

Avaliação ultraestrutural do colágeno do ligamento colateral medial associado ao ligamento oblíquo da articulação do cotovelo de cão SRD após ensaio de tração

Daniela Oliveira¹, Silvana Martinez Baraldi Artoni^{1*}, Antonio Carlos Shimano², Maria Rita Pacheco¹, Juliana Regina Rossi¹ e Marcos Lania de Araújo¹

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Estadual Paulista (Unesp), rodovia acesso Paulo Donato Castellane, s/n, km 5, 14883-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ²Laboratório de Bioengenharia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: smbart@fcav.unesp.br

RESUMO. O presente trabalho objetivou observar a disposição das fibras colágenas do ligamento colateral medial da articulação do cotovelo do cão, quando associado ao ligamento oblíquo submetido a ensaio de tração. Para tanto, foram utilizadas 18 articulações, divididas em três grupos, em que um grupo teve o ligamento colateral medial coletado e não traçado, outro teve o ligamento colateral medial testado isoladamente e o outro grupo teve ambos os ligamentos (colateral medial e oblíquo) testados associadamente. O ligamento colateral medial, verificado por meio de microscopia eletrônica de varredura, apresentou um padrão ondulado e reticular das fibras colágenas quando não submetidos ao ensaio de tração, o qual não foi destruído totalmente quando associado ao ligamento oblíquo, após o ensaio. Quando analisado isoladamente, o ligamento colateral medial após ensaio de tração perde totalmente o padrão reticular, demonstrando o desgaste das fibras por resistir à tensão. O ligamento oblíquo, portanto, contribui para a integridade da arquitetura das fibras colágenas do ligamento colateral medial.

Palavras-chave: ligamento colateral medial, cotovelo, cão, biomecânica, fibras colágenas.

ABSTRACT. **Collagen ultra-structural evaluation of the mongrel dog's medial collateral ligament associated with the oblique ligament after strain.** Ultrastructural evaluation of the collagen of the mongrel dog medial collateral ligament associated to the oblique ligament after strain. The present work aimed to observe the disposition of the collagen fibres of the medial collateral ligament of the elbow joint of the dog, when associated to the oblique ligament. Thus, 18 articulations were used, divided in three groups. A group had the medial collateral ligament collected and not stretched, other group had the collateral medial ligament stretched separately and the other group had both ligaments (medial collateral and oblique) stretched associately. The medial collateral ligament examined by scanning electron microscopy presented a wavy and reticular pattern of the collagen fibres when not submitted to strain, which was not totally destroyed when it was associated to the oblique ligament. When stretched separately, the medial collateral ligament after strain totally loses the reticular pattern, demonstrating the waste of the fibres to resist to the tension.

Key words: medial collateral ligament, elbow, dog, biomechanics, collagen fibres.

Introdução

O cotovelo é uma articulação composta classificada como do tipo gínglimo, possuindo cinco ligamentos: os colaterais (medial e lateral), o ligamento oblíquo, anular e o do olécrano (Campbell, 1969; Denny, 1993; Evans, 1993). Os ligamentos colaterais conectam os três ossos da articulação do cotovelo. Além disso, o ligamento oblíquo, o do olécrano e o anular potencializam a estabilidade da articulação (Taylor, 1996).

Oliveira *et al.* (2003) descreveram o ligamento colateral medial da articulação do cotovelo do cão, dividido em porções cranial e caudal. A porção caudal é mais longa e mais estreita e penetra no espaço interósseo, fixando-se na superfície caudolateral do rádio, caudalmente à inserção da porção cranial do ligamento colateral lateral.

O ligamento oblíquo é capsular e também é dividido em porções cranial e caudal. A porção cranial se fixa à borda medial proximal do rádio,

circundando os tendões de inserção dos músculos braquial e bíceps braquial. A porção cranial do ligamento colateral medial fusiona-se à porção caudal do ligamento oblíquo (Oliveira *et al.*, 2003). Na região de transição entre os dois ligamentos, as fibras colágenas formam um ângulo reto, sugerindo a relação do ligamento colateral medial e o ligamento oblíquo e reforçando a biomecânica desses ligamentos (Oliveira, 2002).

Os ligamentos e tendões são caracterizados, segundo Benjamin e Ralphs (1998), pela grande força de tensão que suportam e são constituídos predominantemente por fibras colágenas. Para Bloomberg (1995), os ligamentos consistem de tecido conjuntivo denso, composto por água, colágeno tipos I e III, diversas proteoglicanas, pouca elastina e várias outras substâncias. Frank *et al.* (1985) incluem a elastina, glicosaminoglicanas (GAGs), enzimas, glicoproteínas e lipoproteínas na composição da matriz. As glicosaminoglicanas seriam funcionalmente importantes devido à capacidade de se ligar à água, apesar de compor apenas 0,5% da massa seca dos ligamentos (Frank *et al.*, 1985). Eles são relativamente hipocelulares, tendo como células predominantes os fibroblastos na porção média e células condróides na região próxima à inserção (Frank *et al.*, 1985; Bloomberg, 1995). As proteoglicanas interagem com o colágeno *in vitro* e *in vivo*, provavelmente devido às ligações eletrostáticas de grupamentos ácidos das proteoglicanas aos radicais básicos do colágeno (Junqueira *et al.*, 1980).

Benjamin e Ralphs (1997) relataram que 70% a 80% do peso seco de tendões e ligamentos é composto por colágeno, sendo que a maior parte é do tipo I e menores quantidades de colágeno tipo III, V e VI estão presentes. Mais de 90% do colágeno dos ligamentos, conforme Frank *et al.* (1985), é do tipo I.

Frank *et al.* (1985) relataram que os ligamentos são estruturas anisotrópicas, orientadas para resistir a tensões ao longo de seu eixo, e possuem propriedades viscoelásticas dependentes do tempo e do histórico do ligamento.

As fibrilas colágenas de tecidos conjuntivos fibrosos possuem dois tipos de disposição, dependendo de sua localização anatômica: uma disposição retilínea, encontrada principalmente em fibrilas largas e paralelas de ligamentos e tendões; e uma conformação "helicoidal", situada em fibrilas delgadas e onduladas, associadas a células e fibras elásticas da pele, paredes de vasos sanguíneos, tecidos intersticiais e bainhas conjuntivas (Raspanti *et al.*, 1990). Um fato

marcante em tendões e ligamentos é o padrão ondulado ("crimp") de disposição das fibras colágenas observadas em secção longitudinal. Essa disposição possibilita um amortecimento de impactos e impede que a estrutura, quando alongada, se danifique (Viidik e Ekholm, 1968; Frank *et al.*, 1985; Benjamin e Ralphs, 1997). Frank *et al.* (1985) descreveram esse padrão de ondulação nas células (fibroblastos) e na matriz, o que pode ser verificado em secções histológicas.

Liao e Belkoff (1999), utilizando o ligamento colateral medial da articulação do joelho de coelhos, criaram um modelo para ligamentos em ensaios biomecânicos, que se baseou na função colágena de resistir a tensões. O colágeno contribui para essa função apenas quando suas fibras estão totalmente esticadas, podendo estar sua resistência relacionada ao sexo, idade e temperatura, de acordo com os mesmos autores. Vogelsang *et al.* (1997) relataram que o ligamento colateral medial possui menos força e menor rigidez do que o ligamento colateral lateral, quando submetidos aos ensaios biomecânicos.

O ligamento, quando testado *in vitro* com tensão longitudinal e unidirecional, apresenta um comportamento mecânico não linear, como comprovado por Frank *et al.* (1985), ou seja, as fibras colágenas são esticadas aos poucos, perdendo seu padrão ondulado, até que todas estejam no limite máximo de tração e iniciem o rompimento.

Viidik e Ekholm (1968), em estudos com ligamentos tracionados observados por meio da microscopia eletrônica, demonstraram a extensibilidade das fibrilas colágenas. Yahia *et al.* (1990), estimaram em 10% o nível de tensão máximo para estimulação mecânica de ligamentos, antes que as fibras de menor diâmetro fossem rompidas.

A contribuição dos ligamentos à estabilidade da articulação do cotovelo é produto do conhecimento da morfologia e dos parâmetros biomecânicos, fundamentais na manutenção da integridade dos tecidos moles que envolvem o cotovelo (Regan *et al.*, 1991; Vogelsang *et al.*, 1997). Como a artroplastia é também desenvolvida para o uso em cães, é necessário conhecer detalhadamente as características anatômicas e as propriedades funcionais dos ligamentos dessa espécie para a correta intervenção (Vogelsang *et al.*, 1997).

Este trabalho visa, portanto, contribuir para os conhecimentos morfológicos da disposição das fibras colágenas do ligamento colateral medial da articulação do cotovelo, relacionando o ligamento oblíquo as suas funções biomecânicas.

Material e métodos

Nove cães (5 machos e 4 fêmeas) adultos, sem

raça definida e de porte médio, foram doados pelo Centro de Pesquisas Parasitológicas (CPPar) da Unesp de Jaboticabal. A eutanásia foi realizada por meio de saturação anestésica e administração endovenosa de cloreto de potássio. Peças frescas das articulações do cotovelo dos membros torácicos direito e esquerdo, constituídas pelo úmero, rádio, ulna e um ou ambos os ligamentos citados foram coletados. Foi realizada uma osteotomia no nível da porção média da incisura troclear da ulna para que a tração do ligamento fosse executada com eficiência.

As articulações do cotovelo foram divididas em três grupos, sendo que um grupo (n = 6) teve o ligamento colateral medial coletado e não tracionado, outro (n = 6) teve o ligamento colateral medial testado isoladamente e o outro grupo (n = 6) teve ambos os ligamentos (colateral medial + oblíquo) testados associadamente. As preparações osso-ligamento-osso submetidas à tração foram colocados em Máquina Universal de Ensaio (EMIC®) do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, para a realização dos ensaios. A máquina foi calibrada para que a velocidade aplicada fosse de 10 mm/minuto, com tensão crescente de 0,5 a 80 kgf.

Coletou-se a porção média dos ligamentos, tanto no grupo não tracionado como nos grupos em que foi realizado ensaio de tração. A fixação dos tecidos foi feita em glutaraldeído a 3% por 36 horas e tetróxido de ósmio a 1% durante 3 horas. Posteriormente, a desidratação foi realizada com etanol em concentrações crescentes, em intervalos de 10 minutos para cada passagem. A secagem do material foi realizada obtendo-se o ponto crítico em aparelho EMS-850®, e em seguida as peças foram metalizadas com mistura coloidal de ouro-paládio em aparelho Desk II Denton Vacuum®. A fotodocumentação foi feita em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5410®.

Resultados e discussão

A associação das fibras colágenas em feixes determina a organização arquitetônica dos tecidos conjuntivos e condiciona suas propriedades mecânicas. A estrutura e a função desses tecidos estão mais certamente relacionadas à atividade biossintética das células que produzem componentes estruturais quimicamente definidos (Lapierre *et al.*, 1977). A correlação entre a função mecânica de tecidos colágenos e os diâmetros das fibrilas colágenas tem sido proposta por vários autores (Tipton *et al.*, 1970; Diamant *et al.*, 1972; Amiel *et al.*, 1984; Frank *et al.*, 1985; Woo *et al.*, 1986a,b; Matthew *et al.*, 1987; Strocchi *et al.*, 1992; Benjamin e Ralphs, 1997).

Woo *et al.* (1983) relatam que ligamentos são muito pequenos para serem testados isoladamente e geralmente ocorre deslizamento ou ruptura precoce nos pontos de fixação à máquina de ensaio. Os autores preconizam a utilização da preparação osso-ligamento-osso para testes biomecânicos devido à maior fidelidade com a situação real.

Sob tração, a ruptura do ligamento geralmente ocorre na porção média, de acordo com Frank *et al.* (1985), em indivíduos adultos.

Bargmann (1968), Frank *et al.* (1985) e Yahia *et al.* (1990) citaram que antes de alcançar o limite de ruptura, a fibra colágena sob tração aumenta progressiva e irreversivelmente o comprimento e perde o padrão ondulatorio, fato também observado por Viidik e Ekholm (1968) em tendões de coelhos. As fibras colágenas do ligamento colateral medial do cão submetido à tração, apresentaram-se mais retilíneas do que o ligamento não tracionado (Figura 1A) e quando o ligamento oblíquo encontrava-se associado (Figura 1B), a perda do padrão helicoidal foi menor do que com o ligamento colateral medial isolado (Figura 1C).

O ligamento colateral medial do cão, verificado por meio de microscopia eletrônica de varredura, apresentou um padrão reticular das fibras colágenas quando não submetido ao ensaio de tração (Figura 1A), o qual não foi destruído totalmente quando associado ao ligamento oblíquo (Figura 1B). Quando analisado isoladamente, o ligamento colateral medial, após ensaio de tração, perde totalmente o padrão reticular (Figura 1C), demonstrando o desgaste das fibras por resistir à tensão. Strocchi *et al.* (1992), trabalhando com o ligamento cruzado anterior humano, observaram fibras colágenas em várias direções, as quais podem prover resistência tênsil variável a estresses multiaxiais a que esse ligamento é submetido.

Frank *et al.* (1985) descreveram que ligamentos testados *in vitro*, submetidos a tensão unidirecional, exibem um comportamento mecânico não-linear por razões multifatoriais. Durante a tração, um número crescente de fibras do ligamento seria recrutado para estabelecer a tensão, protegendo o ligamento contra um rompimento total e imediato. Os autores acrescentam que os ligamentos exibem uma capacidade de “memória”, respondendo, para cada tipo de tração, com uma reação diferente, a fim de diminuir o estresse sobre o ligamento. Esse mecanismo de memória é altamente complexo e certamente envolve uma complicada interação com os elementos da matriz, incluindo o colágeno, a água, as glicosaminoglicanas e elastina, quando presente (Frank *et al.*, 1985).

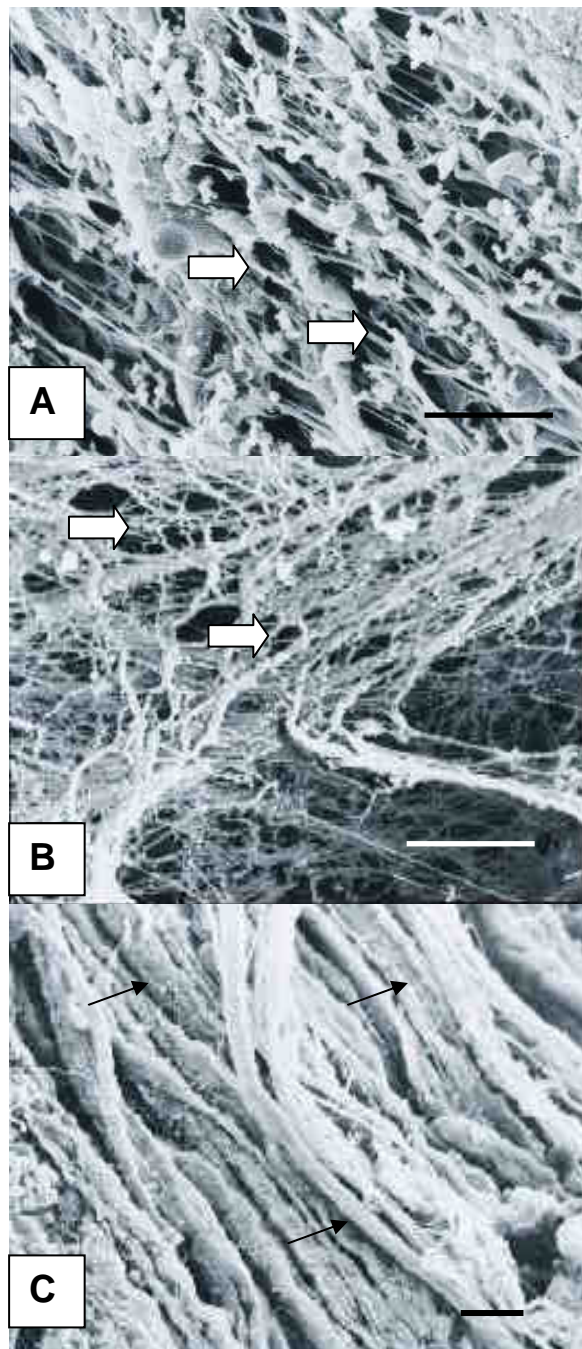


Figura 1. Eletromicrografias de varredura das fibras colágenas do ligamento colateral medial. **A.** As fibras colágenas não submetidas ao ensaio de tração apresentam disposição reticular (seta branca). **B.** As fibras colágenas do ligamento colateral medial, quando associado ao ligamento oblíquo, mantém-se com o padrão reticular (seta branca), após ruptura. **C.** Fibras colágenas do ligamento colateral medial submetido ao ensaio de tração isolado na articulação. As fibras colágenas tornam-se mais retilíneas (seta preta) quando o ligamento oblíquo não está intacto na articulação. Barra = 25 μ m.

Conclusão

O ligamento colateral medial apresenta padrão reticular e ondulado das fibras colágenas e, sob

tensão, as fibras tendem a ficar mais retilíneas. Quando o ligamento oblíquo está intacto na articulação, o padrão reticular do ligamento colateral medial tende a ser preservado após ruptura. O ligamento oblíquo, portanto, contribui para a integridade da arquitetura das fibras colágenas do ligamento colateral medial.

Referências

- AMIEL, D. *et al.* Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J. Orthop. Res.*, New York, v. 1, p. 257-265, 1984.
- BARGMANN, W. *Histologia y anatomía microscópica humanas*. Barcelona: Labor, 1968.
- BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. Tendons and ligaments – an overview. *Histol. Histopathol.*, Murcia, v. 12, p. 1135-1144, 1997.
- BENJAMIN, M.; RALPHS, J.R. Fibrocartilage in tendons and ligaments – an adaptation to compressive load. *J. Anat.*, London, v. 193, n.4, p. 481-494, 1998.
- BLOOMBERG, M.S. Tendon, muscle and ligament injuries and surgery. In: AMSTEAD, M.L. (Ed.) *Small animal orthopedics*. St. Louis: Mosby, 1985. p. 488-521.
- CAMPBELL, J.R. Nonfracture injuries to the canine elbow. *JAVMA*, Schaumburg, v. 155, n. 5, p. 735-744, 1969.
- DENNY, H.R. The forelimb. In: DENNY, H.R. (Ed.) *A guide to canine and feline orthopaedic surgery*. 3. ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1993.
- DIAMANT, J. *et al.* Collagen; ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proc. R. Soc. Lond.*, London, v. 180, p. 293-315, 1972.
- EVANS, H.E. Ligaments and joints of thoracic limb. In: EVANS, H.E. (Ed.) *Miller's Anatomy of the dog*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993.
- FRANK, C. *et al.* Normal ligament properties and ligament healing. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, v. 196, p. 15-25, 1985.
- JUNQUEIRA, L.C.U. *et al.* Quantitation of collagen-proteoglycan interaction in tissue sections. *Connect. Tiss. Res.*, London, v. 7, p. 91-96, 1980.
- LAPIERE, M. *et al.* Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect. Tiss. Res.*, Kidlington, v. 5, p. 21-29, 1977.
- LIAO, H.; BELKOFF, S.M. A failure model for ligaments. *J. Biomech.*, London, v. 32, n. 2, p. 183-188, 1999.
- MATTHEW, C. *et al.* A quantitative ultrastructural study of collagen fibril formation in the healing extensor digitorum longus tendon of the rat. *J. Hand Surg. [Br]*, Rosemont, v. 12, p. 313-320, 1987.
- OLIVEIRA, D. *Aspectos morfológicos e histológicos dos ligamentos colateral medial e oblíquo da articulação do cotovelo do cão (Canis familiaris)*. 2002. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

- OLIVEIRA, D. *et al.* Morphometric study of the medial collateral and oblique ligaments of the elbow joint of the dog (*Canis familiaris*). *Int. J. Morphol.*, Temuco, v. 21, n. 1, p. 23-28, 2003.
- RASPANTI, M. *et al.* Subfibrillar architecture and functional properties of collagen: a comparative study in rat tendons. *J. Anat.*, London, v. 172, p. 157-164, 1990.
- REGAN W.D. *et al.* Biomechanical study of ligaments around the elbow joint. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, v. 271, p. 170-179, 1991.
- STROCCHI, R. *et al.* The human anterior cruciate ligament: histological and ultrastructural observations. *J. Anat.*, London, v. 180, p. 515-519, 1992.
- TAYLOR, R.A. Tratamento das luxações do cotovelo. In: BOJRAB, M.J. (Ed.) *Técnicas atuais em cirurgia dos pequenos animais*. 3. ed. São Paulo: Roca, 1996.
- TIPTON, C.M. *et al.* Influence of exercise on strength of medial collateral knee ligaments of dogs. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 218, n. 3, p. 894-902, 1970.
- VIIDIK, A.; EKHOLM, R. Light and electron microscopic studies of collagen fibers under strain. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.*, Berlin, v. 127, p. 154-164, 1968.
- VOGELSANG, R.L. *et al.* Structural, material and anatomic characteristics of the collateral ligaments of the canine cubital joint. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v. 58, n. 5, p. 461-466, 1997.
- WOO, S.L.Y. *et al.* Measurement of mechanical properties of ligament substance from bone-ligament-bone preparation. *J. Orthop. Res.*, New York, v. 1, p. 22-29, 1983.
- WOO, S.L.Y. *et al.* Tensile properties of the medial collateral ligament as a function of age. *J. Orthop. Res.*, New York, v. 4, n. 2, p. 133-141, 1986a.
- WOO, S.L.Y. *et al.* Effects of postmortem storage by freezing on ligament tensile behavior. *J. Biomech.*, London, v. 19, n. 5, p. 399-404, 1986b.
- YAHIA, L. *et al.* A scanning electron microscopic study of rabbit ligaments under strain. *Matrix*, Stuttgart, v. 10, p. 58-64, 1990.

Received on March 04, 2005.

Accepted on June 29, 2005.