

ESTUDO COMPARATIVO DE PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DA PORÇÃO CENTRAL DO TENDÃO CALCÂNEO CONGELADO E A FRESCO

COMPARATIVE STUDY ON BIOMECHANICAL PROPERTIES OF THE CENTRAL PORTION OF FROZEN AND FRESH CALCANEUS TENDON

RODRIGO BEZERRA DE MENEZES REIFF¹, ALBERTO TESCONI CROCI², RAUL BOLLIGER NETO³, CÉSAR AUGUSTO MARTINS PEREIRA⁴

RESUMO

Métodos de armazenamento de aloenxertos podem alterar certas características mecânicas dos tecidos. Com o objetivo de analisar a influência do fenômeno de congelamento e do tempo de armazenamento sobre as propriedades biomecânicas de tendões, os autores estudaram 40 tendões calcâneos obtidos de 20 cadáveres humanos com idade média de 41,95 anos, variando de 31 a 54 anos, sendo 17 do sexo masculino e três do sexo feminino. De cada cadáver foram retirados dois tendões, sendo que um foi testado a fresco e o contralateral congelado a -85°C em freezer elétrico, durante um período de seis ou 12 semanas. Os corpos de prova foram submetidos a ensaios de tração em uma máquina de ensaios mecânicos Kratos K5002, fornecendo gráficos força-deformação. Foram analisados os parâmetros de força no limite de resistência máxima, rigidez, tensão no limite de resistência máxima, deformação relativa e módulo de elasticidade. Os resultados foram comparados e analisados estatisticamente pelo método de "t-student", com índice de significância de 0,05, sendo que não houve diferença significativa nos valores obtidos entre os grupos. Concluímos que o congelamento a -85°C não altera as propriedades biomecânicas de tendões, a despeito do tempo de armazenamento.

Descritores: Congelamento; Transplante homólogo; Tendão do calcâneo; Biomecânica.

Citação: Reiff RBM, Croci AT, Bolliger Neto R, Pereira CAM. Estudo comparativo de propriedades biomecânicas da porção central do tendão calcâneo congelado e a fresco. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2007; 15(1):06-08. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Com o crescente interesse no desenvolvimento de técnicas menos invasivas para as cirurgias de reconstruções tendíneas e ligamentares, a pesquisa relativa à utilização de aloenxertos tem aumentado. As vantagens relacionadas ao seu uso incluem a diminuição do tempo operatório, a menor morbidade ao sítio doador, e a disponibilidade de uma alternativa biológica após falha de reconstruções envolvendo autoenxertos. Desvantagens teóricas incluem o custo técnico elevado, as possibilidades de transmissão de doenças, do surgimento de uma reação imune tipo corpo estranho e do enfraquecimento do enxerto pelo processo de preparação⁽¹⁻³⁾. O estudo das possíveis alterações das propriedades biomecânicas de tecidos moles submetidos a congelamento não é novo. Alguns autores conseguem reproduzir com bons resultados, através de ensaios experimentais e avaliações cirúrgicas, transplantes de tendões alogênicos para a reconstrução de lesões ligamentares ou tendíneas, crônicas ou agudas⁽⁴⁻⁷⁾.

Um importante aspecto relacionado ao uso de aloenxertos diz respeito a sua forma de armazenamento. Para permiti-lo, várias técnicas de processamento de tecidos foram descritas, incluindo o congelamento, a liofilização e a criopreservação⁽⁸⁾. Todas estas técnicas têm significativas desvantagens, tanto biológicas, como biomecânicas. Os diferentes

SUMMARY

Allograft storage methods can change some mechanical characteristics of tissues. With the objective of analyzing the influence of freezing phenomenon and storage time on tendons' biomechanical properties, the authors studied 40 calcaneus tendons obtained from 20 human cadavers, with an average age of 41.95 years, ranging from 31 to 54 years old, being 17 males and three females. From each cadaver, two tendons were removed, one tested in its fresh state and the contralateral one frozen at -85°C in an electric freezer, during a period of six or 12 weeks. The bodies of evidence were submitted to traction assays in a Kratos K5002 mechanical assay machine, delivering strength-deformation graphics. Strength at maximum resistance limit, stiffness, tension at maximum resistance limit, relative deformation, and elasticity module parameters were assessed. The results were compared and statistically analyzed by "Student's t-method", with a significance level of 0.05, with no significant difference on values achieved between groups. We concluded that freezing at -85°C does not cause changes to tendons' biomechanical properties, despite of storage time.

Keywords: Freezing; Transplantation, homologous; Achilles tendon; Biomechanics.

Citation: Reiff RBM, Croci AT, Bolliger Neto R, Pereira CAM. Comparative study on biomechanical properties of the central portion of frozen and fresh calcaneus tendon. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2007; 15(1): 06-08. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

métodos empregados para o armazenamento dos enxertos podem levar a alterações de suas características biomecânicas⁽⁹⁾.

O Banco de Tecidos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo, armazena os tecidos através do congelamento a -85°C e não utiliza método adicional de esterilização, uma vez que todo o processo que inclui a captação, processamento e embalagem dos tecidos é realizado sob condições assépticas.

Alguns autores estudam os efeitos do congelamento sobre as propriedades de tendões e ligamentos, através de modelos experimentais em animais⁽¹⁰⁾. Entretanto, não há descrição na literatura a respeito do comportamento de tendões ou ligamentos humanos submetidos a congelamento a -85°C , previamente à sua implantação como aloenxertos.

O objetivo deste trabalho foi comparar certas propriedades biomecânicas (força no limite de resistência máxima, rigidez, tensão no limite de resistência máxima, deformação relativa e módulo de elasticidade) de tendões calcâneos de cadáveres humanos submetidos a congelamento a -85°C com as de tendões calcâneos a fresco, e analisar a influência do tempo de armazenamento sobre tais propriedades.

Trabalho realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP.

Endereço para correspondência: Rua Episcopal, no 2262 Apto 81 CEP 13560-580 São Carlos – S.P. - E-mail: rodrigoreiff@hotmail.com

1. Mestre em Ortopedia e Traumatologia pelo Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2. Professor Associado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3. Médico ortopedista, Assistente Doutor e vice-responsável pelo Laboratório de Biomecânica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP.

4. Técnico em saúde, especialista em Biomecânica e coordenador da área de mecânica do Laboratório de Biomecânica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP.

Trabalho recebido em 25/10/05 aprovado em 23/11/06

MATERIAL E MÉTODO

O material deste trabalho foi constituído por 40 tendões calcâneos, obtidos de 20 cadáveres humanos com registro junto ao Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-USP). Os dados referentes à idade, sexo e data de óbito foram obtidos através das fichas do SVOC-USP. A idade variou de 31 a 54 anos, com média de 41,95 anos. Dos 20 cadáveres, 17 eram do sexo masculino e três do sexo feminino.

Fatores de inclusão

Foram utilizados cadáveres na faixa etária dos 17 aos 55 anos, sem patologias prévias, segundo os dados do SVOC-USP, e sem sinais de alterações locais como feridas ou cicatrizes. De cada cadáver foram obtidos dois tendões, sendo que um foi utilizado como controle (a fresco) e o contralateral foi congelado.

Preparo dos tendões

Os tendões foram divididos em quatro grupos de 10 unidades: GC6: o grupo controle de tendões "a fresco" cujos pares foram estudados após seis semanas de congelamento.

GC12: o grupo controle de tendões "a fresco" cujos pares foram estudados após 12 semanas de congelamento.

GE6: o grupo estudo de tendões congelados durante seis semanas.

GE12: o grupo estudo de tendões congelados durante 12 semanas.

Os tendões do grupo controle (a fresco) foram mantidos, após sua retirada, em embalagens seladas de polietileno em refrigerador tipo residencial a + 4° C, durante um período de 24 horas até o momento dos ensaios.

Os tendões do grupo estudo foram acondicionados em três embalagens seladas de polietileno de 0,5 µm e mantidos sob congelamento a - 85° C em freezer horizontal elétrico marca SANYO®, com "backup" de CO₂, controle de manutenção de temperatura por monitorização em gráfico e válvula de alarme interior conectado a sistema de alarme externo para temperaturas inferiores a - 60° C. Os tendões do grupo GE6 foram mantidos congelados a - 85° C durante seis semanas e os do grupo GE12, à mesma temperatura, durante 12 semanas.

Preparo do grupo controle para o ensaio

Para o ensaio do grupo controle, os tendões foram retirados do refrigerador tipo residencial a + 4° C e envolvidos em duas peças de gaze umedecidas com solução salina fisiológica a 0,9%, até o momento do preparo dos corpos de prova.

Preparo do grupo estudo para o ensaio

Na véspera ao dia do ensaio, os tendões congelados foram transferidos do freezer a - 85° C para o refrigerador tipo residencial a + 4° C, onde foram mantidos durante 24 horas. Foram, a seguir, retirados e envolvidos em duas peças de gaze umedecidas com solução salina fisiológica a 0,9%, até o momento do preparo dos corpos de prova.

Preparo dos corpos de prova

Os tendões foram colocados de forma estendida sobre uma superfície de madeira e sua extremidade distal foi estabilizada com o auxílio de uma fixação metálica. Com a utilização de um bisturi de cabo duplo, com distância entre as lâminas de um cm, foi retirada uma fita central do tendão em seu sentido longitudinal.

Com o auxílio de um bisturi simples, a fita de tendão foi seccionada transversalmente em relação ao seu eixo longitudinal em suas extremidades, de modo que o comprimento final do corpo de prova foi de 16 cm.

Ensaio mecânicos

Todas as peças anatômicas foram submetidas a ensaios de tração em máquina universal de ensaios mecânicos marca KRATOS® K5002, dotada de célula de carga de 5000 Kg. Cada extremidade do corpo de prova foi fixada a uma garra denteada sinusoidal de arestas arredondadas própria para fixação tendínea, composta de duas placas conectadas por dois parafusos de compressão. Após um teste preliminar, foi determinado o valor de cinco Nm para o momento de torção a ser aplicado nos parafusos - necessário para uma fixação adequada do enxerto - por meio de um torquímetro digital, marca METALAC®, com capacidade para 100 Nm. A "garra distal" englobou os cinco cm

distais do corpo de prova. A "garra proximal" englobou os cinco cm proximais do corpo de prova. A distância entre as garras, antes de se realizar a compressão das placas, foi de seis cm. Após a compressão, esta distância foi novamente medida e definida como L₀. Os ensaios foram realizados com velocidade de 20 mm/min. A máquina operou monitorada por um microcomputador IBM PC® compatível, que adquiriu e tratou os dados, com a construção de gráficos força-deformação absoluta e tensão-deformação relativa.

Parâmetros analisados

Os parâmetros analisados nos ensaios de tração para os grupos controle e estudo foram: (1) Força no limite de resistência máxima (FLRM) em Newtons; (2) Rigidez (K) em Newtons por milímetros (N/mm); (3) Tensão no limite de resistência máxima (TLRM) em Mega-Pascal (MPa); (4) Deformação relativa (ε%) em percentual; e (5) Módulo de elasticidade (E) em Mega-Pascal (MPa).

A determinação da área transversa dos corpos de prova foi necessária para a confecção dos gráficos de tensão no limite de resistência máxima (TLRM) e módulo de elasticidade (E). Para tanto, os corpos de prova foram posicionados entre uma mesa de apoio transparente e um bloco de acrílico, sobre o qual foi aplicada uma força constante. A seguir, este dispositivo foi posicionado em um projetor de perfil, onde foi possível obter, por meio de raios refratados e refletivos projetados em tela, os valores da largura e altura dos corpos de prova. A partir dos valores de largura e altura, a área transversa foi calculada.

Foram realizadas análises comparativas dos parâmetros acima descritos entre os grupos GC12 e GE12, entre os grupos GC6 e GE6 e entre os grupos GE12 e GE6.

Tratamento estatístico

Realizamos a estatística descritiva - média (MED), desvio padrão (DP), erro padrão da média (EPM), máximo (MAX) e mínimo (MIN) - dos parâmetros quantitativos. Na análise comparativa dos grupos pareados paramétricos foi utilizado o teste de "t-student" pareado. Para a análise dos grupos não pareados paramétricos utilizamos o teste de "t-student" não pareado. O nível de significância adotado foi de 0,05.

RESULTADOS

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na análise comparativa dos parâmetros quantitativos entre o grupo estudo de tendões congelados durante 12 semanas (GE12) e o grupo controle (GC12) (Tabela 1); entre o grupo estudo de tendões congelados durante seis semanas (GE6) e o grupo controle (GC6) (Tabela 2); e entre o grupo estudo de tendões congelados durante 12 semanas (GE12) e o grupo de tendões congelados durante seis semanas (GE6) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

O resultado de uma cirurgia para reconstrução ligamentar ou tendínea está, entre outros fatores, diretamente relacionado ao tipo de enxerto utilizado. Enquanto ligamentos artificiais não alcançaram aceitação entre os ortopedistas, o uso de tecido autógeno - certamente o mais apropriado - não está isento de complicações à área doadora. Neste sentido, o aloenxerto torna-se uma opção atrativa. Pode estar prontamente disponível em vários tipos de tecidos (tendão calcâneo, ligamento patelar, fáscia lata, tendões dos músculos grácil e semiten-

Comparação entre os grupos GE12 e GC12			
Parâmetros	Teste "t - student" pareado		Significância
FLRM	p = 0,608	t = 0,532	n.s.
K	p = 0,616	t = 0,519	n.s.
A	p = 0,397	t = 0,889	n.s.
TLRM	p = 0,225	t = 1,301	n.s.
ε%	p = 0,740	t = 0,343	n.s.
E	p = 0,167	t = 0,502	n.s.

Onde: FLRM = Força no limite de resistência máxima; K = Rigidez; A = Área média; TLRM = Tensão no limite de resistência máxima; ε% = Deformação relativa; E = módulo de elasticidade; p = coeficiente de significância; n.s. = não significativo. Fonte: IOT-HCFMUSP

Tabela 1 - Comparação dos parâmetros quantitativos estudados entre os grupos GE12 e GC12. Análise estatística pelo teste de t pareado (α = 0,05).

Comparação entre os grupos GE6 e GC6			
Parâmetros	Teste "t - student" pareado		Significância
FLRM	p = 0,149	t = 1,570	n.s.
K	p = 0,059	t = 2,157	n.s.
A	p = 0,248	t = 1,235	n.s.
TLRM	p = 0,9996	t = 0,0005	n.s.
ε%	p = 0,900	t = 0,106	n.s.
E	p = 0,918	t = 0,129	n.s.

Onde: FLRM = Força no limite de resistência máxima; K = Rigidez; A = Área média; TLRM = Tensão no limite de resistência máxima; ε% = Deformação relativa; E = módulo de elasticidade; p = coeficiente de significância; n.s. = não significativo. Fonte: IOT-HCFMUSP

Tabela 2 – Comparação dos parâmetros quantitativos estudados entre os grupos GE6 e GC6. Análise estatística pelo teste de "t - student" pareado (α = 0,05).

Comparação entre os grupos GE12 e GE6			
Parâmetros	Teste "t - student" não pareado		Significância
FLRM	p = 0,379	t = 0,901	n.s.
K	p = 0,205	t = 1,169	n.s.
A	p = 0,243	t = 1,207	n.s.
TLRM	p = 0,569	t = 0,581	n.s.
ε%	p = 0,932	t = 0,087	n.s.
E	p = 0,387	t = 0,887	n.s.

Onde: FLRM = Força no limite de resistência máxima; K = Rigidez; A = Área média; TLRM = Tensão no limite de resistência máxima; ε% = Deformação relativa; E = módulo de elasticidade; p = coeficiente de significância; n.s. = não significativo. Fonte: IOT-HCFMUSP

Tabela 3 – comparação dos parâmetros quantitativos estudados entre os grupos GE12 e GE6. Análise estatística pelo teste de "t - student" não pareado (α = 0,05).

díneo), permite estocagem e, por ser preparado antes do início da cirurgia, o tempo cirúrgico e o tempo de isquemia do membro pelo uso do torniquete – quando utilizado – são reduzidos. Por outro lado, o custo técnico elevado, o risco de transmissão de doenças e a possibilidade do enfraquecimento do enxerto pelo processo de preparação constituem a maior desvantagem ao uso dos aloenxertos.

Segundo Zimmerman et al.⁽⁶⁾, distúrbios estruturais das fibras colágenas levam a alterações das propriedades biomecânicas dos enxertos, podendo ainda alterar sua capacidade de remodelação, revascularização e reintegração. Estes distúrbios ainda podem ser causados pela atividade das enzimas presentes nos tecidos. Em temperaturas acima de -40°C, algumas enzimas ainda estão ativas, inviabilizando o armazenamento por tempo prolongado. Por outro lado, abaixo de -80°C a destruição enzimática é mínima, sendo que ao menos a enzima colagenase está inativa⁽¹¹⁾.

A opção de se realizar um estudo envolvendo tecidos de cadáveres humanos teve como objetivo a aproximação do modelo experimental à prática clínica. Procuramos, desta maneira, reproduzir a metodologia empregada na utilização de aloenxertos humanos, incluindo o tipo de tecido, os cuidados de manipulação e a dimensão dos corpos de prova. Utilizamos o tendão calcâneo para este trabalho devido o grande número de autores que relataram o seu uso para diferentes tipos de reconstruções tendíneas e ligamentares⁽⁴⁻⁷⁾.

Uma vez que a principal função de tendões e ligamentos é transmitir carga tênsil, os estudos experimentais das propriedades biomecânicas destes tecidos são, geralmente, realizados através de ensaios de tra-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nikolaou PK, Seaber AV, Glisson RR, Ribbeck BM, Bassett FH 3rd. Anterior cruciate allograft transplantation: Long term function, histology, revascularization and operative technique. *Am J Sports Med.* 1986; 14:348-60.
- Shino K, Inoue M, Horibe S, Hamada M, Ono K. Reconstruction of the anterior cruciate ligament using allogenic tendon. Long-term follow-up. *Am J Sports Med.* 1990; 18:457-65.
- Jackson DW, Grood ES, Goldstein JD, Rosen MA, Kurzweil PR, Cummings JF, et al. A comparison of patellar tendon autograft and allograft used for anterior cruciate ligament reconstruction in the goat model. *Am J Sports Med.* 1993; 21:176-85.
- Levitt RL, Malinin T, Posada A, Michalov A et al. Reconstruction of anterior cruciate ligaments with bone-patellar tendon-bone and achilles allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1994; 303:67-78.
- Falconiero RP, Pallis MP. Chronic rupture of a patellar tendon: a technique for reconstruction with Achilles allograft. *Arthroscopy.* 1996; 12:623-6.
- McNally PD, Marcelli EA. Achilles allograft reconstruction of a cronic patellar tendon rupture. *Arthroscopy.* 1998; 14:340-4.
- Lavigne MJ, Sanchez AA, Coutts RD. Recurrent dislocation after total hip arthroplasty: treatment with an Achilles tendon allograft. *J Arthroplasty.* 2001; 16:13-8.
- Zimmerman MC, Contiliano JH, Parsons JR, Prewett A, Billotti J. The biomechanics and

histopathology of chemically processed patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament replacement. *Am J Sports Med.* 1994; 22:378-86.

9. Jackson DW, Grood ES, Wilcox P, Butler DL, Simon TM, Holden JP. et al. The effects of processing techniques on the mechanical properties of bone-anterior cruciate ligament-bone allografts. An experimental study in goats. *Am J Sports Med.* 1988; 16:101-5.

10. Woo SL, Orlando CA, Camp JF, Akeson WH. Effects of postmortem storage by freezing on ligament tensile behavior. *J Biomech.* 1986; 5:399-404.

11. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE. Bone bank procedures. *Clin Orthop Relat Res.* 1983; 174:15-21.

12. Barad S, Cabaud HE, Rodrigo JJ. Effects of storage at -80 degrees C as compared to 4 degrees C on the strength of rhesus monkey anterior cruciate ligaments. *Trans Orthop Res Soc.* 1982; 7:378.

13. Bechtold JE, Eastlund DT, Butts MK, Lagerborg DF, Kyle RF. The effects of freeze-dried and ethylene oxide sterilization on the mechanical properties of human patellar tendon. *Am J Sports Med.* 1994; 22:562-6.

14. Cooper DE, Deng XH, Burstein AL, Warren RF. The strength of the central third patellar tendon graft: a biomechanical study. *Am J Sports Med.* 1993; 21:818-23.

ção. O objetivo destes testes é adquirir gráficos de força-deformação, dos quais as propriedades mecânicas são determinadas. O ensaio de tração consiste em submeter um material a um esforço que tende a esticá-lo ou alongá-lo. Geralmente, o ensaio é realizado num corpo de prova de formas e dimensões padronizadas, para que os resultados obtidos possam ser comparados, ou, se necessário, reproduzidos. Mesmo assim, os testes de tração podem estar sujeitos à interferência de diversos fatores que levam a artefatos experimentais, com conseqüente perda da confiabilidade dos resultados. Na revisão de suas complicações, Nikolaou et al.⁽¹⁾ notam que, tanto a padronização das dimensões do enxerto (particularmente a medida da área transversa), como a sua estável fixação nas garras, são fatores importantes no sucesso final da operação.

Nossos resultados estão de acordo com os descritos por outros autores. Barad et al.⁽¹²⁾ não encontram diferenças significativas entre as propriedades mecânicas de LCA de joelhos de macacos Rhesus congelados a -80°C e a fresco, após um período de três a cinco semanas. Bechtold et al.⁽¹³⁾ comparam os efeitos dos processos de congelamento a -70°C e liofilização sobre as características mecânicas do tendão patelar humano, sugerindo que a resistência dos tendões congelados foi superior a dos tendões liofilizados. Da mesma forma, o armazenamento de tecidos a -20°C mostra-se adequado, segundo Woo et al.⁽¹⁰⁾, para a manutenção das características mecânicas de ligamentos de coelhos.

No entanto, o mesmo autor recomenda que tecidos submetidos a congelamento utilizando temperaturas acima de -40°C, não devam ser armazenados por um longo período de tempo, devido a possibilidade de ação enzimática e transtorno celular. Entendemos que a dificuldade em comparar os resultados obtidos com os descritos na literatura deve-se à característica heterogênea dos ensaios. No único trabalho onde foram estudados ligamentos patelares de cadáveres humanos⁽¹⁴⁾, os autores utilizam o congelamento a -20°C, sem realizar a padronização dos corpos de prova. No estudo envolvendo o congelamento a -80°C, foram utilizadas unidades músculo-tendíneas de modelos animais com características distintas do tendão calcâneo humano⁽¹²⁾.

A relevância científica deste trabalho baseia-se na criação do Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Havia a necessidade de comprovação dos resultados descritos na literatura sobre supostas alterações biomecânicas de tendões ou ligamentos congelados a -85°C, já que a maioria das referências baseava-se em resultados obtidos de poucos estudos em modelos animais^(1,12).

Consideramos o método de congelamento a -85°C adequado para o armazenamento de tecidos moles destinados a transplantes, já que suas propriedades mecânicas não foram alteradas, a despeito do tempo de armazenamento. Porém, outros estudos deverão ser realizados, com o objetivo de avaliar a influência deste método sobre o processo de incorporação biológica dos enxertos, no que diz respeito aos fenômenos de repovoamento celular, revascularização e remodelação do colágeno; e sobre o mecanismo de incorporação do enxerto no túnel ósseo, potencialmente prejudicado pelo alargamento decorrente da resposta imune.

CONCLUSÕES

Concluímos que o processo de congelamento a -85°C não altera as propriedades biomecânicas dos tendões, a despeito do tempo de congelamento.