras pareadas),  $p < 0,05$ : <sup>a</sup>3º dia x pré, <sup>b</sup>10º dia x 3º dia, <sup>c</sup>20º dia x 10º dia, <sup>d</sup>30º dia x 20º dia, <sup>e</sup>30º dia x 3º dia.



**Figura 2.** Massa Muscular Relativa no 30<sup>o</sup> dia pós-cirúrgico

(a, b, c) Médias das massas musculares relativas nos músculos estudados; (d) Valores das massas musculares relativas de todos os animais para o músculo sóleo. GC= Grupo Controle; GLSB= Grupo Lesão sem Biopolímero; GLB= Grupo Lesão com Biopolímero.

ANOVA (one way), post hoc Teste de Tukey,  $p < 0,05$ : \*GLSBxGC; #GLBxGC; †GLBxGLSB.

### 3.2 ARTIGO 2: CICATRIZAÇÃO DA TENOTOMIA COMPLETA DO TENDÃO DE AQUILES COM USO DE UM BIOPOLÍMERO EXTRAÍDO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Artigo submetido para publicação na *Journal of Inflammation* (ISSN 1476-9255) – Conceito B1 para Biotecnologia (ANEXO C).

Título do trabalho: **Cicatrização da tenotomia completa do tendão de Aquiles com uso de um biopolímero extraído da cana-de-açúcar.**

Título do trabalho (inglês): **Cicatrization of complete tenotomy of the Achilles tendon with the use of a biopolymer extracted from sugarcane.**

Título condensado: **Cicatrization of complete tenotomy of the Achilles tendon**

Kamilla Dinah Santos de Lira<sup>1</sup>, Ana Cristina Falcão Esteves<sup>2</sup>, Anderson Arnaldo da Silva<sup>3</sup>, Anne Gabrielle Vasconcelos de Oliveira<sup>4</sup>, Jose Lamartine de Andrade Aguiar<sup>5</sup>, Sílvia Regina Arruda de Moraes<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Doutoranda, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Anatomia (UFPE), Doutora, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Graduação em Ciências Biológicas, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura, Graduação em Ciências Biológicas, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pós-graduação em Cirurgia (UFPE), Doutor, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Anatomia (UFPE), Doutora, Recife, Pernambuco, Brasil.

Órgão financiador: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)

## Resumo

**Introdução:** O tendão de Aquiles é muito resistente, e sua lesão gera disfunções significativas. O biopolímero da cana-de-açúcar tem sido estudado na cirurgia experimental devido suas propriedades. **Objetivos:** Avaliar a utilização do biopolímero da cana-de-açúcar como um auxiliar do processo de reparação da lesão total do tendão de Aquiles. **Métodos:** Foram utilizados ratos, *Wistar*, distribuídos em: Grupo Controle (GC), sem lesão tendínea; Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB), com lesão tendínea e sem biopolímero; Grupo Lesão+Biopolímero (GLB), com lesão tendínea e com biopolímero. Aos 60 dias de vida, os animais foram cirurgiados para realização da tenotomia do tendão de Aquiles direito. Os animais de cada grupo foram redistribuídos para coleta dos tendões em 4 momentos: 3º, 10º, 20º e 30º dias pós-cirurgia. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA (*one way*) com o Teste de Tukey, adotou-se 95% de confiabilidade, e os dados foram expressos em média e desvio padrão. **Resultados:** Durante o experimento, observou-se deposição de colágeno nos GLSB e GLB. Observou-se aumento da quantidade de tenoblastos nos GLSB e GLB em relação ao GC. Houve aumento da quantidade de macrófagos nos GLSB e GLB em relação ao GC, porém, ao final do estudo, apenas o GLB manteve esse aumento. No GLB, percebeu-se presença de infiltrado inflamatório em torno do biopolímero durante todo o experimento. **Conclusão:** No protocolo utilizado, o biopolímero da cana-de-açúcar não otimizou o processo de cicatrização do tendão de Aquiles, mas demonstrou ser biocompatível.

**Palavras-chave:** Tendão do Calcâneo, Biopolímeros, Cicatrização de Feridas.

## Abstract

**Introduction:** The Achilles tendon is very study, and its injury generates significant dysfunctions. The biopolymer of sugarcane has been studied in experimental surgery due to its properties. **Objective:** To evaluate the use of sugarcane biopolymer as an aid in the repair process of total Achilles tendon injury. **Methods:** *Wistar* male rats were distributed in: Control Group (GC), without tendon injury; Injury without Biopolymer Group (IWBG), with tendinous lesion and without biopolymer; Injury + Biopolymer Group (IBG), with tendinous lesion and biopolymer. At 60 days of age, the animals were operated for tenotomy of the right Achilles tendon. The animals of each group were redistributed to collect the tendons in 4 moments: 3rd, 10th, 20th and 30th postoperative days. For statistical analysis, ANOVA (*one way*) was used

with the Tukey test, 95% reliability was adopted, and the data were expressed as mean and standard deviation. **Results:** During the experiment, collagen deposition was observed in IWBG and IBG. There was increase in the amount of tenoblasts in IWBG and IBG in relation to CG. There was an increase in the amount of macrophages in IWBG and IBG in relation to CG, but at the end of the study, only IBG maintained this increase. In IBG, the presence of inflammatory infiltrate around the biopolymer was observed throughout the experiment. **Conclusion:** In the protocol used, the sugarcane biopolymer did not optimize the healing process of the Achilles tendon, but was shown to be biocompatible.

**Keywords:** Achilles Tendon, Biopolymers, Wound Healing.

## Introdução

O tendão de Aquiles é o mais resistente do corpo [1], sendo capaz de suportar altas tensões [2] e por esse motivo sua lesão pode causar incapacidade e disfunção significativas [3].

A organização e as propriedades mecânicas de um tendão reparado são inferiores às de um tendão saudável [2]. Logo, é muito importante a escolha do tratamento adequado para se conseguir a melhor resposta, e o reparo cirúrgico parece ser uma ótima opção, uma vez que proporciona maior estabilidade [4].

Há alguns anos, um exopolissacarídeo sintetizado a partir do melaço da cana-de-açúcar tem sido estudado e apresentado elasticidade, resistência à tração, flexibilidade [5], baixa citotoxicidade [6,7], além de mostrar ser biocompatível [8,9], absorvível [10], e servir como potencial plataforma para adesão celular [11]. Devido a essas propriedades, esse biopolímero vem sendo testado em várias áreas da cirurgia experimental: na cicatrização de feridas cutâneas [12; 13], na reconstrução vascular [14], como substituto da membrana timpânica [15], na reconstrução do parênquima renal [16], na correção da incontinência urinária [17], entre outras. E obtendo respostas variadas em diferentes tecidos, tais como: controle de infecções cutâneas ([13]; integração com tecido submucoso [18]; integração e indução de remodelação [19]; reação inflamatória intensa [14, 20, 21].

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do biopolímero da cana-de-açúcar como um auxiliar do processo de reparação da lesão total do tendão de Aquiles.

## Métodos

- Amostra: Foram utilizados 66 ratos, *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, com 60±2 dias, 255±30g, mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia (UFPE), em ciclo de luz invertido (12h/12h), sob condições padrão de biotério.
- Grupos experimentais: Os animais foram separados inicialmente em: Grupo Controle (GC) – 22 animais não submetidos à tenotomia; Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB) – 22 animais submetidos à tenotomia e reconstituição; e Grupo Lesão com Biopolímero (GLB) – 22 animais submetidos à tenotomia e reconstituição com biopolímero.
- Obtenção do biopolímero da cana-de-açúcar: O filme microperfurado (Ø=1mm) foi obtido partir do melaço de cana-de-açúcar, na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e proveniente da POLISA (Polímeros para a Saúde Ltda).
- Procedimento cirúrgico: Todos os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina (2%) e cloridrato de cetamina (10%), 0,2ml por 100g de peso do animal [1:1] [22], via intramuscular. Após a tricotomia e a antissepsia, foi feita uma incisão longitudinal na pele da região posteroinferior do membro posterior direito para visualização do tendão de Aquiles. O tendão do músculo Plantar de todos os animais foi retirado, para não atuar como uma “tala interna” [23; 24]. Nos GLSB e GLB, foi realizada a lesão total do tendão de Aquiles no seu ponto médio, reconstituição imediata com fio absorvível CATGUT Cromado 5-0 (ETHICON). Apenas no GLB, o tendão suturado era envolvido pelo filme de biopolímero da cana-de-açúcar (0,6cm×1,8cm). Foi realizada a sutura da pele de todos os animais com fio CATGUT Nylon 4-0 (Somerville), e administração de analgésico e de antibióticos.
- Coleta do material: Após a cirurgia, os animais de cada grupo foram separados de acordo com o período de coletado tendão (3º, 10º, 20º e 30º dias pós-cirúrgicos). Nos respectivos dias de coleta dos tendões, os animais foram anestesiados [22], e o tendão de Aquiles foi retirado em todo seu comprimento, dissecado, fixado em formaldeído 10% e encaminhado para o processamento histológico.
- Processamento e análise do tendão: O material coletado foi emblocado em parafina histológica, cortado longitudinalmente com espessura de 5µm, montado em lâmina silanizada e corado com Hematoxina e Eosina. Foram realizadas imagens

com microscópio óptico (Leica DM500) acoplado a um microcomputador com o Software LAS EZ (Versão 2.0.0 ICC50) (Quadro 1). Cinco imagens de cada lâmina (400x) foram selecionadas aleatoriamente e 540 pontos/lâmina foram utilizados (Software ImageJ 1.45s) [25] para a quantificação dos tenócitos, tenoblastos e macrófagos. Também foi realizada uma análise qualitativa para observação da: presença de infiltrado inflamatório e de células gigantes multinucleares (CGMN) tipo corpo estranho; integração tecidual; distribuição celular; neovascularização; e localização do biopolímero.

- Análise estatística: Foi realizada a Análise de Variância – ANOVA (*one-way*), com Teste de Tukey como *Post Hoc*. Adotou-se uma margem de segurança de 95% de confiabilidade, e os valores foram expressos em média e o desvio padrão.

- Aspectos éticos: O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (processo nº 23076.035304/2013-32).

## **Resultados**

Nos três grupos experimentais, houve perdas amostrais: 1 animal do GLB foi excluído do estudo, pois um dos pontos da sutura da pele rompeu dias depois da tenotomia; 1 animal do GC e 1 animal do GLSB foram excluídos devido a danos no material coletado durante o processamento histológico.

- Resultados Descritivos:

Em todos os estágios avaliados, os tendões do GC apresentaram aspecto normal com presença de tenócitos, tenoblastos e muitos vasos com diversos calibres, tampouco apresentaram sinais de lesão, infiltrado inflamatório ou células gigantes multinucleares (CGMN) tipo corpo estranho, uma vez que não foram submetidos à tenotomia.

No GLSB, em todos os momentos avaliados, foi observada nos tendões uma predominância de tenoblastos com presença de infiltrado inflamatório em torno do fio de sutura (quando presente), ausência de CGMN tipo corpo estranho, e presença de neovascularização com vasos de diversos calibres tanto na região central como na periférica do tecido. Em relação à integração tecidual, no 3º dia pós-cirúrgico, dois tendões apresentaram tecido conjuntivo propriamente dito (TCPD) denso modelado conectando os cotos, ao passo que em um tendão poucas fibras se continuaram na

região lesionada; nos demais períodos avaliados, os tendões apresentaram os cotos bem integrados.

No GLB o biopolímero da cana-de-açúcar inicialmente (3º dia pós-cirúrgico) estava posicionado no interior dos tendões, ocupando grande parte das suas porções centrais, porém sua localização foi sendo alterada até que, ao 30º dia pós-cirúrgico, encontrava-se predominantemente na periferia dos tendões. Ainda neste grupo experimental, foi observado: nos 3º e 10º dias pós-cirúrgicos, presença intensa de infiltrado inflamatório em torno do biopolímero, com células mononucleares e polimorfonucleares predominantemente; presença de moderada a intensa de infiltrado inflamatório em torno do biopolímero, com células inflamatórias, macrófagos (nos 20º e 30º dias pós-cirúrgicos) e predominância de tenoblastos aos 30º dias pós-cirúrgico. A partir do 10º dia pós-cirúrgico, observou-se CGMN tipo corpo estranho em pelo menos um dos tendões, mas também se constatou um aumento da vascularização com vasos de diversos calibres, e uma boa integração tecidual com deposição de colágeno em torno do biopolímero e formação de uma estreita faixa de TCPD denso modelado em uma das laterais com fibras sinuosas bem integradas ao tendão.

- Resultados Analíticos:

Na tabela 1 estão descritos todos os valores obtidos.

Em relação à quantidade de tenócitos, apenas no 10º dia pós-cirúrgico observou-se redução nos valores dos GLSB e GLB em relação ao GC ( $p=0,014$  e  $p=0,044$ , respectivamente). Na análise intragrupos, não foi observada diferença em todos os grupos experimentais nos momentos avaliados.

Observou-se redução nos valores do GLB em relação ao GC ( $p=0,037$ ), da quantidade de tenoblastos, no 3º dia pós-cirúrgico, porém isso não foi mantido nos demais dias avaliados, e no 30º dia pós-cirúrgico os GLSB e GLB apresentaram aumento em comparação ao GC ( $p<0,001$  e  $p<0,001$ , respectivamente). Em relação à análise intragrupos, o GLSB teve um aumento da quantidade de tenoblastos durante todo o período avaliado ( $p_{10^{\circ}\text{dia} \times 3^{\circ}\text{dia}}=0,008$ ,  $p_{20^{\circ}\text{dia} \times 10^{\circ}\text{dia}}=0,434$ ,  $p_{30^{\circ}\text{dia} \times 20^{\circ}\text{dia}}=0,007$ ,  $p_{30^{\circ}\text{dia} \times 3^{\circ}\text{dia}}<0,001$ ), enquanto que no GLB só foi observado um aumento ao final do estudo ( $p_{30^{\circ}\text{dia} \times 20^{\circ}\text{dia}}=0,002$ ,  $p_{30^{\circ}\text{dia} \times 3^{\circ}\text{dia}}<0,001$ ).

Com relação à quantidade de macrófagos, os valores do GLSB e do GLB foram maiores em comparação ao GC em quase todos os momentos avaliados (GLSBxGC:  $p_{3^{\circ}\text{dia}}<0,001$ ,  $p_{10^{\circ}\text{dia}}=0,041$ ,  $p_{20^{\circ}\text{dia}}=0,044$ ,  $p_{30^{\circ}\text{dia}}=0,973$ ;

GLBxGC:  $p_{3^\circ\text{dia}} < 0,001$ ,  $p_{10^\circ\text{dia}} < 0,001$ ,  $p_{20^\circ\text{dia}} = 0,003$ ,  $p_{30^\circ\text{dia}} = 0,005$ ). O GLB apresentou maiores valores que o GLSB em alguns momentos ( $p_{3^\circ\text{dia}} = 0,041$ ,  $p_{10^\circ\text{dia}} = 0,003$ ,  $p_{20^\circ\text{dia}} = 0,398$ ,  $p_{30^\circ\text{dia}} = 0,005$ ). Na análise intragrupos, observou-se redução na quantidade de macrófagos apenas no GLSB após 30 dias pós-cirúrgicos ( $p_{30^\circ\text{dia} \times 20^\circ\text{dia}} = 0,006$ ,  $p_{30^\circ\text{dia} \times 3^\circ\text{dia}} = 0,010$ ).

## Discussão

O estudo avaliou a viabilidade do filme de biopolímero da cana-de-açúcar como auxiliar no processo de reparação do tendão de Aquiles e os resultados mostraram que, independentemente da presença ou não desse biopolímero, houve o reparo do tecido, uma vez que se observou, em ambos os grupos com lesão, a integração tecidual com deposição de colágeno e presença de tenócitos e tenoblastos e, também a existência um número maior de vasos de diversos calibres.

O processo de cicatrização do tendão é caracterizado por três fases que se sobrepõem [26, 27, 28]. A primeira é a fase inflamatória, período que ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios, atraindo células polimorfonucleares e mononucleares e estimulando a neovascularização [29, 30]. A fase de proliferativa (segunda fase) inicia poucos dias após a lesão e é caracterizada pela proliferação de fibroblastos [28] responsáveis pela síntese de colágeno, proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular [31]. A última é a fase de remodelação, que inicia meses depois da lesão e é caracterizada pela redução da celularidade e pelo aumento da síntese de colágeno tipo I [29, 31].

A presença de tenócitos, tenoblastos e colágeno no tecido indica a existência do processo de cicatrização do tendão. E aumento no número de tenoblastos observado em ambos os grupos tenotomizados indica a atividade celular do tecido tendíneo condizente com a fase proliferativa do processo de cicatrização do tendão. Aparentemente a quantidade de tenoblastos aumentou com a evolução da fase proliferativa.

Durante este estudo, foi observada uma reação inflamatória crônica no GLB, com presença de neovascularização e de infiltrado inflamatório caracterizada por células mononucleares e polimorfonucleares em torno do biopolímero e de CGMN tipo corpo estranho em alguns dos animais. Tais células gigantes atuam como parte do processo de reparo, necessário para a integração biológica entre o filme e o tecido [19]. Foi observada uma maior quantidade de macrófagos no GLB em todos

os períodos avaliados em relação ao GC, diferentemente do GLSB que apresentou redução da quantidade de tecido inflamatório com redução da quantidade de macrófagos ao final do experimento.

A existência de infiltrado inflamatório durante no período avaliado nesta pesquisa parece ser uma reação própria à utilização de alguns implantes biológicos e não uma característica apenas do biopolímero avaliada. Ao se comparar o biopolímero com polipropileno observou-se intensa reação inflamatória com presença de neutrófilos polimorfonucleares na utilização de ambas as próteses [32]. Um estudo entre dois tipos de filme de biopolímero da cana-de-açúcar (microperfurado e compacto) e um filme de politetrafluoretileno expandido, demonstrou presença de células gigantes e neovascularização em todos os tipos de próteses avaliados, porém o filme de biopolímero microperfurado apresentou menor quantidade de células gigantes e maior vascularização [19]. Vários outros artigos também observaram uma reação inflamatória, com CGMN tipo corpo estranho [15, 18, 20, 21,33], porém sem apresentar rejeição tecidual, semelhante ao encontrado neste estudo.

Um fato interessante observado no GLB foi a mudança de posicionamento do biopolímero durante o experimento, uma vez que os tendões eram inicialmente envolvidos com o filme, e já no 3º dia essa prótese estava totalmente envolvida pelo tecido em cicatrização, ocupando as áreas centrais tecido. Aparentemente o biopolímero era deslocado para a periferia do tendão a medida que ocorria a evolução do processo de cicatrização.

No GLB, foi percebido que, no mesmo momento em que havia uma reação inflamatória crônica em torno do biopolímero, ocorria a cicatrização do tendão, ou seja, ocorreram as duas reações em paralelo sem que uma inviabilizasse a outra e em áreas distintas do tecido. Enquanto se percebia células características de uma intensa reação inflamatória (células mononucleares, polimorfonucleares e macrófagos) provavelmente para fagocitar e absorver o agente exógeno (o filme de biopolímero da cana-de-açúcar), também foram observados elementos característicos do processo de cicatrização do tendão (tenócitos, tenoblastos em grande quantidade e colágeno). O filme parece ter sido deslocado para a periferia do tecido para que o processo de absorção não interferisse no processo de cicatrização do tendão.

Como este estudo durou até os 30 dias após a lesão tendínea, os processos de cicatrização do tecido e de absorção do biopolímero ainda estavam em andamento. Um trabalho com o período de avaliação maior possivelmente encontraria todos esses processos em estágios diferentes.

### **Conclusão**

No protocolo experimental utilizado, o biopolímero da cana-de-açúcar não otimizou o processo de cicatrização do tendão de Aquiles, porém demonstrou ser biocompatível. A alteração no posicionamento do filme de biopolímero durante o período avaliado, e a ocorrência dos processos de cicatrização e inflamatório distintamente no tendão merecem ser mais investigados para melhores esclarecimentos dos mecanismos ocorridos.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro por meio da bolsa de pós-graduação.

Ao Laboratório de Polímeros (POLISA – Polímeros para a Saúde Ltda) e ao Núcleo de Cirurgia Experimental (Departamento de Cirurgia – UFPE) por fornecer o Biopolímero da Cana-de-Açúcar.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) por ceder a estrutura para realização de alguns procedimentos.

Ao Laboratório de Morfometria (Departamento de Anatomia – UFPE) por ceder a estrutura para realização de alguns procedimentos.

### **Referências**

1. Maquirriain MD. Achilles tendon rupture: avoiding tendon lengthening during surgical repair and rehabilitation. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2011;84:289-300.
2. Tomiosso TC, Nakagaki WR, Gomes L, Hyslop S, Pimentel ER. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. *Cell and Tissue Research*. 2009;337:235-242.

3. Daher RJ, Chachine NO, Razzano P, Patwa SA, Sgaglione NJ, Grande DA. Tendon repair augmented with a novel circulating stem cell population. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2011;4(3):214-219.
4. Gebauer M, Beil FT, Beckmann J, Sárváry AM, Ueblacker P, Ruecker AH, *et al.* Mechanical evaluation of different techniques for Achilles tendon repair. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2007;127:795-799.
5. Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Júnior MD, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*. 2005;50(1):37-40. Portuguese
6. Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marques E, Silva DB. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*. 2004;49(2):73-74. Portuguese
7. Pinto FCM, Oliveira ACAX, Carvalho RR, Gomes-Carneiro MR, Coelho DR, *et al.* Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydrate Polymers*. 2016;137:556-560.
8. De Lucena MT, De Melo Júnior MR, De Melo Lira MM, De Castro CM, Cavalcanti LA, De Menezes MA, *et al.* Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2015;26(2):82.
9. Lima FM, Pinto FC, Andrade-Da-Costa BL, Silva JG, Campos Júnior O, Aguiar JL. Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural defect repair of rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2017;28(3):37.
10. Coelho Júnior ER, Costa LO, Alencar AV, Barbosa AP, Pinto FC, Aguiar JL. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2015;30(3):194-198.
11. Fragoso AS, Silva MB, De Melo CP, Aguiar JL, Rodrigues CG, De Medeiros PL, *et al.* Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014;25(1):229–237.
12. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota RA, Tenório Filho F. Bioplímero produzido a partir de cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002;17(1):11-13.
13. Monteiro VLC, Coelho MCOC, Carrazoni PG, Mota RA, Melo FAD, Carvalho EC, *et al.* Cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas por segunda ou terceira intenção. *Medicina Veterinária (Recife)*. 2007;1(1):1-8. Portuguese
14. Marques SRB, Lins EM, Aguiar JLA, Albuquerque MCS, Rossiter RO, Montenegro LT, Vieira RJ. Um novo substituto vascular : arterioplastia femora em

cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar – avaliação hemodinâmica e histopatológica. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2007;6(4):309-315.

15. Mayer DLB, Araújo JG, Leal MC, Caldas Neto SS, Ataíde RFA, Mello RJV. Sugarcane biopolymer membrane: experimental evaluation in the middle ear. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2011;77(1):44-50, 2011.

16. Tavares LHM, Vilar FO, Aguiar JLA, Paz AR, Melo FAD, Negromonte GRP. Biopolymer sponge for high grade renal trauma: an experimental study in rabbits. *Open Journal of Urology*. 2014;4(1):1-6.

17. Silveira ABFN, Aguiar JLA, Campos Júnior O, Diniz GT, Lima SVC. Membrana de biopolímero da cana-de-açúcar: uma realidade como opção para correção da incontinência urinária. *Millenium*. 2014;46:81-95.

18. Pita PC, Pinto FC, Lira MM, Melo Fde A, Ferreira LM, Aguiar JL. Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2015;30(4):296-300.

19. Silveira RK, Coelho ARB, Pinto FCM, Albuquerque AV, Melo Filho DA, Aguiar JLA. Bioprosthetic mesh of bacterial cellulose for treatment of abdominal muscle aponeurotic defect in rat model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2016;27(8): 129.

20. Leão RA, Assis RC, Caldas Neto SS, Lira MM, Vasconcelos SJ. Effect of sugarcane biopolymer gel injected in rabbit vocal fold. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2014;80(3):220-225.

21. Albuquerque PCVC, Aguiar JLA, Pontes Filho NT, Mello RJV, Olbertz CMCA, Albuquerque PEMC, *et al.* A comparative study of the areas of osteochondral defects produced in femoral condyles of rabbits treated with sugar cane biopolymer gel. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2015;30(11):770-777.

22. Massone F. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: Massone F. *Anestesiologia Veterinária: farmacologia e técnicas*. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. cap.10. Portuguese

23. Murrell GAC, Lilly EG, Davies H, Best TM, Goldner RD, Seabar AV. The Achilles functional index. *Journal of Orthopaedic Research*. 1992;10(3):398-404.

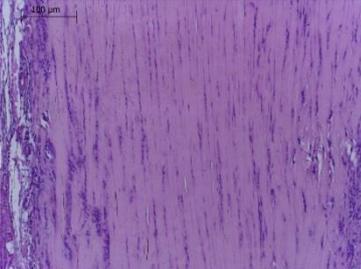
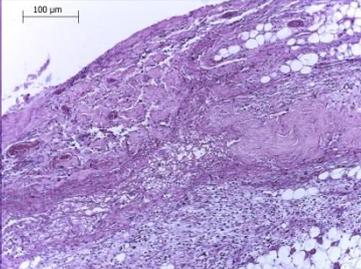
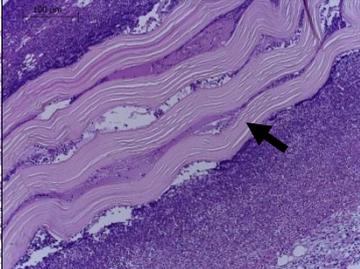
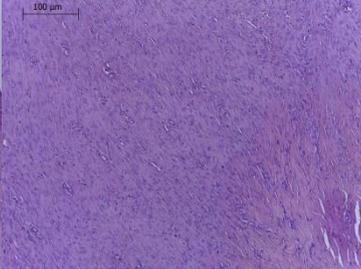
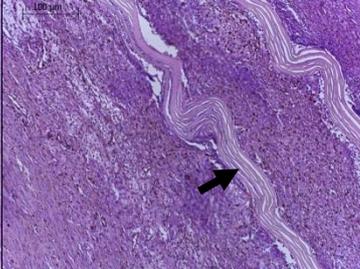
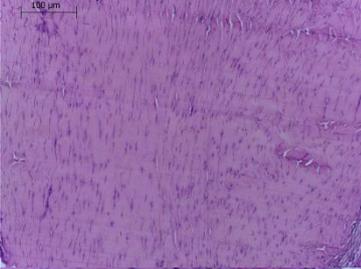
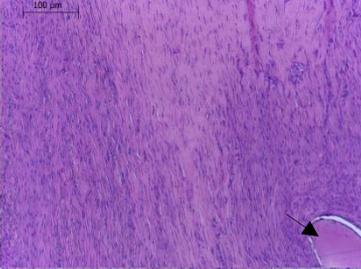
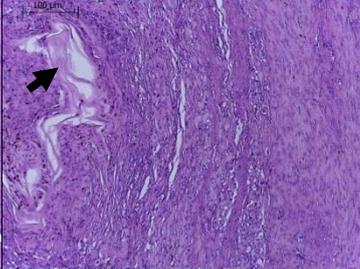
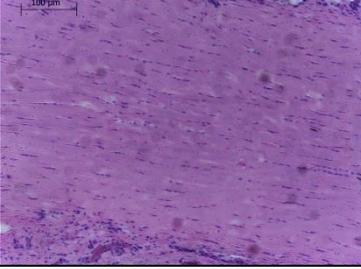
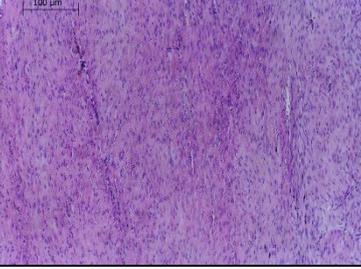
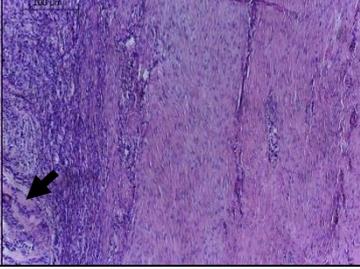
24. Liang JI, Chen MY, Hsieh TH, Liu CY, Lam CF, Chen JJ, Yeh ML. Video-based gait analysis for functional evaluation of healing achilles tendon in rats. *Annals of Biomedical Engineering*. 2012;40(12):2532-2540.

25. Amenábar JM, Padilha DMP, Hugo FN, Fossati ACM. Uso da estereologia como método na pesquisa histológica. *Revista da Faculdade de Odontologia (Porto Alegre)*. 2003;44(1):62-65.

26. Sharma P, Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing. *Surgeon*. 2005a;3(5):309-316.

27. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2005b;87A(1):187-202.
28. Hope H, Saxby TS. Tendon healing. *Foot and Ankle Clinics*. 2007;12(4):553-567.
29. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1999;suppl.367:S312-S323.
30. Rosenbaum AJ, Wicker JF, Dines JS, Bonasser L, Razzano P, Dines DM, Grande DA. Histologic stages of healing correlate with restoration of tensile strength in a model of experimental tendon repair. *HSS Journal*. 2010;6(2):164-170.
31. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *Journal of Hand Surgery*. 2008;33A(1):102–112.
32. Lucena RG, Lima SV, Aguiar JL, Andrade RT, Pinto FC, Vilar FO. Experimental use of a cellulosic biopolymer as a new material for suburethral sling in the treatment of stress urinary incontinence. *International Brazilian Journal Of Urology*. 2015;41(6):1148-53.
33. Cordeiro-Barbosa FA, Aguiar JLA, Lira MMM, Pontes Filho NT, Bernardino-Araújo S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2012;75(4):267-272.

**Quadro 1.** Imagens de Cortes Longitudinais dos Tendões, corados com Hematoxilina e Eosina.

	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo Lesão sem Biopolímero</b>	<b>Grupo Lesão com Biopolímero</b>
<b>3º dia</b>			
<b>10º dia</b>			
<b>20º dia</b>			
<b>30º dia</b>			

*3º dia= 3º dia pós-cirurgia; 10º dia= 10º dia pós-cirurgia; 20º dia= 20º dia pós-cirurgia; 30º dia= 30º dia pós-cirurgia; seta fina=fio de sutura; seta larga=biopolímero. 100x.*

**Tabela 1.** Valores Médios da Quantidade de Tenócitos, Tenoblastos e Macrófagos

		<b>GC</b>	<b>GLSB</b>	<b>GLB</b>
<b>Tenócitos</b>	3º dia	12,80±8,67	8,25±8,81	3,20±3,56
	10º dia	19,33±11,60	4,67±3,83 *	6,80±4,66 *
	20º dia	22,17±6,11	16,83±14,05	10,00±7,92
	30º dia	19,50±5,45	23,00±10,61	20,60±18,74
<b>Tenoblastos</b>	3º dia	53,40±8,88	35,50±26,74	19,40±18,68 *
	10º dia	74,33±41,47	109,00±33,83 <sup>a</sup>	59,00±18,75
	20º dia	47,00±11,06	82,00±35,81	67,17±38,96
	30º dia	48,50±13,28	152,00±17,92 <sup>*,c,d</sup>	139,40±22,55 <sup>*,c,d</sup>
<b>Macrófagos</b>	3º dia	5,60±4,67	36,75±3,77 *	48,40±8,47 <sup>*,#</sup>
	10º dia	6,50±9,63	24,67±12,71 *	53,80±12,30 <sup>*,#</sup>
	20º dia	2,83±3,71	35,67±22,64 *	52,17±29,07 *
	30º dia	0,00±0,00	2,20±2,95 <sup>c,d</sup>	39,80±24,40 <sup>*,#</sup>

GC= Grupo Controle; GLSB= Grupo Lesão sem Biopolímero; GLB= Grupo Lesão com Biopolímero; 3ºdia= 3º dia após a pós-cirurgia; 10ºdia= 10º dia pós-cirurgia; 20ºdia= 20º dia pós-cirurgia; 30ºdia= 30º dia pós-cirurgia. Valores expressos em média ± desvio padrão.

ANOVA (oneway), post hoc Teste de Tukey: \* $p < 0,05$ , GLSBxGC ou GLBxGC; # $p < 0,05$ , GLBxGLSB; <sup>a</sup> $p < 0,05$ , 10ºdia x 3ºdia; <sup>b</sup> $p < 0,05$ , 20ºdia x 10ºdia; <sup>c</sup> $p < 0,05$ , 30ºdia x 20ºdia; <sup>d</sup> $p < 0,05$ , 30ºdia x 3ºdia.

### 3.3 ARTIGO 3: ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE MIP-1 $\alpha$ , TGF 1 $\beta$ E VIMENTINA DURANTE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DO TENDÃO DO CALCÂNEO

Título do trabalho: **Análise da expressão proteica de MIP-1 $\alpha$ , TGF 1 $\beta$  e Vimentina durante o processo de cicatrização do tendão do calcâneo.**

Kamilla Dinah Santos de Lira<sup>1</sup>, Ana Cristina Falcão Esteves<sup>2</sup>, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo<sup>3</sup>, Mário Sérgio de Souza Albuquerque<sup>4</sup>, Deniele Bezerra Lós<sup>5</sup>, Jose Lamartine de Andrade Aguiar<sup>6</sup>, Sílvia Regina Arruda de Moraes<sup>7</sup>.

Instituição que sediou o estudo: Laboratório de Plasticidade Neuromuscular, Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Doutoranda, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Anatomia (UFPE), Doutora, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Bioquímica (UFPE), Doutor, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Graduação em Biomedicina, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Doutoranda, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pós-graduação em Cirurgia (UFPE), Doutor, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>7</sup>Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Anatomia (UFPE), Doutora, Recife, Pernambuco, Brasil.

Órgão financiador: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)

## Resumo

**Introdução:** O tendão do Calcâneo lesionado gera grande instabilidade articular. O biopolímero da cana-de-açúcar pode ser uma opção para auxiliar no reparo do tendão. **Objetivos:** Avaliar o biopolímero da cana-de-açúcar no processo de cicatrização do tendão do Calcâneo através da análise da expressão de algumas proteínas. **Métodos:** Foram utilizados ratos, *Wistar*, distribuídos em: Grupo Controle (GC), sem lesão tendínea; Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB), com lesão tendínea e sem biopolímero; Grupo Lesão+Biopolímero (GLB), com lesão tendínea e com biopolímero. Aos 60 dias, os animais foram cirurgiados para realização da lesão do tendão do Calcâneo. Os animais de todos os grupos foram redistribuídos para coleta dos tendões em 4 momentos: 3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias pós-cirúrgicos. E o material coletado foi encaminhado para a imunohistoquímica. **Resultados:** Observou-se redução da expressão das proteínas durante o experimento. No GLB a expressão das proteínas foi mais intensa em volta do biopolímero. **Conclusão:** O filme de biopolímero da cana-de-açúcar estimulou uma reação inflamatória crônica no tecido tendíneo em cicatrização, mas sem interferir em toda extensão do tendão. **Palavras-chave:** Cicatrização, Imunohistoquímica, Proteínas.

## Introdução:

Um tendão é um tecido conjuntivo fibroso resistente que geralmente liga um músculo a um osso (GUO *et al.*, 2016). Porém, distúrbios no tendão de Aquiles causam dor e incapacidade e podem predispor a ruptura (GLAZEBROOK *et al.*, 2008).

Uma lesão tendínea pode causar uma grande instabilidade articular, e levar a lesões de tecidos adjacentes e ao desenvolvimento de doenças articulares degenerativas (WOO *et al.*, 1999).

Quando ocorre a lesão, eventos de sinalização são iniciados, para se estabelecer uma continuidade física no local (JAMES *et al.*, 2008). Porém, sabe-se que a organização e as propriedades mecânicas de um tendão reparado são inferiores às de um tendão saudável (TOMIOSSO *et al.*, 2009; DAHER *et al.*, 2011).

O biopolímero da cana-de-açúcar pode ser uma opção para auxiliar o reparo do tendão durante o processo de cicatrização, uma vez que há anos tem sido estudado na cirurgia experimental devido a suas propriedades: elasticidade, resistência à tração, flexibilidade (LIMA *et al.*, 2005), baixa citotoxicidade (CASTRO

*et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2016), biocompatibilidade (DE LUCENA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017). Além destas, ele é absorvível (COELHO JÚNIOR *et al.*, 2015), e serve como potencial plataforma para adesão celular (FRAGOSO *et al.*, 2014).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o biopolímero da cana-de-açúcar no processo de cicatrização do tendão do Calcâneo através da análise da expressão de algumas proteínas.

### **Métodos:**

- Amostra: Foram utilizados 36 ratos, *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, com 60±2 dias, 250±30g, mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Anatomia (UFPE), em ciclo de luz claro/escuro invertido (12h/12h), sob condições padrão de biotério.

- Grupos experimentais: Os animais foram inicialmente separados em: Grupo Controle (GC) – 12 animais não submetidos à lesão do tendão; Grupo Lesão sem Biopolímero (GLSB) – 12 animais submetidos à lesão do tendão e reconstituição; e Grupo Lesão com Biopolímero (GLB) – 12 animais submetidos à lesão do tendão e reconstituição com biopolímero.

- Obtenção do filme biopolímero da cana-de-açúcar: O biopolímero foi obtido partir do melão de cana-de-açúcar, na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e cedido pelo Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco.

- Procedimento cirúrgico: Os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina (2%) e cloridrato de cetamina (10%), 0,2ml por 100g de peso do animal [1:1] (MASSONE, 2008), via intramuscular. Após a tricotomia e a antisepsia, uma incisão longitudinal na pele da região posteroinferior do membro posterior direito foi realizada para visualização do tendão do Calcâneo. O tendão do músculo Plantar de todos os animais era retirado, pois poderia servir como uma “tala interna” (MURRELL *et al.*, 1992; LIANG *et al.*, 2012). Nos GLSB e GLB, foi realizada a tenotomia do tendão do Calcâneo no seu ponto médio com reconstituição imediata com fio absorvível CATGUT Cromado 5-0 (ETHICON). O tendão suturado do GLB foi envolvido pelo filme microperfurado de biopolímero da cana-de-açúcar (Ø=1mm, 0,6cm×1,8cm). Em seguida, a pele de todos os animais foi suturada da com fio CATGUT Nylon 4-0 (Somerville), e houve administração de analgésico e de antibióticos nos animais.

- Coleta e processamento do tendão: Após a cirurgia, os animais foram separados por período de coleta do tendão (3<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias após a tenotomia), totalizando 3 animais de cada grupo/período avaliado. Nos respectivos dias de coleta, os animais foram anestesiados (MASSONE, 2008), e o tecido tendíneo foi retirado em todo seu comprimento, dissecado, fixado em formaldeído 10% e encaminhado para processamento histológico de rotina. O tecido emblocado em parafina foi cortado longitudinalmente com espessura de 5µm, montado em lâmina silanizada.

- Imunohistoquímica: Após recuperação antigênica (tampão citrato 10mM, pH 6,0) e incubação com kit Easylink One (Immunobioscience Corp., Immunobioscience - EUA) para bloqueio das ligações inespecíficas, o material foi incubado *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology - Dallas, TX, EUA): proteína inflamatória de macrófagos-1α - MIP-1α (C-5) (sc-365691, 1:50); fator transformador de crescimento beta1 - TGF β1 (3C11) (sc-130348, 1:50); e vimentina (V9) (sc-6260, 1:100). Em seguida, foi incubado em cromógeno DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e contracorado com Hematoxilina. Os controles positivos utilizados foram: baço, para o MIP-1α (C-5); e estômago, para o TGF β1 (3C11). Os controles negativos foram estabelecidos através da substituição do anticorpo primário por anti-IgG humana inespecífica (DAKO) diluído em PBS-BSA 5% (p/v). Foram obtidas imagens com aumentos de 100x e 400x, através de um microscópio óptico (Leica DM500) acoplado a um microcomputador com o Software LAS EZ (Versão 2.0.0 ICC50).

- Aspectos éticos: O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (processo nº 23076.035304/2013-32).

### **Resultados:**

- MIP-1α: O GC a expressou apenas no 3<sup>o</sup> dia pós-cirurgia, e nos demais grupos sua expressão foi reduzindo até o final. No GLSB, foi observada redução da expressão da proteína durante o experimento, porém no 20<sup>o</sup> dia pós-cirurgia percebeu-se uma pequena área com uma coloração mais intensa. No GLB, também foi observada redução da expressão da proteína durante o experimento, porém no 30<sup>o</sup> dia pós-cirurgia percebeu-se uma coloração mais intensa em volta do biopolímero. Ao final do estudo, o GLB apresentou uma coloração mais intensa em comparação ao GC e GLSB (Quadro 1).

- TGF  $\beta$ 1: Não foi observada expressão da proteína no GC. Nos grupos com lesão tendínea, a proteína foi expressa inicialmente, porém foi reduzindo ao longo do estudo. Inicialmente a expressão foi mais intensa no GLSB em comparação aos GC e GLB, mas no 30º dia pós-cirúrgico a maior intensidade foi no GLB, principalmente em torno do biopolímero (Quadro 2).
- Vimentina: Diferentemente das demais proteínas, a vimentina foi altamente expressa no GLB em todos os momentos avaliados, principalmente em volta do biopolímero. Mas, tanto no GC quanto no GLSB, sua expressão foi diminuindo até o término do trabalho. Aos 30º dias pós-cirúrgicos, o GLB apresentou uma coloração mais intensa em comparação ao GC e GLSB (Quadro 3).

### **Discussão:**

Neste estudo, houve redução da expressão das proteínas em todos os grupos ao longo do período avaliado, ou seja, com a evolução do processo de cicatrização. Porém, o 30º dia pós-cirúrgico, o GLB apresentou maior expressão de todas as proteínas em comparação aos GC e GLSB.

O processo de cicatrização começa rapidamente após a lesão (CUI *et al.*, 2011). No início do processo de reparo do tendão (durante a fase inflamatória), a MIP-1 $\alpha$  [CCL3] e outras quimiocinas são expressas, principalmente por vasos sanguíneos e feixes nervosos que cercam o local lesionado, e atraem células inflamatórias (STÅLMAN; BRING; ACKERMANN, 2015). O TGF  $\beta$ 1 é produzido e liberado pelas células inflamatórias que invadem o tecido danificado (INOUE *et al.*, 2015). Ele desempenha um papel importante na cicatrização do tendão por promover uma maior migração celular e sintetiza fibras de colágeno (OTOSHI *et al.*, 2011) para a formação inicial de cicatrizes, estabelecendo assim a continuidade do tecido no local da ferida (CUI *et al.*, 2011). A fase de proliferativa do processo de cicatrização é caracterizada pela proliferação de fibroblastos (HOPE; SAXBY, 2007), e estes expressam uma série de marcadores, entre eles a vimentina (XU *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017).

Com a evolução da cicatrização, é natural ocorrer a redução da expressão das proteínas estudadas uma vez que vai havendo diminuição do processo inflamatório, e deposição de colágeno. Porém, apenas em volta do biopolímero da cana-de-açúcar, continuou havendo um processo inflamatório crônico com uma alta atividade celular.

Como o filme utilizado é um “agente exógeno” ao tecido estudado, ele parece estimular essa reação inflamatória crônica para sua absorção, gerando uma manutenção do recrutamento de fibroblastos e estímulo da síntese e deposição de colágeno.

### **Conclusão:**

O filme de biopolímero da cana-de-açúcar estimulou uma reação inflamatória crônica no tecido tendíneo em cicatrização, porém sem interferir em toda extensão do tendão.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro por meio da bolsa de pós-graduação.

Ao Laboratório de Polímeros (POLISA – Polímeros para a Saúde Ltda) e ao Núcleo de Cirurgia Experimental (Departamento de Cirurgia – UFPE) por fornecer o Biopolímero da Cana-de-Açúcar.

Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE) por ceder a estrutura para realização das imunohistoquímicas.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) por ceder a estrutura para realização de alguns procedimentos.

### **Referências:**

CASTRO, C. M. M. B.; AGUIAR, J. L. A.; MELO, F. A. D.; SILVA, W. T. F.; MARQUES, E.; SILVA, D. B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, n. 2, p. 73-4, 2004.

COELHO JUNIOR, E.R.; COSTA, L.O.; ALENCAR, A.V.; BARBOSA, A.P.; PINTO, F.C.; AGUIAR, J.L. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 194-8, 2015.

CUI, Q.; WANG, Z.; JIANG, D.; QU, L.; GUO, J.; LI, Z. HGF inhibits TGF- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation and ECM deposition via MMP-2 in Achilles tendon in rat. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 7, p. 1457-63, 2011.

DAHER, R. J.; CHACHINE, N. O.; RAZZANO, P.; PATWA, S. A.; SGAGLIONE, N. J.; GRANDE, D. A. Tendon repair augmented with a novel circulating stem cell population. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.4, n.3, p.214-9, 2011.

DE LUCENA, M.T.; DE MELO JÚNIOR, M.R.; DE MELO LIRA, M.M.; DE CASTRO, C.M.; CAVALCANTI, L.A.; DE MENEZES, M.A.; PINTO, F.C.; DE ANDRADE AGUIAR, J.L. Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.26, n. 2, p. 82, 2015.

FRAGOSO, A.S.; SILVA, M.B.; DE MELO, C.P.; AGUIAR, J.LI; RODRIGUES, C.G.; DE MEDEIROS, P.L.; BRANCO JUNIOR, J.F.; ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, M.D. Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 1, p. 229–37, 2014.

GLAZEBROOK, M.A.; WRIGHT JR, J.R.; LANGMAN, M.; STANISH, W.D.; LEE, J.M. Histological analysis of achilles tendons in an overuse rat model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 6, p. 840-6, 2008.

GUO, J.; CHAN, K.M.; ZHANG, J.F.; LI, G. Tendon-derived stem cells undergo spontaneous tenogenic differentiation. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 1, p. 1-7, 2016.

HOPE, H.; SAXBY, T. S. Tendon healing. **Foot and Ankle Clinics**, v. 12, n. 4, p. 553-67, 2007.

INOUE, M.; NAKAJIMA, M.; OI, Y.; HOJO, T.; ITOI, M.; KITAKOJI, H. The effect of electroacupuncture on tendon repair in a rat Achilles tendon rupture model. **Acupuncture in Medicine**, v. 33, n. 1, p. 58-64, 2015.

JAMES, R.; KESTURU, G.; BALIAN, G.; CHHABRA, A. B. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. **Journal of Hand Surgery**, v. 33A, n. 1, p. 102–12, 2008.

LIANG, J. I.; CHEN, M. Y.; HSIEH, T. H.; LIU, C. Y.; LAM, C. F.; CHEN, J. J.; YEH, M. L. Video-based gait analysis for functional evaluation of healing achilles tendon in rats. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 12, p. 2532-40, 2012.

LIMA, F.R.; LIMA, J. R. A.; HIRAKAWA, P.; MEDEIROS JÚNIOR, M. D.; LIMA, F. M. T.; AGUIAR, J. L. A. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.50, n.1, p.37-40, 2005.

LIMA, F.M.; PINTO, F.C.; ANDRADE-DA-COSTA, B.L.; SILVA, J.G.; CAMPOS JÚNIOR, O.; AGUIAR, J.L. Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural

defect repair of rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 3, p. 37, 2017.

MASSONE, F. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: \_\_\_\_\_. **Anestesiologia Veterinária: farmacologia e técnicas**. 5. ed. ampl. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap.10.

MURRELL, G. A. C.; LILLY, E. G.; DAVIES, H.; BEST, T. M.; GOLDNER, R. D.; SEABAR, A. V. The Achilles functional index. **Journal of Orthopaedic Research**, v.10, n. 3, p.398-404, 1992.

OTOSHI, K.; KIKUCHI, S.; OHI, G.; NUMAZAKI, H.; SEKIGUCHI, M.; KONNO, S. The process of tendon regeneration in an achilles tendon resection rat model as a model for hamstring regeneration after harvesting for anterior cruciate ligament reconstruction. **Arthroscopy**, v. 27, n. 2, p. 218-27, 2011.

PINTO, F.C.M.; DE-OLIVEIRA, A.C.A.X.; DE-CARVALHO, R.R.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; COELHO, D.R.; LIMA, S.V.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; AGUIAR, J.L.A. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 556-60, 2016.

STÅLMAN, A.; BRING, D.; ACKERMANN, P.W. Chemokine expression of CCL2, CCL3, CCL5 and CXCL10 during early inflammatory tendon healing precedes nerve regeneration: an immunohistochemical study in the rat. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 9, p. 2682-9, 2015.

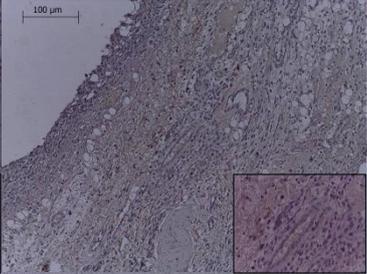
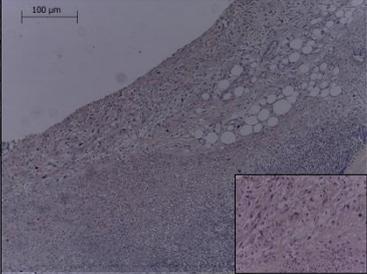
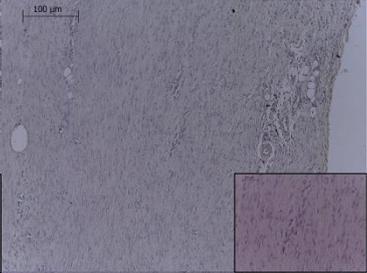
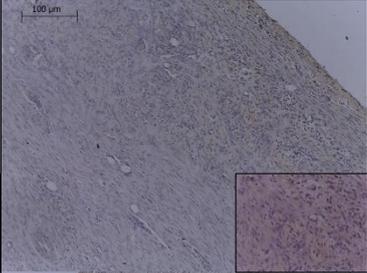
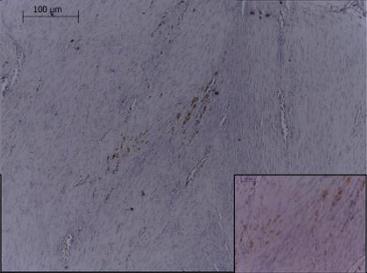
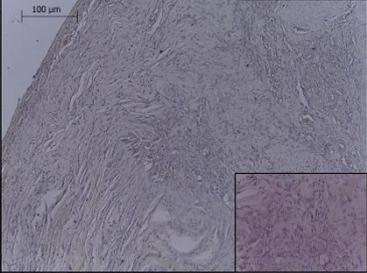
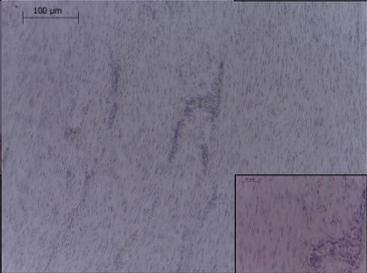
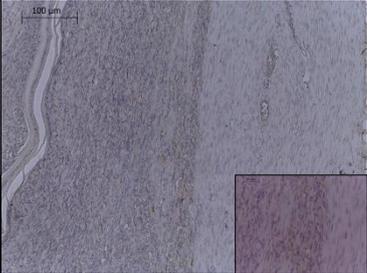
TOMIOSSO, T. C.; NAKAGAKI, W. R.; GOMES, L.; HYSLOP, S.; PIMENTEL, E. R. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. **Cell and Tissue Research**, v. 337, p. 235-242, 2009.

WANG, L.; TU, L.; ZHANG, J.; XU, K.; QIAN, W. Stellate Cell Activation and Imbalanced Expression of TGF- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ 3 in Acute Autoimmune Liver Lesions Induced by ConA in Mice. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 2540540, 2017.

WOO, S. L.; HILDEBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A.; PAPAGEORGIOU, C. D.; WANG, J. H. Tissue engineering of ligament and tendon healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, suppl. 367, p. S312-S323, 1999.

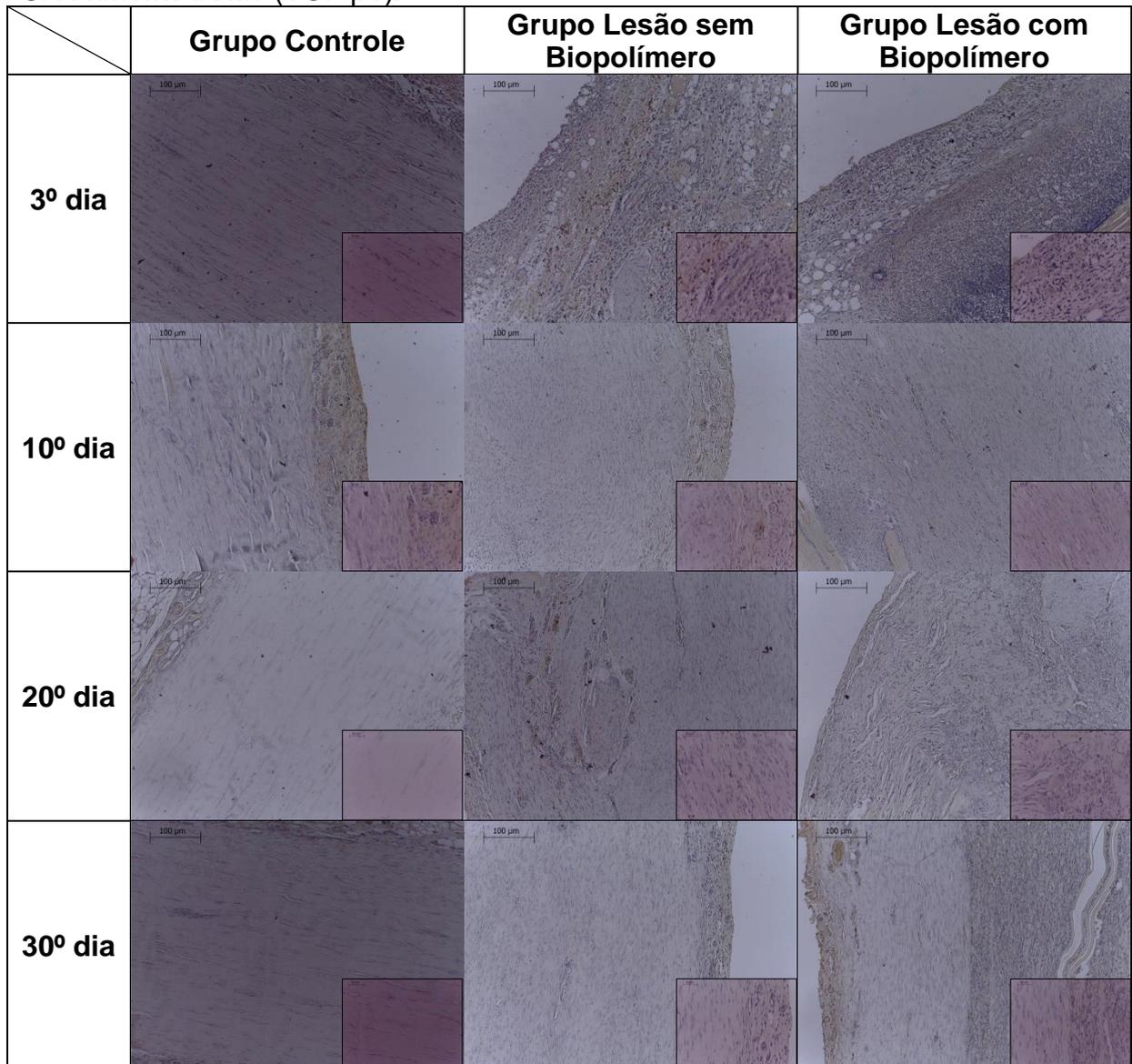
XU, W.; SUN, Y.; ZHANG, J.; XU, K.; PAN, L.; HE, L.; SONG, Y.; NJUNGE, L.; XU, Z.; CHIANG, M. Y.; SUNG, K. L.; CHUONG, C. M.; YANG, L. Perivascular-derived stem cells with neural crest characteristics are involved in tendon repair. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 7, p. 857-68, 2015.

**Quadro 1.** Imagens de Imunohistoquímica para Proteína Inflamatória do Macrófago-1alfa (MIP-1 $\alpha$ ).

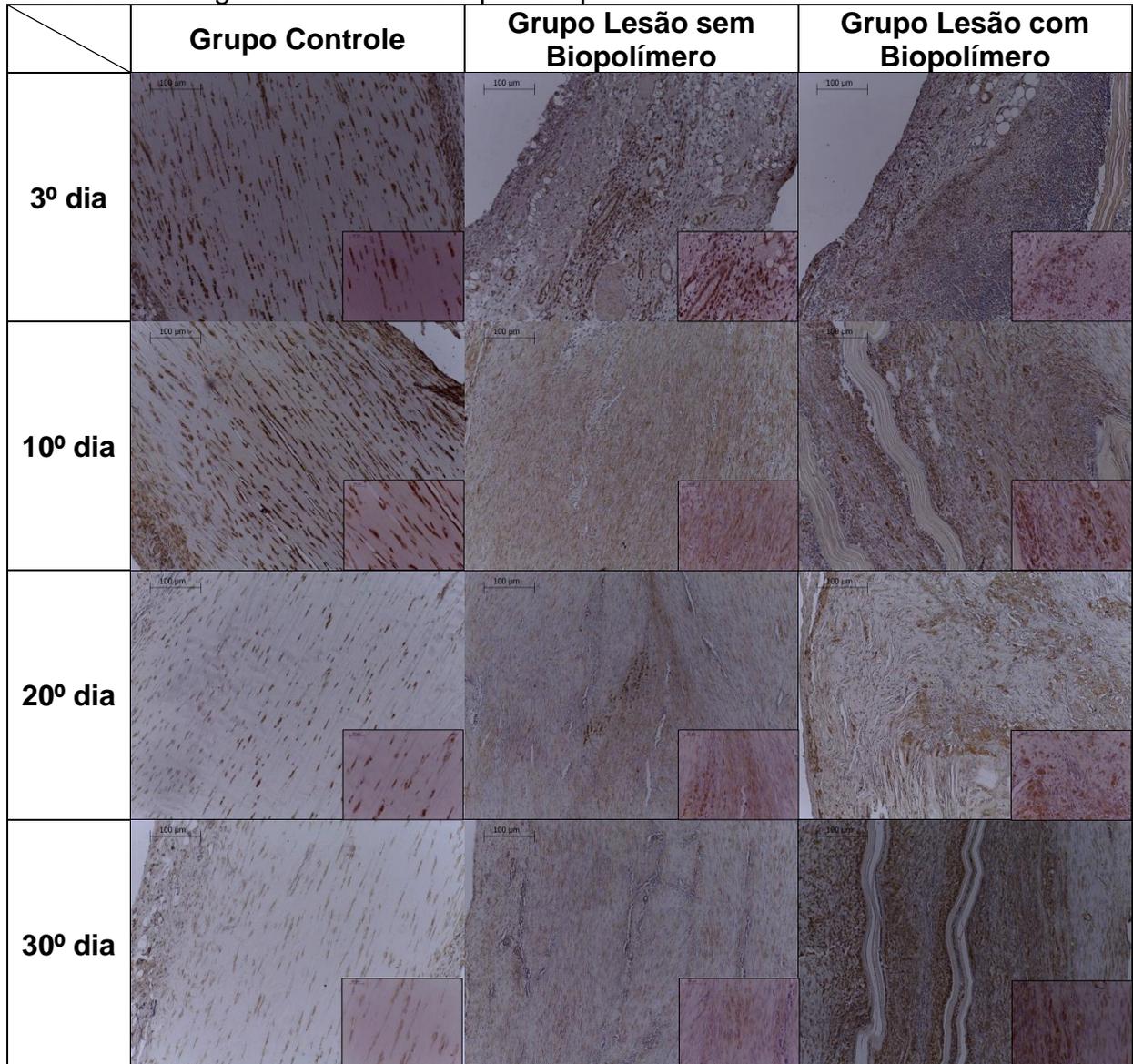
	Grupo Controle	Grupo Lesão sem Biopolímero	Grupo Lesão com Biopolímero
<b>3º dia</b>			
<b>10º dia</b>			
<b>20º dia</b>			
<b>30º dia</b>			

*3º dia= 3º dia após a tenotomia; 10º dia= 10º dia após a tenotomia; 20º dia= 20º dia após a tenotomia; 30º dia= 30º dia após a tenotomia. Aumento: 100x (imagens grandes) e 400x (imagens pequenas).*

**Quadro 2.** Imagens de Imunohistoquímica para Fator Transformador de Crescimento beta1 (TGF  $\beta$ 1).



*3º dia= 3º dia após a tenotomia; 10º dia= 10º dia após a tenotomia; 20º dia= 20º dia após a tenotomia; 30º dia= 30º dia após a tenotomia. Aumento: 100x (imagens grandes) e 400x (imagens pequenas).*

**Quadro 3.** Imagens de Imunohistoquímica para Vimentina.

*3º dia= 3º dia após a tenotomia; 10º dia= 10º dia após a tenotomia; 20º dia= 20º dia após a tenotomia; 30º dia= 30º dia após a tenotomia. Aumento: 100x (imagens grandes) e 400x (imagens pequenas).*

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O biopolímero da cana-de-açúcar:

- 1) Do ponto de vista funcional no protocolo adotado, parece não ter otimizado a recuperação estrutural do tendão do Calcâneo a ponto de reverter as alterações morfológicas musculares e de trazer benefícios na deambulação dos animais tenotomizados.
- 2) Comprovou ser realmente maleável e flexível, pois não interferiu na deambulação dos animais, e biocompatível a ponto de não sofrer rejeição pelo tecido em cicatrização.
- 3) Durante o período avaliado, sofreu alteração no posicionamento em relação ao tendão.
- 4) Estimulou uma reação inflamatória crônica no tecido tendíneo em cicatrização, sem interferir em toda extensão do tendão.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, T. C.; LIMA, R. P.; SOUZA, V. S. B.; CAMPOS JÚNIOR, O.; ALBUQUERQUE, A. V.; AGUIAR, J. L. A.; ANDRADE, E. S. S.; VASCONCELOS, B. C. E. The biopolymer sugarcane as filling material of critical defects in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 53-8, 2016.
- ALBUQUERQUE, P. C. V. C.; AGUIAR, J. L. A.; PONTES FILHO, N. T.; MELLO, R. J. V.; OLBERTZ, C. M. C. A.; ALBUQUERQUE, P. E. M. C.; PAZ, S. T.; SANTOS, A. H. S.; MAIA, C. S. A comparative study of the areas of osteochondral defects produced in femoral condyles of rabbits treated with sugar cane biopolymer gel. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 770-777, 2015.
- AMENÁBAR, J. M.; PADILHA, D. M. P.; HUGO, F. N.; FOSSATI, A. C. M. Uso da estereologia como método na pesquisa histológica. **Revista da Faculdade de Odontologia (Porto Alegre)**, v. 44, n. 1, p. 62-65, 2003.
- ARAÚJO, P. H. C.; DIAS, M. R. P.; AGUIAR, J. L. A.; SILVA, M. B.; SILVA, E. C.; MEDEIROS, P. L. Diferenciação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano em queratinócitos sobre biomembranas de cana-de-açúcar. **Revista Enfermagem Atual**, v. 68, n. 6, p. 18-21, 2014.
- BAJOTTO, G.; SHIMOMURA, Y. Determinants of disuse-induced skeletal muscle atrophy: exercise and nutrition countermeasures to prevent protein loss. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, p. 233-247, 2006.
- BOOTH, F. W. Effect of limb immobilization on skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 52, n. 5, p. 1113-1118, 1982.
- BOOTH, F. W. Physiologic and biochemical effects of immobilization on muscle. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 219, p. 15-20, 1987.
- BOOTH, F. W.; GOLLNICK, P. D. Effects of disuse on the structure and function of skeletal muscle. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 15, n. 5, p. 415-420, 1983.
- BRITO, V. C.; OLIVEIRA, B. D. R.; MORAES, S. R. A. Effects of immobilization on rat skeletal muscle tissue. **Journal of Morphological Science**, v. 28, n. 4, p. 217-221, 2011.
- BUNZEN, D. L.; LINS, N.; LEAL, M. C.; LIRA, M. M.; CALDAS NETO, S. S. Middle ear packing materials: comparison between absorbable hemostatic gelatine sponge and sugarcane biopolymer sponge in rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 80, n. 3, p. 237-244, 2014.
- CASTRO, C. M. M. B.; AGUIAR, J. L. A.; MELO, F. A. D.; SILVA, W. T. F.; MARQUES, E.; SILVA, D. B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar.

**Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, n. 2, p. 73-74, 2004.

COELHO, M.C.O.C.; CARRAZONI, P. G.; MONTEIRO, V. L. C.; MELO, F. A. D.; MOTA, R. A.; TENÓRIO FILHO, F. Bioplímero produzido a partir de cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, suppl.1, p.11-13, 2002.

COELHO JUNIOR, E.R.; COSTA, L.O.; ALENCAR, A.V.; BARBOSA, A.P.; PINTO, F.C.; AGUIAR, J.L. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 194-8, 2015.

CORDEIRO-BARBOSA, F. A.; AGUIAR, J. L. A.; LIRA, M. M. M.; PONTES FILHO, N. T.; BERNARDINO-ARAÚJO, S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 75, n. 4, p. 267-272, 2012.

CRIBB, M.; SCOTT, J. E. Tendon response to tensile stress: an ultrastructural investigation of collagen: proteoglycan interactions in stressed tendons. **Journal of Anatomy**, v.187, p.423-428, 1995.

CUI, Q.; WANG, Z.; JIANG, D.; QU, L.; GUO, J.; LI, Z. HGF inhibits TGF- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation and ECM deposition via MMP-2 in Achilles tendon in rat. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 7, p. 1457-63, 2011.

DAHER, R. J.; CHACHINE, N. O.; RAZZANO, P.; PATWA, S. A.; SGAGLIONE, N. J.; GRANDE, D. A. Tendon repair augmented with a novel circulating stem cell population. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.4, n.3, p.214-219, 2011.

DE LUCENA, M.T.; DE MELO JÚNIOR, M.R.; DE MELO LIRA, M.M.; DE CASTRO, C.M.; CAVALCANTI, L.A.; DE MENEZES, M.A.; PINTO, F.C.; DE ANDRADE AGUIAR, J.L. Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.26, n. 2, p. 82, 2015.

FRAGOSO, A.S.; SILVA, M.B.; DE MELO, C.P.; AGUIAR, J.LI; RODRIGUES, C.G.; DE MEDEIROS, P.L.; BRANCO JUNIOR, J.F.; ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, M.D. Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 1, p. 229–37, 2014.

FRASSON, N. F. V.; TACIRO, C.; PARIZOTTO, N. A. Análise nanoestrutural da ação do ultra-som terapêutico sobre o processo de regeneração do tendão de ratos. **Revista Fisioterapia e Pesquisa**, v.16, n.3, p.198-204, 2009.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado e histologia em cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 456p.

GEBAUER, M.; BEIL, F. T.; BECKMANN, J.; SÁRVÁRY, A. M.; UEBLACKER, P.; RUECKER, A. H.; HOLSTE, J.; MEENEN, N. M. Mechanical evaluation of different techniques for Achilles tendon repair. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v.127, p.795-799, 2007.

GUO, J.; CHAN, K. M.; ZHANG, J. F.; LI, G. Tendon-derived stem cells undergo spontaneous tenogenic differentiation. **Experimental Cell Research**, v. 341, n. 1, p. 1-7, 2016.

HOPE, H.; SAXBY, T. S. Tendon healing. **Foot and Ankle Clinics**, v. 12, n. 4, p. 553-567, 2007.

INOUE, M.; NAKAJIMA, M.; OI, Y.; HOJO, T.; ITOI, M.; KITAKOJI, H. The effect of electroacupuncture on tendon repair in a rat Achilles tendon rupture model. **Acupuncture in Medicine**, v. 33, n. 1, p. 58-64, 2015.

IWANAGA, T. C.; AGUIAR, J. L. A.; MARTINS-FILHO, E. D.; KREIMER, F.; SILVA-FILHO, F. L.; ALBUQUERQUE, A. V. Análise de parâmetros biomecânicos em anastomoses colônicas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 29, n. 2, p. 90-92, 2016.

JAMES, R.; KESTURU, G.; BALIAN, G.; CHHABRA, A. B. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. **Journal of Hand Surgery**, v. 33A, n. 1, p. 102-112, 2008.

JÓZSA, L.; KANNUS, P.; THÖRING, J.; REFFY, A.; JÄRVINEN, M.; KVIST, M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 72B, n. 2, p. 293-297, 1990.

KOH, I. H.; KANG, H. J.; JEON, S. W.; PARK, J. H.; CHOI, Y. R. Passive skeletal muscle excursion after tendon rupture correlates with increased collagen content in muscle. **Yonsei Medical Journal**, v. 55, n. 5, p. 1395-1399, 2014.

LEÃO, R. A.; ASSIS, R. C.; CALDAS NETO, S. S.; LIRA, M. M.; VASCONCELOS, S. J. Effect of sugarcane biopolymer gel injected in rabbit vocal fold. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 80, n. 3, p. 220-225, 2014.

LIANG, J. I.; CHEN, M. Y.; HSIEH, T. H.; LIU, C. Y.; LAM, C. F.; CHEN, J. J.; YEH, M. L. Video-based gait analysis for functional evaluation of healing achilles tendon in rats. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 12, p. 2532-2540, 2012.

LIMA, F. M.; PINTO, F. C.; ANDRADE-DA-COSTA, B. L.; SILVA, J. G.; CAMPOS JÚNIOR, O.; AGUIAR, J. L. Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural defect repair of rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 3, p. 37, 2017.

LIMA, F.R.; LIMA, J. R. A.; HIRAKAWA, P.; MEDEIROS JÚNIOR, M. D.; LIMA, F. M. T.; AGUIAR, J. L. A. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. **Anais da**

**Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.50, n.1, p.37-40, 2005.

LIMA, S. V. C.; RANGEL, A. E. O.; LIRA, M. M. M.; PINTO, F. C. M.; CAMPOS JÚNIOR, O.; SAMPAIO, F. J. B.; AGUIAR, J. L. A. The Biocompatibility of a Cellulose Exopolysaccharide Implant in the Rabbit Bladder When Compared With Dextranomer Microspheres Plus Hyaluronic Acid. **Urology**, v. 85, n. 6, p. 1520.e1-6, 2015.

MANN, C. J.; AYUSO, E.; ANGUELA, X. M.; BOSCH, F. Skeletal muscle metabolism in the pathology and treatment of type 1 diabetes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 8, p. 1002-1020, 2010.

MAQUIRRIAIN, M. D. Achilles tendon rupture: avoiding tendon lengthening during surgical repair and rehabilitation. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.84, p. 289-300, 2011.

MARQUES, S. R. B.; LINS, E. M.; AGUIAR, J. L. A.; ALBUQUERQUE, M. C. S.; ROSSITER, R. O.; MONTENEGRO, L. T.; VIEIRA, R. J. Um novo substituto vascular : arterioplastia femora em cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar – avaliação hemodinâmica e histopatológica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 4, p. 309-315, 2007.

MASSONE, F. Técnicas anestésicas em animais de laboratório. In: \_\_\_\_\_. **Anestesiologia Veterinária: farmacologia e técnicas**. 5. ed. ampl. e atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap.10.

MAYER, D. L. B.; ARAÚJO, J. G.; LEAL, M. C.; CALDAS NETO, S. S.; ATAÍDE, R. F. A.; MELLO, R. J. V. Sugarcane biopolymer membrane: experimental evaluation in the middle ear. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 1, p. 44-50, 2011.

MARTINS, A. G.; LIMA, S. V.; ARAÚJO, L. A.; VILAR, F. O.; CAVALCANTE, N. T. A wet dressing for hypospadias surgery. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 39, n. 3, p. 408-413, 2013.

MONTEIRO, V.L.C.; COELHO, M. C. O. C.; CARRAZZONI, P. G.; MOTA, R. A.; MELO, F. A. D.; CARVALHO, E. C.; ANDRADE, L. S. S. Cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas por segunda ou terceira intenção. **Medicina Veterinária (Recife)**, v.1, n.1, p.1-8, 2007.

MOSHIRI, A.; ORYAN, A. Tendon and Ligament Tissue Engineering, Healing and Regenerative Medicine. **Journal of Sports Medicine & Doping Studies**, v. 3, n. 2, p. 1-18, 2013.

MULLANEY, M. J.; MCHUGH, M. P.; TYLER, T. F.; NICHOLAS, S. J.; LEE, S. J. Weakness in end-range plantar flexion after Achilles tendon repair. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 7, p. 1120-5, 2006.

MURRELL, G. A. C.; JANG, D.; DENG, X. H.; HANNAFIN, J. A.; WARREN, R. F. Effects of exercise on Achilles tendon healing in a rat model. **Foot & Ankle International**, v.19, n. 9, p.598-603, 1998.

MURRELL, G. A. C.; LILLY, E. G.; DAVIES, H.; BEST, T. M.; GOLDNER, R. D.; SEABAR, A. V. The Achilles functional index. **Journal of Orthopaedic Research**, v.10, n. 3, p.398-404, 1992.

NG, G. Y. F.; FUNG, D. T. C. The Combined treatment effects of therapeutic laser and exercise on tendon repair. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 2, p. 137-141, 2008.

NHAMPOSSE, C. T. **Avaliação morfoquantitativa no músculo estriado esquelético de ratos wistar (*Rattus norvegicus*) dos efeitos da dieta utilizada na alimentação de crianças das zonas rurais de Moçambique**. 2012. 112f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OTOSHI, K.; KIKUCHI, S.; OHI, G.; NUMAZAKI, H.; SEKIGUCHI, M.; KONNO, S. The process of tendon regeneration in an achilles tendon resection rat model as a model for hamstring regeneration after harvesting for anterior cruciate ligament reconstruction. **Arthroscopy**, v. 27, n. 2, p. 218-27, 2011.

PALMES, D.; SPIEGEL, H. U.; SCHNEIDER, T. O.; LANGER, M.; STRATMANN, U.; BUDNY, T.; PROBST, A. Achilles tendon healing: long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model. **Journal of Orthopaedic Research**, v.20, n. 5, p.939-946, 2002.

PATERSON-BEEDLE, M.; KENNEDY, J. F.; MELO, F. A. D.; LLOYD, L. L.; MEDEIROS, V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 4, p. 375-383, 2000.

PINTO, F.C.M.; DE-OLIVEIRA, A.C.A.X.; DE-CARVALHO, R.R.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; COELHO, D.R.; LIMA, S.V.C.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; AGUIAR, J.L.A. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 556-60, 2016.

ROSENBAUM, A. J.; WICKER, J. F.; DINES, J. S.; BONASSER, L.; RAZZANO, P.; DINES, D. M.; GRANDE, D. A. Histologic stages of healing correlate with restoration of tensile strength in a model of experimental tendon repair. **HSS Journal**, v. 6, n. 2, p. 164-170, 2010.

SCOTT, W.; STEVENS, J.; BINDER-MACLEOD, S. A. Human skeletal muscle fiber type classifications. **Physical Therapy**, v. 81, n. 11, p. 1810-1816, 2001.

SEE, E. K.; NG, G. Y.; NG, C. O.; FUNG, D. T. Running exercises improve the strength of a partially ruptured Achilles tendon. **British Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 5, p. 597-600, 2004.

- SHARMA. P; MAFFULLI, N. Basic biology of tendon injury and healing. **Surgeon**, v. 3, n. 5, p. 309-316, 2005a.
- SHARMA. P; MAFFULLI, N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 87A, n. 1, p. 187-202, 2005b.
- SILVEIRA, A. B. F. N.; AGUIAR, J. L. A.; CAMPOS JÚNIOR, O.; DINIZ, G. T.; LIMA, S. V. C. Membrana de biopolímero da cana-de-açúcar: uma realidade como opção para correção da incontinência urinária. **Millenium**, n. 46, p. 81-95, 2014.
- SILVEIRA, R.K.; COELHO, A.R.B.; PINTO, F.C.M.; ALBUQUERQUE, A.V.; MELO FILHO, D.A.; AGUIAR, J.L.A. Bioprosthetic mesh of bacterial cellulose for treatment of abdominal muscle aponeurotic defect in rat model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 8, p. 129, 2016.
- SILVEIRA, F.C.; PINTO, F.C.; CALDAS NETO, S.S.; LEAL, M.C., CESÁRIO, J.; AGUIAR, J.L.A. Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.82, n. 2, p. 203-8, 2016.
- STÅLMAN, A.; BRING, D.; ACKERMANN, P.W. Chemokine expression of CCL2, CCL3, CCL5 and CXCL10 during early inflammatory tendon healing precedes nerve regeneration: an immunohistochemical study in the rat. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 9, p. 2682-9, 2015.
- SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 172p. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=WV1ngzp7e0UC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 21 jul, 2016.
- TAVARES, L. H. M.; VILAR, F. O.; AGUIAR, J. L. A.; PAZ, A. R.; MELO, F. A. D.; NEGROMONTE, G. R. P. Biopolymer sponge for high grade renal trauma: an experimental study in rabbits. **Open Journal of Urology**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2014.
- TEIXEIRA, F.M.F.; PEREIRA, M.F.; FERREIRA, N.L.G.; MIRANDA, G.M.; AGUIAR, J.L.A. Spongy film of cellulosic polysaccharide as a dressing for aphthous stomatitis treatment in rabbits. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 231-6, 2014.
- TOMIOSSO, T.C.; NAKAGAKI, W. R.; GOMES, L.; HYSLOP, S.; PIMENTEL, E. R. Organization of collagen bundles during tendon healing in rats treated with L-NAME. **Cell and Tissue Research**, v. 337, p. 235-242, 2009.
- TOSCANO, A. E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270-278, 2008.
- VILAR, F. O.; PINTO, F. C.; ALBUQUERQUE, A. V.; MARTINS, A. G.; ARAÚJO, L. A.; AGUIAR, J. L.; LIMA, S. V. A wet dressing for male genital surgery: A phase II clinical trial. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 42, n. 6, p. 1220-1227, 2016.

WANG, L.; TU, L.; ZHANG, J.; XU, K.; QIAN, W. Stellate Cell Activation and Imbalanced Expression of TGF- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ 3 in Acute Autoimmune Liver Lesions Induced by ConA in Mice. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 2540540, 2017.

WOO, S. L.; HILDEBRAND, K.; WATANABE, N.; FENWICK, J.A.; PAPAGEORGIU, C. D.; WANG, J. H. Tissue engineering of ligament and tendon healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, suppl. 367, p. S312-S323, 1999.

XU, W.; SUN, Y.; ZHANG, J.; XU, K.; PAN, L.; HE, L.; SONG, Y.; NJUNGE, L.; XU, Z.; CHIANG, M.Y.; SUNG, K.L.; CHUONG, C.M.; YANG, L. Perivascular-derived stem cells with neural crest characteristics are involved in tendon repair. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 7, p. 857-68, 2015.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 17 de dezembro de 2013.

Ofício nº 663/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª. Sílvia Regina Arruda de Moraes**  
Universidade Federal de Pernambuco  
Departamento de Anatomia  
Processo nº 23076.035304/2013-32

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Caracterização do tecido muscular esquelético após o uso do biopolímero extraído da cana-de-açúcar como coadjuvante do processo de reparação da lesão completa do tendão do calcâneo”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de criação do Departamento de Nutrição; Animal: ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Idade: 60 dias; Peso: 250 g; Sexo: machos; Nº Total de Animais: 120.

  
Profª Tania Rieger  
Presidente do CEUA/CCB-UFPE  
SIAPE 2306924

CCB: Integrar para desenvolver