

# AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E ULTRA-ESTRUTURAL DE TENDÕES DE BOVINOS PRESERVADOS EM DIFERENTES MEIOS

(HISTOLOGY AND ULTRASTRUCTURAL AVALIATION FROM THE TENDONS ON CATTLE PRESERVED IN DIFFERENTS PRODUCTS)

R. M. NOLASCO<sup>1</sup>, M. E. BELETTI<sup>2</sup>, D. EURIDES<sup>3</sup>, F. O. C. E SILVA<sup>3</sup>, H. E. COELHO<sup>3</sup>,  
C. R. DALECK<sup>4</sup>, L. A. F. DA SILVA<sup>5</sup>

## RESUMO

Para avaliar a influência de cinco diferentes meios de preservação de tecidos biológicos, 30 fragmentos do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de bovinos foram divididos em seis grupos de igual número. Os meios utilizados foram solução de polivinil-pirolidona a 0,5% (I), solução supersaturada de açúcar a 300% (II), glicerina a 98% (III), solução de glutaraldeído a 0,5% (IV) e congelamento a -16°C (V). Os fragmentos dos grupos I, II, III, IV e V foram preservados por 70 dias e posteriormente reidratados 24 horas em solução fisiológica a 0,9%. O grupo VI foi processado e analisado para controle sem nenhum tipo de tratamento. A análise histológica não revelou alterações degenerativas, mas detectou diferenças de grau de desidratação nas diferentes preservações. A ultra-estrutural possibilitou a avaliação da integridade dos fibrócitos e a agregação das fibrilas. A preservação pela solução de glutaraldeído a 0,5% com reidratação em solução fisiológica a 0,9% mostrou-se mais adequada à conservação das características histológicas e ultra-estruturais dos fragmentos dos tendões analisados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tendões. Tecidos. Preservadores. Bovino. Histologia.

## ABSTRACT

In order to evaluate the influence of five different products preservation of the biological tissues, 30 fragments from the tendon of the superficial flexor muscle toes on bovines, were divided into six groups with the same number. The product used were solution of polivinil-pirolidone 0,5% (I), 300% supersaturated sugar solution (II), glycerin 98% (III), solution of glutaraldehyde 0,5% (IV) and frozen at less than 16°C. The group VI was processed for control with no kind of treatment. The groups I, II, III, IV and V were preserved for 70 days and were further rehydrated for 24 hours in physiological solution 0,9%. The histology analysis did not show any degenerative alterations, but it detected different degrees of dehydration due to the preservations. The ultrastructural analysis allowed an evaluation of the collection collagen fibril and the integrity of the fibrocytes. The preservation by the solution of glutaraldehyde 0,5% and rehydration in physiological solution 0,9% showed more appropriated to conservation of the histological features and ultrastructural of the tendons analysis.

**KEY-WORDS:** Tendons. Tissues. Preservers. Bovine.

---

<sup>1</sup> Médico Veterinário Autônomo, Msc.

<sup>2</sup> Professor Adjunto Doutor, Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Uberlândia/UFU.

<sup>3</sup> Professor Titular, Faculdade de Medicina Veterinária/UFU, Av. Pará, 1720. Bloco D. Campus Umuarama. 38400-902. Uberlândia, MG. duvaldo@ufu.br

<sup>4</sup> Professor Adjunto Doutor, Dep. de Ciência e Cirurgia Veterinária da Unesp Jaboticabal

<sup>5</sup> Professor Adjunto Doutor, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, GO

## INTRODUÇÃO

A constante preocupação na tentativa de minimizar os danos decorrentes das lesões tendíneas tem levado a inúmeras pesquisas, procurando-se o material adequado à cicatrização dos tendões. Os traumatismos com ruptura dos tendões flexores figuram como uma das mais freqüentes injúrias tendíneas observadas em grandes animais (COSTANETO et al., 1999).

Os enxertos livres não devem ser carcinogênicos ou antigênicos e sim de fácil incorporação pelo receptor, mantendo sua função por toda a vida. O tendão é um tecido relativamente hipocelular contendo principalmente colágeno maduro que não é antigênico (VÁMHIDY et al., 1990).

Diversos tecidos biológicos e materiais sintéticos foram utilizados em cirurgias reparadoras para substituir tecidos lesados. Estes podem ser mantidos em diferentes meios de preservação. Tais meios devem impedir a decomposição, manter o máximo da integridade celular e atuar por um período de tempo prolongado (ALVARENGA, 1992).

Os tecidos preservados devem ser reidratados antes da realização dos enxertos. O tempo de reidratação pode variar de acordo com o formato, espessura e tamanho, podendo levar até 24 horas. Aqueles de formato arredondado levam mais tempo (SMITH et al., 1996).

As membranas biológicas tem sido utilizadas no reparo de diversas alterações anatômicas e patológicas em diferentes espécies de animais domésticos (DALECK et al., 1988).

Para que percam a capacidade de estimular reação imunológica, os tendões devem ser preservados por um tempo mínimo de 30 dias (DALECK et al., 1992; SARTORI FILHO et al., 1997). Existem relatos de preservação por até sete meses (PIGOSSI, 1967).

A glicerina a 98% apresenta propriedades anti-séptica e rápida ação desidratante. Substitui a maior parte da água intracelular sem alterar a concentração iônica das células, protegendo assim a integridade celular (ALVARENGA, 1992). Foi utilizada na preservação de pericárdio de equino (RANZANI, 1986), de peritônio bovino (DALECK et al., 1992) e jejuno (MASTANTONIO & EURIDES, 2002). Além de ser de baixo custo, pode ser mantida a temperatura ambiente (ALVARENGA, 1977).

Tendões preservados em glicerina demoram mais tempo para reidratar e a preservação por tempo prolongado causa um grau de desidratação que não pode ser compensado em 24 horas de reidratação (RAISER et al., 2001).

REYES (1993) realizou testes físicos comparativos de membranas biológicas preservadas em glicerina,

congeladas e a fresco. Concluiu que o pericárdio equino preservado em glicerina a 98%, em temperatura ambiente por 30 ou 40 dias, aumenta significativamente os valores dos alongamentos até a rotura, quando comparado com resultados em preparações não preservadas. O congelamento mantém valores bem próximos ao do material a fresco.

O glutaraldeído foi utilizado por GALLO et al. (1982) em pericárdio de bovino, quando observaram boa vedação do defeito diafragmático e formação de tecido conjuntivo fibroso sobre o implante. Mais tarde, SILVARES (1990) trabalhou com enxerto de pericárdio bovino em tendão calcâneo comum de ratos.

O polivinil-pirolidona é um anti-séptico não irritante e de baixa toxicidade para os tecidos (MOURA, 1997). Foi utilizado na preservação da porção muscular do intestino delgado de cães (MOTA et al., 2002). Produz um efeito rápido de ação bactericida, fungicida, virucida e, com o contato prolongado, esporicida (BAINES, 1996).

No tratamento de feridas crônicas contaminadas, o açúcar granulado foi recomendado (MARTINEZ et al., 1986; RAISER & BADKE, 1987; LUCAS & PILHA, 2000). Soluções supersaturadas em concentrações superiores a 250% foram consideradas bactericidas (CENTERO NETO et al., 1997). Um segmento de músculo diafragma preservado por mais de 30 dias em solução supersaturada de açúcar a 300% foi utilizado na reparação de defeito no diafragma de cão, quando não se observou alteração histológica e nem rejeição pelo tecido receptor (MAZZANTI et al., 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da preservação por 70 dias, das soluções de polivinil-pirolidona a 0,5%, açúcar supersaturada a 300% e glutaraldeído a 0,5%, bem como a glicerina a 98% e o congelamento a menos 16°C, em fragmentos do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de bovinos, reidratados posteriormente 24 horas em solução fisiológica a 0,9%.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados, em frigorífico, 30 membros torácicos de fêmeas bovinas azebuadas, clinicamente saudáveis, com idades entre 30 e 48 meses, que foram seccionados da carcaça próximo da articulação carpo-metacárpica.

Com auxílio de instrumental cirúrgico, incidiu-se na face palmar de cada membro, a pele, o tecido subcutâneo e a bainha fibrosa metacárpica, longitudinalmente ao osso metacárpico III e IV. O tendão do músculo flexor superficial dos dedos foi exposto, de onde se coletou um segmento

medindo aproximadamente 6,0 cm de comprimento.

O material foi dividido aleatoriamente em seis grupos de igual número, denominados I, II, III, IV, V e VI. Protegidos em frascos de vidro, receberam os seguintes tratamentos de imersão: solução de polivinil-pirolidona<sup>a</sup> a 0,5% (I), solução supersaturada de açúcar<sup>b</sup> a 300% (II), glicerina<sup>c</sup> a 98% (III), solução de glutaraldeído<sup>d</sup> a 0,5% (IV) e o congelamento a menos 16°C (V). O grupo VI foi processado para análise em microscopia de luz e eletrônica de transmissão sem qualquer tipo de preservação e serviu como controle do experimento.

A glicerina foi utilizada na forma pura sem diluição. As soluções I, II e IV, foram preparadas em solução fisiológica<sup>e</sup> a 0,9% e, para o congelamento, as amostras foram envolvidas em gaze umedecida em solução fisiológica a 0,9%.

As amostras foram mantidas nos respectivos meios de preservação por 70 dias. Durante o tratamento, as amostras dos grupos I, II e III permaneceram em temperatura ambiente e as do grupo IV resfriadas entre 2 e 8°C. As do grupo V foram mantidas no interior de freezer. Decorrido este período foram lavadas várias vezes em água destilada para retirada do excesso de preservadores. Frascos de vidro contendo solução fisiológica a 0,9% foram preparados e identificados, as amostras foram mergulhadas, para que ocorresse a reidratação dos tecidos. Desta forma permaneceram por 24 horas, resfriadas entre 2 e 8°C.

Após reidratação, retirou-se de cada amostra uma porção de aproximadamente 4,0mm de comprimento e outra de 1,0mm<sup>3</sup> de espessura. As amostras para análise em microscopia de luz (ML) foram fixadas em solução aquosa de formol a 10% por um período de 72 horas. Em seguida foram submetidas à desidratação em série crescente de graus de álcoois, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Com auxílio de micrótomo, realizou-se corte de 7µm de espessura, que posteriormente foram reidratados e corados pela hematoxilina-eosina (HE). As amostras para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5%, tamponada em solução de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2), por um período de 48 horas. O material foi lavado três vezes em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,2), por 15 minutos e fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% acrescido de ferrocianeto de potássio a 1,25%, por 90 minutos. Posteriormente, foi desidratado em série crescente de graus de álcoois e óxido de propileno, sendo então incluído em resina. Cortes ultrafinos foram preparados e contrastados

com acetato de uranila e citrato de chumbo.

## RESULTADOS

Os diferentes meios de preservação utilizados neste experimento foram de fácil preparação e conservação.

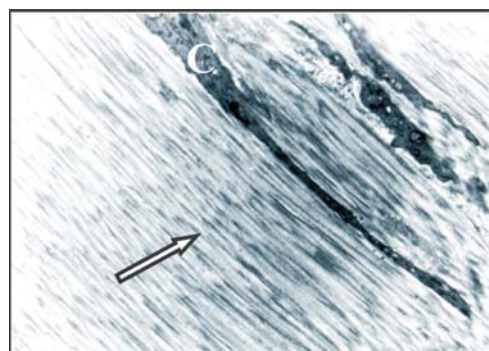
Durante o processamento de corte dos fragmentos tratados e já reidratados, observou-se diferença na consistência de alguns deles em relação ao controle. Os preservados na solução de glutaraldeído a 0,5%, solução de polivinil-pirolidona a 0,5% e pelo congelamento a menos 16°C apresentaram-se de consistência macia. Os preservados em glicerina a 98% e em solução supersaturada de açúcar a 300% apresentaram-se endurecidos, mesmo depois da reidratação.

A análise histológica não revelou sinais de alterações degenerativas em nenhum dos grupos tratados. No controle observou-se integridade e organização das fibras colágenas.

Os fragmentos preservados pelo congelamento e nas soluções de polivinil-pirolidona e glutaraldeído mostraram fibras colágenas organizadas, em semelhança ao controle.

Nas preservações pela glicerina e solução supersaturada de açúcar, observou-se acentuado distanciamento das fibras colágenas, sem, contudo, aumentar o volume do fragmento, caracterizando retração tecidual, sendo isto mais evidente na glicerina.

A análise ultra-estrutural permitiu a avaliação da agregação das fibrilas colágenas que constituem cada fibra, bem como a integridade dos fibrócitos encontrados entre elas.



**Figura 1** - Elétron-micrografia de um fragmento do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de um bovino, preservado em solução de glutaraldeído a 0,5%. Notam-se fibrilas colágenas (seta) e prolongamento citoplasmático de fibrócito íntegro (C). 10.000X.

a. Riodeine tóxico. Rioquímica. São José do Rio Preto, SP.

b. Açúcar cristal peneirado. Copersucar. São Paulo, SP.

c. Glicerina bidestilada. Berilo Comercial. Uberaba, MG.

d. Glutaraldeído. Vetec Química Fina. Rio de Janeiro, RJ.

e. Solução fisiológica a 0,9%. J P Indústria Farmacêutica. Ribeirão Preto, SP.

As amostras congeladas apresentaram semelhança ao grupo controle, porém com pequenas alterações, tais como ruptura de organelas e da membrana citoplasmática dos fibrócitos.

O açúcar ocasionou pequenos e raros espaçamentos entre as fibrilas, destruiu totalmente o citoplasma dos fibrócitos sem desagregação do núcleo. A glicerina ocasionou pequenos espaçamentos entre as fibrilas colágenas e destruiu o citoplasma dos fibrócitos, sem desagregação do núcleo, em grau mais evidente que na solução supersaturada de açúcar.

Na preservação pelo polivinil-pirolidona, observaram-se fibrilas totalmente desagregadas, com freqüentes espaços entre elas e total destruição dos fibrócitos, inclusive do núcleo.

## DISCUSSÃO

O tempo preestabelecido de 70 dias de tratamento baseou-se no fato de não haver, na literatura consultada, trabalhos de preservação de tendões com tal duração. DALECK et al. (1988) e SARTORI FILHO et al. (1997) recomendaram a preservação em glicerina a 98% por no mínimo 30 dias. PIGOSSI (1967) relatou um período de até sete meses. MOTA et al. (2002) recomendaram o tempo de 45 dias.

A consistência dos fragmentos preservados em glicerina, após a reidratação, está coerente com o trabalho de RAISER et al. (2001), quando afirmaram que o tempo prolongado de preservação em glicerina provoca desidratação que não pode ser compensada em 24 horas de reidratação. A mesma consistência observada nos fragmentos tratados pelo açúcar condiz com CENTERO NETO et al. (1997), quando deduziram que soluções supersaturadas de açúcar promovem a saída de água dos tecidos.

O distanciamento das fibras colágenas verificado nos tendões tratados pela solução supersaturada de açúcar e pela glicerina ocorreu pelo efeito desidratante dos dois preservadores. O mesmo não aconteceu nas soluções de polivinil-pirolidona e glutaraldeído e nem no congelamento, por não produzirem estes o mesmo efeito desidratante.

O formato arredondado dos tendões exige um tempo de reidratação mais prolongado, à semelhança do observado por SMITH et al. (1996). O tempo de reidratação deve ser adequado a cada preservador e também a cada tipo de tecido.

Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica demonstraram que a solução supersaturada de açúcar não preservou bem os tendões, divergindo com as

informações de MOTA et al. (2002) com segmento intestinal de cães, MAZZANTI et al. (2001) com músculo diafragma de cão.

A glicerina ocasionou alterações ultra-estruturais, demonstrando não ser o preservador ideal para tendões, não estando coerente com as observações de ALVARENGA (1977) com pericárdio de cão e DALECK et al. (1992) com peritônio de bovino.

O polivinil-pirolidona ocasionou alterações de destruição que divergem com as informações de MOURA (1997), que o considera de baixa toxicidade para os tecidos. Porém, está coerente com o trabalho de MOTA et al. (2002), quando observaram a destruição de núcleos em um segmento intestinal de cães, preservado em solução de polivinil-pirolidona.

## CONCLUSÃO

A imersão de fragmentos do tendão do músculo flexor superficial dos dedos de bovinos, por 70 dias em solução de glutaraldeído a 0,5%, posteriormente reidratados 24 horas em solução fisiológica a 0,9%, mostrou-se mais adequada na preservação das características histológicas e ultra-estruturais, quando comparada ao congelamento a menos 16°C, à glicerina a 98% e às soluções de polivinil-pirolidona a 0,5% e de açúcar supersaturada a 300%.

ARTIGO RECEBIDO: Setembro/2002

APROVADO: Setembro/2003

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, J. **Substituição de segmento de colédoco de cão por preparado de pericárdio homólogo conservado em glicerina**. São Paulo, SP. 1977. 108 p. Tese (LivrepDocência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C.R., BAPTISTA, L.C., MUKAI, L.S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal, FUNESP-UNESP, 1992. Cap.2. p.33-42.

BAINES, S. Surgical asepsis: principles and protocols. **In Practice**, v.18, n.1, p.23-33, 1996.

COSTA NETO, J.M., DALECK, C.R., ALESSI, A.C., BRACCIALLI, C.S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p.697-703, 1999.

CENTERO NETO, A.A., PAES, J.L.L., CARVALHO, R.G., PANTOJA, A., HOMOBONO, I.R., COUTO JÚNIOR, P. Concentração bactericida do açúcar em culturas de *Escherichia coli*. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.24, n.3, p.151-154, 1997.

DALECK, C.R., ALESSI, A.C., COSTA NETO, J.M., DALECK, C.L.M., PADILHA FILHO, J.G. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 53-61, 1988.

DALECK, C.R., DALECK, C.L.M., PADILHA FILHO, J.G., COSTA NETO, J.M. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

GALLO, J.I., ARTINÃNO, E., VAL, F., DURAN, C.G. Glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the repair of diaphragmatic defects. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.83, n.6, p.905-908, 1982.

LUCAS, S.S., PILHA, L.F.C. Uso de açúcar granulado no tratamento de ferida aberta em equino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, n.3, p.131-132, 2000.

MARTINEZ, N.R., SGARBI, E.C., SGARBI, S.T., SGARBI, J.M., SGARBI, D.M. O açúcar no tratamento das feridas infectadas. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.76, n.1, p.23-26, 1986.

MASTANTONIO, E.C., EURIDES, D. **Reparo do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos com enxerto de jejuno livre homólogo conservado em glicerina a 98%**. Uberlândia, MG. 2002. 22p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.

MAZZANTI, A., PIPPI, N.L., RAISER, A.G., GRAÇA, D.L., SILVA, A.F., FARIA, R.X., ALVES, A.S., GONÇALVES, G.F., STEDILE, R., BRAGA, F.A. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar para reparação de grande defeito no diafragma de cão. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 277-283, 2001.

MOTA, F.C.D., EURIDES, D., BELETTI, M.E., FREITAS, P.M.C., MASTRANTONIO, E.C., SHIMIZU, B.J. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, 2002.

MOURA, C.J. **Limpeza e sanitização em pequenas fábricas de laticínios e mini usinas de beneficiamento**. Lavras: UFLA, 1997, 30p.

PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter**. São Paulo, SP. 1967. 36p. Tese (Livre-Docência) Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo.

RAISER, A.G., BADKE, M.R. Terapia de infecções cirúrgicas com jatos de solução salina e açúcar granulado. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.9, n.6, p.125-128, 1987.

RAISER, A.G., GRAÇA, D.L., PIPPI, N.L., ZINN, L.L., ILHA, D.S., BORDIN, A.I., BAIOTO, G.C., RIOS, M.V., SILVEIRA, A.F. Homoimplante ortopédico de tendão calcâneo em cães. Conservação, assepsia e implantação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 89-94, 2001.

RANZANI, J.J.T. **Substituição de segmento da porção muscular diafragmática de cão por pericárdio de equino conservado em glicerina**. Botucatu, SP. 1986. 57 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

REYES, E.E.F. **Testes físicos comparativos de membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco**. São Paulo, SP. 1993. 85 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SARTORIFILHO, R., GANDOLFI, W., BANDARRA, E.P. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v.9, p.69-77, 1997.

SILVARES, P.R.A. **Enxerto de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído em tendão calcâneo - Estudo experimental em ratos**. Botucatu, SP. 1990. 91 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

SMITH, C.W., YOUNG, I.S., KEARNEY, J.N. Mechanical properties of tendons with sterilization and preservation. **Journal of Biomechanical Engineering**, v.118, n.1, p.56-61, 1996.

VÁMHIDY, L., STRAUCH, B., BIRÓ, V. Preserved tendon grafts in reconstructive hand surgery: a review. **Acta Chirurgica Hungarica**, v.31, n.3, p.209-215, 1990.