KAREN CRISTINA LAURENTI

Desenvolvimento de um biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 em gradiente funcional para reparo de cartilagem articular: estudos *in vitro* e *in vivo*.

Tese apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Área de Concentração: Projeto Mecânico

Orientador: Dr. Carlos Alberto Fortulan

São Carlos
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Laurenti, Karen Cristina
L383d Desenvolvimento de um biomaterial composto de poliuretano e microfibras de biovidro em gradiente funcional para reparo de cartilagem articular : estudos *in vitro* e *in vivo* / Karen Cristina Laurenti ; Carlos Alberto Fortulan. — São Carlos, 2011.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica e Área de Concentração em Projeto Mecânico — Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.

1. Biomateriais. 2. Cartilagem articular. 3. Defeito osteocondral. 4. Poliuretano. 5. Microfibras de biovidro. 6. Teste *in vitro*. 7. Teste *in vivo*. 8. Reparação cartilagem.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Fisioterapeuta **KAREN CRISTINA LAURENTI**

Título da tese: **Desenvolvimento de um biomaterial composto de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5 em gradiente funcional para reparo de cartilagem articular: estudos *in vitro* e *in vivo*.**

Data da defesa: 06/09/2011:

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. **Carlos Alberto Fortulan (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada
Aprovada

Prof. Associado **João Manoel Domingos de Almeida Rollo**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof.^a. Dr.^a. **Eliana Cristina da Silva Rigo**
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP)

Aprovado

Prof.^a. Dr.^a. **Ana Maria Minarelli Gaspar**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP/campus de Araraquara)

APROVADA

Dr. **Rodrigo Bezerra de Menezes Reiff**
(Clínica Santa Monica)

Aprovada.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica:
Prof. Associado **Marcelo Areias Trindade**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo Cesar Lima Segantine**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãs que, se eu pudesse ter escolhido, não teria escolhido tão bem. Obrigada por tanto amor e dedicação!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos privilégios de minha vida.

Ao meu querido orientador Dr. Carlos Alberto Fortulan por ter sido a “minha bússola” na realização deste trabalho. O modo como me apoiou no decorrer deste trabalho: uma orientação científica criteriosa, estimulando e dando o tempo para uma construção pessoal do trabalho. A disponibilidade que sempre manifestou e a empatia com que recebeu as minhas idéias foram o estímulo que me permitiu vencer as inseguranças deste processo, e, principalmente pela orientação, condução, participação durante as fases desta pesquisa, paciência e boa vontade em ensinar e principalmente pela amizade. Para mim, é uma imensa honra e orgulho tê-lo como meu orientador.

Ao Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo ter como meu co-orientador foi um privilégio. De coração, sou grata pela disponibilidade, dedicação, conselhos e atenção prestadas para a realização desse trabalho.

Ao prof. Titular Benedito de Moraes Purquerio pela oportunidade.

Ao Dr. Arnaldo Rodrigues Santos Júnior pelo auxílio na realização dos testes *in vitro*. E principalmente por ter contribuído com importantes e enriquecedoras sugestões que com certeza foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. E por sua disposição em me ajudar... SEMPRE.

Ao Dr. Rodrigo Bezerra de Menezes Reiff, cirurgião ortopedista brilhante, agradeço a parceria, disposição, boa vontade e participação neste projeto.

A Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar, eu sempre pude contar com você! Tenho certeza de que somei à minha lista de amigos mais um nome de peso.

A Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo “Lica” a minha melhor escolha para participar da minha banca. Obrigada pelas sugestões e boa vontade.

Ao técnico Pedrinho da Histologia da FOAr – Unesp.

Aos amigos do Laboratório de Tribologia e Compósitos.

À querida “fotógrafa” e amiga Lourdes Cristina de Albuquerque Haach por sua ajuda e a Camila Roberta Meira.

A Luciana Portal e a Lubrizol pela doação do poliuretano médico.

A Ted Day da Mo-Sci Corporation pela atenção dispensada e pela doação da microfibrila de biovidro 45S5.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, em especial Dr. Francisco José Correia Braga, Dra. Margarida Mizue Hamada, Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo e Paulo de Souza pela ajuda na esterilização dos implantes.

Ao Roberto Ap. Lourenço por ter cedido os coelhos.

Ao Eliezer Dias Francisco (Tito) e ao Márcio de Paula pela ajuda com o Microscópio Eletrônico e MEV.

Ao Marcelo Assumpção pela análise de Microscopia de Força Atômica.

Ao Biotério da Interunidades em Bioengenharia, ao biólogo Nelson e ao médico veterinário Dr. Thiago Francisco de Moraes.

Ao pessoal da secretaria de graduação em Engenharia Mecânica: Cristina, Maragno, Wilma, Joãozinho e Juliana.

As secretárias da pós-graduação: Paula, Lara, Dani e Patrícia.

A Capes pela bolsa a mim concedida.

Ao Projeto Pró-Engenharia CAPES no. PE 0652008 481500/2007-3.

À Escola de Engenharia de São Carlos – EESC, pela oportunidade de poder usufruir de toda a sua estrutura física e dos conhecimentos nela adquiridos.

Aos animais, vítimas solicitadas pela Ciência em benefício da Humanidade o meu respeito e eterna gratidão.

E finalmente, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigante.

Isaac Newton

RESUMO

LAURENTI, K.C. Desenvolvimento de um biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 em gradiente funcional para reparo de cartilagem articular: estudos *in vitro* e *in vivo*. 2011. 163f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

*A cartilagem articular é um tema amplamente discutido na literatura por meio de vários estudos e pesquisas. Com o presente estudo, busca-se uma proposta inovadora e original no uso de um biomaterial composto e o desenvolvimento de uma cartilagem artificial que aja como coxim elástico, apresentando características de gel fibro-reforçado com finalidade biomimética mecânica que imite o comportamento da cartilagem articular. Foi conceituado um implante que tivesse uma superfície tribológica para contato com a cartilagem do platô tibial e gradualmente se convertesse em região osteo-integrável para fixação mecânica no osso subcondral. Foi desenvolvido um biomaterial composto por poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 em gradiente funcional que foi obtido e validado através de ensaios *in vitro*, microscopia eletrônica de varredura e análise histológica. Nos testes *in vitro* seja na condição de citotoxicidade direta ou indireta, notou-se que a quantidade de células foi estatisticamente semelhante ao controle negativo, e estatisticamente diferente do controle positivo indicando que o biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 apresentou não toxicidade direta ou indireta da amostra e ainda promoveram o crescimento e o espalhamento celular, resultados que o habilitaram para a continuidade nos estudos com experimentos *in vivo* com coelhos. O material foi manufaturado para aplicação em defeitos osteocondrais de coelhos medindo 3mm de diâmetro e 4mm de profundidade que foi realizado na região central da tróclea femoral. Após períodos experimentais de 15, 30 e 90 dias as análises de microscopia eletrônica de varredura mostrou na região distal da superfície tribológica uma neo-formação de uma estrutura semelhante as trabéculas ósseas que foi considerada biomimética confirmadas por análises histológicas, e na região proximal à superfície tribológica a presença de tecido fibrocartilaginoso com condrócitos e ricamente vascularizado, validando com sucesso o conceito proposto para o implante.*

*Palavras-chave: Cartilagem articular, defeito osteocondral, poliuretano, microfibra de biovidro 45S5, testes *in vitro*, testes *in vivo*, reparação cartilagem, gradiente funcional.*

ABSTRACT

LAURENTI, K.C. Development of a biomaterial composed of polyurethane and bioglass microfiber in gradient functional to repair articular cartilage: *in vitro* and *in vivo* studies. 2011. 163f. Thesis (Doctoral) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

Articular cartilage has been widely discussed in the literature by means of several studies and researches. The present thesis reports on an innovative and original proposal to use a biomaterial compound and the development of an artificial cartilage that acts as a cushion rubber with characteristics of fiber-reinforced gel with biomimetic mechanical purpose mimicking the behavior of articular cartilage. An implant with a tribological surface for contact with the cartilage of the tibial plateau was designed. It should gradually turn into an osteo-integrable region for mechanical fixation in the subchondral bone. A biomaterial composed of polyurethane and bioglass microfiber in functional gradient was then developed and validated by scanning electron microscopy and histological analysis through in vitro tests. Under either direct or indirect cytotoxicity conditions, the tests showed that the amount of cells is statistically similar to negative control and statistically different from the positive control, indicating that the biomaterial composed of polyurethane and bioglass microfiber showed no direct or indirect toxicity and promoted cell growth and spreading. Such results allowed continuing the studies with in vivo experiments with rabbits. The material was manufactured for use in 3mm diameter and 4mm depth osteochondral defects in the central region of the femoral trochlea of rabbits. After experimental periods of 15, 30 and 90 days, the scanning electron microscopy analysis showed a neo-formation of a structure similar to trabecular bones on the tribological surface in the distal region. This neo-formation was considered biomimetic, confirmed by both histological analysis and the presence of richly vascularized fibrocartilaginous tissues with chondrocytes in the region proximal to the tribological surface.

Keywords: Articular cartilage, osteochondral defect, polyurethane, bioglass microfiber, in vitro tests, in vivo tests, repair cartilage, functional gradient.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cartilagem articular do joelho. (www.core.med.br/pag4.cfm).....	28
Figura 2: Composição da cartilagem hialina (GARRIDO, 2007).....	29
Figura 3: Apresentação de um corte histológico de cartilagem articular de joelho de cão (GARRIDO, 2007).	31
Figura 4: Classificação dos defeitos articulares (BITTENCOURT, 2008).....	32
Figura 5: Implante autólogo de condrócitos (BITTENCOURT, 2008).....	36
Figura 6: Enxerto autólogo osteocondral (EAO) (BITTENCOURT, 2008).	37
Figura 7: Transplante de condrócitos.	37
Figura 8: Mandíbula com três pedaços de conchas do mar implantadas (PAIVA, 2005 <i>apud</i> RING, 1998).	41
Figura 9: Classificação dos materiais para implante relativamente à interação com o meio fisiológico (CAMILO, 2006).....	44
Figura 10: Forma das partículas de biocerâmicas usadas em biomateriais (PAIVA, 2005).	53
Figura 11: Representação estrutural do polímero de silicone. A: Matriz de silício e oxigênio, onde R1 e R2 representam radicais metil, etil ou fenil, que podem estar ligados ao Si; B: representação química do polímero de silicone e C: representação tridimensional (NOGUEIRA, 2008).....	56
Figura 12: Reação de produção do poliuretano.	57
Figura 13: Esquema comparativo entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico de varredura (adaptado de Raven <i>et al.</i> , 1996).	87
Figura 14: Diagrama de funcionamento do microscópio de varredura de força (Bernardes Filho e Mattoso, 2003).	89
Figura 15: Mapa de forças entre amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica (Bernardes Filho e Mattoso, 2003).	89

Figura 16: Curva de força mostrando a aproximação e o afastamento entre a agulha e a amostra em um experimento para verificar a adesão (Bernardes Filho e Mattoso, 2003).	90
Figura 17: Conceituação do corpo de prova frente ao tecido cartilaginoso osteocondral em gradiente funcional.....	94
Figura 18: Diagrama de fluxo da metodologia utilizando PMMA, CMC e Silicone. ...	97
Figura 19: Desenho esquemático do implante osteocondral de poliuretano e microfibra de biovidro.	99
Figura 20: Coelhos em gaiolas individuais.	103
Figura 21: Anti-asepsia do joelho direito do coelho.	104
Figura 22: Via de acesso longitudinal medial sobre o joelho.....	105
Figura 23: Afastamento da gordura infra-patelar em direção caudal.....	106
Figura 24: Visualização do sulco troclear.	106
Figura 25: Realização do defeito osteocondral na região central da tróclea femoral com broca de 3 mm.....	107
Figura 26: Defeito osteocondral com 3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade.	107
Figura 27: Colocação do implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 no defeito osteocondral.	108
Figura 28: Visualização do implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 no defeito osteocondral.	108
Figura 29: Sutura com fio de nylon.....	109
Figura 30: Corpo-de-prova de PMMA, CMC e silicone.	112
Figura 31: Distribuição desigual na concentração de silicone e a presença de vazios, maior e menor magnificação, respectivamente.	113
Figura 32: Presença de vazios, fraturas e distribuição desordenada do silicone, maior e menor magnificação, respectivamente.	113
Figura 33: Presença de vazios, fraturas e distribuição desordenada do silicone, maior e menor magnificância, respectivamente.	113
Figura 34: Presença de vazios e fraturas.	114
Figura 35: Corpos-de-prova do compósito de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.....	115
Figura 36: Amostra de microscopia eletrônica de varredura da microfibra de biovidro 45S5, menor e maior magnificância respectivamente.	115

Figura 37: Amostras do biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.....	116
Figura 38: Presença de poros interconectados, bem distribuídos e apresentando vários tamanhos.	116
Figura 39: Toxicidade das amostras estudadas. O controle positivo de toxicidade foi considerada significativamente diferente (0,01) das demais amostras avaliadas. ..	117
Figura 40: Avaliação morfológica qualitativa da toxicidade das amostras estudadas. A) Controle negativo (não tóxico); B) Controle positivo (tóxico); C) Citotoxicidade direta; D) Citotoxicidade indireta. Barra de aumento: 100 μm	118
Figura 41: O valor da rugosidade do poliuretano foi 15,74 nm.....	118
Figura 42: O valor da rugosidade da superfície oposta à tribológica com alta concentração de biovidro 45S5 foi 15,35 nm.	118
Figura 43: Projeção tridimensional do poliuretano.	119
Figura 44: Projeção tridimensional do lado oposto da superfície tribológica.	119
Figura 45: Microscopia Eletrônica de Varredura do Implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.....	120
Figura 46: Imagem da superfície da amostra, na posição proximal à superfície tribológica mostrando o poliuretano e as microfibras de biovidro bem visíveis. Em A poliuretano e em B microfibra de biovidro 45S5.....	121
Figura 47: Imagem com reparo de 15 dias de implantação do coelho 01.	122
Figura 48: Imagem do reparo de 15 dias de implantação do coelho 02.	122
Figura 49: Imagem do reparo de 15 dias de implantação do coelho 04.....	123
Figura 50: Imagem do reparo de 30 dias de implantação do coelho 05.....	123
Figura 51: Imagem do reparo de 30 dias de implantação do coelho 06.	124
Figura 52: Imagem do reparo de 30 dias de implantação do coelho 08.....	124
Figura 53: Imagem do reparo de 90 dias de implantação do coelho 03.	125
Figura 54: Imagem do reparo de 90 dias de implantação do coelho 07.....	125
Figura 55: Grupo 30 dias - Coelho 04 – observa-se tecido ósseo; tecido fibroso com fibras colágenas, fibroblastos (f) e inúmeros vasos sanguíneos (v). HE. Aumento 100 μm	126
Figura 56: Grupo 90 dias – Coelho 03 - Observa-se tecido ósseo; tecido fibrocartilaginoso com condrócitos (c), inúmeros vasos sanguíneos (*) e o material. HE. Aumento 100 μm	127

Figura 57: Grupo 90 dias – Coelho 03 - Observa-se tecido ósseo; tecido fibrocartilaginoso com condrócitos (c) e o material. HE. Aumento 100µm.	127
Figura 58: Grupo 90 dias – Coelho 07 – Observa-se tecido ósseo; tecido fibrocartilaginoso com condrócitos (c), inúmeros vasos sanguíneos (*) e o material. HE. Aumento 100µm.	128
Figura 59: Grupo 90 dias – Coelho 07 – Observa-se tecido ósseo; tecido fibroso, composto por fibras colágenas, fibroblastos e inúmeros vasos sanguíneos (*) e o material. HE. Aumento 100µm.	128
Figura 60: Imagem do grupo controle (defeito vazio) após 30 dias de seguimento cirúrgico. Observa-se a reabsorção local com a remodelação dos tecidos.....	129
Figura 61: Imagem da neo formação óssea na porosidade com ocupação do espaço nos primeiros 15 dias. Estrutura semelhante às trabéculas ósseas que foi considerada biomimética.....	130
Figura 62: Ocupação quase que total da porosidade por osso neoformado com 30 dias de implantação, preenchimento das trabéculas com osso osteóide.....	130
Figura 63: Consolidação da formação óssea aos 90 dias com preenchimento densificado da área porosa e formação de osteon.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos tratamentos que visam reparar lesões na cartilagem articular (BITTENCOURT, 2008).	40
Tabela 2: Formulações Estudadas e Manufaturas.	96
Tabela 3: Identificação dos coelhos experimentais e controle.	103
Tabela 4: Formulações e Manufaturas estudadas.	114
Tabela 5: Toxicidade indireta dos polímeros testados.	117

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA - Alginato

ABNT – Associação Brasileira de Norma Técnicas

ADAS - Células adiposas derivadas de células tronco adultas

AH - Ácido hialurônico

ARPE-19 - Células epiteliais pigmentares da retina

As-Ga - Arseneto de gálio

CET - Coeficiente de Expansão Térmica

CMC – Carboximetilcelulose

CS - Sulfato de Condroitina

EAO - Enxerto Autólogo Osteocondral

ESCA - Espectroscopia para Análise da Composição Química

FDA - *Food and Drug Administration*

GAGs – Glicosaminoglicanas

GPa – Giga Pascal

H RMN – Espectros Registrados

HA - Hidroxiapatita

HCA – Hidroxiapatita carbonatada

HMDI - Diisocianato de Metileno

IAC - Implante Autólogo de Condrócitos

ICRS - *International Cartilage Repair Society*

INSS - Instituto Nacional do Seguro Social

ISO - *International Standart Organization*

MDA - Metileno Dianilina

MDI - Diisocianato de compostos aromáticos de metileno

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MFB – Microfibra de biovidro

MMA - Monômero Metil Metacrilato

MOD - Matriz Óssea Desmineralizada

MPa – Mega Pascal

MSC - Células Tronco Mesenquimais

OA – Osteoartrose

OCP - octacálcio fosfato
OMS - Organização Mundial de Saúde
OP-1 - Proteína Osteogênica Recombinante Humana
PCDO - Policarbonato Diol
PEUAPM - polietileno de ultra-alto peso molecular
PGA – poli (ácido glicólico)
PLA – poli (ácido láctico)
PLGA - Poli (ácido –láctico-co ácido glicólico)
PLLA – poli (L- ácido láctico)
PMMA - Polimetilmetacrilato
PTFE - Poliutetrafluoretileno
PTMEG - Politetrametileno Glicol Éter
PU - Poliuretano
PUD5 - Dispersão aquosa do poliuretano 5
PUD6 - Dispersão aquosa do poliuretano 6
RM - Ressonância Magnética
RT-PCR - Reação de transcrição reversa em cadeia de polimerase
RWN - *Rotating wall vessel*
SAXS - Espalhamento de raios-X em baixo ângulo
SBF - Soro Bovino Fetal
TDA - Toluene-Diisocianato Diamina ou Toluenediamina
TGF- β - Fator β de crescimento de fibroblastos
TPU – Poliuretano
TTCP - tetracálcio-fosfato
u-HAp - Hidroxiapatita sinterizada
XRD - Difração de raios-X
 α -TCP - α - fosfato tricálcico
 β -TCP - Beta- -fosfato-tricálcico
 γ -PGA-g-CS/PCL - Sulfato de Condroitina e poli (ϵ -caprolactona)

LISTA DE SÍMBOLOS

μm – Micrômetro

AISI F138 – aço inoxidável

Al_2O_3 - Alumina

$\text{Ca Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 (\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ – Fluorapatita

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – Hidroxiapatita

CaO – Óxido de Cálcio

cm^2 – centímetro quadrado

Co-Cr – Cromo-cobalto

J/cm^2 – Joule/centímetro quadrado

K_2O – Óxido de Potássio

MgO – Óxido de Magnésio

Mm – Milímetros

Na_2O – Óxido de sódio

Na_2O – Óxido de Sódio

nm - Nanômetro

P_2O_5 – Pentóxido de Fósforo

poliHEMA - poli(2-hidróxi etil metacrilato)

poliHEMA-AC - poliHEMA com acetato de celulose

poliHEMA-poli(MMA-co-AA-poliHEMA com poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico

Psi – *Pounds square inch*

Si – Silício

SiO_2 – Dióxido de Silício

Ti6Al4V – Liga de Titânio

Ti6Al7Nb – Liga de titânio

TiO_2 – Dióxido de Titânio

W – watts

ZrO_2 – Zircônia

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Símbolos

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1	Cartilagem Articular	28
2.2	Classificação dos Defeitos da Cartilagem Articular	32
2.2.1	Lesão e Reparo da Cartilagem Articular	32
2.3	Propriedades Mecânicas da Cartilagem Articular	38
2.4	Defeitos osteocondrais	39
2.5	Origem dos Biomateriais	40
2.6	Biomateriais	41
2.6.1	Enxertos Ósseos autógenos ou autólogos	44
2.6.2	Enxertos Ósseos homólogos e heterógenos	45
2.6.3	Biocompatibilidade e Biofuncionalidade	46
2.6.4	Desenvolvimento e Importância dos Biomateriais	47
2.6.5	Tipos d Biomateriais	47
2.6.6	Biovidro	50
2.6.7	Composições Químicas dos Vidros Bioativos	50
2.6.8	Aplicações dos Vidros Bioativos	51
2.6.9	Compósitos Cerâmicos (biovidro/polímero)	52
2.6.10	Classificação dos Biomateriais Quanto a Resposta Biológica	54
2.6.11	Silicone	55
2.6.12	Poliuretano	56
2.7	Estudos sobre reparo e substituição de cartilagem	61

2.8 Testes Biológicos	84
2.8.1 Testes <i>in vitro</i>	84
2.9 Microscopia de Varredura (MEV)	86
2.10 Microscopia de Força Atômica (MFA)	86
2.10.1 Modo contato	90
2.11.2 Modo de força lateral.....	90
2.12.3 Modos não-contato e contato intermitente	91
3 MATERIAIS E MÉTODOS	94
3.1 Etapa 1 – PMMA, Silicone, Gel de CMC e HA	95
3.1.1 Componente da Matriz	95
3.1.2 Monômero Metil Metacrilato	95
3.1.3 Borracha de Silicone	95
3.1.4 Materiais auxiliares de Processo.....	96
3.1.4.1 Carboximetilcelulose (CMC) – Agente Porogênico	96
3.1.4.2 Água destilada e Deionizada.....	96
3.1.5 Formulações estudadas e Manufatura	96
3.2 Ensaios realizados	98
3.2.1 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)	98
3.3 Etapa 2 – Definição do novo compósito: Poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.....	99
3.3.1 Conceito do implante.....	99
3.3.2 Manufatura do implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.....	100
3.4 Ensaios realizados	100
3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	100
3.4.2 Microscopia de Força Atômica (MFA)	100
3.4.3 Cultura celular	101
3.4.4 Avaliação da Biocompatibilidade e Citotoxicidade dos materiais	101
3.4.5 Citotoxicidade Indireta.....	101
3.4.6 Citotoxicidade Direta	102
3.5 Estudos <i>in vivo</i>	102
3.5.1 Procedimento anestésico	104
3.5.2 Procedimento cirúrgico.....	104

3.6 Pós operatório	109
3.7 Eutanásia	110
3.8 Preparo das peças – Análise histológica.....	110
4 RESULTADOS	112
4.1 PMMA, Silicone, Gel de CMC e HA	112
4.2 Poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.....	114
4.2.1 Teste de Citotoxicidade.....	116
4.2.2 Microscopia de força atômica.....	118
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura do Implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.....	120
4.2.4 Avaliação macroscópica dos joelhos.....	121
4.3 Análise Histológica	126
4.3.1 Análise Histológica – Coelho C4 – 15 dias.....	126
4.3.2 Análise Histológica – Coelho C3 – 90 dias.....	127
4.3.3 Análise Histológica – Coelho C7 – 90 dias.....	128
4.4 Análises das imagens após sacrifício dos animais por MEV	129
5 DISCUSSÃO	132
6 CONCLUSÕES	138
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

Segundo Reiff (2010) a pesquisa relativa ao reparo da cartilagem apresentou um expressivo crescimento nos últimos dez anos, impulsionada pelo desenvolvimento de novas tecnologias.

A cartilagem articular é um tecido avascular, esparsamente celular, cujas características bioquímicas refletem principalmente a composição da matriz extracelular. Esta é hiperhidratada (conteúdo de água variando de 66 a 80%), com 20-34% de sólidos dos quais, 5-6% são componentes inorgânicos (principalmente hidroxapatita) e do restante orgânico, 48-62% é formado por colágeno tipo II e 22-38% por proteoglicanos. A rigidez e elasticidade do tecido são resultados da relativa incompressibilidade das moléculas de proteoglicanos. As fibrilas colágenas subjacentes e paralelas à superfície articular formam uma "pele" e provavelmente servem não somente como uma camada limitadora, mas também para a distribuição de forças de compressão. As fibrilas da camada basal da cartilagem ficam perpendiculares à superfície e servem como âncora fixando a cartilagem descalcificada à zona calcificada e ao osso subcondral. Nas zonas intermediárias as fibrilas se dispõem mais ao acaso. As fibrilas oblíquas provavelmente assistem na resistência as tensões (BRANDT e MANKIN, 1993).

A cartilagem articular é um tecido com baixo ciclo celular e pouca atividade de regeneração e é definida como um tecido incapaz de regenerar por si mesma, acima de tudo por sua natureza avascular (CAPLAN *et al.*, 1997).

O'Driscoll (2001) descreve que a verdadeira regeneração requer a restauração de todos os componentes da superfície articular, de forma que o novo tecido seja semelhante ao normal. O reparo, ao contrário da regeneração, envolve a formação de um tecido funcional que preencha o defeito inicial, mas que não seja completamente idêntico ao original.

Didaticamente, é possível subdividir o processo de regeneração de um tecido, em três fases: necrose, inflamação e reparo. Assim sendo, torna-se nítida a capacidade limitada da cartilagem hialina em se restabelecer, por ser este tecido avascular e não possibilitar a instalação do processo inflamatório no foco de lesão.

Lesões superficiais da cartilagem hialina que não atinjam o osso subcondral (defeitos condrais), normalmente não se recompõem. Nesse tipo de lesão, a degeneração da cartilagem hialina ocorre a partir da zona superficial, onde se visualiza finas porções de

fibras de colágeno com aspecto descamativo. Com o tempo, o dano progride e é possível visualizar fissuras verticais na cartilagem articular, produzindo macroscopicamente aspecto irregular e sem brilho.

Por outro lado, o reparo do defeito da cartilagem hialina que atinge a região do osso subcondral (defeitos osteocondrais) difere da anterior por desencadear um processo inflamatório, mediado por células presentes na corrente sangüínea, já que a região atingida é ricamente vascularizada. Defeitos osteocondrais são preenchidos imediatamente por sangue, que evoluem para a formação de um coágulo de fibrina, com hemácias, leucócitos, plaquetas e outras células da medula óssea. A população de células mesenquimais indiferenciadas multiplica-se, a fim de formar um tecido fibrovascular. Esse tecido rico em fibras de colágeno e brotos vasculares evolui para tornar-se um tecido fibrocartilaginoso e, eventualmente, dependendo dos estímulos mecânicos e biológicos, um tecido cartilaginoso hialino. Na base do defeito, na região em contato com o osso subcondral, ocorre neoformação óssea, que se estende na direção da articulação. Por razões ainda não esclarecidas, a formação de tecido ósseo geralmente é interrompida na zona de transição, permitindo que o defeito remanescente seja preenchido com o tecido fibrocartilaginoso.

A literatura mostra que diversos estudos experimentais têm sido desenvolvidos para avaliar a resposta da cartilagem articular em lesões osteocondrais. Os resultados desses estudos têm mostrado ilimitado potencial de regeneração da cartilagem articular hialina.

As articulações do corpo humano são constituídas, em maior parte, em juntas sinoviais ou diatrodiais, tornando possível a locomoção e as atividades diárias e, por isso quando danificadas, sua restauração é de extrema importância.

Quando o problema é diagnosticado em estágios iniciais, são indicadas terapias como modificações no estilo de vida, visando à diminuição da atividade da articulação. A prescrição de diferentes medicamentos e a fisioterapia também pode levar à diminuição dos sintomas, mas não alteram o curso da doença. Quando a junta já se encontra em estágio avançado no processo de degeneração, seu reparo é realizado através de cirurgias ortopédicas com a substituição da articulação por próteses totais ou parciais. No entanto, esses procedimentos não permitem a restauração de uma superfície articular com propriedades mecânicas e durabilidade semelhantes às da articulação natural, limitando a vida útil das próteses.

Além das próteses, têm sido estudados alguns procedimentos alternativos para serem utilizados nos casos em que o problema se encontre em estágios iniciais, cujo defeito se apresenta com área bem definida. O uso de biomateriais sintéticos como enxerto para o preenchimento do defeito e restauração da superfície articular, tem apresentado resultados

interessantes, porém é necessário o estudo contínuo em buscas de biomateriais e metodologia adequada.

No decorrer dos anos, muitas técnicas cirúrgicas que estimulam a cicatrização e o reparo da cartilagem articular foram desenvolvidas, mas nenhuma se mostrou, até hoje, 100% eficaz. O raciocínio de que uma resposta inflamatória eficiente poderia se desenvolver não da cartilagem lesada, mas do osso abaixo dela, também conhecido como subcondral, levou ao desenvolvimento da espongilização, *drilling* e micro-fraturas, que nada mais são que "raspagens" ou perfurações múltiplas, causando sangramento e, conseqüente cicatrização. Observou-se, no entanto, que o defeito cartilaginoso é preenchido não por tecido cartilaginoso hialino, mas por fibrocartilagem, rica em fibras colágenas tipo I, com propriedades biomecânicas diferentes da cartilagem articular.

Na literatura têm sido descritos diferentes métodos cirúrgicos para o tratamento de lesões cartilaginosas. A decisão sobre a modalidade a ser utilizada depende da idade e atividade do paciente, bem como da profundidade, tamanho, localização da lesão (SELLARDS *et al.*, 2002) e cirurgião qualificado.

Os procedimentos cirúrgicos atualmente em uso para o tratamento das lesões cartilaginosas podem ser divididos em quatro modalidades:

- ✓ Lavagem com ou sem desbridamento;
- ✓ Procedimentos de estímulo da medula do osso subcondral (raspagem, furação e microfraturas;
- ✓ Reparo pela utilização de células ou tecidos e,
- ✓ Reparo pela utilização de suportes biológicos e fatores de crescimento.

Métodos como lavagem e desbridamento têm mostrado capacidade em promover alívio dos sintomas durante um período de tempo, produzindo um efeito paliativo. Os procedimentos de estímulo da medula do osso subcondral procuram induzir as células com potencial condrogênico e osteogênico disponíveis no sítio da lesão a produzir um tecido de reparo funcional. As três técnicas mais populares de estímulo da medula do osso subcondral são a artroplastia abrasiva, a perfuração subcondral e a microfratura. Embora cada técnica tenha certas vantagens e desvantagens, o tecido de reparo formado tem características semelhantes. Por natureza é um tecido fibrocartilaginoso que eventualmente cede sob estresse crônico (D'LIMA e COLWELL, 2001).

Com a evolução das pesquisas, surgiram as técnicas que envolvem o transplante de tecido cartilaginoso. O transplante osteocondral autógeno é outra opção utilizada nos defeitos osteocondrais. Envolve o transplante de um enxerto osteocondral de uma região da articulação no sentido de restaurar o sítio de lesão. Evidências experimentais indicam que a porção óssea do enxerto permite a cicatrização preservando a zona calcificada e o osso

esponjoso. Este procedimento é limitado pela quantidade de sítios doadores, sendo indicado em pacientes com defeitos focais e não muito profundos. O enxerto osteocondral alógeno envolve o transplante de cartilagem hialina madura obtida de cadáveres, podendo ser utilizado em lesões mais extensas e profundas. O aloenxerto fresco é preferível ao congelado, já que viabilidade dos condrócitos é crítica para a produção de matriz extracelular. A possibilidade de reação imune e o risco de transmissão de doenças continuam constituindo as maiores desvantagens desta técnica (SELLARDS *et al.*, 2002).

Atualmente, encontra-se tal amontoado de abordagens e propostas terapêuticas que se torna difícil definir qual seja a melhor. Sendo assim, este é um tema amplamente discutido na literatura por meio de vários estudos e pesquisas. O principal desafio é a escolha do material (biomaterial) que mimetize o tecido vivo, de modo que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agente agressor ao seu meio.

Com o presente estudo, buscou-se uma proposta inovadora e original no uso de um biomaterial composto e o desenvolvimento de uma cartilagem artificial. Assim, neste trabalho, as alterações na cartilagem articular foram substituídas por um material composto confeccionado em poliuretano e microfibras de biovidro com finalidade biomimética mecânica da cartilagem articular, o que proporcionou amostras dos possíveis efeitos osteocondrais ocasionados em implantes efetuados em joelhos de coelhos.

Neste trabalho foi investigada a toxicidade dos materiais constituintes através de testes *in vitro* com cultura de células VERO para observação da influência do novo material em atividades celulares e o comportamento destes em condições próximas daquelas a serem encontradas no ambiente de implantação. A caracterização da superfície deste material foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM).

Os testes *in vivo* foram realizados com o intuito de averiguar a interação tecido-material (bioatividade), biocompatibilidade do material e a potenciabilidade do uso do material em aplicações a superfícies (osteointegração). A análise histológica dos tecidos explantados foi elaborada para análise da morfologia geral dos componentes teciduais encontrados junto ao implante.

Este trabalho tem como objetivo geral propor o desenvolvimento de um substituto de cartilagem artificial que aja como coxim elástico, e que apresente características de gel fibro-reforçado com finalidade biomimética mecânica e imite o comportamento da cartilagem articular, onde a integridade da rede macromolecular que forma a matriz extracelular é realizada pelo poliuretano responsável pelo comportamento elasto-plástico e pelas microfibras de biovidro 45S5 que proporciona a resistência mecânica.

Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar o desempenho biológico e mecânico do implante composto por poliuretano e microfibras de biovidro no reparo de lesões osteocondrais na região intercondiliana (sulco troclear) no joelho de coelhos;
- ✓ Avaliar a superfície dos implantes em relação à cartilagem adjacente e,
- ✓ Estudar as relações matriz/reforço que produzem compósitos com melhor bioatividade e propriedades mecânicas adequadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cartilagem Articular

Cotran (2001) define a cartilagem hialina como um tecido denso, translúcido, de consistência firme com aspecto macroscópico branco-azulado, situado principalmente nas extremidades dos ossos longos que compõem as articulações diartrodiais. Segundo Bojrab (1996), nos mamíferos, a espessura média da cartilagem hialina é de 5 mm, sendo que esta medida varia em função da espécie, da articulação avaliada e da região onde se efetua a mensuração (Figura 1).

Figura 1 - Cartilagem articular do joelho. (www.core.med.br/pag4.cfm).

A cartilagem articular é uma estrutura complexa que tem como funções a absorção de choque e distribuição da carga recebida sobre o osso subcondral. Isso ocorre porque a sua constituição cria um ambiente intra-articular de baixo atrito, com lubrificação, o que possibilita movimentos articulares repetitivos, indolores por até oito décadas, ou mais, em seres humanos (BUCKWALTER, 2000). A nutrição da cartilagem articular provém do líquido sinovial que é produzido pela membrana sinovial e, em menor grau, da difusão de substratos sanguíneos que cursam através do osso subcondral. O líquido sinovial também é responsável pela lubrificação das superfícies deslizantes (SOUZA *et al.*, 2001). As lesões superficiais da cartilagem articular, que não envolvem o osso subcondral, possuem pouca

capacidade intrínseca de reparação, por se tratar de um tecido desprovido de irrigação sangüínea e, portanto, dependente da vascularização proveniente da medula óssea para que ocorra migração de células mesenquimais, responsáveis pelo processo de cicatrização (SOUZA *et al.*, 2001; LAMMI *et al.*, 2001).

A cartilagem articular é hiperhidratada (conteúdo de água variando de 66 a 80%), com 20-34% de sólidos dos quais, 5-6% são componentes inorgânicos (principalmente a hidroxiapatita) e do restante orgânico, 48-62% é formado por colágeno tipo II e 22-38% por proteoglicanos. A rigidez e elasticidade do tecido cartilaginoso são resultado da relativa incompressibilidade das moléculas de proteoglicanas. As fibrilas colágenas paralelas subjacentes e a superfície articular formam uma camada estável limitadora, que distribui as forças de compressão. As fibrilas da camada basal da cartilagem ficam perpendiculares à superfície e servem como âncora fixando a cartilagem descalcificada à zona calcificada e ao osso subcondral. Nas zonas intermediárias as fibrilas se dispõem mais ao acaso. As fibras oblíquas provavelmente assistem na resistência a tensões (BRANDT e MANKIN, 1993). A Figura 2 mostra a composição da cartilagem articular.

Figura 2: Composição da cartilagem hialina (GARRIDO, 2007).

Sendo a cartilagem articular um tecido avascular, a nutrição dos condrócitos ocorre por difusão, ou seja, a partir do líquido sinovial, passando pela matriz extracelular, até atingir os condrócitos. A cartilagem possui cerca de 10% de condrócitos. De acordo com Buckwalter (2000) em animais jovens a linha de crescimento que separa o tecido ósseo do tecido cartilaginoso ainda não está calcificada e, desse modo, é possível que a nutrição dos condrócitos ocorra também a partir do osso subcondral.

Os condrócitos são responsáveis pela síntese dos inúmeros componentes da matriz, bem como por substâncias que a degradam. Comparativamente, estas células podem ser

metabolicamente mais ativas do que um macrófago. Possuem uma taxa glicolítica similar às células de outros tecidos vascularizados. Estas células variam em tamanho, forma e atividade metabólica nas diferentes camadas do tecido. Todas contêm as organelas para a síntese de matriz incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Frequentemente possuem filamentos intracitoplasmáticos, lipídeos, glicogênio e vesículas secretoras. Algumas células possuem cílios estendendo-se à matriz. Os condrócitos envolvem-se de matriz extracelular e não mantêm contato célula-célula. Na cartilagem de adultos, os condrócitos raramente se dividem. Com a idade, a densidade de condrócitos declina principalmente nas camadas superficiais. Sua capacidade de resposta biológica diminui, aumentando a probabilidade de degeneração (BRAY *et al.*, 1996).

A matriz é composta por líquido tissular e uma rede estrutural de moléculas que conferem ao tecido forma e estabilidade. O líquido tissular é composto por água, gases, pequenas proteínas, metabólitos e alta concentração de cátions para contrabalançar os proteoglicanos carregados negativamente. As macromoléculas estruturais respondem por 20% do peso total do tecido. Deste percentual, o colágeno corresponde a 60%, proteoglicanos a 25% a 35% e proteínas não colágenas e glicoproteínas a 15% a 20%. A cartilagem articular contém múltiplos tipos geneticamente distintos de colágeno, especificamente tipos II, VI, IX, X e XI. A organização destas fibrilas em uma forte rede que se estende por todo o tecido confere sua forma e resistência tênsil. O colágeno tipo II possui uma vida média de trezentos dias e está presente em maior quantidade na cartilagem articular normal (CHAMBERS *et al.*, 2002).

Quanto a organização da cartilagem articular, esta pode ser subdividida para fins didáticos, em quatro zonas distintas (TEMENOFF e MIKOS, 2000; PIERMATTEI, 2006), sendo elas:

Zona superficial. Camada mais fina e compõe 10% da cartilagem; encontra-se na superfície articular. É acelular, apresenta grandes fibrilas colágenas intimamente agregadas (tangenciais à superfície articular) e escassez de proteoglicanos. Essa orientação colágena tem como função uma maior resistência às forças de cisalhamento. Aprofundando a camada celular, mas ainda considerada parte da camada superficial as células são achatadas e elipsóides. Elas degradam proteoglicanos mais rapidamente e sintetiza menos colágeno e proteoglicanos que as camadas mais profundas. A matriz tem alta concentração de colágeno e pequena concentração de proteoglicanos como consequência do metabolismo celular. Na periferia os componentes fibrosos se fundem ao periósteo fibroso do osso adjacente.

Zona de transição ou média. Localizada abaixo da camada superficial. É muito maior que a zona superficial e compõe aproximadamente 40-60% da espessura total. Os

condrócitos têm forma arredondada e sua matriz tem fibrilas colágenas de maior diâmetro, mas em menor concentração que na camada superficial. As fibrilas colágenas não são paralelas, mas anguladas em diferentes direções. Esse arranjo angulado permite o colágeno resistir melhor às cargas compressivas. Elas formam um invólucro em forma de rede ao redor das células. Essa zona tem maior concentração de proteoglicana com menor conteúdo de água.

Zona profunda. Essa camada equivale a 30% da espessura total da cartilagem. Nela as fibrilas de colágeno do tipo II também apresentam grande diâmetro, porém nessa camada elas estão organizadas e dispostas perpendicularmente à superfície articular. Os condrócitos são arredondados e em maior número que na zona de transição. Além disso, na zona profunda há maior concentração de proteoglicanos e menor teor de água, especialmente na sua camada mais profunda.

Zona calcificada. É uma fina zona de cartilagem calcificada que reside próximo ao osso subcondral e atua como uma suave transição da cartilagem hialina ao osso. Os condrócitos são pequenos e irregulares, com quase nenhum retículo endoplasmático. Em alguns lugares, eles parecem estar completamente cercados por matriz extracelular calcificada, indicando que apresentam muito pouca atividade metabólica. Por ser calcificada, ela é menos elástica que o restante da cartilagem hialina e menos rígida que o osso subcondral, transferindo assim de forma mais suave as solicitações mecânicas da cartilagem articular ao osso subcondral.

A Figura 3 ilustra a disposição das zonas superficial, transição ou média, profunda e calcificada da cartilagem articular do joelho de cão.

Figura 3: Apresentação de um corte histológico de cartilagem articular de joelho de cão (GARRIDO, 2007).

A matriz extracelular da cartilagem pode ser subdividida em 3 regiões (pericelular, territorial e interterritorial), dispostas ao redor do condrócito. Estas regiões diferem entre si em função do conteúdo, diâmetro e organização das fibras de colágeno (GARRIDO, 2007).

Região pericelular: circunda o condrócito e é formada por proteoglicanos e poucas fibrilas de colágeno.

Região territorial: circunda a região pericelular e é constituída por finas fibrilas de colágeno, que formam uma rede.

Região interterritorial: é a maior das regiões e contribui com a maior parte das propriedades mecânicas e a maioria dos proteoglicanos (BUCKWALTER, 2000).

2.2 Classificação dos Defeitos da Cartilagem Articular

Sellards *et al.*, (2002) descrevem a classificação de Outerbrigde para defeitos articulares de acordo com a profundidade da lesão. Essa classificação, conforme a Figura 4 são: grau 0 - normal, grau I - lesão articular branda, grau II - são lesões caracterizadas por fibrilação, com fissuras menor que 1,5 cm, grau III - lesões com fissuras profundas até o osso subcondral e grau IV - lesões diferenciadas por expor o osso subcondral (Mandelbaum *et al.*, 1998, Hunziker, 2001). A Figura 4 ilustra esses defeitos articulares.

Figura 4: Classificação dos defeitos articulares (BITTENCOURT, 2008).

2.2.1 Lesão e Reparo da Cartilagem Articular

A degeneração da cartilagem articular é multifatorial. A resultante da ação degenerativa desta cartilagem é a incapacidade física temporária ou permanente. Inúmeras doenças podem provocar tais acometimentos, desde microorganismos (tuberculose, sífilis, etc.) até lesões secundárias aos processos inflamatórios como doença reumática e artrite reumatóide além das causas degenerativas (osteoartrose), afecções traumáticas e doenças metabólicas (gota, ocrinose - doença caracterizada pela coloração marrom-escuro de certos tecidos ricos em fibras conjuntivas, mais particularmente das cartilagens e dos tendões, etc.) (LEMOS *et al.*, 2000).

O fenômeno de cicatrização tecidual pode ser dividido em três fases naturais: necrose, inflamação e reparação. Os autores salientam que uma lesão restrita às camadas superficiais da cartilagem (defeito condral) não obedece inteiramente às três fases, justamente pela natureza avascular da cartilagem hialina. Por outro lado, na presença de um defeito osteocondral, com exposição do osso subcondral, todas as três fases ocorrem naturalmente (RIBEIRO *et al.*, 2004).

O comportamento da lesão condral difere do comportamento da lesão osteocondral. O autor define três classes de lesões condrais e osteocondrais: (1) defeito de espessura parcial com a base composta por cartilagem; (2) defeito de espessura total, não ultrapassando o limite do osso subcondral; e (3) defeito osteocondral, que ultrapassa o limite do osso subcondral (O'DRISCOLL, 2001).

Existem alguns tratamentos para recompor a cartilagem articular lesada devido a uma doença ou trauma, como por exemplo, a perfuração ou microfratura do osso subcondral ou artroplastia de abrasão, que promovem a formação de uma cartilagem fibrosa com propriedades distintas do tecido hialino original. No entanto, este mecanismo de reparo tem duração limitada (BENTLEY e MINAS, 2001; WROBLE, 2000).

Na maioria das situações clínicas, a articulação pode reparar a lesão que não perturbe a integridade da superfície articular. Uma interrupção mecânica da superfície da cartilagem estimula a atividade de síntese condral, mas raramente resulta em reparo da lesão. Nas lesões osteocondrais, por sua vez, pode ser observado um mecanismo de estímulo para o reparo ósseo e condral, mas incapaz de reproduzir as propriedades mecânicas e biológicas da cartilagem articular normal (BUCKWALTER, 2002).

Os tratamentos para osteoartrose severa incluem a substituição da superfície articular degenerada por uma prótese artificial ou substituição da articulação. Entretanto, esses tratamentos são indicados geralmente a indivíduos com idade acima de 60 anos e menos indicado para indivíduos com idade inferior a 50 anos, devido ao limite de duração dessas próteses (BRITTBERG *et al.*, 1994).

Um dos maiores avanços no campo da engenharia tecidual e dentro da medicina ortopédica tem sido a produção de cartilagem articular “*in vitro*”, retirada do próprio paciente, para a realização de implante autólogo de condrócitos (IAC), com intuito de regenerar o tecido cartilaginoso lesado. Esta possibilidade de isolar células do próprio paciente para posteriormente implantá-las em terapia celular, pode resolver um dos maiores problemas desse tratamento: a rejeição imunológica de tecidos e órgãos (CARVALHO, 2001). No caso do implante de cartilagem articular autóloga a ação imediata é a restauração da função da articulação lesada e evitar possivelmente doenças como osteoartrose (BENTLEY e MINAS, 2001).

A medicina ortopédica tem focado o seu estudo na regeneração da cartilagem articular, com ou sem lesão do osso subjacente. Acreditava-se há pouco tempo que a cartilagem articular possuía pequena capacidade de regeneração em resposta a diferentes tipos de lesão. No entanto, a literatura vem demonstrando que a cartilagem é um tecido metabolicamente ativo e apresenta capacidade de resposta a alguns estímulos, melhorando seu processo de reparo (Mc DEVITT e MUIR, 1976; MITCHELL e SHEPARD, 1975; SALTER *et al.*, 1975). O reparo ocorre pela substituição de fibrocartilagem ou, mais raramente, pela indução de mitoses nas células da cartilagem articular (MANKIN, 1982). Entre os métodos usados para estimular a reparação cartilaginosa, encontram-se as perfurações até o osso subcondral (MITCHELL e SHEPARD, 1975; VACHON *et al.*, 1986), estímulo da movimentação passiva imediatamente após a lesão (SALTER *et al.*, 1975; SALTER *et al.*, 1980), exposição da articulação a cargas elétricas (Mc DEVITT e MUIR, 1974), hormonioterapia (SALTER *et al.*, 1975) e a laserterapia (BOROVOY *et al.*, 1989; HARDIE, CARLSON e RICHARDSON, 1989; SCHULTZ *et al.*, 1985).

Quando ocorrem danos, a cartilagem articular possui uma capacidade limitada para recomposição devido à ausência de vascularização, que permitiria que as células progenitoras do sangue ou da medula entrem no tecido lesado. Essa limitação levou pesquisadores e clínicos a desenvolverem métodos cirúrgicos para restaurar a superfície da cartilagem. Alguns bons resultados foram obtidos com a utilização de abordagens que dependem da penetração mecânica da medula óssea subcondral para estimular a vascularização no interior da lesão, tais como os enxertos no periósteo e pericôndrio ou os transplantes autólogos de condrócitos. Infelizmente, nenhuma dessas abordagens tem prestado uma completa e reprodutível solução para este problema. As últimas estratégias dependem de terapias baseada em células, que estão atualmente em desenvolvimento ou em estágios iniciais e envolvem biomateriais que tem sido cultivado com condrócitos ou células progenitoras e/ou fatores condrogênicos (VINATIER *et al.*, 2009).

Várias estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas para reparar danos da cartilagem articular. A mais popular dessas estratégias são a microfratura, a mosaicoplastia e o transplante autólogo de condrócitos (HUNZIKER, 2002). Observou-se, no entanto, que nessas práticas o defeito da cartilagem é preenchido não por cartilagem hialina, mas por fibrocartilagem, rica em fibras colágenas tipo I, com propriedades biomecânicas diferentes da cartilagem hialina articular original. Atualmente, existe uma tendência em se indicar esse procedimento para pacientes com idade acima de 40 anos, com múltiplas lesões, ou atletas de alta demanda com lesões pequenas, menores que 1cm².

As lesões focais da cartilagem articular requerem tratamento cirúrgico que vão desde métodos clássicos de estimulação da medula óssea como desbridamento, perfurações múltiplas, abrasões, microfaturas, bem como métodos biológicos modernos como transplantes periosteais e pericondrais, implante autólogo condrócitos de cultivados (IAC) e enxertos autólogos osteocondrais (HUNZIKER, 2001; SHAH *et al.*, 2007; RIBEIRO, CAMANHO e TAKITA, 2004).

Para a realização de um implante autólogo de condrócitos (IAC), a cartilagem das margens da articulação do joelho, por exemplo, é colhida através de artroscopia, como mostra a Figura 5. Posteriormente, os condrócitos são cultivados durante quatro semanas, e depois são transplantados na área lesada. As células são sustentadas por uma membrana de perióstio retirada da parte superior do osso tíbia. Esta membrana é suturada sobre o defeito da cartilagem, antes da injeção dos condrócitos isolados (BENTLEY e MINAS, 2001; BRITTBERG *et al.*, 1994). Recentemente tem-se usado no lugar do perióstio a cola de fibrina (SHAH *et al.*, 2007). Bittencourt (2008) relata que a mais popular terapia baseada na cultura de condrócitos para uso em implantes autólogos de condrócitos é a Carticel® (Genzyme Biocirurgia, EUA e Europa). Em avaliações clínicas de pacientes tratados com Carticel® após 24 a 36 meses, 85% tiveram uma melhora no defeito do côndilo femoral após 36 meses de evolução. Os custos dos procedimentos de IAC utilizando Carticel® variam de US\$17.000,00 a US\$38.000,00 dólares, com uma média de US\$26.000,00 por procedimento.

Figura 5: Implante autólogo de condrócitos (BITTENCOURT, 2008).

Brittberg e colaboradores (1994) *apud* Bittencourt (2008) foram os pioneiros na realização do implante de condrócitos autólogos em humanos, obtendo resultados satisfatórios no tratamento de pacientes com lesões no côndilo femoral. No entanto o procedimento é considerado eficiente para o tratamento de condromalácia patelar, somente. As explicações mais prováveis para o sucesso do processo de reparação da cartilagem articular através do IAC conforme Fernandez *et al.*, (1997) são as seguintes:

- ✓ Os condrócitos transplantados repopulam a área da lesão e sintetizam a matriz cartilaginosa; o periósteo sela o defeito;
- ✓ O periósteo estimula a replicação dos condrócitos cultivados e implantados;
- ✓ O periósteo e os condrócitos implantados estimulam os condrócitos da cartilagem adjacente ou as células das camadas calcificadas mais profundas da cartilagem articular a entrarem na área defeituosa, dividirem-se e reparar o defeito. Recentemente tem-se usado no lugar do periósteo a cola de fibrina (SHAH *et al.*, 2007).

De acordo com os dados de Wroble (2000) cerca de 80% dos pacientes seguidos num período de 5 a 10 anos após o IAC, tiveram bons ou excelentes resultados. Complicações referentes à adesão ou a artrofibrose foram encontrados em 5% deles. Houve registro de falha no transplante em 2% dos pacientes.

Outerbridge e colaboradores (1995) foram os primeiros a relatarem a técnica que envolve o enxerto autólogo osteocondral (EAO). A Figura 6 mostra a técnica de enxerto autólogo osteocondral. Esta técnica é baseada na transferência de fragmentos de cartilagem de áreas do joelho onde não há desgaste e sobrecarga e implante em áreas de lesão.

Figura 6: Enxerto autólogo osteocondral (EAO) (BITTENCOURT, 2008).

Outra metodologia é o enxerto alogênico osteocondral, freqüentemente as amostras são obtidas de cadáveres podendo causar reações imunológicas (HUNZIKER, 2001).

A primeira técnica envolve a retirada de um bloco de tecido cartilaginoso junto ao tecido ósseo e inserção direta no defeito articular e a segunda envolve processo semelhante, porém com inserção através de paliçadas. São procedimentos indicados para pacientes jovens, com grandes defeitos (1 a 4 cm²).

Uma nova técnica desenvolvida na escola sueca de Gothenburg aparenta ser promissora no tratamento de defeitos cartilagosos. Trata-se da cultura de condrócitos, onde nesta técnica, um fragmento de cartilagem é retirado de uma área sadia; faz-se um tratamento e crescimento celular em laboratório por determinado período e, estas células cultivadas, são reimplantadas no defeito cartilaginoso e recobertas por um camada de periósteo, a membrana que envolve o osso conforme ilustra a Figura 7. Os resultados em curto prazo têm se mostrado excelentes no alívio de dores e retorno dos pacientes às atividades esportivas e demonstram que, a chave para a cura da lesão cartilaginosa seja a manipulação direta da célula, possivelmente através do trabalho em células-tronco, ou da clonagem tecidual. Segundo Cohen *et al.*, (2008) esta técnica possibilita a regeneração da cartilagem hialina lesada, restaurando a biomecânica articular.

Figura 7: Transplante de condrócitos.

2.3 Propriedades Mecânicas da Cartilagem Articular

De uma forma geral, as funções principais da cartilagem articular são as de absorver o choque e distribuir a carga ao longo da superfície articular durante a descarga de peso e permitir o deslizamento livre e suave dos movimentos da articulação. O que permite que isso ocorra é a composição, a organização, o sistema de expansão e contrabalanço existente em sua matriz extracelular e sua superfície lisa deslizante com baixo coeficiente de atrito (TUREK, 1999; FELICE *et al.*, 2002; ANGEL *et al.*, 2003).

A orientação espacial do colágeno associada às propriedades e concentrações de proteoglicanos tem implicações biomecânicas. Quando não há carregamento na cartilagem, o fluido preenche a matriz se espalhando através da cartilagem por todo o seu espaço. Entretanto, quando a articulação é submetida a um carregamento, a cartilagem é comprimida e sua rigidez e resiliência ficam dependentes exclusivamente da força das macromoléculas. Todavia, a permeabilidade da cartilagem permite que haja uma quantidade apropriada de fluido para permitir uma maior resistência na absorção do choque quando submetido a cargas mecânicas. Com o tempo, a carga cíclica enfraquece a superfície da cartilagem articular e reduz sua permeabilidade, impedindo o controle do escoamento de fluidos. A cartilagem articular passa a contar somente com a força mecânica das macromoléculas como única opção das forças articulares (WHITING e ZERNICKE, 2001).

A pressão de contato diretamente na superfície articular nunca é harmônica no arco de movimento normal da articulação. O carregamento varia topograficamente; ou de algumas áreas recebem cargas maiores. Portanto, a significância desse carregamento vai depender da sua quantidade e da área da superfície para qual está sendo transmitida. Há áreas mais macias que outras (ANGEL *et al.*, 2003).

A cartilagem articular lesada apresenta um aumento de sua maciez. Ao se aplicar a mesma carga compressiva em uma cartilagem fibrilada e em uma normal, a fibrilada apresenta maior maciez e maiores reentrâncias que a cartilagem normal. Assim como as forças compressivas, as forças de cisalhamento aplicadas em uma cartilagem macroscopicamente e histologicamente lesada resultam em maior deformação, quanto mais macia e mais fraca for essa superfície. Entretanto, a diferença no tamanho da deformação diminui muito quando são testadas amostras das camadas mais profundas. O conteúdo do colágeno tem relação direta com a rigidez tênsil da cartilagem. O mais importante é a orientação dessas fibras em direção paralela. Em maiores profundidades, não há significância entre conteúdo de colágeno e rigidez em relação às forças tensivas. A orientação perpendicular das fibras, em relação à superfície articular, é significativamente mais fraca que a orientação paralela. Já com relação às glicosaminoglicanos (GAGs), foi

estabelecido um coeficiente de correlação significativo entre a compressão e sua concentração. Quanto maior a concentração de glicosaminoglicanos, mais rígida é a cartilagem (AROKOSKI *et al.*, 2000; Angel *et al.*, 2003).

Athanasiou *et al.*, (1991) descrevem que os valores típicos do módulo elástico para cartilagem ocupam a faixa de 0,5 a 0,90 MPa e se diferencia do módulo da cartilagem agregada, que é aquela onde o tecido está em equilíbrio, ou seja quando cessa todo o fluxo de fluido, estes valores encontram-se na faixa de 0,45 a 0,80 MPa.

2.4 Defeitos osteocondrais

O processo de reparação de defeitos osteocondrais produzidos artificialmente é uma forma de se estudar e de se entender o processo de cicatrização da cartilagem articular. Os defeitos osteocondrais podem se auto-reparar e isso depende do animal, dimensão e localização do defeito. Sendo assim, para o estudo de procedimentos de materiais que possam substituir o tecido cartilaginoso na sua função, é necessário que se testem materiais e procedimentos em defeitos osteocondrais produzidos artificialmente (GARRIDO, 2007).

Entre os diferentes procedimentos estudados citam-se os auto-enxertos, aloenxertos (TOOLAN, 1998), transplante de células e o estímulo do crescimento dos tecidos a partir da região vascularizada abaixo da cartilagem, ou seja, o osso subcondral. Nestes casos, estes procedimentos envolvem o reparo de um defeito osteocondral, ou um defeito que atinge a cartilagem articular e o osso subcondral (BAVARESCO, 2000).

A Tabela 1 ilustra as vantagens e as desvantagens dos tratamentos que visam reparar lesões na cartilagem articular.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos tratamentos que visam reparar lesões na cartilagem articular (BITTENCOURT, 2008).

Tratamento	Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Microfratura 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo alto; • Técnica aplicável. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não produz cartilagem articular hialina confiável.
<ul style="list-style-type: none"> • Enxerto osteocondral autólogo 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta taxa de sobrevida dos condrócitos na articulação; • Características de tecido cartilaginoso hialino. 	<ul style="list-style-type: none"> • Morbidade da área doadora; • Reabilitação a longo prazo; • Lesão na superfície articular devido ao implante dos fragmentos levando aos processos de inflamação e restrição na mobilidade da articulação.
<ul style="list-style-type: none"> • Enxerto osteocondral alogênico 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta taxa de sobrevida dos condrócitos na articulação; • Características de tecido cartilaginoso hialino. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reações imunológicas e transmissões de doenças; • Problemas na fixação e viabilidade celular; • Reabilitação longa; • Lesão na superfície articular devido ao implante dos fragmentos levando aos processos de inflamação e restrição na mobilidade da articulação.
<ul style="list-style-type: none"> • Implante autólogo de condrócitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Característica de tecido cartilaginoso hialino de reparo; • Implante de células autólogas; • Um ano de tratamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Atividades restritas durante um ano para permitir a integração das células; • Custo alto; • Realização de dois procedimentos cirúrgicos.

2.5 Origem dos Biomateriais

Em antigos textos orientais de Medicina, já se encontrava provas detalhadas da utilização de materiais como ouro, marfim, madeira e pedras preciosas em reimplantes de dentes e a recolocação de algumas partes ósseas. No ano de 2500 a.C. essa prática era muito comum entre os povos egípcios, chineses, romanos e astecas. No início do século VIII, na América Central, os maias talvez tenham sido os pioneiros no uso de implantes aloplásticos, mas foi somente em 1860 na Europa que um médico desenvolveu as técnicas de esterilização e assepsia gerando as condições ideais que possibilitaram o uso de implantes aloplásticos (BAVARESCO, 2000).

Após algum tempo, esses materiais foram substituídos por tecidos de origem animal, já que na Inglaterra em 1865, Charles Allen, se declarava contra os transplantes entre humanos (autólogos), pois esse tipo de procedimento envolvia razões sociais, uma vez que as famílias pobres trocavam seus órgãos e dentes com famílias ricas por alimento.

Paiva (2005) descreve que o primeiro relato de um implante não orgânico enxertado em osso humano, endosteal aloplástico (material inorgânico), datada de 600 d.C. Este implante era de uma mandíbula encontrada em 1931 em Honduras, na qual havia três fragmentos de concha do mar no lugar dos incisivos inferiores.

Ring (1998) concluiu após investigações radiográficas concluiu que, devido à osteointegração entre o implante e o osso, os implantes haviam sido implantados em paciente vivo. A Figura 8 apresenta uma imagem desse implante ou parte dessa mandíbula. Hoje os enxertos aloplásticos são extensivamente estudados.

Figura 8: Mandíbula com três pedaços de conchas do mar implantadas (PAIVA, 2005 *apud* RING, 1998).

Na modernidade, as primeiras tentativas de emprego dos implantes aloplásticos endósseos foi feita por Maggiolo, no ano de 1807, quando ele idealizou uma raiz dentária metálica de ouro que serviria de sustentação de um dente a pivô. A partir daí, no mundo moderno, inúmeros outros tipos de materiais (platina, porcelana, cromo-cobalto, tântalo, titânio, vitallium, biovidros, etc) foram utilizados no reparo de partes ósseas do corpo humano. A partir desse pioneiro, as pesquisas referentes à obtenção de materiais para a fabricação de implantes foram fortemente estimuladas pela necessidade de minimizar danos físicos causados por conflitos militares (BAVARESCO, 2005).

2.6 Biomateriais

Williams (1987) definiu os biomateriais como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias farmacologicamente inertes, de natureza sintética ou natural, que

são utilizadas para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente os tecidos e órgãos.

O aprimoramento técnico-científico na área médica faz-se necessário devido à busca incansável do ser humano pela longevidade e por padrões de vida superiores, o que gera a necessidade de alternativas para reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas, patologias, fraturas, dentre outros (PEREIRA, CLARK e HENCH, 1994). Devido a problemas como disponibilidade limitada, dificuldades de armazenamento e um tempo cirúrgico maior dos enxertos autógenos e alógenos, os pesquisadores buscam materiais sintéticos que facilitem a reparação óssea visando o restabelecimento rápido das funções fisiológicas (BORGES *et al.*, 2000).

Durante muitos anos diversos materiais foram utilizados como biomateriais, por exemplo, a madeira. No entanto, no ano de 1937, o polimetilmetacrilato (PMMA), um polímero, foi introduzido na odontologia. Com o uso deste material sintético deu-se início a uma nova era de biomateriais, abrindo o leque de alternativas de tratamento. O termo biomateriais foi utilizado, de fato, pela primeira vez somente na década de 60 e no fim desta aconteceu o primeiro simpósio de biomateriais (RATNER, 1996)

Um número cada vez maior de pessoas e animais sofre de afecções ósseas e necessita de intervenções cirúrgicas e os grandes defeitos ósseos resultantes dessas afecções neoplásicas, congênitas, infecciosas e traumáticas representam os maiores desafios para os cirurgiões (EID *et al.*, 2001; XYNOS *et al.*, 2001). Tais problemas geram contínua demanda por substitutos ósseos eficientes nas cirurgias ortopédicas, craniomaxilofaciais, plásticas reconstrutivas e odontológicas (SHAPOFF, ALEXANDER, CLARK, 1997; ILAN e LADD, 2003; ELBATAL, AZOOZ e KHALI, 2003).

Numerosos materiais têm sido desenvolvidos para tentar solucionar esses problemas, sendo alguns utilizados para corrigir defeitos ósseos e outros para fabricar ou recobrir próteses (KARATZAS *et al.*, 1999; EID *et al.*, 2001). Dentre os materiais, os sintéticos ou implantes atualmente vêm ganhando mais aceitação, já que são substâncias que podem ser fabricadas em quantidade ilimitada, são imunologicamente inertes e bem tolerados pelo organismo (PIECUCH, 1982; HATTAR *et al.*, 2005).

O conceito dos biomateriais está vinculado às mudanças nos conceitos e aplicações destes no decorrer dos anos. No princípio, os órgão e membros eram simplesmente extirpados. Atualmente, após o desenvolvimento dos transplantes, enxertos e implantes, a substituição tecidual é o tratamento de eleição. A regeneração tecidual vem ganhando espaço como alternativa de tratamento com o desenvolvimento da engenharia de tecidos e dos materiais bioativos. Futuramente, o tratamento de diversas afecções será realizado através da regeneração tecidual (PAIVA, 2005).

Os biomateriais tem tido diversas aplicações como: biosensores, implantes, liberação controlada de drogas, lente intraoculares, entre outros. A cada ano são desenvolvidos novos biomateriais com o intuito de oferecer outras opções de tratamento para diversas enfermidades. Devido à mudança no conceito de desenvolvimento de biomateriais a grande maioria dos novos materiais é voltada para a regeneração tecidual. A engenharia de tecidos tem mostrado grandes avanços na criação de tecidos retirados do próprio paciente, os quais são cultivados em meios específicos e em seguida são novamente reimplantados auxiliando a reparação tecidual. Os materiais bioativos são aqueles que, quando implantados, têm a capacidade de induzir a formação de tecido sadio em locais onde a reparação natural seria impraticável ou dificultada, portanto são classificados como materiais para regeneração tecidual (PAIVA, 2005).

O desenvolvimento dos biomateriais envolve profissionais de diversas áreas da Ciência. Portanto, a multidisciplinaridade é uma necessidade do desenvolvimento de novos biomateriais. Devido à expansão na utilização de biomateriais, avanços na medicina e em técnicas cirúrgicas resultaram na interação de diversos profissionais como médicos, engenheiros, fisioterapeutas, biólogos, entre outros (ZAVAGLIA, 1993).

Um dos aspectos importantes na escolha de um material para implantes é a sua compatibilidade com o corpo humano. Os materiais devem possuir boas propriedades mecânicas, ser inerte ou bioativo. A escolha de um material sintético alternativo para a confecção de um implante constitui-se de um processo criterioso. Devem-se levar em consideração as propriedades mecânicas, físicas, químicas para garantir não somente a resistência estrutural do implante, mas também a compatibilidade com os tecidos do corpo humano. No entanto, os materiais utilizados em implantes deverão ser biocompatíveis, ou seja, não deverão causar reações incontroláveis e as possíveis reações induzidas e os produtos de desgaste, corrosão e dissolução deverão ser tolerados pelo organismo implantado. Os implantes deverão possuir interface equivalente ao tecido hospedeiro e a resposta do material aos estímulos físicos deve corresponder ao tecido substituído (WREGE, 2000).

Todos os materiais existentes, de um modo geral, são classificados em cerâmicos, metálicos, poliméricos e compósitos. No entanto, para aplicação em implantes, os materiais podem ser divididos de outra forma dependendo da interação com o meio fisiológico, quando aplicados na engenharia de tecidos. Nesta, segundo Camilo (2006) os biomateriais podem ser classificados pela origem e pelas aplicações a que se destinam, sendo esta última geralmente dividida em três grupos: substituição de tecidos moles, substituição de tecidos duros e materiais para o sistema cardiovascular (Figura 9).

É importante ressaltar que os enxertos ósseos são classificados de acordo com a diferença genética existente entre os organismos doadores e receptores, sendo classificados em autógenos ou autólogos (quando compostos por tecido do próprio doador), homogêneos ou homólogos ou alógenos (obtidos de outro indivíduo da mesma espécie que o receptor) e heterôgenos ou heterólogos ou xenôgenos (retirados de seres de uma espécie diferente do receptor (LANCE, 1985). Um biomaterial ou material aloplástico significa um material sintético ou orgânico modificado em laboratório (MELLONIG, 1998).

Figura 9: Classificação dos materiais para implante relativamente à interação com o meio fisiológico (CAMILO, 2006).

2.6.1 Enxertos Ósseos autógenos ou autólogos

Os enxertos ósseos autógenos ou autólogos têm a inconveniência da morbidade cirúrgica da fonte doadora, além da sua disponibilidade limitada de material (CALIXTO, *et al.*, 2001). Como exemplo, cita-se o osso esponjoso, que além de fornecer fatores de indução óssea, possui estrutura porosa favorecendo o crescimento vascular e osteogênico em seu interior (CAMILO, 2006).

O osso autógeno pode ser empregado de três formas principais: enxerto membranoso, cortical, vascularizado ou misto. O osso membranoso é derivado embriologicamente de centros de ossificação como na calota craniana e na mandíbula. Tem grande poder osteogênico, osteoindutivo e osteocondutivo, não sofre grande absorção, mas também não exerce suporte mecânico. O osso cortical é derivado da calcificação endocondral, sendo encontrado nos ossos longos, possuindo uma porção de osso medular entre as duas lâminas corticais. Tem vantagem sobre o anterior pela maior resistência, mas, por ser mais absorvido, perde um tanto dessa característica nos primeiros dias (BAUER e MUSCHKER, 2000).

Outro fator importante nos transplantes de ossos autólogos desvascularizados é que, embora uma pequena fração de células sobreviva, elas contribuem para uma resposta reparadora (STEVENSON, 1998; GOSAIN e PERSING, 1999).

O osso autógeno vascularizado é bem menos disponível, e sua obtenção é bem trabalhosa, (pelo tempo de cirurgia e pela morbidade no sítio doador), tendo uso restrito. Também necessita imobilização para evitar deiscência das anastomoses. Frequentemente ele não cicatriza bem e motiva novas intervenções (HARDIN, 1994).

2.6.2 Enxertos Ósseos homólogos e heterógenos

Os enxertos homólogos e heterógenos, por sua vez, apesar de grandemente diminuídos os riscos de transmissão de infecção e ativação do sistema imunológico do hospedeiro pelos processos de liofilização e congelamento, ainda apresentam a desvantagem dos altos custos dos bancos de ossos. Em vista disso, vem sendo intensificadas as pesquisas que visam o desenvolvimento de materiais aloplásticos que apresentem as características adequadas de biocompatibilidade e osteointegração, e que superem as desvantagens da utilização dos enxertos ósseos (CALIXTO, *et al.*, 2001).

Na Engenharia Tecidual é utilizado o termo “materiais biomiméticos”, que são aqueles que mimetizam ou imitam biologicamente a estrutura porosa da matriz extracelular nativa, ou seja, sendo eles colágenos, proteoglicanos, componentes de glicosaminoglicanos e ácido hialurônico e a hidroxiapatita como fase mineral do osso (FISHER e REDDI, 2003).

É importante, quando se trabalha com biomateriais, o entendimento da correlação entre propriedades, funções e estruturas dos materiais biológicos. No estudo dos biomateriais, consideram-se três áreas: materiais biológicos, materiais de implante e a interação tecido biológico e material do implante (ZAVAGLIA, 1993).

O sucesso de um material implantado depende de três fatores principais: as propriedades e a biocompatibilidade do implante, a condição de saúde do paciente e a competência do cirurgião (ZAVAGLIA, 1993).

Do ponto de vista mecânico, os implantes são relativamente simples, contudo as necessidades de biocompatibilidade do material tem sido difíceis de serem atendidas (ZAVAGLIA, 1993; WILLIAMS, 1987).

2.6.3 Biocompatibilidade e Biofuncionalidade

Além de o material ter biocompatibilidade, ele ainda deve ter biofuncionalidade, ou seja, o implante deve permitir o desempenho imediato e com êxito à função específica que este foi destinado (BAVARESCO, 2000). A biofuncionalidade refere-se às propriedades mecânicas e físicas que habilitam um implante a desempenhar as funções esperadas, enquanto biocompatibilidade é definida como “um estado de mútua coexistência entre um material e o ambiente fisiológico, sem que exerça efeito desfavorável sobre o outro” (BOSS *et al.*, 1995).

A biocompatibilidade é uma propriedade inerente a certos materiais inertes e inócuos (biomateriais) que expostos intermitentemente ou continuamente aos fluidos orgânicos do corpo humano, como sangue, líquido sinovial, etc, apresente aceitação e tolerância dos tecidos envoltórios, à sua presença. Porém, esses materiais não devem causar disfunções no organismo no decorrer do tempo. Como exemplo, pode-se citar o FDA (*Food and Drug Administration*) que exige uma segurança funcional para que este seja liberado para implantes, uma segurança funcional superior a 20 anos (CALLISTER *et al.*, 1999).

As células brancas do sangue do organismo humano são excelentes indicadores da compatibilidade dos materiais sintéticos junto ao tecido. Os monócitos, por exemplo, são células produzidas na medula óssea que colaboram com outras células brancas do sangue na remoção de tecidos mortos ou danificados, destruição de células cancerígenas e regulação do sistema imunológico contra “substâncias estranhas”. Poucas horas após entrarem na circulação sangüínea, os monócitos migram para os tecidos onde amadurecem em macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, auxiliam as células do sistema imune, sobretudo porque têm a capacidade de fagocitar células ou eliminar “corpos estranhos” prevenindo contra o alastramento de agentes infecciosos. Devido a essas propriedades os macrófagos muitas vezes são usados para determinar a resposta biológica a potenciais materiais para aplicação médica (ISHIDUKA *et al.*, 1999).

2.6.4 Desenvolvimento e Importância dos Biomateriais

Durante os últimos 50 anos, foram feitos avanços notáveis no desenvolvimento e no uso de dispositivos que têm sido confeccionados com textura que imitam ou aproximam da composição e estrutura dos tecidos biológicos, visando à restauração em um ambiente de total compatibilidade. Porém, existem ainda muitos problemas a serem resolvidos no desenvolvimento dos biomateriais (STOCUM, 2001).

Nota-se que os biomateriais são interessantes tanto na área de saúde como também na economia (BURNY *et al.*, 1995). Provêm aos pacientes benefícios como boa funcionalidade da parte substituída, longevidade e qualidade de vida. Dados divulgados pelo *National Institute of Health* (1982) descreve que os pacientes têm aceitado os biomateriais como parte estabelecida do tratamento médico.

O desenvolvimento atual da Área Médica tem exigido que os implantes apresentem um elevado grau de desempenho para que possam cumprir de maneira adequada às funções da parte substituída ou reposta. É imprescindível, neste sentido, a utilização de materiais que apresentem boa biocompatibilidade e resistência satisfatória dentre outras características (KATTI, 2004).

A caracterização do biomaterial não habilita o seu uso como biocomponente, mas pode e deve ser utilizado como pré-seleção de condições a serem testadas nas etapas seguintes. Os materiais “aprovados” nesta etapa terão que passar por testes laboratoriais em cultura de células (testes *in vitro*) e posteriormente por testes *in vivo* (animais) e, por último, por testes clínicos. Porém, à medida que se percorre esse caminho, os testes se tornam cada vez mais caros e complexos, devendo ser restringidos ao menor número de condições possíveis (BAVARESCO, 2005).

O desenvolvimento de pesquisas para o reparo da cartilagem articular é um assunto que vem recebendo a atenção de muitos pesquisadores, tendo em vista o grande número de pacientes que podem vir a ser beneficiados.

2.6.5 Tipos de Biomateriais

Os biomateriais abrangem uma classe ampla de substâncias naturais ou sintéticas, com propriedades mecânicas, físicas e químicas adequadas à recuperação das funções originais dos tecidos, órgãos ou sistemas (WILLIAMS, 1994). Os materiais sintéticos são divididos em metais e suas ligas, polímeros, compósitos e os materiais cerâmicos.

Os **materiais metálicos** são usados em formas de ligas e geralmente apresentam alta resistência mecânica à tração, ao impacto, à fadiga e ao desgaste, mas possui algumas desvantagens dependendo do tipo de material metálico, como a baixa biocompatibilidade,

corrosão em meio fisiológico, alta densidade e diferença de propriedades mecânicas em relação aos tecidos. Como exemplos têm-se os aços AISI F138, ligas de Co-Cr, titânio e ligas Ti6Al4V e Ti6Al7Nb (que são aplicadas em eletrodos, fios, placas, parafusos, cravos, grampos, pinos, próteses articulares, implantes dentários, etc). Os metais mais utilizados em aplicações em implantes estruturais são o aço inoxidável, ligas de cobalto-cromo e titânio e suas ligas (CAMILO, 2006).

Os **materiais poliméricos** constituem de grande interesse para a pesquisa científica e são largamente empregadas em implantes devido à facilidade de fabricação, baixa densidade e boa biocompatibilidade, porém com relativa baixa resistência mecânica. Como exemplos desses materiais podem citar o polietileno, poliuretano, polimetilmetacrilato de metila, politetrafluoretileno, nylon, Dracon, silicone e poli (ácido láctico). Esses polímeros são aplicados em superfícies articulares, vasos, cartilagens, cimento ortopédico, sutura, substituição de tecidos moles, placas de reparação óssea, etc (BAVARESCO, 2000).

Os **materiais cerâmicos** são usados em aplicações biomédicas porque pode oferecer propriedades desejáveis como biocompatibilidade, dureza, boa resistência mecânica e alguns possuem na sua composição ação osteocondutora. As principais aplicações biomédicas para as cerâmicas se concentram mais nas áreas de ortopedia, odontologia e cardiologia (CAMPBELL, 2003).

Os **compósitos** ainda constituem materiais pouco explorados cientificamente, mas sabe-se que alguns destes exibem boa biocompatibilidade, inércia química, são resistentes à corrosão e a maioria deles possui alta resistência à tração. Há desvantagens quanto a estes materiais devido à dificuldade de fabricação e um custo elevado. Os compósitos mais utilizados atualmente são o teflon-carbono, carbono-carbono e nylon-poliuretano que são empregados como cartilagens, na substituição de tecidos moles, em odontologia e ortopedia (GOMIDE, 2005).

Uma das grandes combinações que vêm sendo realizada nas últimas duas décadas é entre cerâmicas e polímeros. Esta combinação busca produzir compósitos de desempenho satisfatório tanto na área biológica quanto na área mecânica. O grande objetivo por trás deste conceito é de fazer uso de propriedades inerentes das entidades envolvidas, propriedades estas que estão fundamentalmente ligadas à estrutura básica destes materiais (como ligações químicas primárias e arranjo atômico).

O Homem descobriu as cerâmicas há milhares de anos, ao verificar que o barro colocado no fogo se transforma em uma massa rígida e dura. As cerâmicas podem ser definidas como compostos de elementos metálicos e não-metálicos, por exemplo, Al_2O_3 , MgO , TiO_2 , que são materiais cerâmicos simples (VAN VLACK, 1973).

Paiva (2005) descreve que nos últimos quarenta anos foram desenvolvidas novas cerâmicas que podem ser utilizadas para auxiliar na reparação de tecidos corporais lesados. Estas novas cerâmicas são também chamadas de biocerâmicas. As biocerâmicas têm diversas composições e fases diferentes. As biocerâmicas mais utilizadas são as apatitas (estrutura policristalina) e os vidros (amorfo). Há também algumas estruturas amorfas parcialmente cristalizadas que são conhecidas como vitro cerâmicas, como por exemplo, a apatita/wollastonita. As funções das biocerâmicas estão relacionadas às fases presentes nos materiais.

A alumina e a zircônia são cerâmicas com uso limitado como biomaterial. Estas cerâmicas têm a propriedade de serem inertes, portanto quando implantadas há uma formação de tecido fibroso sobre o implante (HULBERT *et al.*, 1983). O uso mais comum destas cerâmicas é cabeça artificial do fêmur em articulações coxo-femorais. A alumina também pode ser utilizada como recobrimento de algumas próteses onde não se necessita de osteointegração. As duas diferem em suas propriedades mecânicas, pois a zircônia apresenta tenacidade à fratura superior à da alumina (STREICHER e SCHO, 1991).

O grupo de cerâmicas conhecidas como apatitas apresenta estruturas similares, mas não necessariamente as mesmas composições. O composto hidroxicarbonato de apatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{HCO}_4]$ é o principal componente da porção mineral do osso humano. Outras fases da apatita também estão presentes, como hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e em menor quantidade a fluoroapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 (\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$. A hidroxiapatita (HA) é comumente sintetizada e utilizada como biomaterial, bem como o fosfato de cálcio o qual dá origem a própria HA. A hidroxiapatita e o fosfato de cálcio podem ter propriedades de bioatividade e bom comportamento mecânico. Os principais usos destas cerâmicas são: reparo de defeitos ósseos em odontologia e ortopedia, preenchimento de cavidades patológicas, traumáticas ou cirúrgicas, reconstrução maxilo-facial, recobrimento de implantes de titânio e bioreatores (HENCH e WILSON, 1993).

As biocerâmicas têm sido empregadas na forma densa e porosa. A quantidade e distribuição de porosidade nos materiais cerâmicos influenciam fortemente a resistência, módulo de elasticidade, resistência à oxidação, resistência ao desgaste e outras propriedades importantes. Apesar do aumento da porosidade diminuir a resistência mecânica do material isoladamente, a existência de poros com dimensões adequadas podem favorecer o crescimento de tecidos através deles, fazendo com que ocorra um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, por conseguinte, a resistência do material *in vivo*. Na forma macroporosa, os implantes aceleram o processo de cura, já que permitem o crescimento progressivo de colágeno e seguinte mineralização de tecido ósseo através dos poros abertos e interconectados (ZAVAGLIA, 2003).

Materiais cerâmicos são usados em cirurgia de reconstrução, sendo classificados em dois grandes grupos: bioinerte e bioativo; cerâmicas bioinertes não tem quase nenhuma interação com o tecido vivo. Cerâmicas bioativas são capazes de aderir ao tecido ósseo vivo; vários fosfatos de cálcio e certas composições cerâmicas exibem tal característica (VALLET, 2004; GONZÁLEZ, 2004).

Sabe-se que a osteocondução é quase sempre observada nas cerâmicas, sobretudo quando estas possuem composição e/ou porosidade similares à estrutura óssea (CORNELL *et al.*, 1998).

Os compósitos biocerâmicos têm surgido na forma de compostos com plásticos, carbono, vidros ou matrizes cerâmicas reforçadas com vários tipos de fibras; incluindo carbono, aço inoxidável, vidros de fosfatos e Zircônia (ZrO_2). Em muitos casos, esses compósitos são investigados, com o objetivo de aumentar a resistência à flexão e a torção e a diminuição do módulo de elasticidade. Nos compósitos alumina-zircônia, uma biocerâmica inerte, busca-se com a variação da concentração dos componentes, a possibilidade de estabelecer um acordo entre as suas propriedades com a obtenção de alta resistência mecânica, alta tenacidade e elevada dureza (BURELLI *et al.*, 1998).

2.6.6 Biovidro

Van Vlack (1973) e Hulbert e Hench (1983) classificam os vidros como cerâmicas, apesar de apresentarem uma estrutura amorfa. Isso se deve ao caráter cerâmico dos constituintes dos vidros. Hench, no ano 1969, utilizou o primeiro biovidro como biomaterial (HENCH, *et al.*, 1971). O biovidro foi o primeiro biomaterial a apresentar bioatividade (OLIVEIRA, CORREIA e FERNANDES, 1995).

2.6.7 Composições Químicas dos Vidros Bioativos

Hench foi o pioneiro na produção de biovidros, culminando com o que hoje é conhecido como Bioglass® (HENCH e WILSON, 1993). Algumas destas variações de concentrações dos componentes podem ser visto no ANEXO B. Entre eles se destaca o biovidro 45S5 por ter sido o primeiro vidro utilizado e foi o primeiro a ser comercializado sob o nome de Bioglass®.

Quando o CaO substitui o MgO ou o Na₂O substitui o K₂O na composição química do biovidro, apresenta uma pequena diferença no comportamento adesivo do osso ao biovidro, quando estes são usados como recobrimento de implantes.

Gomez-Veja *et al.*, (2000) produziram vidros de sistemas multicomponentes que envolvem os compostos SiO₂, Na₂O, K₂O, CaO, MgO e P₂O₅. Estes biovidros têm um

coeficiente de expansão térmica (CET) próximo ao do aço, sendo que o CET do biovidro é igual a $15,1 \times 10^{-6}$ (m/m.°C) e o da liga de titânio Ti-6Al-4V é igual a $9,6 \times 10^{-6}$ (m/m.°C). Isto permite que os biovidros possam ser usados para esmaltar ou fazer recobrimento das ligas de titânio sem se destacar da base.

Peitl, Zanotto e Hench (2001) demonstraram que, no sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$, a quantidade de P_2O_5 influencia positivamente na formação de hidroxicarbonato de apatita (HCA), ou seja, na concentração de 6% de P_2O_5 a formação ocorreu mais rápido (8h) do que na composição sem P_2O_5 (35h) cujas concentrações eram de 50,3% de SiO_2 , 18,5% de Na_2O , 31,3% de CaO . Porém, ao analisar a bioatividade das cerâmicas vítreas deste sistema, encontraram-se valores similares ao Bioglass®.

2.6.8 Aplicações dos Vidros Bioativos

O Bioglass®, inicialmente, foi utilizado como reconstrutor de ossículos do ouvido médio. Isto permitiu a audição de pessoas que não tinham continuidade do sistema de condução do som dentro do ouvido (HENCH e WILSON, 1993). Em 1998, Kokubo demonstrou que devido a uma maior adesão ao osso e ao tecido conjuntivo, o Bioglass® apresentou bioatividade superior quando comparados com antigos substitutos, tais como polímeros e metais.

Autores como Camargo *et al.*, (2000) e Thronson, Sexton e Tex (2002) demonstraram que o biovidro pode ser utilizado em cirurgia oral como preenchimento do alvéolo dentário após extrações, acelerando o processo de cura com o mínimo de perda da estrutura adjacente. Também em odontologia na área de cirurgia e traumatologia maxilo-facial Kinnunen *et al.*, (2000) descreveram em relatos clínicos que o uso do biovidro pode ser utilizado como suporte em caso de fraturas cominutivas na reconstrução de assoalho de órbita.

Na periodontia, o biovidro tem sido muito utilizado para reconstrução de defeitos ósseos verticais provocados por doença periodontal. Allan, Newman e Wilson (2002) e Allan, Newman e Wilson (2001) provaram que o biovidro também apresenta efeito antibacteriano. Sendo assim, o fato do biovidro apresentar um efeito antibacteriano, aumenta a possibilidade de sucesso no tratamento de doença periodontal quando o biovidro é empregado como enxerto. O biovidro pode ser utilizado associado com o osso autógeno para levantamento de seio maxilar ou como preenchimento de cavidades ocasionadas por lesões como cistos e tumores (WHELLER *et al.*, 1998). Os biovidros são amplamente empregados como recobrimento de implantes aumentando assim, a osteointegração deste ao osso (BLOYER *et al.*, 1999; SCHROOTEN, ROEBBEN e HELSEN, 1999).

2.6.9 Compósitos Cerâmicos (biovidro/polímero)

Bonfield *et al.*, (1981) foram os pioneiros na utilização de compósitos cerâmica/polímero como biomaterial. Os autores utilizaram a hidroxiapatita como material bioativo e o polietileno como material de suporte, obtendo um compósito bioativo estável quando imerso em uma solução que simula o plasma sanguíneo.

As cerâmicas e os vidros apresentam um módulo de elasticidade alto e baixa resistência à fratura apesar de excelente resistência à compressão (HEIKKILA *et al.*, 1996).

Com relação ao osso, as biocerâmicas e biovidros não têm um bom comportamento mecânico. No entanto, para resolver esse problema, o ideal é a confecção de compósitos nos quais as propriedades mecânicas se aproximem das propriedades do osso (ORÉFICE, 2000). Estes compósitos têm como principal aplicação onde ocorre muita tensão de deformação, levando a fratura da cerâmica por esta não apresentar deformação plástica, assim, cabe aos polímeros suportar tais tensões.

De acordo com Chen e Wang (2002) e Ni e Wang (2002), os primeiros compósitos desenvolvidos para aplicação como auxiliares na regeneração óssea envolviam compósitos bioestáveis. O desenvolvimento de novos biomateriais direcionou a atenção dos materiais que permaneciam completamente estáveis quando implantados para os materiais que alteravam suas propriedades ou degradavam em resposta ao ambiente celular ou extracelular. Uma vantagem que os compósitos biodegradáveis apresentam é permitir a neoformação tecidual à medida que é degradado. A remoção destes materiais não é necessária, ao contrário dos materiais bioestáveis, eliminando a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica.

A biodegradabilidade e a bioatividade, quando combinadas, aperfeiçoam o uso de tecidos sintéticos de suporte (ROETHER *et al.*, 2002). Sendo assim, os compósitos que apresentam estas propriedades permitem a criação de suportes bioreabsorvíveis e bioativos, com adaptação física e com propriedades mecânicas satisfatórias. Além disso, podem ser aplicados em situações onde a taxa de reabsorção do polímero (que promove suporte para crescimento das células) seja compensada pela formação de novos tecidos, que é estimulada pelo biovidro.

As propriedades biológicas, químicas e mecânicas dos compósitos biomédicos podem ser afetadas por fatores como: tamanho, forma e distribuição do reforço; propriedades e porcentagens de volume de reforço; bioatividade do reforço ou da matriz; propriedades da matriz (peso molecular, tamanho de grão, etc.) e interface matriz-reforço. A arquitetura do compósito também é importante. O controle destes fatores fornece as características desejadas para cada aplicação (WANG, 2003).

Wang (2003) elucida que as características morfológicas do reforço são muito importantes para determinar as propriedades mecânicas do compósito. Os compósitos bioativos podem apresentar partículas de forma esférica, irregular, paralelas e chatas ou acicular (Figura 10). Nos vidros as partículas apresentam formas irregulares com ângulos vivos conforme ilustra a Figura 11 – c. Para a remoção destes ângulos é necessária uma moagem adicional, o que aumenta também a área de contato das partículas.

Figura 10: Forma das partículas de biocerâmicas usadas em biomateriais (PAIVA, 2005).

Destaca-se também em relação às partículas a sua distribuição no compósito, que podem ser em estado condensado, estado intermediário e estado disperso. O estado disperso é considerado ideal, pois permite evitar os pontos de iniciação de fraturas e a propagação destas sob estresse mecânico com mais eficácia. A distribuição das partículas pode estar relacionada ao seu tamanho. Wang (2003) classifica esse tipo de distribuição em monomodal ou bimodal. A distribuição monomodal apresenta tamanho uniforme de partículas e a distribuição bimodal apresenta dois tamanhos de partículas diferentes. As partículas onde os tamanhos são variados são conhecidas como distribuição híbrida (ANUSAVICE, 1998). A distribuição monomodal é a pior, pois permite espaços sem partículas no compósito e a melhor é bimodal, pois elimina esses espaços. Tanto a distribuição híbrida como a distribuição em estado disperso apresentam as mesmas funções.

Wang (2003) descreve que a porcentagem em volume de reforço tem um valor mínimo, no qual o compósito apresenta bioatividade. Para compósitos de hidroxiapatita o volume crítico é 20% e acredita-se que para os outros reforços bioativos a porcentagem necessária seja próxima a esse valor. As porcentagens de reforço podem variar de 0 a 40%. Porcentagens maiores apresentam maiores valores de dureza e módulo de Young (CHEN e WANG, 2002); (NI e WANG, 2002). Os compósitos com porcentagens de reforço entre 30 e 40% apresentam melhores comportamentos bioativos, pois valores superiores a 40% diminuem a taxa de degradação dos polímeros no compósito, levando a menor exposição do reforço que é um dos fatores responsáveis pela bioatividade (BOCCACCINI e MAQUET, 2003); (DOYLE, TANNER e BONFIELD, 1991).

2.6.10 Classificação dos Biomateriais Quanto a Resposta Biológica

Os biomateriais devem ser biocompatíveis e se classificam em quatro categorias: materiais bioativos, bioinertes, biotolerantes e bioabsorvíveis, conforme o aspecto da interação química com o tecido humano (SAWAKI; KAWASAKI e ZILIOTTO, 1992).

Segundo CAMILO (2006) **materiais biotoleráveis** são aqueles apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através de formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os **materiais biotoleráveis** são praticamente todos os polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais. **Materiais bioinertes** são aqueles também tolerados pelo organismo, mas a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica é passageira e uma fina cápsula toma lugar após a colocação do implante. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são a alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.

Segundo a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986 (WILLIAMS, 1987), o termo bioinerte, não é adequado, já que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que seja mínima e, de acordo com HENCH (1993) não existe material implantado em tecido vivo que seja completamente inerte, por este motivo, o termo bioinerte deve ser evitado. No entanto, o termo ainda é comumente utilizado, e é definido como um material que apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa não aderente ao redor do material (WILLIAMS, 1987). Como exemplos de cerâmicas bioinertes podem ser citadas a alumina (α - Al_2O_3), zircônia (ZrO_2) e dióxido de titânio (TiO_2) (AOKI, 1988).

Os **materiais bioativos** são aqueles que proporcionam ligações de natureza química entre o material e o tecido ósseo, induzindo a osteointegração. Esses materiais promovem uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na união entre os tecidos e o material (HENCH *et al.*, 1972). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a estes materiais, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros bioativos e as vitro-cerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

Biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (VERT *et al.*, 1992).

Material bioabsorvível são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular, como no caso da dissolução lenta de implantes solúveis em fluidos orgânicos (VERT *et al.*, 1992).

Materiais bioreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*: i.e., materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo (VERT *et al.*, 1992).

Os biomateriais também são usados em dispositivos médicos, para substituição temporária ou permanente no corpo humano e é uma área de crucial importância para todos os tipos de tecnologias médicas. Dentre os materiais utilizados em dispositivos médicos estão o silicone e o poliuretano.

Os dispositivos médicos devem suportar o ambiente do corpo humano. Esses componentes devem ser capazes de resistir à exposição prolongada à ambientes aquosos, a temperatura corporal, a composição bioquímica corrosiva do sangue e fluidos corporais que podem degradar muitos materiais. Ao mesmo tempo, o dispositivo deve causar complicações mínimas para o paciente. As respostas de coagulação do sangue, rejeição, inflamação do tecido e lixiviação de produtos químicos tóxicos para o corpo deve ser minimizadas e o material deve atender os requisitos de segurança de um dispositivo médico. Sendo assim, os componentes médicos devem ser resistentes, facilmente manufaturáveis, além de tamanhos e projetos variados. Por exemplo, é importante manter o catéter do menor tamanho possível quando eles serão utilizados no sistema circulatório - uma aplicação comum para dispositivos cardiovasculares de diagnóstico e clínica.

Atualmente, muitos materiais podem ser usados como dispositivos médicos como, por exemplo, o silicone e o poliuretano que são designados como biomateriais de classe médica.

2.6.11 Silicone

Sintetizado por volta do ano de 1900 pelo cientista alemão Wöhler, o silicone é polímero composto por uma matriz inorgânica de silício e oxigênio (...-Si-O-Si-O-...) intercalado com grupos orgânicos – metil, etil e fenil – ligados ao átomo de silício

tetravalente cuja fórmula química é $[R_2SiO]_n$, onde o R é a denominação dos grupos orgânicos.

O silicone é obtido pela transformação da areia de quartzo em silício metálico quando submetida à alta temperatura. O silício é quimicamente transformado em silanos e siloxanos, matérias-primas destinadas à fabricação dos polímeros.

Variações no tamanho da cadeia $-Si-O-$, nos grupos laterais e nas ligações transversais fornecem diferentes propriedades químicas e físicas ao polímero, como óleo de silicone – moléculas menores - gel de silicone ou elastômero de silicone – moléculas maiores com ligações cruzadas semelhantes as encontradas no quartzo, no vidro e na areia (Figura 11 B e 12C).

Figura 11: Representação estrutural do polímero de silicone. A: Matriz de silício e oxigênio, onde R1 e R2 representam radicais metil, etil ou fenil, que podem estar ligados ao Si; B: representação química do polímero de silicone e C: representação tridimensional (NOGUEIRA, 2008).

Como características principais, o elastômero resiste a temperaturas extremas – de -80°C a +400°C - não contém nenhum outro aditivo ou amaciante, é resistente a decomposição pela água, agentes oxidantes e ozônio, com inércia química e fisiológica, moldável e elástico, com baixa deformação permanente, resistindo à tração, estiramento e compressão, além de possuir propriedades condutivas e isolantes.

As cirurgias reconstrutivas - área da medicina que engloba diferentes especialidades e diferentes sistemas orgânicos – vem sofrendo avanços importantes nas últimas décadas sejam em relação ao desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas ou na pesquisa e desenvolvimento de novos materiais empregados como substitutos de órgãos e tecidos – permanente ou temporariamente.

2.6.12 Poliuretano

Na medicina, o poliuretano tem sido exaustivamente pesquisado, sendo os primeiros trabalhos sobre o seu uso, na década de 50, como substituto ósseo (SALVATORE e MANDARINO, 1959). Em aplicações biomédicas é considerado o “polímero ideal” devido as

suas propriedades de durabilidade, elasticidade, resistência à fadiga mecânica, complacência, bicompatibilidade e propriedade de modificação de espessura e superfície de modificação do balanço hidrofóbico/hidrofílico, além de facilidade na manufatura. Atualmente, o poliuretano tem diversas aplicabilidades, entre elas, bolsas de coletas de sangue, catéteres vasculares e urinários, enxertos vasculares e até coração totalmente artificial (ZDRAHALA e ZDRAHALA, 1999).

O poliuretano é um polímero constituído de uma cadeia de unidades unidas por ligações de uretano. A principal reação de produção do poliuretano engloba um reagente, um catalisador e materiais para o controle de estruturas das células como os surfactantes (SALVATORE e MANDARINO, 1959). O reagente é o que determina a característica do poliuretano - como ser termoplástico ou não. Assim, ao usarmos um diisocianato – na forma alifática ou aromática – ou diamina tem-se um segmento duro de poliuretano; para a obtenção de um segmento mole usa-se o terminal poliálcool – como o etilenoglicol, 1,4 butanodiol, dietilenoglicol, glicerol ou trimetilol propano – ou hidróxi, ou ainda amina, poliéster, poliéter, policarbonato e hidrocarbono. Os segmentos duro e mole podem ser utilizados em conjunto na composição de um único dispositivo, aproveitando-se as qualidades de cada um de seus componentes (ZDRAHALA E ZDRAHALA, 1999). A reação de produção do poliuretano está ilustrada na Figura 12.

Figura 12: Reação de produção do poliuretano.

O uso do surfactante é imprescindível para a confecção de espuma de poliuretano. Esta é feita com a adição de pequenas quantidades de materiais voláteis, chamados de agentes de sopro, à mistura reacional. Tais materiais podem ser substâncias químicas voláteis e simples – como a acetona ou o cloreto de metileno – ou a fluorocarbonetos mais sofisticados – os quais conferem características importantes, como o isolamento térmico. A porosidade da espuma de poliuretano, bem como alterações da sua superfície é capaz de mediar ativamente ou controlar a inflamação associada ao implante e intrusão dos biomateriais (ZDRAHALA e ZDRAHALA, 1999).

A espuma de poliuretano utiliza, na sua confecção, o tolueno diisocianato em dissociação rápida na presença de amina. Como consequência, na degradação da espuma de poliuretano, encontra-se 2,4 e 2,6 toluene-diisocianato diamina ou TDAs – produto químico também chamado de Toluenediamina 2,4. As TDAs liberadas mostraram-se carcinogênicas em animais de laboratório. Em camundongos levou a câncer de fígado, ovários, baço, tecido celular subcutâneo e peritônio; em ratos ocasionou câncer de pâncreas e fígado e fibrossarcoma de mama. Há evidências do aumento dos índices de câncer quando 2,4 - TDA são injetados no tecido subcutâneo, pintado na pele ou adicionados a dieta. Ainda, a inalação de TDA por trabalhadores de indústrias que fabricam o poliuretano, é um importante causador de asma ocupacional (AUSTIN, 2007).

Em humanos, o poliuretano é utilizado na cobertura de próteses mamárias para reduzir o risco de contraturas mamárias desde a década de 70. Estima-se que 10% das próteses mamárias dos Estados Unidos são cobertas de poliuretanos (BRINTON e BROWN, 1997). Com relação ao risco de câncer por exposição ao TDA, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) emitiu relatório em novembro de 1995, liberando o emprego deste material – após suspensão de quatro anos de seu uso – afirmando que o risco é negligenciável em torno de 1: 1 000 000 em toda a vida, já que o volume de TDA nestas próteses é pequeno, que o valor de TDA detectado na urina das pacientes com implantes mamários com poliuretano é semelhante daquelas sem prótese mamária sem poliuretano e porque não foi detectado TDA no sangue periférico daquelas pacientes (SEGAL, 1995).

O poliuretano induz uma reação inflamatória do tipo corpo estranho homogeneamente distribuída ao redor do implante. A inflamação é mediada pela interação antígeno-anticorpo, com migração de macrófagos e células gigantes multinucleadas que fagocitam ou englobam os fragmentos de poliuretano, formando microcápsulas, que tardiamente são substituídas por fibroblastos e colágenos. Estas microcápsulas levam ao crescimento lento da fibrose e atrapalham a contratura da cápsula fibrótica ao redor da prótese e levam a maior aderência do implante aos tecidos circunjacentes (VAZQUEZ e PELLON, 2007).

Os poliuretanos fabricados pela Lubrizol são sintetizados a partir de produtos de reação diisocianatos, macrodiols e extensores de cadeia. As características de cada poliuretano podem ser atribuídas à sua estrutura. Poliuretanos são feitos de domínios duros e de baixa dureza, onde o diisocianato e o extensor compõem os domínios rígidos e os macrodiol compõem o domínio macio. Variando as proporções desses dois domínios para permitir a formulação de poliuretanos com durômetros macios como 72A ou tão duros quanto 84D (Dureza Shore).

Poliuretanos são designados aromáticos ou alifáticos, com base da natureza química do componente isocianato em sua formulação. Tecoflex®, Tecophilic® e resinas Carbothane® são fabricadas usando os compostos alifáticos hidrogenados diisocianato de metileno (HMDI). As resinas Tecothane® e Tecoplast® apresentam em sua formulação o diisocianato de compostos aromáticos de metileno (MDI). Todas as formulações, com exceção de Carbothane®, são formuladas usando politetrametileno glicol éter (PTMEG) e 1,4 butanodiol como extensor de cadeia. O Carbothane® está formulado especificamente com um policarbonato diol (PCDO). Estas diferenças representam composição química importantes entre as várias famílias.

As partes aromáticas e alifáticas dos poliuretanos são propriedades similares que os tornam matérias pendentes para uso em dispositivos médicos. Em geral, não há muita diferença entre a classe médica dos poliuretanos alifáticos e aromáticos que diz respeito às propriedades químicas, mecânicas e biológicas como alta resistência à tração (4.000 - 10.000 psi); alto alongamento final (250 - 700%); ampla gama de dureza (72 Shore A de 84 Shore D); boa biocompatibilidade; alta resistência à abrasão; boa estabilidade hidrolítica; pode ser esterilizada com óxido de etileno e da irradiação gama; retenção de propriedades elastoméricas a baixa temperatura e boas características de processamento de extrusão, moldagem por injeção, etc.

Com um impressionante conjunto de características desejáveis, não é de admirar que tanto poliuretanos alifáticos e aromáticos tornaram-se cada vez mais material de escolha na concepção dos componentes da classe médica. Há, no entanto, diferenças marcantes entre estas duas famílias de poliuretano que pode ditar a escolha de um sobre o outro para uma determinada aplicação. As características do poliuretano Lubrizol® está detalhada no ANEXO C.

O poliuretano pode ter uma variedade de densidades e de durezas, que mudam de acordo com o tipo de monômero usado e de acordo com a adição ou não de substâncias modificadoras de propriedades. Os aditivos também podem melhorar a resistência à combustão, a estabilidade química, entre outras propriedades.

Os poliuretanos Lubrizol® podem ser carregados com materiais radiopacos para a detecção por raio-X ou fluoroscopia e coloridas para identificação de produtos ou de codificação. Todos os aditivos radiopacos ou coloridos são introduzidos e dispersos no tempo de polimerização, criando misturas extremamente consistentes e suavidade superior do polímero final. Todos os aditivos são cuidadosamente selecionados e cuidadosamente testados para a estabilidade química, biocompatibilidade e desempenho na resina antes da sua utilização como agente radiopaco ou coloração.

As qualidades naturais de cada família são evidentes (transparente) na cor. O poliuretano pode ser feito radiopaco adicionando o sulfato de bário. O pó de tungstênio também tem sido utilizado como um radiopacificador eficaz. O carbonato de bismuto tem sido usado com muito sucesso em conjunto com a família TPU Tecoflex®.

Na literatura destaca-se a grande aplicabilidade do poliuretano na medicina. Como exemplo de aplicação do poliuretano na área médica, destaca-se o trabalho de Lunardelli *et al.*, (2008) que tratam de epífora que é uma obstrução parcial ou completa da via lacrimal que provoca um lacrimejamento constante ou intermitente. Os autores relatam a primeira experiência brasileira com o implante de poliuretano, realizado pelos serviços de Radiologia Intervencionista e Oftalmologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP - SP. Embora o implante nasolacrimal tenha suas vantagens por ser um procedimento radiológico intervencionista *versus* uma cirurgia invasiva, não é o procedimento indicado como tratamento primário da obstrução do ducto nasolacrimal. Estudos a longo prazo ainda são necessários para avaliar e resolver as complicações encontradas nos últimos trabalhos. Novos desenhos e métodos de recanalização *in situ* (mecanicamente ou com auxílio de medicações) talvez melhorem a viabilidade deste método terapêutico para a resolução de epífora.

Outra aplicação de poliuretano que merece destaque é o trabalho de Silva (2009). Neste trabalho, poliuretanos denominados PUD5 (Dispersão aquosa do poliuretano 5) e PUD6 (Dispersão aquosa do poliuretano 6), derivados de poli(e-caprolactona) e poli(etileno glicol), foram produzidos baseados em dispersões aquosas destes polímeros, e o acetato de dexametasona foi incorporado às dispersões aquosas destes poliuretanos. A partir desta incorporação, implantes constituídos de poliuretanos e acetato de dexametasona foram desenvolvidos e explorados como dispositivos intra-oculares de liberação controlada do fármaco, destinados ao tratamento de doenças inflamatórias graves que acometem o segmento posterior do olho. Estes implantes foram caracterizados por FTIR (Infravermelho por transformada de Fourier – Reflexão Total Atenuada), XRD (Difração de raios-X) e SAXS (Espalhamento de raios-X em baixo ângulo), e também foram submetidos ao estudo de liberação *in vitro* do acetato de dexametasona. Adicionalmente, os filmes de poliuretanos puros foram submetidos aos estudos de biodegradação *in vitro* e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*. As diferentes técnicas de caracterização revelaram que o acetato de dexametasona manteve sua integridade química após dispersão nas matrizes poliméricas, e que o mesmo conduziu a uma nova morfologia do PUD5, enquanto que alterações significativas não foram detectadas na nanoestrutura do PUD6. Os sistemas poliméricos propiciaram a liberação controlada do acetato de dexametasona por um período prolongado, sem que picos de liberação do fármaco fossem detectados, representando uma vantagem

dos sistemas. O processo de biodegradação dos poliuretanos conduziu à perda de massa e à formação de cristalitos, devido à hidrólise das ligações éster da poli(caprolactona) presentes nos segmentos macios destes biomateriais. Os segmentos rígidos, formados pelas ligações uretano, foram preservados durante a biodegradação. Além disso, células ARPE-19 (Células epiteliais pigmentares da retina) incubadas em meio de cultura contendo os produtos de degradação de PUD5 e PUD6 apresentaram viabilidade, indicando que os mesmos não apresentaram efeitos citotóxicos significantes. Os poliuretanos demonstraram biocompatibilidade *in vitro*, uma vez que as células ARPE-19 foram capazes de aderir, migrar, proliferar e formar uma monocamada altamente organizada e funcional sobre as superfícies poliméricas. Os poliuretanos também demonstraram biocompatibilidade *in vivo*, uma vez que sinais de inflamação e desorganização dos tecidos oculares não foram detectados após implantação de PUD5 e PUD6 no espaço subretiniano e vítreo de olhos de ratos. Portanto, PUD5 e PUD6, poliuretanos biodegradáveis e biocompatíveis, possibilitaram o desenvolvimento de implantes intra-oculares de liberação controlada de acetato de dexametasona, destinados ao tratamento de doenças oculares que atingem o segmento posterior do olho.

2.7 Estudos sobre reparo e substituição de cartilagem

A literatura apresenta várias formas de tratamento dos defeitos osteocondrais sintomáticos como furação, microfraturas, recobrimento com periósseo, transposição de cartilagem de zonas de menor solicitação, mosaicoplastia ou transplante autólogo de condrócitos.

Vários procedimentos cirúrgicos experimentais com o uso de animais foram desenvolvidos nas últimas décadas visando solucionar as perdas ou falhas da cartilagem articular, ou seja, restabelecendo a falha por meio de um tecido fibrocartilaginoso (ou eventualmente cartilaginoso), oriundo da perfuração do osso subcondral na região lesada ou por substituição do tecido cartilaginoso por um material inerte, com características físico-químicas semelhantes a esse tecido (GARRIDO, 2007).

Reiff (2010) cita que o processo de reparação da cartilagem hialina pode ser compreendido através de modelos de reparação de defeitos osteocondrais produzidos artificialmente.

Mitchell e Shepard (1976) realizaram experimentos em côndilos femorais do joelho de 25 coelhos. Em um dos lados realizou-se curetagem e, no lado oposto, além da curetagem foram feitas de 20 a 30 perfurações com 1 mm de diâmetro cada. Após o período de seguimento (um, dois, quatro, oito e doze meses), os animais foram eutanasiados e as amostras colhidas para posterior análise histológica. Verificou-se que no lado que foi

realizada a curetagem mais a perfuração do osso subcondral, os defeitos foram preenchidos por tecido fibrocartilaginoso, enquanto que no lado oposto isso não ocorreu. Esse achado pode ser justificado devido à falta de vascularização na região em que foi realizada somente a curetagem.

Inouye *et al.*, (2002) estudaram a morfologia da articulação do joelho de coelhos após a reparação de um defeito osteocondral padronizado com fio de sutura polidioxanone, criando um defeito osteocondral no côndilo femoral medial do joelho de 80 coelhos. Os animais foram distribuídos em 2 grupos com seguimentos de 7 e 42 dias e submetidos à técnica A (ressecção e retirada do fragmento osteocondral; recolocação e síntese de fio PDX-00), técnica B (ressecção e retirada do fragmento osteocondral; reposição com enxerto autólogo no joelho contralateral, após rotação de 180° no sentido ântero-posterior; síntese com fio PDX-00) ou técnica C (ressecção e retirada do fragmento osteocondral deixando o defeito padrão vazio, nos joelhos contralaterais aos operados pela técnica A ou B) como controle. Fez-se estudo clínico, radiográfico, macroscópico e histológico nos dois grupos mostrando que a recolocação do fragmento ou enxerto autólogo osteocondral facilita a perfeita integração dos fragmentos aos côndilos femorais, sem deslocamento ou necrose cartilaginosa ou óssea; que nos joelhos submetidos à ressecção simples do fragmento com seguimento de 42 dias, não houve formação de cartilagem na superfície articular, havendo predisposição à formação de osteófitos, mostrando relação significativa entre a técnica C e a presença de osteófitos. Os autores concluíram que a reconstituição da superfície articular com recolocação do fragmento ou o enxerto autólogo osteocondral fixado com fio de sutura PDX é exequível e apresentou melhor resultado do que a ressecção simples do fragmento.

Del Carlo *et al.*, (2007), por exemplo, avaliaram o processo de reparação de defeito osteocondral experimental na cabeça do úmero de cães, após a aplicação de laser diodo de arseneto de gálio (As-Ga). As aplicações de laser As-Ga foram realizadas com um aparelho de 45 W (watts) de intensidade máxima e comprimento de onda de 904 nm, na dose de 4J/cm², em cada um dos três pontos irradiados na área da lesão. Trinta e dois animais foram separados aleatoriamente em dois grupos, tratado (GT, *n* = 16) e controle (GC; *n* = 16). A reparação das lesões aconteceu a partir da diferenciação de células mesenquimais provenientes da medula óssea que migraram por túneis vasculares e foi observado nos diferentes tempos pós-operatórios: 7, 21, 35 e 60 dias (subgrupos 1, 2, 3, e 4, respectivamente). Nos animais tratados com laser notou-se rápida transformação do tecido pouco diferenciado em tecido ósseo, que estava relacionada à abundante vascularização. O avanço da linha de maré, observado nos animais do GC, representou alteração da mecânica da articulação e da natureza e distribuição das forças aplicadas na cartilagem articular lesada. A análise histológica da membrana sinovial demonstrou variados graus de sinovite

em ambos os grupos. Foi evidenciada a potencialização da reparação da cartilagem articular e da osteogênese local no grupo submetido à laserterapia.

Sakihama *et al.*, (2006) estudaram a morfologia da articulação do joelho de coelhos após a reparação de um defeito osteocondral padronizado com adesivo de resorcina ou síntese metálica. Criou-se um defeito osteocondral em côndilo femoral medial do joelho de 80 coelhos. Os animais foram distribuídos em dois grupos com seguimentos de 7 e 42 dias e submetidos à técnica G (ressecção e retirada do fragmento osteocondral do côndilo femoral medial e recolocação com adesivo de resorcina), técnica S (ressecção e retirada do fragmento osteocondral do côndilo femoral medial e recolocação de síntese metálica) ou técnica C (ressecção e retirada do fragmento osteocondral do côndilo femoral medial, deixando o defeito padrão vazio como controle). Fez-se estudo clínico, radiográfico, macroscópico e histológico nos dois grupos. O adesivo de resorcina provocou necrose do fragmento osteocondral em 100% e 95%, degeneração 90% e 100%, corpo livre em 80% e 65% respectivamente no grupo I e II; comparado com a síntese metálica que apresentou: necrose em 25% e 35%, degeneração 25% e 35%, corpo livre em 35% e 10% respectivamente no grupo I e II. Os autores concluíram que o adesivo de resorcina, está relacionado com a necrose, degeneração cartilaginosa e desprendimento do fragmento osteocondral com maior frequência que a síntese metálica.

Neste trabalho, Fonseca (2009) avaliou os resultados clínicos dos doentes com defeito osteocondral tratados por mosaicoplastia. Utilizaram-se vinte joelhos com defeito osteocondral superior a 2cm² que foram operados entre 1999 e 2005, com recurso de duas técnicas cirúrgicas (mosaicoplastia/*mosaicambium*). Todos os doentes foram avaliados em pré-operatório clinicamente, radiograficamente e com Ressonância Magnética (RM). No ano de 2008 todos foram revistos e avaliados seguindo os mesmos critérios. Os casos foram distribuídos em dois grupos consoantes o tipo de tratamento. Comparando os resultados entre grupos (mosaicoplastia/*mosaicambium*), não houve diferenças significativas entre os grupos. Radiograficamente, não existiam alterações em 55% dos casos. Conclui-se que a técnica *mosaicambium* é uma boa opção alternativa para perdas de substância osteocondral com mais de 2 cm².

Ribeiro *et al.*, (2004) avaliou macroscopicamente e histologicamente defeitos osteocondrais já cicatrizados, também conhecidos como reparos em coelhos da raça Nova Zelândia. Realizaram-se defeitos cilíndricos osteocondrais de 3,2 mm de diâmetro por 4,0 mm de profundidade em ambos os côndilos femorais mediais. O cilindro osteocondral retirado do joelho esquerdo (defeito não tratado) foi implantado no joelho direito (joelho tratado). Comparou-se macroscopicamente e histologicamente ambos os tipos de defeitos após doze semanas de evolução. A avaliação macroscópica de todos os defeitos mostrou

evolução para reparos denominados biologicamente aceitáveis. O termo "biologicamente aceitável" foi utilizado para definir reparos, que à observação macroscópica, se apresentaram como tecido neoformado semelhante à fibrocartilagem, brilhante, liso, firme, em continuidade com a cartilagem adjacente. Como todos os defeitos, tratados e não tratados, eram macroscopicamente semelhantes, realizou-se um estudo histológico comparativo para averiguar qual tipo de tecido de reparação que se formou em ambos os defeitos. Pela análise histológica dos reparos biologicamente aceitáveis, concluiu-se que houve formação de tecido cartilaginoso hialino nos defeitos tratados com enxerto autólogo e de tecido fibrocartilaginoso nos defeitos não tratados.

Souza *et al.*, (2000) investigaram o processo de reparação da superfície articular, avaliando microscopicamente em uma falha osteocondral produzida no sulco troclear esquerdo de 12 coelhos adultos. Observou-se preenchimento inicial com tecido de granulação, com diferenciação tecidual em cartilagem hialina e reposição parcial do osso subcondral excisado sete semanas após a cirurgia. Houve formação de fendas entre o tecido de reparação e o tecido ósseo adjacente, sempre em áreas onde não ocorreu remodelação óssea. Nos animais em que o fundo e as laterais da falha osteocondral eram constituídos por osso subcondral compacto, contendo poucos vasos sanguíneos, não foi observada a remodelação óssea e o tecido de reparação que preenchia a falha não foi integrado ao tecido ósseo adjacente. Os resultados evidenciam a importância da remoção completa do osso subcondral compacto nos procedimentos cirúrgicos em superfícies articulares, possibilitando melhor afluxo sanguíneo a partir do osso esponjoso subjacente e, conseqüentemente, melhor remodelação óssea e integração do tecido de reparação ao fundo da falha.

Ignácio *et al.*, (2002) operaram 42 cães no período de janeiro de 1997 a abril de 1998. Os animais foram divididos em 2 grupos. No grupo I foram produzidas falhas ósseas cilíndricas com dimensões de 1,0 cm de diâmetro por 0,8 cm de profundidade, com auxílio de uma trefina, localizadas nas metáfises distais dos fêmures e proximais das tíbias bilateralmente e preenchidas com a poliuretana da mamona nas formas compactas e porosas. Os animais pertencentes a esse grupo foram divididos igualmente de acordo com o tempo de sacrifício de cada um, respectivamente, após três, seis e doze meses do ato cirúrgico, quando foram feitas avaliações radiográficas, macroscópicas, histológicas, por microscopia eletrônica de varredura (somente implantes porosos em todos os tempos de avaliação) e tomografia computadorizada (implantes compactos e porosos após 12 meses de cirurgia). Os autores concluíram que o implante de poliuretana foi biocompatível, mas comportou-se como um espaçador biológico, preenchendo uma cavidade e permanecendo biotolerante ao longo do tempo, sem osteointegração.

O'Driscoll *et al.*, (1988) também produziram defeitos osteocondrais, porém neste estudo os defeitos foram realizados na região do sulco troclear de coelhos adolescentes (com um a dois meses de vida) e os mesmos foram preenchidos com periósteo autólogo. Após a cirurgia os animais foram colocados em gaiolas com movimentação intermitente por um período de 52 semanas, porém em um dos grupos foi realizada imobilização prévia de quatro semanas e no outro foi realizada duas semanas de movimentação passiva contínua. Os autores concluíram que houve crescimento tecidual semelhante ao tecido cartilaginoso em todos os grupos, porém no grupo em que foi realizada a movimentação passiva contínua o tecido apresentou melhor qualidade e maior durabilidade.

Mow *et al.*, (1991) realizaram defeitos osteocondrais medindo 4 mm no côndilo medial do fêmur de 55 animais (coelhos) e esses foram preenchidos com periósteo autólogo. Segundo os autores, em 70% dos animais os implantes apresentaram propriedades biomecânicas e bioquímicas semelhantes à cartilagem articular normal, porém os resultados não se mantiveram ao longo do tempo.

Breinan *et al.*, (1997) investigaram o efeito da cultura autóloga de condrócitos na reparação da cartilagem articular em cães adultos. Para tanto, realizaram 44 defeitos osteocondrais de 4 mm de diâmetro, no sulco troclear de 14 animais. Esses animais foram divididos em três grupos: no primeiro o defeito foi deixado vazio, no segundo um enxerto de periósteo foi suturado na cartilagem hialina ao redor do defeito e, no terceiro grupo, foi injetado cultura autóloga de condrócitos abaixo do enxerto de periósteo após a sutura. Os animais foram seguidos por 0, 12 e 18 semanas e ao final os autores concluíram que não houve diferença significativa nos três grupos em relação à qualidade do reparo.

Costa *et al.*, (2001) produziram defeitos de 3,5 mm de diâmetro e 5,0 mm de profundidade nos joelhos direito e esquerdo de 15 coelhos adultos, com os objetivos de: a) avaliar a utilização da matriz óssea desmineralizada (MOD) no processo de reparação das lesões osteocondrais, b) analisar a capacidade de neoformação óssea e integração com o tecido ósseo subcondral adjacente e, c) analisar sua capacidade de indução condrogênica. Nos joelhos esquerdos o defeito foi preenchido com matriz óssea desmineralizada de cadáveres humanos, enquanto que nos joelhos direitos o defeito permaneceu vazio. Os animais foram seguidos por 2, 4 e 6 semanas de pós-operatório. A análise dos dados demonstrou que houve predomínio de formação de tecido de reparação e preenchimento total da lesão, com características planas e regulares nos grupos experimentais. No grupo controle os autores observaram a produção de um tecido de reparação que preenchia parcialmente a lesão. Concluíram os autores que a MOD é um tecido firme, com características elásticas, que pode ser moldado facilmente, facilitando o preenchimento de lesões osteocondrais.

A utilização de materiais sintéticos para o preenchimento de defeitos osteocondrais vem se mostrando uma excelente alternativa. Os principais trabalhos de pesquisa nesta linha têm como objetivo desenvolver biomateriais, tais como carbono, colágeno, matrizes de ácido polilático e esponjas de poli vinil álcool, para serem utilizados como enxertos no reparo de pequenos defeitos articulares.

Malinin *et al.*, (2006) utilizaram enxertos osteocondrais alógenos, conservados sob refrigeração entre 4 e 6°C, imersos em soro bovino fetal, para preencher defeitos osteocondrais criados nos côndilos femorais de 16 bugios adultos. Em cada animal foi realizado apenas um defeito osteocondral, apresentando a dimensão de 10x15mm. Os animais foram subdivididos em 7 grupos, ocorrendo variação apenas no tempo de conservação dos implantes: implantes frescos (2 animais), conservados por 7 dias (2 animais), conservados por 13 e 14 dias (2 animais), conservados por 18 dias (1 animal), conservados por 21 dias (1 animal) conservados por 28 dias (4 animais) e conservados por 85 dias (2 animais). A superfície articular onde foi utilizado enxerto autólogo fresco, apresentou-se lisa e brilhante, enquanto que esta se apresentou fina e contendo rachaduras nos implantes conservados por 21 dias. Os implantes conservados por 28 dias apresentavam-se com superfície lisa e mais “pálida” quando comparada ao tecido vizinho. Verificou-se afundamento e erosão em um enxerto conservado por 85 dias, estando o osso subcondral abaixo do implante visível. Estes resultados, segundo os autores, documentam uma progressiva deterioração do tecido cartilaginoso com o decorrer do tempo de conservação dos implantes. Sendo desta forma, sugerida a utilização de enxertos osteocondrais autólogos refrigerados até um tempo máximo de 14 dias.

Malmonge (1997a) realizou um estudo com hidrogéis sintéticos, para a obtenção de biomaterial com características adequadas ao uso no reparo de defeitos da cartilagem articular. Amostras de hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) (poliHEMA), blendas do tipo redes semi interpenetrantes - SIPN de poliHEMA com acetato de celulose (poliHEMA-AC) e de poliHEMA com poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (poliHEMA-poli(MMA-co-AA)) foram obtidas por polimerização térmica e caracterizadas quanto à capacidade de absorção de água e de solução salina; quanto ao comportamento mecânico, através de ensaios de fluência a indentação e quanto à citotoxicidade frente a cultura de células *in vitro*. Os resultados mostraram que é possível melhorar o comportamento mecânico de hidrogéis de poliHEMA, através da variação na quantidade de agente de reticulação ou da obtenção de blendas de poliHEMA com polímeros lineares, porém o aumento das propriedades mecânicas é sempre acompanhado de uma diminuição da capacidade de absorção de água. Nenhum dos hidrogéis estudados apresentou efeito citotóxico frente a cultura de células VERO. A blenda poliHEMA-poli(MMA-co-AA) possibilitou uma melhora das

propriedades mecânicas do hidrogel de poliHEMA, sem diminuir muito a sua capacidade de absorção de água e permitiu a incorporação de grupos negativos fixos a estrutura macromolecular, mimetizando assim a matriz extracelular da cartilagem articular e apresentando características semelhantes as da cartilagem hialina.

Rudert *et al.*, (2005) compararam o uso de dois implantes (matriz biológica e matriz polimérica de ácido poli láctico, ambos preenchidos com condrócitos) no preenchimento de defeitos osteocondrais com 3 mm de diâmetro, produzido no sulco troclear dos joelhos de 33 coelhos. Após 6 semanas de seguimento, a maior parte dos defeitos havia sido preenchido com tecido mais claro, até nível do tecido cartilaginoso vizinho, independente do tipo de implante utilizado. A análise macroscópica após 12 meses de estudo não mostrou diferença significativa entre o desempenho biológico dos dois implantes. A avaliação microscópica demonstrou variabilidade no desempenho dos implantes, sendo que implante de matriz biológica apresentou desempenho superior. Tais resultados satisfatórios foram percebidos até 6 meses de seguimento do estudo, quando os implantes começaram a se degenerar.

Messner e Gillquist (1993) compararam o desempenho de dois polímeros diferentes [poliéster e poliuretano tetrafluoretileno (PTFE)] no preenchimento de defeitos osteocondrais (3 mm de diâmetro), produzidos no côndilo femoral dos joelhos de 30 coelhos adultos. Após três meses de seguimento, os autores referem que todos os reparos foram associados à sinovite, sendo que nos joelhos preenchidos com o PTFE essa inflamação foi mais freqüente. A soltura do polímero na região intra-articular foi verificada em alguns reparos e, além disso, referem que a maioria dos implantes apresentou frouxidão em relação às bordas do defeito osteocondral. Por esses motivos, os autores concluíram que nenhum implante possibilitou a restauração adequada da superfície articular.

Hasegawa *et al.*, (1999) avaliaram o desempenho biológico de um implante osteocondral tridimensional, composto de polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM) e hidroxiapatita pulverizada em sua superfície. O defeito osteocondral, com dimensão de 5x10x5 mm, foi produzido no sulco troclear de um dos joelhos de coelhos adultos. O lado contralateral foi utilizado como controle. Os animais foram divididos em cinco grupos e seguidos por um período de 2, 4, 8, 12 e 24 semanas. Segundo os autores, o fato dos implantes terem ficado firmes e imóveis desde a sua implantação favoreceu a formação de tecido ósseo adjacente ao osso subcondral. Além disso, relatam que houve formação de um tecido de aspecto macroscópico semelhante ao cartilaginoso sobre uma parte da superfície do implante e concluem que esse resultado foi decorrente do atrito do implante contra a superfície da patela.

Shahgaldi e colaboradores (1998) produziram 48 defeitos osteocondrais (4 mm de diâmetro), no sulco troclear do joelho de 24 coelhos adultos. Em vinte e quatro defeitos

osteocondrais foi introduzido o implante composto por coral e os demais permaneceram vazios. Após 3 e 6 meses de seguimento foram obtidos cortes histológicos e após análise os autores constaram que houve reabsorção gradativa do coral, com preenchimento de tecido ósseo local. Aos 6 meses, o aspecto macroscópico da superfície do implante era semelhante ao tecido cartilaginoso vizinho.

Em 2000, Diduch e colaboradores preencheram defeitos osteocondrais (3 x 6 mm), produzidos no côndilo femoral do joelho de 12 coelhos adultos, com três diferentes substratos, embebidos por células mesenquimais: agarose, alginato de cálcio e colágeno tipo I. Após seguimento de oito semanas os autores relataram aumento na concentração de proteoglicanos e de fibras de colágenos tipo II nas suspensões que continham agarose e alginato de cálcio e, além disso, havia nesses grupos maior potencial condrogênico que os demais.

Mierish *et al.*, (2002) utilizaram fator β de crescimento de fibroblastos (TGF- β) disperso em gel de alginato de cálcio, para avaliar defeitos osteocondrais de 4x3 mm de diâmetro. Foram operados 33 coelhos, subdivididos em 3 grupos: no primeiro, com 9 animais, os defeitos foram preenchidos com gel de alginato de cálcio; no segundo, com 18 animais, os defeitos foram preenchidos com gel de alginato de cálcio e TGF- β ; no terceiro, com 8 animais, os defeitos permaneceram vazios. Após período de 6 e 12 semanas de seguimento os autores encontraram aumento significativo na qualidade do tecido de reparo no grupo que continha TGF- β .

Cohen *et al.*, (2003) avaliaram o reparo de um defeito osteocondral experimental (4x4mm). Os defeitos foram produzidos no sulco troclear de joelhos de 30 coelhos jovens e foram preenchidos com suspensão de condrócitos, dispersa sobre duas matrizes poliméricas: uma composta por ácido polilático/alginato de cálcio e outra por ácido poliglicólico/alginato de cálcio. Segundo os autores, o alginato de cálcio, por ser um carreador, estimulou a regeneração da cartilagem articular ao facilitar o acesso dos condrócitos ao foco de lesão.

Cook *et al.*, (2003) desenvolveram defeitos osteocondrais de 5x6 mm de diâmetro no côndilo femoral dos joelhos de 65 cães adultos e avaliaram a capacidade de preenchimento de dispositivos que continham proteína osteogênica recombinante humana (OP-1). No total foram realizados 76 defeitos, que receberam o implante com ou sem a adição de carboximetilcelulose, como auxiliar para retenção do implante. Outros 54 defeitos (denominados controle) foram preenchidos com osso bovino, sem colágeno, com ou sem a adição de carboximetilcelulose. Os implantes foram avaliados macroscópica e histologicamente após períodos de 16, 26 e 52 semanas. Analisando os resultados obtidos, os autores concluíram que o OP-1 induziu o crescimento de um tecido com aspecto

semelhante ao tecido cartilaginoso, com preenchimento completo do defeito osteocondral e sem apresentar degradação significativa ao término do estudo.

Utilizando Beta-tricálcio-fosfato (β -TCP), Kondo *et al.*, (2005) avaliaram o preenchimento de defeito osteocondral experimental de 2 mm de diâmetro, produzidos nos côndilos femorais de 35 ratos. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram subdivididos em 5 grupos e sacrificados após 4, 7, 14, 28 e 56 dias de seguimento. Constatou-se por meio de análise imunohistoquímica, realizada com 14, 28 e 56 dias, que houve diminuição significativa nos locais onde foram implantados β -TCP. Segundo os autores, o β -TCP puro estimula a osteocondução, com reabsorção da cerâmica e formação de tecido ósseo.

Frenkel *et al.*, (2005), implantaram ácido polilático recobertos por colágeno ou por ácido hialurônico/quitosan em defeitos osteocondrais de 3x2,8 mm, produzidos no côndilo femoral de coelhos. Após 24 semanas de estudo concluíram que os dois dispositivos foram capazes de estimular a formação de tecido semelhante ao tecido cartilaginoso.

Já Uematsu *et al.*, (2005) implantaram ácido poli-láctico glicólico (PLGA) embebido por células tronco mesenquimais (MSC) em defeitos osteocondrais de 5x1,5 mm, produzidos no sulco troclear de ambos os joelhos de 20 coelhos adultos. Em um dos lados foi implantado o dispositivo composto por MSC/PLGA. No lado contralateral, 10 animais receberam um dispositivo composto apenas por MSC e os outros 10 animais foram utilizados como grupo controle, persistindo o defeito vazio durante as 12 semanas de estudo. Os resultados mostraram que nos defeitos onde se utilizou MSC/PLGA houve formação de um tecido branco, liso e brilhante, macroscopicamente semelhante à cartilagem articular.

Shao *et al.*, (2006) também utilizaram células tronco mesenquimais sobre a matriz polimérica em coelhos. Inicialmente, os resultados foram semelhantes aos relatados por UEMATSU *et al.*, (2005), porém, após 6 meses de seguimento os implantes apresentaram perda da integração com a margem da cartilagem articular vizinha, além de fissura. A reparação anatômica do osso subcondral, por oferecer estabilidade mecânica e suporte vascular, é uma etapa importante para a regeneração da cartilagem articular.

Witte *et al.*, (2006) compararam o desempenho mecânico de implantes osteocondrais, compostos por magnésio (com poros de diferentes tamanhos) e enxerto ósseo autólogo. Os defeitos foram realizados no sulco troclear do joelho de 26 coelhos adultos e o tempo de seguimento foi de 24 semanas. Os autores concluíram que o implante composto por magnésio, mesmo sendo reabsorvido, apresentou suporte mecânico semelhante ao enxerto ósseo no decorrer das primeiras 12 semanas do estudo.

Suominen *et al.*, (2006) compararam o uso de implantes de hidroxiapatita e de vidro bioativo de 4 mm de diâmetro, introduzidos em defeitos osteocondrais produzidos no sulco

troclear dos joelhos de 18 coelhos adultos. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos em três grupos: o primeiro grupo recebeu implante de hidroxiapatita, o segundo vidro bioativo e o terceiro um compósito formado por ambos os materiais. Os autores relatam que os três implantes apresentaram capacidade inicial de restauração da superfície da cartilagem articular, com formação de tecido semelhante ao tecido cartilaginoso. No entanto, referem que, por ter sido degradado rapidamente, o implante contendo compósito não ofereceu sustentação mecânica duradoura.

Bentley *et al.*, (2003) descrevem que o implante autólogo de condrócitos e a mosaicoplastia são um sucesso em defeitos de cartilagem articular do joelho. Este estudo foi realizado com um total de 100 pacientes com idade média de 31,3 anos (16 a 49) e com lesão sintomática da cartilagem articular do joelho. Cerca de 58 pacientes foram submetidos ao implante autólogo de condrócitos e 42 a mosaicoplastia. A maioria das lesões era pós-traumática e o tamanho médio do defeito era de 4,66 cm². Para a avaliação funcional utilizaram a escala de Cincinnati e Stanmore e a avaliação clínica objetiva mostrou que 88% tiveram excelentes ou bons resultados após o implante autólogo de condrócitos em comparação com 69% após a mosaicoplastia. A artroscopia após um ano demonstrou reparo excelente ou bom em 82% depois do implante autólogo de condrócitos e em 34% após a mosaicoplastia. De acordo com os autores, este estudo mostrou uma superioridade significativa do implante autólogo de condrócitos sobre a mosaicoplastia na reparação de defeitos articulares do joelho. Os resultados para o implante autólogo de condrócitos são comparáveis com os de outros estudos, mas aqueles para mosaicoplastia sugerem que seu uso continuado é de valor duvidoso.

Welsing *et al.*, (2008) estudaram a substituição do menisco por um implante que poderia evitar a degeneração da cartilagem, usando um implante de policaprolactron-poliuretana que agiu com um *scaffold* temporário permitindo a regeneração do menisco por uma degradação lenta do polímero com crescimento e diferenciação simultânea do tecido dentro de tecidos típicos da cartilagem como o tecido do menisco. Substituiu-se 13 meniscos laterais de cães por um implante de polímero poroso. Os implantes foram plenamente integrados ao tecido sem formação de uma cápsula. Concluíram que o final de remodelação do tecido em neomenisco não poderia ter lugar uma vez que a estrutura original do polímero ainda estava presente após 24 meses. O implante não impediu a degradação da cartilagem. Apesar da aplicação clínica de um implante de polímero para a substituição de todo o menisco não é suportado por este estudo, os autores acreditam firmemente no conceito, mas melhorias adicionais no implante e técnica cirúrgica são necessárias antes que o implante possa ser recomendado para uso clínico em humanos.

Os objetivos do estudo de Custers e colaboradores (2009) foram investigar a viabilidade da aplicação do defeito do tamanho do implante femoral para tratamento de defeitos da cartilagem localizada e comparar este tratamento, em termos de degeneração articular, com o uso de microfratura em um modelo estabelecido de defeitos da cartilagem em cabra. Em nove cabras criou-se um defeito no côndilo femoral medial em ambos os joelhos. Após dez semanas, os joelhos foram aleatoriamente tratados por microfratura ou pela colocação de um implante de zircônio oxidado. Após vinte semanas decorridas da cirurgia, os animais foram sacrificados. A avaliação macroscópica da cartilagem não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Na avaliação histológica, a cartilagem do platô tibial medial demonstrou degeneração significativamente maior nas microfraturas tratadas nos joelhos do que nos implantes tratados do joelho. Concluiu-se que tanto a microfratura como a utilização de implantes como um tratamento para os defeitos estabelecidos na cartilagem localizada no côndilo femoral medial causou considerável degeneração da cartilagem articular bem como em locais mais remotos do joelho. No entanto, no platô tibial medial, implantes de metal causam menos danos do que a técnica de microfratura.

Schagemann *et al.*, (2009) determinaram a aplicabilidade de células carregadas e células livres de biopolímero hidrogel de gelatina e alginato para restauração de defeitos osteocondrais em cabras. Em cada animal foram realizados quatro defeitos femorais que foram preenchidos com hidrogel, condrócitos autólogos, células do periósteo, somente gel ou foram deixados sem tratamento. Após seis meses de pós-operatório os defeitos foram processados para microscopia de luz e imunofluorescência. Em conclusão, a verdadeira origem do tecido de reparação, o papel e o destino das células implantadas continuam sem resposta. No entanto, conseguiu-se demonstrar o princípio da restauração osteocondral usando um hidrogel injetável de alginato-gelatina. O compósito foi criado em um ambiente propício para a formação de tecidos diferenciados.

Erggelet *et al.*, (2009) avaliaram os resultados parciais de uma célula polimérica livre baseada em cartilagem de reparação com abordagem em um modelo de cartilagens de ovelhas comparando com tratamento em microfraturas. Os defeitos no côndilo medial mediam 11 X 8 mm e foram criados utilizando um bisturi e uma cureta. Em cada defeito, nove perfurações de microfraturas foram introduzidas usando *chondropick®* até onde foi observado o sangramento. Os implantes de células livres de cartilagem (11 X 8 X 1,1 mm) foram imersos em *serum* de ovelhas por 10 minutos, usado para abranger os defeitos e fixado. Após seis meses, os animais foram eutasiados. O tecido de reparação formado no defeito mostra uma quantidade abundante de proteoglicanas e colágeno do tipo II sugerindo a formação de cartilagem hialina após a implantação de implantes de células livres. Os

defeitos tratados com microfraturas formaram uma mistura e o tecido fibroso cartilaginoso apresentou uma quantidade variável de cartilagem específica de colágeno do tipo II. Os autores concluíram que a implantação de implantes de células livres poliméricas baseada em defeito da cartilagem é sugestivo para uma pesquisa promissora para regeneração de defeitos da cartilagem articular após microfraturas.

Chang *et al.*, (2009) propuseram desenvolver um biomaterial compósito como *scaffold* de poli (γ -ácido glutâmico), sulfato de condroitina e poli (ϵ -caprolactona) (γ -PGA-g-CS/PCL) para a engenharia de tecidos de cartilagem. O sulfato de condroitina (CS) foi enxertado com γ -PGA, formando um copolímero γ -PGA-g-CS com 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (EDC). Os copolímeros γ -PGA-g-CS foram, então, misturado com PCL para produzir um *scaffold* poroso γ -PGA-g-CS/PCL por lixiviação de sal. Estes *scaffolds* misturados foram caracterizados por ¹H RMN (espectros), ESCA (espectroscopia para análise da composição química), capacidade de ligação de água, ensaios mecânicos, a taxa de degradação e ensaio de CS. Os resultados mostraram que com o γ -PGA-g-CS como um componente, com capacidade de ligação de água e a taxa de degradação dos *scaffolds* aumentaria substancialmente. Durante um período de 4 semanas de cultura, a estabilidade mecânica dos *scaffolds* γ -PGA-g-CS/PCL foi aumentando gradualmente e os condrócitos foram induzidos a funcionar normalmente *in vitro*. Conclui-se que apresentou excelentes matrizes γ -PGA-g-CS/PCL e biocompatibilidade de condrócitos e têm potencial na engenharia de tecidos como substitutos temporários para a regeneração da cartilagem articular.

Strehl *et al.*, (2005) desenvolveram um método de cultura que permite a manutenção *in vitro* de explantes humanos de cartilagem hialina em qualidade ótima durante um período extenso de tempo. Neste estudo comparou-se culturas estáticas convencionais, com e sem suplementação de soro para uma cultura de perfusão de soro-livre para manter a capacidade humana de explantes da cartilagem articular em um estado morfolologicamente íntegro e diferenciado durante um período de até 56 dias. Os resultados foram avaliados e comparados por métodos morfológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos. Os experimentos mostraram que a manutenção de curto prazo de cartilagem em um estado diferenciado até 14 dias é possível em todas as condições de cultura testadas. No entanto, os melhores resultados em longo prazo de cultura por até 56 dias foram obtidos com a cultura de perfusão sob condições de soro livre. Tal sistema de cultura de perfusão pode ser utilizado para realizar testes *in vitro* de biocompatibilidade por longo prazo de cultura de biomaterial e da cartilagem articular humana intacta.

Li *et al.*, (2009a) o objetivo deste estudo foi avaliar uma célula cultivada em *scaffold* de nanofibras para reparação da cartilagem *in vivo*. Utilizou-se *scaffold* de nanofibras

biodegradáveis de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) cultivadas com condrócitos alogênicos ou células-tronco mesenquimais xenogênicas (MSCs), ou *scaffold* de PCL e sem implante como controle para reparação iatrogênica. Os defeitos de cartilagem mediam 7 mm de espessura integral em um modelo de suínos. Seis meses após o implante, MSC cultivadas mostraram um reparo mais completo nos defeitos em relação a outros grupos. Macroscopicamente, o MSC cultivadas desenvolveu uma cartilagem hialina como o tecido e restaurou uma superfície lisa da cartilagem, enquanto os condrócitos cultivados produziram principalmente fibrocartilagem como tecido com uma cartilagem descontínua superficial de contorno. Os resultados mostraram que os *scaffolds* de nanofibras biodegradáveis cultivados com células-tronco efetivamente reparam defeitos da cartilagem *in vivo*, e que a abordagem atual é promissora para o reparo da cartilagem.

Li *et al.*, (2009b) desenvolveram compósitos biomimeticamente constituídos por polímeros e componentes minerais, assemelhando-se ao osso na estrutura e composição. Foram produzidos utilizando uma técnica de prototipagem rápida para aplicações em engenharia de tecido ósseo. Usando a técnica prototipagem rápida indireta, produziu-se um *scaffold* de três componentes com uma estrutura de pilha de lenha, que consiste de microesferas de poli-L-láctico (PLLA), quitosana e hidroxiapatita (HA) contendo uma macroporosidade maior que 50%, juntamente com microporos induzidos por liofilização. As células pré-osteoblásticas cultivadas sobre estes *scaffolds* formaram uma rede no micro-HA e proliferaram, não só nos canais de macroporos, mas também nos microporos, como pôde ser visto a partir da análise histológica e microscopia eletrônica. As células em proliferação formaram uma rede de matriz extracelular e também se diferenciam em osteoblastos maduros, como indicado pela atividade da enzima fosfatase alcalina.

Han *et al.*, (2007) estudaram as propriedades da cartilagem regenerada usando derivadas da medula óssea de células tronco mesenquimais (CTMs) e poli láctico-co-ácido glicólico (PLGA) e *scaffolds* de compósitos pré-tratados com TGF- β 3 foram investigados e comparados com a não-TGF- β 3 CTMs tratado / compósitos de PLGA em um modelo de coelho. Preparou-se *scaffold* de PLGA e pré-tratados com TGF- β 3 por 3 semanas antes do transplante. Em seguida, os compósitos foram transplantados para o defeito osteocondral no joelho de coelhos. Após 12 semanas de transplante, 10 dos 12 coelhos, em que o TGF- β 3 CTMs pré-tratados/*scaffold* de PLGA foram transplantados apresentaram regeneração cartilaginosa. Ocorreu a regeneração com êxito e a melhoria da cartilagem hialina e a viabilidade de tratamento da cartilagem articular danificada usando CTMs/*scaffold* de PLGA pré-tratados com TGF- β 3.

Laprade *et al.*, (2009) o objetivo deste estudo foi examinar resultados clínicos e funcionais dos pacientes que receberam aloenxertos osteoarticular refrigerado entre 15 e

28 dias após a adjudicação. O transplante de aloenxerto osteoarticular armazenado refrigerado entre 15 e 28 dias proporciona melhora funcional e clínica significativa após um seguimento médio de três anos em pacientes tratados por defeitos osteocondrais de espessura total do côndilo femoral, com resultados semelhantes aos relatos históricos de pacientes com implantes frescos de aloenxertos.

Knutsen *et al.*, (2007) neste estudo os autores compararam a implantação de condrócitos autólogos com microfraturas. Oitenta pacientes foram utilizados neste estudo, sendo divididos em dois grupos iguais, onde trataram 40 pacientes com implantação de condrócitos autólogos e quarenta pacientes foram tratados com microfraturas. Ambos os métodos apresentaram resultados satisfatórios em 77% dos pacientes.

Saris *et al.*, (2008) compararam a implantação de condrócitos (n=57) com microfratura (n=61). Observou-se que a caracterização da estrutura da implantação de condrócitos resultou em uma melhor estrutura de reparo. Conclui-se um ano após o tratamento, que a caracterização da implantação de condrócitos foi associada com o tecido de regeneração é superior após a microfratura.

Ohyabu *et al.*, (2008) relatam que técnicas de cultura em 3D tem atraído muita atenção na engenharia de tecidos. Utilizando um bioreator RWN (*rotating wall vessel*) com simulação de ambiente de microgravidade para células, favorece o reconhecimento e é uma ferramenta usada para espécies severas de células para tecidos de regeneração como condrócitos, osteoblastos, etc. Os autores relatam com sucesso o controle do tamanho do tecido cartilaginoso para células da medula óssea de coelhos por bioreator RWN usando um *scaffold* de esponja de colágeno. No entanto, o uso de *scaffold* proveu o aumento do conteúdo de glicosaminoglicanas e fortalece a força de compressão, com alcance de 0,9 MPa em somente um mês de cultura RWN. Conclui-se que o uso de *scaffold* de esponja de colágeno necessita de um período curto de cultura para transplantação do tecido.

Jukes *et al.*, (2008) pesquisaram a formação de cartilagem em um suporte de carga, com tamanho clinicamente relevante de *scaffolds in vitro* e *in vivo*, para regenerar defeitos em pacientes que sofrem de transtornos de cartilagens articulares. Para o sucesso do implante, as células devem ser cultivadas de forma eficiente e homogênea por todo o *scaffold*. Foram investigados parâmetros da arquitetura do *scaffold*, o método de cultura e a condição celular. A cultura em três dimensões da fibra depositada (3DF) no *scaffold* era mais homogênea do que em uma compressão do *scaffold* moldado. A eficiência de cultura do *scaffold* foi comprometida pela ausência de soro no meio condrogênico, mas poderia ser melhorado através da combinação das células com um gel e injeção subsequente de 3DF no *scaffold*. No entanto, a viabilidade das células foi insatisfatória no interior do enxerto. O protocolo de diferenciação exige melhorias para alcançar a diferenciação homogênea e

abolir formação de teratoma *in vivo*. Os autores concluíram que as células ES (células tronco) podem ser usadas como uma fonte de células para a engenharia de tecidos de cartilagem, ainda pendente de otimização da estratégia.

Giannini, Vannini e Buda (2002), por exemplo, examinaram neste artigo dois métodos de tratamento de lesões osteocondrais do talo (enxertos autógenos de defeitos osteocondrais e transplante autólogo de condrócitos). Os procedimentos para o tratamento de lesões osteocondrais do talo incluem desbridamento da articulação, raspagem da cartilagem fibrilada e ressecção ou perfuração do osso subcondral. Embora estes métodos de tratamento proposto para a reparação de defeitos cartilaginosos têm sido capazes de dar bons resultados em 70% dos casos, eles não foram histologicamente eficaz em restabelecer a bainha de cartilagem hialina, e, invariavelmente, a neoformação de cartilagem foi de natureza fibrocartilaginosa com várias características celulares. Enxertos autógenos de defeitos osteocondrais e transplante autólogo de condrócitos provaram ser capazes de restaurar a superfície da cartilagem articular hialina incluindo defeitos maiores que 2 cm². As lesões osteocondrais do talo são uma ocorrência comum, especialmente em lesões esportivas. A natureza biomecânica desta articulação torna propensa a entorse que pode causar danos não somente a estruturas capsulo-ligamentares, mas também para a cartilagem articular e o osso subcondral. Segundo alguns pesquisadores, há certos fatores subjetivos que favorecem o início da lesão osteocondral, como instabilidade funcional ou transtorno orgânico. As articulações do tornozelo, joelho, cotovelo são mais freqüentemente envolvidas em lesões osteocondrais articulares. Há, no entanto, consenso geral de que todas as lesões osteocondrais da cúpula lateral do tálus são causadas por lesões, como em muitos casos de lesões cúpula medial.

Knecht *et al.*, (2006), neste estudo, testaram mecanicamente a estabilidade da fixação de quatro biomateriais usados para implantação autóloga de condrócitos (ACI) ligado por quatro diferentes técnicas de fixação (não fixo, cola de fibrina, suturas condrais, e sutura trans-ósseo) *in situ*. *Scaffolds* à base de ácido poliglicólico (PGA) e ácido poliglicólico e poli-L-láctico (PGLA), membranas de colágeno e um material *gel-like* foram fixados na matriz retangular de defeitos com espessura total da cartilagem de 10x15mm² e tracionado até a ruptura. A fixação de cola de fibrina do *scaffold* PGLA suportou uma carga de 2,18 ± 0,47 N, o *scaffold* condral de PGA suturado foi de 26,29 ± 1,55 N, e o *scaffold* trans-ósseo de PGA fixo suportou 38,18 ± 9,53 N. Sendo assim, estes resultados servem como base para a seleção da técnica mais adequada para a fixação de *scaffold* de tecidos baseados na engenharia de enxertos de acordo com o esperado para cargas *in vivo*.

Marchand *et al.*, (2009) estudaram os mecanismos subjacentes de quitosana - fosfato de glicerol (GP)/solidificação sangue - implante. A metodologia para solidificação *in*

vitro de quitosana – GP/misturas de sangue, com ou sem adição de fatores de coagulação, foi avaliada por tromboelastograma. O soro foi analisado para o início da trombina, plaquetas e ativação FXIII. Na solidificação *in vivo* de quitosana - GP/ misturas de sangue, com e sem fatores de coagulação, foi avaliado em defeitos da cartilagem com micro furos em 41 coelhos adultos. Pode-se concluir que os implantes de quitosana - GP/sangue solidificaram através de mecanismos de coagulação que envolve a geração de trombina, ativação plaquetária e polimerização da fibrina, levando uma dupla fibrina – o coágulo do polissacarídeo do *scaffold* resiste à lise e é fisicamente mais estável do que o coágulo normal de sangue. Os fatores de coagulação têm potencial para aumentar o uso prático, a residência e atividade terapêutica do polímero – implante sangue.

Horas *et al.*, (2003) avaliaram os resultados clínicos e histológicos de duas técnicas (transplante de cilindro osteocondral autólogo e implante de condrócitos autólogos). Foi realizado um estudo clínico prospectivo para investigar os resultados de dois anos em pacientes com lesões articulares da cartilagem do côndilo femoral que foram aleatoriamente tratados com transplante cilindro osteocondral autólogo ou implante de condrócitos autólogos. A biópsia de pacientes representativos de ambos os grupos foram avaliados com coloração histológica, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de varredura. De acordo com o escore de Lysholm pós-operatório, a recuperação após o implante autólogo de condrócitos foi mais lento do que após o transplante osteocondral em seis meses ($p \leq 0,015$), doze meses ($p \leq 0,001$) e vinte e quatro meses ($p \leq 0,012$). Com base no escore Meyers e escore de atividade Tegner os resultados foram igualmente bons com os dois métodos, dois anos após o tratamento. Ambos os tratamentos resultaram em uma diminuição dos sintomas. No entanto, a melhoria fornecida pelo implante autólogo de condrócitos foi além do previsto pelo transplante cilindro osteocondral. Histologicamente, os defeitos tratados com implante autólogo de condrócitos eram principalmente cheio de fibrocartilagem, enquanto os transplantes de cilindro osteocondral mantiveram seu caráter hialino, embora houvesse uma relação persistente entre o transplante e ao redor da cartilagem original.

Lien, Chien e Huang (2007) desenvolveram uma gelatina cerâmica (CGA) para ser utilizado como um *scaffold* osteocondral para reparo da cartilagem articular. O *scaffold* CGA consiste em quatro níveis, sendo uma camada porosa de cerâmica como componente ósseo e também como âncoras, uma densa camada cerâmica para evitar a penetração dos vasos sanguíneos e também ponto de cisalhamento, uma camada porosa de cerâmica para fixação do osso na cartilagem, isto é, para unir a parte de cerâmica à camada porosa de gelatina, sendo este último é utilizado como componente cartilaginoso. A união foi realizada pela infiltração da solução de gelatina na camada porosa de cerâmica, gelificação e *cross-*

linking. Este *scaffold* foi testado através de cultura de células *in vitro*, com condrócitos articulares de ratos da raça Wistar. Ensaio de DNA, ensaio de GAGs (glicosaminoglicanas), RT-PCR (reação de transcrição reversa em cadeia de polimerase) e avaliação histológica com hematoxilina-eosina e coloração de safranina-O foram realizados para demonstrar que o tecido da cartilagem pode ser desenvolvido em quatro semanas.

Višňa *et al.*, (2004) compararam os resultados do tratamento cirúrgico de defeitos profundos da cartilagem do joelho em um grupo de pacientes tratados por transplante autólogo, transplante de condroenxerto *versus* pacientes tratados com técnicas abrasivas. Entre os 50 pacientes incluídos neste estudo, 25 pacientes (50%) foram submetidos a transplante autólogo de condroenxerto (Grupo I), 25 pacientes (50%) foram tratados com técnicas abrasivas de acordo com Johnson (grupo II). Estes dois grupos eram semelhante com relação à idade, tamanho do defeito, profundidade e localização e a presença de lesões de joelho. Os resultados obtidos neste estudo confirmaram o melhor resultado nos pacientes tratados com transplante autólogo de condroenxerto. Este método inicial mostrou serem tão eficazes como as técnicas abrasivas e recomenda-se seu uso na prática clínica.

Gooding *et al.*, (2006) compararam o uso de recobrimento periosteal (ACI-P) e a utilização de membranas de colágeno do tipo I/III (ACI-C). Foram selecionados 68 pacientes com idade média de 30,52 anos com sintomas de defeitos da cartilagem articular, sendo 33 pacientes (ACI-P) e 35 pacientes (ACI-C). O tamanho médio do defeito foi de 4,54cm². Todos os pacientes foram acompanhados durante 24 meses. Na avaliação clínica e funcional mostrou-se que 74% dos pacientes tinham um bom resultado ou excelente após a ACI-C, em comparação com 67% depois da ACI-P em dois anos. O exame artroscópico em um ano também demonstrou resultados semelhantes para ambas as técnicas. Concluiu-se que não há nenhuma vantagem em usar o *periosteum* como uma tampa para manter os condrócitos dentro do defeito osteocondral, como um resultado do uso de um recobrimento alternativo, como fabricado na membrana de colágeno do tipo I / III.

Ehlers *et al.*, (1999) neste estudo criaram uma célula-matriz mecanicamente estável com implante de condrócitos viáveis e ativos que poderia servir para preencher lesões articulares criadas em joelhos de ovinos. Para este efeito, colheu-se a cartilagem articular de lesões no joelho, os condrócitos foram liberados enzimaticamente e cultivados em frascos de cultura até a confluência. As células foram então tripsinizadas e houve crescimento da matriz de colágeno do tipo I / III (Chondro-GideTM, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça) por 3, 6 e 10 dias antes de ser fixado e embebido para microscopia eletrônica por métodos de rotina. Através da microscopia de luz, os agrupamentos de condrócitos puderam ser vistos na superfície da matriz com algumas células crescentes na matriz. Os resultados de microscopia eletrônica de varredura mostraram grandes condrócitos achatados, sem sinais

de diferenciação, enquanto o crescimento de condrócitos cultivados com esponja Chondro-Gide™ mostrou um aspecto mais arredondado envolvendo firmemente ao redor das fibrilas de colágeno, exibindo numerosos contatos com a matriz.

Gerard *et al.*, (2005) utilizaram hidrogéis de polissacarídeos como alginato (AA) e ácido hialurônico (AH). Vários índices de AA/HA foram utilizados bem como três derivados obtidos por modificação química de HA (HA-C18, HA-C12^{2,3}, HA-C12^{2,5}-TEG^{0,5}). Condrócitos esternal foram cultivados com sucesso em *scaffolds* 3D de alginato e alginato/HA. A retenção de HA em esferas de alginato foi encontrada para ser mais elevada em grânulos cultivados com células do que sem células. HA-C18 melhorou a retenção de picos, mas inibiu o processo de síntese dos condrócitos. A proliferação celular e o metabolismo foram reforçados em todas as esferas de biomateriais quando foram mecanicamente agitadas. Os resultados preliminares mostraram que a matriz neo-sintetizada de condrócitos adquiriu características articulares após 21 dias de cultura.

Tuan (2007) foca o desenvolvimento e construções tridimensionais utilizando células nativas e biomateriais sintéticos. Resultados significantes e clinicamente satisfatórios da aplicação de condrócitos autólogos cultivados em fibrinas dentro de um material polimérico biodegradável. Futuramente, a terceira geração de células baseadas em reparação de cartilagem articular deve incidir sobre o uso de células condroprogênitoras e biomateriais biofuncionais para reparo mais amplo e mais extenso.

Wei *et al.*, (2008) investigaram o efeito da presença de sulfato de condroitina (CS) em cartilagem com um *scaffold* de fibrina sobre a diferenciação de células adiposas derivadas de células tronco adultas (ADAS) em condrócitos. Isolaram-se células (ADAS) de coelho e foram cultivadas em matrizes de fibrina, com e sem CS por até 14 dias. As células ADAS foram diferenciadas em condrócitos em ambas as matrizes, mas a proliferação das células, o conteúdo glicoaminoglicanos e a expressão de colágeno tipo II foram significativamente maiores na matriz de fibrina (CS). O exame histológico e a microscopia eletrônica de varredura revelaram que matriz de fibrina excedeu em induzir a diferenciação de células (ADAS) em condrócitos em termos de características morfológicas do tecido. Concluiu-se que as matrizes de fibrina-CS da cartilagem que imitou a matriz extracelular de cartilagem nativa poderiam funcionar como um *scaffold* tridimensional para a engenharia de tecidos de cartilagem e tem potencial para promover a diferenciação de células ADAS em condrócitos.

Kandel *et al.*, (2006) desenvolveram um dispositivo básico composto por polifosfato de cálcio, recoberto por cultura autóloga de condrócitos. Neste estudo, foram produzidos 29 defeitos osteocondrais (4 x 6 mm de diâmetro) no sulco troclear no joelhos de 12 carneiros. Em cada um dos joelhos um dos defeitos permaneceu vazio e o outro foi utilizado como

controle. Os animais foram acompanhados por 9 meses e ao final desse tempo os autores concluíram que os implantes apresentaram evidências de fusão do implante ao tecido cartilaginoso adjacente, com fixação ao osso subcondral.

Ko *et al.*, (2009) neste estudo discutiram a preparação, caracterização e evolução dos efeitos de *scaffold* de colágeno do tipo II com e sem hidroxiapatita e sulfato de condroitina *in vitro*. Os resultados indicaram que a esponja de colágeno do tipo II-sulfato de condroitina-hidroxiapatita tem boa biocompatibilidade e reproducibilidade para condrogênese *in vitro*.

Vários estudos tem relatado a reparação de danos da cartilagem articular após a implantação de células tronco mesenquimais (MSCs) em defeitos completos da cartilagem sugerindo que as células de reparação foram obtidas a partir do implante.

Quintavalla *et al.*, (2002) estudaram o efeito a curto prazo de células-tronco mesenquimais (MSC) marcadas com corante fluorescente após o implante em defeitos de espessura completa da cartilagem *in vivo*. O corante fluorescente utilizado neste estudo não afetou a viabilidade das MSC ou a sua capacidade de sofrer diferenciação osteogênica e condrogênica *in vitro*. Construções de MSC/gelatina foram implantadas nos defeitos da cartilagem em caprinos. Estas células mantiveram o corante e eram detectáveis pelo exame histopatológico e citometria de fluxo. Em intervalos medidos duas semanas pós-implante observaram-se perda gradual de células implantadas no defeito, bem como fragmentos de esponja de gelatina contendo células tronco da medula marcado em espaços profundos, indicando fragmentação, deslocamento e migração passiva. A marcação com corante fluorescente permitiu determinar se as células implantadas foram perdidas durante os momentos de início após o implante bem como a sua orientação espacial durante o defeito. Ao determinar o destino das células implantadas, novos biomateriais podem ser projetados para corrigir características indesejáveis. Teste de novos biomateriais em curto prazo, em modelos *in vivo* daria uma otimização mais rápida para a retenção de célula necessária para o sucesso e em longo prazo a regeneração da cartilagem.

Chiang *et al.*, (2005) demonstraram a utilização de micro-esferas de gelatina de condrócitos autólogos para a geração de cartilagem *in vivo*. Os condrócitos foram colhidos a partir do membro esquerdo, de 12 suínos. No total, 48 côndilos foram igualmente distribuídos em grupos experimentais, controle e grupos nulo de que foram preenchidos sob o *patch* com esferas de condrócitos carregado de gel, condrócitos em solução em meio normal, ou nada, respectivamente. O reparo foi examinado 6 meses pós-cirurgia com base na aparência macroscópica, os escores histológicos com base na Escala da *International Cartilage Repair Society*, e a característica da proporção de condrócitos. O grupo experimental foi maior que o grupo controle, nas categorias de natureza matriz, o padrão de

distribuição celular e da ausência de mineralização, com suavidade da superfície similar. Ambos os grupos controle e experimental foram superiores ao do grupo nulo nas categorias acima mencionadas. As populações de células viáveis foram iguais em todos os grupos, mas a proporção de característica de condrócitos foi maior no grupo experimental. A aplicação de micro-esferas e gel para o transplante ajudou a manter as células transferidas *in situ* e manter um fenótipo melhor de condrócitos.

Vasara *et al.*, (2006) objetivaram descobrir o quão profundo as lesões condrais podem curar-se espontaneamente em animais em fase de crescimento e após o transplante autólogo de condrócitos. Realizaram um lesão condral de 6 mm de profundidade na articulação do joelho de 57 suínos imaturos e reparados com transplante autólogo de condrócitos, cobertos com perióstio ou fásia muscular, apenas com o perióstio, ou não tratada. Depois de 3 e 12 meses, o tecido de reparação foi avaliado de acordo com a *International Cartilage Repair Society* (ICRS) como a classificação macroscópica, histológica O'Driscoll pela pontuação, e coloração para colágeno tipo II e ácido hialurônico, e com azul de toluidina e safranina-O que marca o glicosaminoglicanos. A estrutura do tecido de reparação foi também analisada com microscopia de luz polarizada quantitativa e análise de recuo da rigidez da cartilagem. Segundo os resultados da classificação indicada pela ICRS o tecido de reparação foi quase normal em 65% (10/17) após o transplante autólogo de condrócitos e 86% (7/8) depois de qualquer reparação em 3 meses. Em 1 ano, o tecido de reparação era quase normal em todos os casos, no grupo reparação espontânea e em 38% (3/8) no grupo de transplante de condrócitos. Na maioria dos casos, o tecido de reparação da cartilagem foi corado intensamente por glicosaminoglicanos e colágeno tipo II, indicando que o tecido de reparação com os constituintes da cartilagem articular. Houve uma diferença estatística nos escores totais histológico em 3 meses ($P = 0,028$) com o melhor reparo no grupo reparação espontânea. A reação do osso subcondral marcada, a coloração com azul de toluidina e colágeno tipo II, foi observada em 65% de todos os animais. Conclui-se que a capacidade espontânea de reparação de defeitos de espessura total da cartilagem de suínos imaturos é significativa e o perióstio autólogo não trazem vantagens adicionais para o reparo.

Sams e Nixon (1995) estudaram compósitos de condrócitos e colágeno para a reconstrução de grandes defeitos articulares. Os condrócitos isolados foram cultivados em *scaffolds* de colágeno expandido por 7-10 dias para fornecer um composto contendo $3,6 \times 10^4$ células/mm³. O enxerto foi transplantado em 15 milímetros de espessura total de defeito na articulação femoropatelar de 12 cavalos usando técnicas artroscópicas. Frações de defeitos sem enxerto na articulação femoropatelar do lado oposto serviram como controles. O líquido sinovial, progressos clínicos e as respostas de dor foram avaliados em

grupos de 6 cavalos com mais de 4 meses e por um período de 8 meses. Após este período, realizaram-se as avaliações histoquímica e histológica dos tecidos e reparação da membrana sinovial. O desbridamento do defeito artroscópico e o implante de condrócitos resultaram durante o pós-operatório em derrame ou dor e os constituintes do líquido sinovial não foram significativamente diferentes nas articulações enxertadas e não enxertadas. As diferenças em defeitos enxertados não eram aparentes. O aumento do número de condrócitos e da coloração histoquímica da cartilagem foi evidente nas camadas mais profundas de defeitos enxertados, considerando que os defeitos sem enxertos apresentaram tecido quase que inteiramente fibroso. A camada superficial dos defeitos enxertados foi de tecido fibroso. Não houve respostas celulares do líquido sinovial, membrana sinovial ou osso subcondral infiltrados para sugerir reação imune relacionadas com as células do enxerto. Os enxertos de condrócito-colágeno foram implantados artroscopicamente e resultou na cura da cartilagem, apresentando melhora em grandes defeitos. No entanto, a organização estrutural das camadas da superfície era insuficientemente pobre e sugeriu durabilidade a longo prazo.

De acordo com Zavaglia (2003) a procura por novas opções de materiais possíveis de serem utilizados para preenchimento de defeitos osteocondrais, persiste, tendo em vista que nenhum material pesquisado até os dias de hoje, apresentou desempenho mecânico satisfatório em longo prazo. O uso de biomateriais poliméricos como enxerto no reparo de defeitos osteocondrais, dentre estes os hidrogéis, iniciou-se na década de 70, continuando até os dias atuais. Trata-se de uma classe de materiais com grande potencial de estudo para o reparo de defeitos osteocondrais, pois são biocompatíveis, fáceis de produzir e manusear (BRAY e MERRYLL, 1973; PEPPAS e MERRYLL, 1977; KON e DE VISSER, 1981; CORKHILL, 1990; MOW, 1991; PATELL, 1994; DOWNES, 1994; REISSIS, 1995; MALMONGE *et al.*, 1997(a); MALMONGE *et al.*, 1997(b); MALMONGE *et al.*, 2000).

Bavaresco (2000) descreve que os hidrogéis poliméricos são definidos como polímeros de cadeia reticulada capazes de absorver água sem se dissolver, podendo ter origem natural ou artificial. Quando secos, são quebradiços e apresentam aspecto de vidro. No entanto, quando em presença de água, tornam-se elásticos. Sua estrutura polimérica tridimensional, geralmente não cristalina, apresenta ligações covalentes fortes e forças coesivas fracas na forma de ligações iônicas. Esta rede tridimensional é que confere a este material a propriedade de insolubilidade, bem como estabilidade em presença de água. Sua característica hidrofílica deve-se à presença em sua estrutura química, de grupos que apresentam afinidade em ligar-se a moléculas de água. Seu aspecto macio e elástico é determinado pelo monômero hidrofílico básico e pela concentração de agentes de reticulação (WILEY, 1989; GONZALEZ, 1992; NETTI, 1993).

Os hidrogéis poliméricos apresentam, ainda, facilidade em serem sintetizados dentro de uma grande variedade de morfologias, sem, no entanto, alterar suas propriedades físicas. Dessa forma, podem ser preparados na forma de esponjas, géis não esponjosos, filmes opticamente transparentes, líquidos que podem ser polimerizados na forma de géis e como recobrimentos de matrizes (substratos).

Para que um material seja utilizado como cartilagem articular artificial ele deve apresentar um comportamento viscoelástico compressivo, semelhante ao da cartilagem articular natural (MOW, 1984). Objetivando melhorar suas propriedades mecânicas, os hidrogéis poliméricos utilizados como cartilagem articular artificial, são geralmente obtidos por copolimerização, isto é, pelo uso de mais de um monômero (GONZALES, 1992).

O hidrogel de poli (2-hidroxi etil metacrilato) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (75:25) (pHEMA/poli(MMA-co-AA)) é um copolímero, da classe dos hidroxialquil metacrilatos ou acrilatos. São polímeros altamente estáveis quanto a sofrer hidrólise e altamente hidrofílicos devido à presença de grupos ésteres.

Os trabalhos até então realizados com hidrogéis poliméricos encorajam a continuidade dos estudos para a avaliação da biofuncionalidade destes materiais no reparo de defeitos osteocondrais, pois os resultados obtidos em estudos com hidrogéis de pHEMA/poli(MMA-co-AA) mostraram ser possível mimetizar o comportamento mecanoelétrico-químico da cartilagem articular (MALMONGE e ARRUDA, 2000). Tais resultados, associados a resultados de ensaios *in vitro* (LOMBELLO, MALMONGE e WADA, 1999a, 1999b; LOMBELLO, MALMONGE e WADA, 2000a; LOMBELLO, MALMONGE e WADA, 2000b) e *in vivo* (MALMONGE, 1997; MALMONGE *et al.*, 2000) demonstram a potencialidade destes materiais para uso no reparo de superfícies articulares.

O fato de o hidrogel ter apresentado excelentes resultados em estudos prévios experimentais *in vitro*, principalmente quanto à sua resistência mecânica, quando submetido à carga por longos períodos de tempo, (BAVARESCO, 2000; BAVARESCO, 2003) autoriza a sua utilização como potencial substituto da cartilagem articular. Estudos prévios mostraram que o hidrogel, utilizado como substituto e como elemento de preenchimento do defeito osteocondral, não teve o desempenho esperado (MALMONGE *et al.*, 2000). Uma das justificativas para tal fato era de que o hidrogel necessitaria de suporte mecânico que, por sua vez, deveria ser incorporado pelo tecido ósseo.

Dentre os grupos de materiais estudados para ser utilizado como suporte mecânico para o hidrogel, o polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM), e as cerâmicas biologicamente ativas, como o β -tricálcio fosfato (β -TCP), podem ser consideradas uma boa opção.

O polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM) é um homopolímero linear de etileno com densidade em torno de 0,93g/cm³ e peso molecular acima de um milhão de gramas por mol. Sua estrutura molecular é composta por ligações covalentes C-C, e quando em estado sólido, são semicristalinos (ORÉFICE, 2006). Além das características de superfície não aderente, baixo coeficiente de atrito e boa resistência mecânica, o PEUAPM apresenta alta resistência ao impacto e ao desgaste devido às grandes extensões de regiões amorfas (WANG, 1998).

O PEUAPM devido sua elevada resistência ao impacto, densidade, biocompatibilidade e bioestabilidade, é uma opção para a confecção de matrizes para implantes osteocondrais (HASEGAWA, 1999; FUKUDA, 2005).

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as biocerâmicas. Cerâmicas reabsorvíveis, como o fosfato de cálcio, seja na forma particulada ou porosa, tem sido usadas para regeneração óssea em situações clínicas. Dentre as cerâmicas compostas por fosfato de cálcio, a hidroxiapatita (HA) e o β -tricálcio fosfato (β -TCP), despertam grande interesse como materiais substitutos para o tecido ósseo, pois são biocompatíveis e reabsorvíveis (ORÉFICE, 2006).

Elastômeros sintéticos são frequentemente os materiais de escolha para a construção de componentes implantáveis para uso médico. Para funcionar de forma eficaz, as propriedades químicas e mecânicas do polímero escolhido deve ser adequado para o aplicação pretendida (Gunatillake *et al.*, 2003).

Entre os muitos elastômeros testados para implantes, as borrachas de silicone e poliuretanos têm tido algum sucesso, particularmente em aplicações cardiovasculares. As borrachas de silicone geralmente possuem boa estabilidade química em ambientes biológicos e, muitas vezes provocam uma série respostas. No entanto, as aplicações da borracha de silicone são muitas vezes limitadas devido às propriedades mecânicas inerentemente fracas destes materiais, particularmente em relação ao rasgo e à abrasão. Apesar de alguns avanços na melhoria dessas propriedades da borracha de silicone através da utilização de cargas de reforço e introdução de produtos químicos de ligações cruzadas, estes problemas não têm sido totalmente superados (Polmanteer, 1988).

Em contraste, os elastômeros de poliuretano podem ser preparados em faixas de propriedades onde é possível reunir suas excelentes propriedades mecânicas, alta tenacidade, excelentes capacidade de carga como mancais, alta resistência ao desgaste abrasivo e excelentes propriedades tribológicas em ambiente aquoso. Além disso, os poliuretanos geralmente oferecem uma boa compatibilidade com o tecido e sangue, e sua resistência à degradação mecânica é boa (Gunatillake *et al.*, 2003). Portanto foi uma das alternativas escolhidas para estudo neste presente trabalho.

Com o crescente aumento no surgimento de novos materiais para utilização como substituto de cartilagem articular - independente do material escolhido – é necessário a realização de testes biológicos.

2.8 Testes Biológicos

A norma “ISO 10993-1: *General Principles*” apresenta os princípios fundamentais que governam a avaliação biológica de biomateriais e dispositivos biomédicos. Os ensaios devem ser realizados no material em condições de uso e qualquer modificação na matéria prima, processamento, esterilização ou indicação clínica vai exigir a reavaliação do biomaterial. Os testes são categorizados em função da natureza do contato (não contato; contato de superfície como pele ou mucosa; contato externo – circulação extracorpórea, por exemplo, implantes) e da duração do contato (exposição limitada, prolongada ou permanente). Dois ensaios são sempre indicados, independente do tipo de contato ou duração: citotoxicidade e sensibilização (no caso de implantes metálicos).

Soares (2005) cita que se enquadram nesta categoria os testes de hemocompatibilidade, que definem o potencial de formação de trombos, e os testes de citotoxicidade, que utilizando técnicas avançadas de biologia celular permitem avaliar a adesão, migração, proliferação, síntese e deposição de matriz extracelular, diferenciação, vias de sinalização, entre outras.

Entretanto, estes testes por si só, apesar de serem muito importantes, não permitem entender toda a complexidade da interação do material com o tecido, posto que utilizem uma única linhagem celular por vez. Ainda que, não consideram a homeostase do organismo, pois são realizados em um sistema fechado. Desta forma, faz-se necessário complementar as análises de citotoxicidade com os estudos *in vivo* (SOARES, 2005).

A engenharia tecidual atualmente é fundamental ao exercício da medicina regenerativa e o mercado potencial de produtos desenvolvidos via Engenharia Tecidual como pele, osso, cartilagem, etc. são estimados em cerca de 100 bilhões de dólares ao ano. Embora, a formação *in vitro* de tecidos necessite, em muitos casos, de um biomaterial (natural ou sintético) na forma de arcabouço para células, há uma tendência crescente de se considerar - dada a sua complexidade - a Engenharia Tecidual como uma área à parte. Dessa forma, o desenvolvimento e produção de biomateriais devem visar seu uso direto e, também, o atendimento às necessidades dessas áreas correlatas (SOARES, 2005).

2.8.1 Testes *in vitro*

Com o rigoroso controle em relação ao uso de animais, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente (ROGERO *et al.*, 2003).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO *et al.*, 2003).

Existem vários métodos para testes *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, que foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Tais ensaios, de acordo com a norma ISO 10993, consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, a fim de verificar as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular.

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos testes *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente, além do período do teste ser, em muitos casos, mais curto. A quantidade de material “gasto” nos ensaios *in vitro* costuma ser menor também. A maior vantagem dos ensaios *in vitro* com cultura de células é também a sua maior desvantagem. Se por um lado se obtém o resultado direto do contato do material com um determinado tipo celular, por outro se eliminam todas as possíveis interações que o material pode causar no organismo. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referências apropriados, atualmente em uso em clínicas.

Rogero e colaboradores (2003) relatam que a determinação da citotoxicidade pode ser através da avaliação qualitativa ou quantitativa. A avaliação qualitativa é realizada pelo exame microscópico das células para a verificação de mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento, lise celular ou de membrana e o resultado é relatado como atóxica, leve, moderada ou severa citotoxicidade, que também pode ser numérico (ex. 0, 1, 2, 3). Na avaliação quantitativa é realizada medida de morte celular, proliferação celular ou formação de colônias celulares. O número de células, quantidade de proteínas, liberação de

enzimas, liberação ou redução de corante vital ou outro parâmetro de medida pode ser quantificado por meios objetivos.

Estudos com estes métodos demonstram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*.

Como variedade e o desenvolvimento de produtos a serem avaliados têm crescido exaustivamente, é necessário o estudo de novas metodologias e escolher dentre elas a que possa responder melhor quanto à presença de possíveis elementos tóxicos (ROGERO *et al.*, 2003).

2.9 Microscopia de Varredura (MEV)

O funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) consiste basicamente de uma varredura de uma superfície sólida com um padrão de rastreamento através de um feixe de elétrons energéticos. Quando o feixe atinge a superfície da amostra, diversos sinais são produzidos por elétrons espalhados, secundários e Auger, fótons de fluorescência de raios-X e fótons de várias energias.

Os elétrons secundários e retroespalhados são coletados e mostrados à mesma taxa de varredura sobre um tubo de raios catódicos (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A resolução do microscópio eletrônico de varredura (*Scanning Electron Microscope*) é de 10 nanômetros, constituindo-se em uma ferramenta bastante importante em atividades de pesquisas. As aplicações do microscópio eletrônico de varredura (MEV) incluem desde estudo de organismos inteiros, tecidos e órgãos, até em certos casos, visualização *in situ* de organelas subcelulares (CASTRO, 2002).

O MEV usa elétrons que se dispersam ou são emitidos a partir da superfície da amostra. O feixe de elétrons é localizado dentro de uma pequena sonda que passa rapidamente para frente e para trás sobre a amostra. O rastreamento completo de cima abaixo geralmente leva apenas alguns segundos. As diferenças na superfície da amostra afetam o padrão com o qual os elétrons são dispersos a partir deste. Vazios ou fissuras aparecem escuros, as protuberâncias e saliências aparecem claras, resultando em uma imagem tridimensional. Somente estruturas superficiais podem ser examinadas com o MEV. Conseqüentemente, este é utilizado para estudar células inteiras, tecidos e superfícies de diversas estruturas (CASTRO, 2002). Outra vantagem da técnica é através do ajuste em elétrons retoespalhados onde partes compostas por átomos com maior peso atômico aparecem mais claros, destacando qualitativamente diferentes materiais onde informações sobre homogeneidade, dimensões, posicionamento podem ser verificadas.

O microscópio eletrônico de varredura é o mais versátil instrumento para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não-biológicas. O interesse maior é obter informações topográficas (CASTRO, 2002).

A grande vantagem deste instrumento é a elevada profundidade de campo, da ordem de 10 μm para aumentos de cerca de 10.000 X, chegando a 1 cm para aumentos de 20 X. Esta característica possibilita obter imagens estereoscópicas e bem enfocadas com espécimes até macroscópicos. Além disso, no MEV a amostra pode ser inclinada e rotacionada sob o feixe eletrônico em todas as orientações, logo precisa estar bem preservada nas três dimensões.

O estudo de materiais biológicos envolve na grande maioria dos casos, informações de topografia da superfície, e para este tipo de imagem usam-se elétrons secundários (baixa energia), provenientes da interação do feixe primário com a camada de ouro que recobre o espécime. No estudo de materiais biológicos, geralmente são usadas tensões aceleradoras de 5 a 10 KV, podendo variar até 25 KV.

Para assegurar melhor imagem, o operador deve cuidar do alinhamento correto das lentes e do canhão, do ajuste do foco, da compensação do astigmatismo, etc. O registro fotográfico é, em geral, feito em negativos que têm dimensão menor do que o visor onde a imagem é formada; assim, a qualidade do filme usado e as condições do registro adequadas (brilho, velocidade da varredura, contraste) são também importantes (CASTRO, 2002).

Figura 13: Esquema comparativo entre um microscópio óptico e um microscópio eletrônico de varredura (adaptado de Raven *et al.*, 1996).

2.10 Microscopia de Força Atômica (MFA)

A microscopia de varredura de força atômica (MVF SFM “scanning force microscopy”) também conhecida como microscopia de força atômica (MFA AFM “atomic force microscopy”) tem sido utilizada largamente no estudo de polímeros (Jandt, 1998; Schneider e Hermann, 2001 e Hodges, 2002), devido a sua capacidade de fornecer informações que não eram passíveis de se obter com o uso da microscopia eletrônica de varredura. A técnica de microscopia de força atômica (AFM) possibilita a reconstrução tridimensional de superfícies com rugosidades extremamente pequenas, da ordem de décimos de nanômetros até a faixa de micrometros. Devido à obtenção de imagens de superfície de materiais sob as mais variadas condições (ar, vácuo e em meio líquido) se tornou um dos equipamentos mais completos para estudos de materiais em micro e nano escalas. Apresenta muitas vantagens em relação às microscopias eletrônicas (ME) de varredura e de transmissão, para estudo de polímeros, entre elas: dispensar o uso de vácuo ou de recobrimento da amostra, a possibilidade de se realizar medidas diretas de altura e rugosidade, além de, para estruturas ordenadas, poder obter imagens com resolução atômica.

As imagens obtidas com os diferentes tipos de AFM são relacionadas com a natureza das forças envolvidas: repulsão coulômbica (AFM - modo contato), força de van der Waals (AFM modo não contato e contato intermitente) (Meyer, 1992), força magnética (MFM), força elétrica (MFE), força de atrito entre outras (Jandt, 1998). Embora a AFM apresente várias vantagens em relação a ME, quanto à preparação das amostras e obtenção de imagens, ela não pode substituir totalmente esta no estudo de polímeros e deve ser vista como uma técnica complementar, que permite obter várias informações sobre as superfícies dos materiais: a) possibilidade de se realizar medidas em ar e em meio líquido (Morris *et al.*, 2001), permitindo a obtenção de imagens de polímeros em seu estado funcional; b) obtenção de imagens com resolução centenas de vezes superior a ME (análise de estruturas na escala nanométrica); c) custo operacional inferior aos microscópios eletrônicos existentes no mercado.

Compreender o princípio de funcionamento do microscópio de força atômica é fundamental para entender suas vastas aplicações. O microscópio de força atômica trabalha de forma semelhante a uma agulha de toca-disco (vinil), onde, no lugar da agulha (probe), se encontra o cantilever, que consiste de uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta com dimensão de poucos micra. Para percorrer a amostra de forma a se obter uma imagem, é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas, capazes de realizar movimentos nas três direções (xyz), com precisão de ângstrons (Å). Durante esta varredura, é utilizado um sistema de alinhamento, onde um feixe de laser

incide sobre o cantilever e refletindo em um sensor, de quatro quadrantes, fornece informação de posição para o sistema de realimentação e controle. Este corrige a posição do cantilever de forma a manter o contato com a amostra, durante a varredura e permitir a obtenção da imagem (Figura 15). Durante a varredura da amostra podem atuar forças de atração ou repulsão, que variam em função da distância entre o cantilever e a amostra (Figura 16). Forças de atração podem ter origem tanto em fatores físicos, como a capilaridade, ou químicos como a afinidade entre o cantilever e a amostra. A força de repulsão se deve a interação coulombiana. A Figura 16 apresenta um esquema das forças envolvidas na MFM em algumas de suas diferentes formas de varredura. Para modo contato a varredura ocorre com a agulha se movendo próxima à amostra.

Figura 14: Diagrama de funcionamento do microscópio de varredura de força (Bernardes Filho e Mattoso, 2003).

Figura 15: Mapa de forças entre amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica (Bernardes Filho e Mattoso, 2003).

A imagem obtida na AFM é resultante da convolução da topografia real da amostra com a forma da agulha do cantilever. Este é uma das principais fontes de artefatos de imagem nesta técnica. Os diferentes modos de se obter imagem variam em função de vários fatores: amostra, tipo de cantilever utilizado, tipo de varredura. A primeira informação que deve ser obtida sobre a amostra é se ela é rígida ou não, isto vai determinar se será utilizado o modo contato, contato intermitente ou não contato. Normalmente, as imagens de amostras de filmes finos são obtidas nos modos de contato intermitente ou não-contato, onde as interações do cantilever com a amostra são menos severas, o que diminui a possibilidade de danos tanto na amostra como na agulha.

Existem várias formas de se obter imagens com um microscópio de força atômica e sua compreensão é fundamental para entender as potencialidades de seu uso. Um conceito importante para o entendimento do funcionamento do microscópio de força atômica é a curva de força que serve para quantificar a interação entre a agulha e a amostra. A Figura

16 mostra uma curva de força onde é apresentado o comportamento do cantilever durante o processo de aproximação e afastamento em relação à amostra. No ponto 1 o cantilever não está em contato com a amostra, isto ocorre no ponto 2, após o contato, o cantilever é posicionado entre os pontos 2 e 3, quanto mais próximo à amostra maior a força exercida sobre esta. No afastamento atua uma força de adesão entre o cantilever e a amostra que possui valor de $\delta_{\max}$.

Figura 16: Curva de força mostrando a aproximação e o afastamento entre a agulha e a amostra em um experimento para verificar a adesão (Bernardes Filho e Mattoso, 2003).

2.10.1 Modo contato

Neste modo de operação é utilizado um cantilever com baixa constante de mola, na faixa de 0,02 a 2 N/m. A imagem é obtida com a agulha tocando suavemente a amostra. Durante esta varredura o sistema de realimentação/controle monitora o feixe de laser refletido pelo cantilever mantendo constante a força exercida pelo cantilever sobre a amostra. Esta forma de obtenção de imagens é mais indicada para amostras rígidas onde a varredura da agulha do cantilever não danifica a amostra.

Outro dado importante é a deposição de água sobre a superfície da amostra que pode causar, devido a efeito de capilaridade, a fixação do cantilever na amostra. Nesta situação não se obtém imagem, pois não ocorre o deslocamento deste sobre a amostra. Quando a amostra é hidrofílica e há acúmulo acentuado de água em sua superfície, o $\delta_{\max}$ pode atingir valores grandes e impedir o deslocamento da agulha sobre a amostra. Nestes casos devem-se utilizar os modos de contato intermitente ou não contato.

2.10.2 Modo de força lateral

Esta informação é obtida quando se utiliza o modo contato de operação. Durante a varredura da amostra o cantilever sofre torção, devido à força de atrito entre a agulha e a amostra. Esta força varia em função da geometria e composição da amostra em análise. Esta informação pode ser muito útil para identificar regiões compostas por diferentes materiais, pois a força de atrito varia significativamente em função do material da amostra. No estudo de polímeros pode ser utilizada para identificar diferentes materiais em blendas poliméricas.

2.10.3 Modos não-contato e contato intermitente.

Neste modo de operação é utilizado cantilever bem mais rígido do que o utilizado para modo contato, para este tipo de varredura a constante de mola varia de 10 a 80 N/m. No caso do modo contato intermitente TM (*TappingMode*) a agulha do cantilever vibra em alta frequência, dezenas a centenas de kilohertz, sobre a amostra tocando-a suavemente durante a varredura, podendo ocorrer contaminação do cantilever com material retirado da amostra, durante o contato. Quanto maior a constante de mola, mais rígido o cantilever e conseqüentemente maior será frequência de oscilação deste durante a varredura.

No caso do modo não-contato o cantilever oscila sobre a amostra sem tocá-la. Neste caso não há contaminação da agulha, com material retirado da amostra. Nesta situação as imagens obtidas apresentam menos detalhes que as obtidas em modo contato ou contato intermitente, pelo fato da varredura ocorrer com a agulha mais afastada da amostra.

Apesar da versatilidade das técnicas de AFM deve-se salientar que a informação obtida é sempre da superfície de estudo não podendo, até o momento, ser obtidas informações a cerca que camadas internas do material. Outra informação importante é que as amostras devem ser razoavelmente planas, pois a diferença máxima de alturas permitida para utilização destas técnicas, é de 10mm. Isto obriga a busca, durante a preparação de amostras, de substratos planos como: mica, grafite pirolítico, vidro ou quartzo polido entre outros materiais.

O uso de substratos planos ajuda a prevenir o possível aumento da rugosidade obtida por “contaminação” da rugosidade proveniente de suporte de amostra com defeitos de polimento, principalmente na deposição de monocamadas de moléculas orgânicas, filmes de Langmuir-Blodgett, moléculas de DNA e etc (JANDT, 1998).

O uso do AFM para estudo de polímeros tem se difundido muito, uma vez que, o custo e manutenção do equipamento é bem inferior ao dos microscópios eletrônicos modernos, além de permitir obter novas informações sobre a superfície de polímeros, tais

como: morfologia, distribuição de fases em blendas e compósitos, dados tribológicos, conformação de cadeias poliméricas entre outras aplicações (KUNDU *et al.*, 2003).

Utilizando o modo de força modulada do AFM é possível também detectar variações entre os diferentes componentes de uma blenda polimérica, pois pode obter imagens cujo contraste é função da rigidez do polímero (THOMANN *et al.*, 1998).

Desta forma a técnica de AFM pode diferenciar os materiais constituintes mesmo que não haja diferença na topografia na blenda. Isto é feito utilizando-se o modo de contato intermitente com detecção em fase, onde a dureza de cada material ocasionará alteração na fase de detecção do cantilever que vibra durante a varredura da amostra. Outra aplicação desta técnica foi realizada por Qian *et al.*, (1996) que observou a forma como as partículas de poliestireno foram espalhadas por um atomizador sobre uma superfície de mica, a partir de soluções diluídas de poliestireno monodisperso, obtendo que a morfologia varia com o tipo de solvente utilizado e o tempo de secagem.

Oh *et al.*, (2003) utilizaram várias técnicas de microscopia eletrônica e AFM, entre elas contato intermitente com detecção em fase, para estudar a compatibilização de blendas poliméricas de polipropileno e borracha natural. O AFM das interfaces revelou aumento de rugosidade que teve como consequência o aumento da adesão entre as partes o que melhorou as propriedades mecânicas das blendas assim produzidas.

No estudo de filmes poliméricos ultra-finos, na faixa de 60 a 800nm, o uso de microscopia de força atômica em contato intermitente permite a obtenção de dados topográficos sem danos ao filme em estudo (PIENTKA, 2003). Outra aplicação interessante de AFM é o seu uso para obter imagens de superfícies poliméricas em meio aquoso onde se elimina os problemas causados pela tensão superficial da água adsorvida nas amostras (HODGES, 2002).

A microscopia força atômica também permite realizar mapeamento de cargas elétricas em superfícies carregadas, esta é uma informação bastante importante para o estudo de blendas e compósitos condutores elétricos, pois permite visualizar e identificar as áreas que apresentam maior concentração de cargas. Nesta mesma linha de trabalho existe ainda a possibilidade de realizar medidas de força magnética o que permite mapear domínios magnéticos em superfícies magnetizadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi idealizada a obtenção de corpos de prova para substituição de cartilagem, para isto deveria ser composto por biomateriais que tivesse o comportamento de integração e funções mecânicas tribológicas e amortecedoras. Dois conjuntos foram pré-avaliados: o primeiro um compósito composto por duas matrizes de silicone e PMMA e hidroxiapatita em pó como agente osseointegrador; o segundo foi elaborado com matriz de poliuretano reforçado por microfibras de biovidro 45S5. Na conceituação do corpo de prova as presenças dos componentes variam em gradiente funcional, onde a superfície progressivamente em contato com o platô tibial deve ter prevalentemente características tribológicas e as internas de osteointegração (Figura 17).

Figura 17: Conceituação do corpo de prova frente ao tecido cartilaginoso osteocondral em gradiente funcional.

3.1 Etapa 1: Estudo preliminar: PMMA, Silicone, gel de CMC e Hidroxiapatita

Primeiramente, selecionaram-se materiais que apresentavam propriedades que suportassem o ambiente do corpo humano como PMMA, gel de CMC e o silicone. O conceito foi baseado em três camadas, sendo a primeira camada elástica, a segunda camada densa e a terceira porosa. Neste material na camada porosa (3ª. camada) variou a porosidade entre 80, 85 e 95%.

Elaborou-se uma seleção de materiais e técnicas de manufatura disponíveis, economicamente estáveis, reproduzíveis e tecnicamente funcionais.

Escolheram-se materiais auxiliares de processo e materiais aloplásticos por estes fazerem parte do implante e permanecerem em contato físico com o tecido ósseo e o meio fisiológico do hospedeiro.

3.1.1 Componente da Matriz

Como componente da matriz, o polimetilmetacrilato (PMMA) foi escolhido devido a sua extensa aplicação na área médica, ser biocompatível, não condutor térmico nem magnético, radiopaco, leve, rígido, relativo baixo custo. O tipo auto-polimerizável foi escolhido devido a sua facilidade de manufatura. Apresenta boa disponibilidade no mercado, baixo módulo elástico (~3,5 GPa) embora, a cartilagem esteja entre (0,45 a 0,80 MPa) e o valor médio do osso cortical que é (~17-25 GPa) (SOUSA, 2009).

Utilizou-se o acrílico comercial auto-polimerizável (PMMA) Vipi Flash (Laboratório Vipi), com diâmetro médio 15µm, densidade 1,18g/cm³, peso molecular 9x10⁴ e a área da superfície específica igual a 1m²/g.

3.1.2 Monômero Metil Metacrilato (MMA)

O MMA é responsável pela dissolução parcial (dependente do tempo de processo, quantidade e características do meio ambiente) das esferas de acrílico e promove ligações entre as esferas (reticulação). O monômero Metil Metacrilato (MMA) Vipi Flash (Laboratório Vipi), pureza de 99,09%. O líquido MMA inclui 0,9% de dimetiltolúideno (DMT) e 0,1% de hidroquinona, um inibidor (SOUSA, 2009).

3.1.3 Borracha de Silicone

A borracha de silicone foi o componente responsável pela elasticidade e mimetização do efeito coxim elástico, ou seja, responsável pela absorção dos impactos. Foi

selecionado o silicone 364 A, marca Fillepoxi Matérias Plásticas Ltda e catalizador 364 B, marca Fillepoxi Matérias Plásticas Ltda, de dureza 65 shore A e módulo elástico de 5 MPa, compatível com o da cartilagem.

3.1.4 Materiais Auxiliadores de Processo

São materiais que participam do processo de manufatura dos implantes, mas não permanecem no implante ou não tem contato com o tecido ósseo nem com o meio fisiológico do hospedeiro (SOUSA, 2009).

3.1.4.1 Carboximetilcelulose (CMC) - Agente Porogênico

O carboximetilcelulose sódico (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose, solúvel em água, apresenta capacidade de rápida absorção de água que em quantidade controlada se transforma em géis interconectados que definirão as dimensões, morfologia e quantidade dos poros. Utilizou-se o carboximetilcelulose (CMC) $C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$ do laboratório Sigma – Aldrich – C 5678, com densidade $1,59g/cm^3$.

3.1.4.2 Água Destilada e Deionizada

A água destilada e deionizada foi utilizada como agente formador de gel (CMC).

3.1.4.3 Formulações Estudadas e Manufatura

A busca pela otimização das propriedades mecânicas, tamanho dos poros e interconectividade entre os poros, elaborou-se as formulações mostradas na Tabela 2.

Tabela 2: Formulações Estudadas e Manufaturas.

Materiais/Porosidade	75%	80%	85%	95%
PMMA	1,18	1,20	1,00	0,416
MMA	2,36	2,40	2,00	0,706
CMC	0,27	0,292	0,336	0,469
Água	0,35	3,885	4,46	6,23
Hidroxiapatita	0,79	-	-	-
Silicone	4,0	4,0	4,0	4,0
Catalisador	0,4	0,4	0,4	0,4

A Figura 18 mostra a técnica de manufatura das matrizes porosas obtidas pela manufatura de PMMA, CMC e silicone.

Figura 18: Diagrama de fluxo da metodologia utilizando PMMA, CMC e Silicone.

No primeiro estágio, processa-se a parte bioativa: o PMMA em pó ($\varnothing$ 8 μ m) é misturado a HA em pó e ao CMC em pó ($\varnothing$ equivalente a 3 μ m); adiciona-se água à mistura e neste estágio o CMC adquire a forma de gel, formando uma rede tridimensional, finalmente o MMA é adicionado e o processo de polimerização é iniciado. O comportamento plástico do material no estágio inicial permite que a mistura seja transferida para a cavidade

de molde manualmente, não excedendo 5 minutos. O molde tampado com uma lâmina de vidro a qual foi presa com elástico e transferido para uma autoclave e pressurizado a 0,2 MPa com ar comprimido em temperatura ambiente. Permaneceu neste estado por 40 minutos, despressurizado e aberto para desmoldagem da peça. A peça conformada foi colocada em autoclave em água fervente e pressurizada a 0,2 MPa por 40 minutos. Após este período, foi removida e seca em estufa estabilizadora à 110°C por 2 horas.

No segundo estágio, o silicone é misturado com o catalisador e colocado em vácuo para evitar a formação de bolhas. Em seguida, a matriz porosa foi colocada sobre vácuo separadamente, após 5 minutos a matriz porosa é imersa em silicone líquido ainda sobre vácuo e então foi feita a quebra lenta do vácuo. Nesse momento a pressão atmosférica realizou parte importante da infiltração da matriz porosa pelo silicone. Ainda imerso, a matriz porosa semi-infiltrada e o silicone ainda líquido foram transferidos para um balão elastomérico (camisa de Vênus) desaerado e amarrado e colocado em um vaso de uma prensa isostática que foi pressurizada a 70 MPa por 2 horas.

Depois de despressurizada e aberta o balão elastomérico foi cortado e as matrizes agora preenchidas com silicone polimerizado teve o excesso de silicone removido com lâmina corte e a peça finalizada.

3.2 Ensaios Realizados

Realizou-se a investigação do biomaterial utilizado neste trabalho por meio de teste de microscopia eletrônica de varredura.

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias de MEV foram obtidas através de um equipamento LEO com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram recobertas com 20 nm de ouro em um metalizador BALSERS modelo SDC 050 e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO (modelo 440) com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20kV. As amostras foram recobertas com 10 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 e mantidas em dessecador até o momento de análise. Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, *dead time* de 30%, corrente de 2,82A e I probe de 950 pA . O mapeamento foi obtido com 20 frames e Linescan com 3000 frames.

3.3 Etapa 2 – Definição do novo compósito: Poliuretano e microfibra de biovidro 45S5

3.3.1 Conceito do implante

Este implante apresenta um conceito que ao ser aplicado *in vivo* mantenha as propriedades mecânicas e as características tribológicas, e simultaneamente garanta a boa adesão celular à superfície óssea da região intercondiliana do joelho (superfície de tecido integrador). Um corpo com estas características, uma vez implantado, é esperado que se estabeleça um compromisso entre: propriedades mecânicas x biocompatibilidade. Para este conteúdo elaborou-se a combinação de materiais (biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro), técnicas de manufatura disponíveis, reprodutíveis e tecnicamente funcionais. Sendo assim, espera-se que este conceito de material composto apresente as características de um possível substituto de cartilagem articular. A Figura 19 demonstra o conceito do implante de microfibra de biovidro e poliuretano.

Figura 19: Desenho esquemático do implante osteocondral de poliuretano e microfibra de biovidro.

3.3.2 Manufatura do implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5

3.4 Ensaios Realizados

Após a manufatura do biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 realizou-se a investigação por meio de teste de microscopia eletrônica de varredura e testes *in vitro*, microscopia de força atômica e análise histológica.

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias de MEV foram obtidas através de um equipamento LEO com detector OXFORD, operando com feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram recobertas com 20 nm de ouro em um metalizador BALSERS modelo SDC 050 e mantidas em dessecador até o momento da análise. Os ensaios MEV foram realizados no Departamento de Química, Escola de Engenharia de São Carlos.

3.4.2 Microscopia de Força Atômica (MFA)

As imagens de Microscopia de Força Atômica foram obtidas através de um equipamento da marca Digital Instruments, modelo MultiMode Nanoscope 3a. O microscópio foi operado no modo de contato intermitente usando uma agulha de silício com constante de mola de 70n/m a uma frequência de 330.000 Hz. Este ensaio se justifica pela micro-análise da superfície tribológica que se deve ao poliuretano (fusão, união, poros, rugosidade, entre outras) e da superfície de osteointegração, seja da porosidade. Os ensaios MFA foram realizados no Departamento de Física, Escola de Engenharia de São Carlos.

3.4.3 Cultura celular

Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular fibroblástica estabelecida, originários do rim do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) obtidas originalmente junto ao Instituto Adolfo Lutz, localizado na cidade de São Paulo/SP. Estas células foram mantidas em meio Ham F-10 (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo-USA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF – Nutricell, Campinas/SP). As células VERO são uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais (ISO, 1992, KIRKIPATRIC, 1992) e foram utilizadas para o desenvolvimento do Ensaio de Citotoxicidade Direta e Indireta. Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (Labimo) da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

3.4.4 Avaliação da Biocompatibilidade e Citotoxicidade dos Materiais

Os biomateriais foram submetidos aos testes recomendados pelas normas internacionais vigentes (ISO-10993, 1997 e ABNT – NBRISO 10993 (1999)), utilizando-se células Vero, recomendadas pela ASTM F813-83 como padrão para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. Todos os procedimentos adotados nos ensaios de Citotoxicidade Indireta e Direta "*in vitro*" foram realizados no Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (LABIMO) Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP- Campinas, SP.

3.4.5 Citotoxicidade Indireta

Os extratos dos materiais (poliuretano e microfibra de biovidro) foram obtidos através da incubação destes em meio Ham F-12 com 10% SFB a 37°C por 48 horas sem agitação, na proporção de 01 g/ml (ISO-10993, 1997). Depois de transcorrido esse período o meio foi recolhido, permitindo desta forma, avaliar o possível efeito de substâncias liberadas pelos

diferentes materiais que poderiam estar presentes no meio de cultura. Como controle positivo, foi utilizado solução de Fenol 0,5% em meio de cultura. Após obtenção dos extratos, os mesmos foram utilizados para cultivo das células Vero. As células serão inoculadas a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ células/ml em placas de 24 poços em meio Ham F-12 com 10% SFB. Após 2h horas de incubação, tempo suficiente para a adesão celular, o meio de cultura foi trocado pelos extratos e respectivos controles, e mantidos nas condições de cultura por 24 horas. Também foi feito o método da contagem direta de células, onde 5 campos foram escolhidos aleatoriamente para cada poço e as células foram contadas. Também foram obtidas imagens destes campos para documentação fotográfica.

3.4.6 Citotoxicidade Direta

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos diferentes materiais foi efetuado através da utilização do teste de viabilidade celular pelo método da contagem direta de células, onde 5 campos foram escolhidos aleatoriamente para cada poço e as células foram contadas. Também foram obtidas imagens destes campos para documentação fotográfica.

3.5 Estudos *in vivo*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (ANEXO A). Foram utilizados oito coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso médio de 2,5 kg e mantidos no Biotério da Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos. O coelho é um modelo experimental muito utilizado, tem seu metabolismo menor em relação aos modelos ratos, e comparado com estes é mais próximo do humano. Na literatura já foram descritos estudos ortopédicos utilizando coelhos como modelos experimentais com diversas finalidades, dentre elas, o uso de enxertos, comportamento da consolidação de fraturas, técnicas cirúrgicas ortopédicas, uso de fatores de crescimento, utilização de materiais biológicos e sintéticos como indutores de crescimento ósseo, entre outras.

Algumas vantagens do uso desses animais são: a facilidade de manuseá-los, seu pequeno porte, baixo custo de manutenção, requisição de pequeno espaço para mantê-los durante o período experimental e principalmente a curta maturidade esquelética, cerca de seis meses após a maturidade sexual (Matos *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 2007). Em comparação com outras espécies, as alterações ou mudanças no esqueleto do coelho são mais rápidas, assim como a fase de remodelação óssea (Pearce *et al.*, 2007).

O grupo experimental recebeu um implante de poliuretano e microfibras de biovidro, medindo 3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade no centro da região intercondiliana (sulco troclear) do joelho direito e no grupo controle foi realizado apenas o defeito ósseo com 3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade. Os animais foram alojados em gaiolas metálicas individuais de 70x70x70 cm, com recipiente cerâmico para água e ração industrial peletizada (Nutriara®) *ad libitum*. A iluminação do biotério seguiu um ciclo de 12/12 horas claro / escuro. Os animais foram divididos em três grupos de períodos diferentes: 15 dias, 30 dias e 90 dias de experimentação. A Tabela 3 ilustra os coelhos controle e experimental.

Figura 20: Coelhos em gaiolas individuais.

Tabela 3: Identificação dos coelhos experimentais e controle.

Coelho	Grupo
Coelho 01	Experimental
Coelho 02	Experimental
Coelho 03	Experimental
Coelho 04	Controle – defeito vazio
Coelho 05	Experimental
Coelho 06	Controle – defeito vazio
Coelho 07	Experimental
Coelho 08	Experimental

3.5.1 Procedimento anestésico

Cada animal recebeu aplicação intramuscular de solução contendo de Quetamina 5% (Vetnil®) na dose de 50 mg/kg de peso associada ao Cloridrato de Xilazina 2% (Bayer®) na dose de 3 mg/kg de peso, na região proximal do membro pélvico. O tempo médio de indução anestésica foi em torno de 10 minutos, proporcionando uma duração média de 50 minutos.

3.5.2 Procedimento cirúrgico

Com o animal em decúbito dorsal horizontal, após a realização da tricotomia do joelho direito e assepsia e anti-assepsia com solução degermante Laboriodine® com 10% de iodopovidona (Figura 21). A equipe cirúrgica foi composta pelo ortopedista Dr. Rodrigo Bezerra de Menezes Reiff que realizou o procedimento cirúrgico, pelo médico veterinário Dr. Thiago Francisco de Moraes e o técnico Nelson Ferreira da Silva Júnior responsáveis pela anestesia, a fisioterapeuta Karen Cristina Laurenti responsável pela tomada de decisões e apoio durante o procedimento cirúrgico e a fisioterapeuta Lourdes Cristina de Albuquerque Haach e o professor Dr. Carlos Alberto Fortulan responsáveis pelas fotografias.

Figura 21: Anti-assepsia do joelho direito do coelho.

O campo cirúrgico foi montado com campos fenestrados estéreis, ficando exposta somente a região do joelho direito. A técnica cirúrgica utilizada foi a mesma descrita por Reiff (2010). Realizou-se via de acesso longitudinal medial sobre o joelho (Figura 22), estendendo-se do pólo inferior da patela em direção à tuberosidade anterior da tíbia, dissecção de pele e subcutâneo e exposição do tendão patelar. Realizou-se incisão na porção central do tendão patelar, no sentido longitudinal, por toda a sua extensão, desde o pólo inferior da patela até a tuberosidade anterior da tíbia. Procedeu-se o afastamento da gordura infra-patelar em direção caudal (Figura 23), com subsequente visualização do sulco troclear do joelho (Figura 24). O defeito osteocondral foi realizado na região central da tróclea femoral, utilizando-se uma broca de 3 mm de diâmetro dotado de baixa velocidade de rotação (Figura 25). A Figura 26 ilustra Defeito osteocondral com 3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade. A colocação do implante de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5 no defeito osteocondral pode ser observada na Figura 27. A Figura 28 mostra a visualização do implante de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5 no defeito osteocondral.

Figura 22: Via de acesso longitudinal medial sobre o joelho.

Figura 23: Afastamento da gordura infra-patelar em direção caudal.

Figura 24: Visualização do sulco troclear.

Figura 25: Realização do defeito osteocondral na região central da tróclea femoral com broca de 3 mm.

Figura 26: Defeito osteocondral com 3 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade.

Figura 27: Colocação do implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 no defeito osteocondral.

Figura 28: Visualização do implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 no defeito osteocondral.

Realizou-se o fechamento da ferida operatória com fio de seda 4-0 (Sertix®) no tendão patelar e fio de sutura não absorvível, composto de nylon mononylon Ethicon® 3.0 para a sutura da pele (Figura 29).

Figura 29: Sutura com fio de nylon.

3.6 Pós-operatório

Imediatamente após o término do procedimento cirúrgico, foi administrado em cada animal de Ketofen 1% - Ketoprofeno (Merial®) via intramuscular (por 3 dias consecutivos) e aplicação tópica de Riodeine Iodopovidona Tópico Spray, contendo 1% de iodo ativo, (Rioquímica®) no local da sutura.

Após a recuperação anestésica, a carga total do membro operado foi permitida imediatamente, sem qualquer tipo de restrição ou imobilização.

Os oito coelhos foram divididos em três grupos, sendo três animais do grupo 1, três animais do grupo 2, 2 animais do grupo 3 em função do tempo decorrido entre o procedimento cirúrgico e a eutanásia. Constituíram-se, assim, os grupos controle e experimental estudados após 2, 4 e 12 semanas.

3.7 Eutanásia

A eutanásia nos animais foi conduzida por um médico veterinário habilitado. Os animais foram sacrificados após 15, 30 e 90 dias do procedimento cirúrgico. A eutanásia foi realizada em sala separada, longe dos demais animais. A anestesia foi similar à do pré-operatório, seguida de injeção endovenosa de 60 mg/kg de cloreto de potássio. Os joelhos direitos foram retirados para estudo histológico e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após a retirada das peças anatômicas para estudo histológico, para o descarte das carcaças, cada animal foi embalado individualmente e recolhido por coleta específica. As peças foram submetidas à limpeza cuidadosa, retirando-se o excesso de partes moles, colocadas em recipientes adequados com solução de formol a 10% e identificados com o número do coelho.

3.8 Preparo das Peças - Análise Histológica

Após 15, 30 e 90 dias de implantação, as amostras foram colhidas, fixadas em formol 10% (em tampão fosfato 0,1M em pH 7,2) por cerca de 24h. Os ossos foram mantidos em solução descalcificadora até que os mesmos permitissem o corte histológico. Então, as amostras foram lavadas em água corrente, desidratadas através de concentrações crescentes de etanol e incluídas em parafina por técnicas histológicas de rotina. Foram feitos cortes com 5mm de espessura para as diferentes amostras estudadas. Os cortes foram então corados com hematoxilina e eosina.

4 RESULTADOS

Os primeiros resultados obtidos foram relativos à manufatura e análise visual dos corpos de prova na identificação da viabilidade do conceito de Silicone/PMMA e Poliuretano/Microfibra de biovidro 45S5; seguida esta aprovação do conceito, os projetos com potencial de aplicação foram analisados quanto à citotoxicidade *in vitro* e finalmente analisadas em experimento *in vivo*.

4.1 PMMA, Silicone, Gel de CMC e hidroxiapatita

A manufatura para obtenção dos corpos de prova de PMMA, gel de CMC e silicone apresentou-se macroscopicamente insatisfatória e inviável, devido ao extravasamento do silicone da amostra, caracterizando uma superfície grudenta, pois sob as condições de pressão isostática por um período de 24 horas, o polímero não se polimerizou como ocorrido em aplicações normalmente em pressão ambiente. A Figura 30 ilustra uma seção de um corpo de prova processado de acordo com o processo de manufatura desenvolvido.

Figura 30: Corpo-de-prova de PMMA, CMC e silicone.

Através da análise de microscopia eletrônica de varredura os implantes de PMMA, gel de CMC e silicone apresentaram independente da porosidade, os mesmos padrões de vazio, fraturas e distribuição desordenada do silicone, possivelmente devido a pressão isostática. Na amostra 01, (Figura 31) observa-se uma distribuição desigual na concentração de silicone e a presença de vazios. Na amostra 02 do material de PMMA, CMC e silicone com porosidade de 80%. Nota-se a presença de vazios, fraturas e distribuição desordenada do silicone como pode ser observado na Figura 32. Na amostra 03 do material de PMMA,

CMC e silicone com porosidade de 85%. Nas Figura 33 e na Figura 34 nota-se a presença de fraturas.

Amostra 01:

Figura 31: Distribuição desigual na concentração de silicone e a presença de vazios, maior e menor magnificação, respectivamente.

Amostra 2:

Figura 32: Presença de vazios, fraturas e distribuição desordenada do silicone, maior e menor magnificação, respectivamente.

Amostra 03:

Figura 33: Presença de vazios, fraturas e distribuição desordenada do silicone, maior e menor magnificação, respectivamente.

Figura 34: Presença de vazios e fraturas.

Independente da porosidade, as diferentes amostras apresentaram o mesmo padrão de vazios, fraturas e distribuição desordenada do silicone.

As características apresentadas pelos implantes de PMMA, gel de CMC e silicone não foram satisfatórias, pois não foi obtida a polimerização do silicone na superfície que manifestou aspecto “grudento” onde a ocorrência destes eventos repetidos nas amostras foi possivelmente devido à alta pressão isostática que provavelmente separou o catalisador do monômero de silicone. Outro aspecto negativamente relevante foi a ruptura da fase PMMA dos corpos com o simples esforço manual.

4.2 Poliuretano e microfibras de biovidro 45S5

O segundo conceito combina os materiais microfibras de biovidro 45S5 e poliuretano, técnicas de manufatura disponíveis, reprodutíveis e tecnicamente aceitáveis. A Tabela 4 mostra as formulações e as manufaturas estudadas. Os implantes foram esterelizados pelo IPEN com tipo de fonte CO-60 Panorâmica (ANEXO D). Os implantes apresentavam diâmetro de 3 mm x 4 mm de profundidade.

Tabela 4: Formulações e Manufaturas estudadas.

Composição	Estrato 1		Estrato 2		Estrato 3	
	PU (g)	PU(g)	MFB(g)	PU(g)	MFB(g)	NaCl (g)
A	0,008709	0,009144	0,009447	0,003919	0,009447	0,010077
B	0,013063	0,007402	0,003149	0,005225	0,006298	0,010077
C	0,013063	0,007838	0,002099	0,006531	0,003149	0,010077

A Figura 35 ilustra os corpos de prova do compósito de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5 manufacturados.

Figura 35: Corpos-de-prova do compósito de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5.

A análise de microscopia eletrônica de varredura da amostra de microfibras de biovidro 45S5 mostra as fibras e as esferas de biovidro 45S5. A Figura 36 ilustra as micrografias das amostras de microfibras de biovidro 45S5 da Mo-Sci Corporations.

Figura 36: Amostra de microscopia eletrônica de varredura da microfibras de biovidro 45S5, menor e maior magnificação respectivamente.

A imagem de MEV da Figura 37 mostra a estrutura microporosa das amostras do biomaterial composto de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5. Na Figura 38 nota-se que os poros estão interconectados, bem distribuídos e apresentando vários tamanhos.

Figura 37: Amostras do biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5.

Figura 38: Presença de poros interconectados, bem distribuídos e apresentando vários tamanhos.

4.2.1 Testes de Citotoxicidade

No material estudado (biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro), seja na condição de citotoxicidade direta ou indireta, observa-se que a quantidade de células é estatisticamente semelhante ao controle negativo, e estatisticamente diferente do controle positivo. Isso indica não toxicidade direta ou indireta da amostra. Estes resultados podem ser vistos na Figura 39 e Tabela 5. A análise qualitativa do ensaio mostrou que a aparência das células que cresceram nas condições de citotoxicidade direta ou indireta se assemelha ao controle negativo e é bastante diferente do controle positivo. Esses dados podem ser vistos na Figura 40.

Figura 39: Toxicidade das amostras estudadas. O controle positivo de toxicidade foi considerada significativamente diferente (0,01) das demais amostras avaliadas.

Tabela 5: Toxicidade indireta dos polímeros testados.

Amostra	Média	Desvio padrão	Erro padrão
Controle -	301,55556	104,80113	34,93371
Controle +	132,88889	18,6912	6,2304
Citotoxicidade direta	326,88889	16,54119	5,51373
Citotoxicidade indireta	365,22222	14,90619	4,96873

Figura 40: Avaliação morfológica qualitativa da toxicidade das amostras estudadas. A) Controle negativo (não tóxico); B) Controle positivo (tóxico); C) Citotoxicidade direta; D) Citotoxicidade indireta. Barra de aumento: 100 µm.

4.2.2 Microscopia de força atômica

A Figura 41 e Figura 42 permitem visualizar as topografias superficiais das amostras do poliuretano na superfície tribológica e da amostra de microfibras de biovidro. As medidas de rugosidades através da microscopia de força atômica para a amostra de poliuretano foi de 15,74 nm e para a amostra microfibras de biovidro foi 15,35 nm.

Figura 41: O valor da rugosidade do poliuretano foi 15,74 nm.

Figura 42: O valor da rugosidade da superfície oposta à tribológica com alta concentração de biovidro 45S5 foi 15,35 nm.

A Figura 43 mostra a imagem tridimensional da superfície tribológica do corpo de prova (poliuretano) e a Figura 44 mostra a imagem tridimensional do lado oposto à superfície tribológica. É observado na Figura 43 a superfície com o polímero fundido e resfriado com a superfície apresentando relevos arredondados e presença mínima de porosidade.

Figura 43: Projeção tridimensional do poliuretano.

Já na Figura 44 sobre uma área superficial observa-se maior relevo e heterogeneidade.

Figura 44: Projeção tridimensional do lado oposto da superfície tribológica.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura do Implante de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5

A Figura 45 mostra o corpo de prova vista lateral onde em a) são observados as regiões proximais à superfície tribológica, intermediária e distal, em b) a mesma imagem em opção de elétrons retroespalhados que mostra em cor mais branca a presença de NaCl remanescente e a lixiviação na porosidade.

Figura 45: Microscopia Eletrônica de Varredura do Implante de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5.

Os cortes para a análise por MEV tiveram uma espessura que variou de 20 a 22 μm e foram realizadas após a fixação, desmineralização, desidratação, diafanização e emblocadas em parafina para a realização dos cortes.

A Figura 46 ilustra a superfície tribológica do biomaterial composto de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5. O poliuretano e as microfibras de biovidro 45S5 estão bem definidos e podem ser facilmente visualizados.

Figura 46: Imagem da superfície da amostra, na posição proximal à superfície tribológica mostrando o poliuretano e as microfibras de biovidro bem visíveis. Em A poliuretano e em B microfibra de biovidro 45S5.

4.2.4 Avaliação macroscópica dos joelhos

A articulação do joelho foi escolhida por ser uma articulação que sofre elevada solicitação mecânica e por apresentar características anatômicas, que facilitam a abordagem cirúrgica e a avaliação do desempenho dos implantes. Optou-se pela região do sulco troclear, e não pela região dos côndilos femorais, pela facilidade de abordagem do primeiro, tornando desse modo procedimento cirúrgico seguro e reprodutível. Além disso, a região troclear também está sujeita a solicitações mecânicas repetidas durante a marcha do coelho, do mesmo modo que a região dos côndilos (REIFF, 2010).

Analisou-se a inspeção prévia macroscópica das características externas do reparo, sendo a superfície, o brilho e a consistência do tecido formado (RIBEIRO, 2004).

Grupo Sacrifício – 15 dias

Na Figura 47, Figura 48 e Figura 49 e após 15 dias de implante, a superfície estava plana, sem tecido fibrocartilaginoso com a peça fixa, brilho normal, coloração translúcida e sem nenhuma depressão.

Figura 47: Imagem com reparo de 15 dias de implantação do coelho 01.

Figura 48: Imagem do reparo de 15 dias de implantação do coelho 02.

Figura 49: Imagem do reparo de 15 dias de implantação do coelho 04.

Grupo Sacrifício – 30 dias

Os animais do grupo sacrifício – 30 dias apresentaram superfície plana, coloração translúcida, ausência de depressão e sem formação de tecido fibrocartilaginoso. A Figura 50, Figura 51 e Figura 52 ilustram os coelhos 05, 06 e 08 respectivamente.

Figura 50: Imagem do reparo de 30 dias de implantação do coelho 05.

Figura 51: Imagem do reparo de 30 dias de implantação do coelho 06.

Figura 52: Imagem do reparo de 30 dias de implantação do coelho 08.

Grupo Sacrício – 90 dias

Os coelhos 03 e 07 foram sacrificados aos 90 dias de implantação e apresentaram como características macroscópicas a presença de superfície plana, crescimento de tecido fibrocartilagenoso, coloração translúcida e sem nenhuma depressão como pode ser observado na Figura 53 e na Figura 54.

Figura 53: Imagem do reparo de 90 dias de implantação do coelho 03.

Figura 54: Imagem do reparo de 90 dias de implantação do coelho 07.

Algumas horas após a cirurgia, todos os coelhos apresentaram deambulação normal, ou seja, apoiaram normalmente o membro operado e durante o período experimental não apresentam nenhum problema aparente de claudicação.

Através da análise macroscópica observou-se a ausência de alterações macroscópicas nas amostras dos joelhos de coelhos (região intercondiliana), ausência de infecção e a manutenção da estabilidade articular durante a evolução (15, 30 e 90 dias) demonstrando a validade do método experimental empregado.

Os animais foram submetidos a observações diárias da ferida cirúrgica durante uma semana, avaliando-se a presença de reação inflamatória baseado na presença de edema e de dor.

Avaliou-se, ainda, a presença de hemorragia, secreção purulenta e a deiscência de suturas.

Não se observou, em nenhum dos animais deste estudo, deiscência de sutura e presença de secreção na área operada. Isto se deveu provavelmente à eficiência da solução iodada com aplicação diária, tornando livre de contaminação. Além disso, o uso do antibiótico por sete dias no pós-operatório, que preveniu uma possível infecção da ferida cirúrgica.

4.3 Análise Histológica

Na análise histológica do coelho 04 (grupo controle – 15 dias), nota-se a presença de tecido ósseo, tecido fibroso com fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos. Não apresentou processo inflamatório (Figura 55).

Na análise histológica tanto coelho C3 e coelho C7 (grupo experimental – 90 dias) observa-se a formação de tecido ósseo, tecido fibrocartilaginoso com condrócitos e rico em vasos sanguíneos (Figura 56, Figura 57, Figura 58 e Figura 59).

4.3.1 Análise Histológica – Coelho C4 – 15 dias

Figura 55: Grupo 30 dias - Coelho 04 – observa-se tecido ósseo; tecido fibroso com fibras colágenas, fibroblastos (f) e inúmeros vasos sanguíneos (v). HE. Aumento 100µm.

4.3.2 Análise Histológica – Coelho 03 – 90 dias

Figura 56: Grupo 90 dias – Coelho 03 - Observa-se tecido ósseo; tecido fibrocartilaginoso com condrócitos (c), inúmeros vasos sanguíneos (*) e o material. HE. Aumento 100μm.

Figura 57: Grupo 90 dias – Coelho 03 - Observa-se tecido ósseo; tecido fibrocartilaginoso com condrócitos (c) e o material. HE. Aumento 100μm.

4.3.3 Análise Histológica – Coelho 07 – 90 dias

Figura 58: Grupo 90 dias – Coelho 07 – Observa-se tecido ósseo; tecido fibrocartilaginoso com condrócitos (c), inúmeros vasos sanguíneos (*) e o material. HE. Aumento 100μm.

Figura 59: Grupo 90 dias – Coelho 07 – Observa-se tecido ósseo; tecido fibroso, composto por fibras colágenas, fibroblastos e inúmeros vasos sanguíneos (*) e o material. HE. Aumento 100μm.

4.4 Análises das imagens após sacrifício dos animais por MEV

A fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) após 30 dias de seguimento cirúrgico mostra a rebsorção local com a remodelação dos tecidos (Figura 60).

A Figura 61 mostra a neo formação óssea na porosidade com ocupação do espaço nos primeiros 15 dias do grupo controle. Essa estrutura é semelhante as trabéculas ósseas que foi considerada biomimética. A Figura 62 mostra a ocupação quase que total da porosidade por osso neoformado com 30 dias de implantação, preenchimento das trabéculas com osso osteóide. A Figura 63 mostra a consolidação da formação óssea com preenchimento densificado da área porosa e formação de osteon após 90 dias de experimentação.

Figura 60: Imagem do grupo controle (defeito vazio) após 30 dias de seguimento cirúrgico. Observa-se a rebsorção local com a remodelação dos tecidos.

Figura 61: Imagem da neo formação óssea na porosidade com ocupação do espaço nos primeiros 15 dias. Estrutura semelhante às trabéculas ósseas que foi considerada biomimética.

Figura 62: Ocupação quase que total da porosidade por osso neoformado com 30 dias de implantação, preenchimento das trabéculas com osso osteóide.

Figura 63: Consolidação da formação óssea aos 90 dias com preenchimento densificado da área porosa e formação de osteon.

5 DISCUSSÃO

O tratamento cirúrgico das lesões condrais e osteocondrais que acometem articulações que suportam carga, principalmente o joelho, ainda representa um desafio para o ortopedista, isto se deve às características da cartilagem hialina articular, que por ser desprovida de vascularização tem limitado potencial de cicatrização (RIBEIRO, CAMANHO e TAKITA, 2004).

Segundo Reiff (2010) o fenômeno do reparo envolve os processos de indução de uma resposta inflamatória à lesão inicial, proliferação, migração de células teciduais, parenquimatosas e conjuntivas, formação de novos vasos sanguíneos, síntese de matriz extracelular e deposição de colágeno, remodelação tecidual, contração da ferida e aquisição de resistência mecânica. Nem todos esses eventos ocorrem em toda reação de reparação. Este processo é influenciado por fatores que incluem o ambiente, a extensão do dano tecidual e a intensidade e duração do estímulo.

Didaticamente, é possível subdividir o processo de regeneração de um tecido em três fases: necrose, inflamação e reparo (MANKIN, 1982). Assim sendo, torna-se nítida a capacidade limitada da cartilagem hialina em se restabelecer, por ser este tecido avascular e não possibilitar a instalação do processo inflamatório no foco da lesão.

Como em qualquer outro tecido corpóreo lesado, existe a mesma fase de necrose inicial e conseqüentemente ocorre a perda celular e da matriz. Como os condrócitos são relativamente insensíveis à condição de hipóxia instalada, existe um número menor de células mortas do que em qualquer outro tecido orgânico. A segunda fase de inflamação por ser inteiramente mediada pelo sistema vascular é ausente, conseqüentemente, não há formação do hematoma, não há produção de fibrina e nem de coágulo de fibrina que serviria como arcabouço para o novo tecido de reparação que iria crescer, não havendo conseqüentemente continuidade do processo. Considerando que a terceira fase que é a reparação, e a ausência de uma fase vascular ou inflamatória limita consideravelmente o número de células disponíveis para responder ao trauma e a capacidade de reparo falha nos condrócitos remanescente o que terminar por bloquear definitivamente o processo de cicatrização (RIBEIRO, CAMANHO e TAKITA, 2004).

Frenkel *et al.*, (2005) citam que as lesões superficiais da cartilagem hialina que não atinjam o osso subcondral, normalmente não cicatrizam. Nesse tipo de lesão, a degeneração da cartilagem hialina ocorre a partir da zona superficial. Com o tempo, a progressão do dano produz um aspecto macroscópico irregular e sem brilho.

É reconhecido, no entanto, que a lesão que se estende até o osso subcondral (defeito osteocondral), muito bem vascularizado, todas as três fases ocorrem naturalmente

(CALANDRUCCIO e GILMER, 1962; CONVERY, AKESON e KEOWN, 1972; KEY, 1931; MANKIN, 1962).

O reparo do defeito da cartilagem que atinge o osso subcondral desencadeia um processo inflamatório, mediado por células presentes na corrente sanguínea, já que a região atingida é ricamente vascularizada. Defeitos osteocondrais são preenchidos imediatamente por sangue, que evolui para a formação de um coágulo de fibrina, com hemácias, leucócitos, plaquetas e outras células da medula óssea. A população de células mesenquimais e indiferenciadas multiplicam-se, a fim de formar um tecido fibrovascular. Esse tecido rico em fibras de colágenos e brotos vasculares evolui para tornar-se um tecido fibrocartilaginoso e, eventualmente, dependendo dos estímulos mecânicos e biológicos, um tecido cartilaginoso. Na base do defeito, na região em contato com o osso subcondral, ocorre neoformação óssea, que se estende em direção à articulação. Por razões ainda não esclarecidas, a formação do tecido ósseo geralmente é interrompida na zona de transição, permitindo que o defeito remanescente seja preenchido com o tecido fibrocartilaginoso (MANKIN, 1982; BUCKWALTER, 2000).

Huntley *et al.*, (2005) descreve que esse tecido neoformado, que preenche o defeito osteocondral, difere significativamente do tecido cartilaginoso normal em relação à sua composição, bem como na disposição de elementos no seu interior. Apesar de o condrócito sintetizar novas moléculas de proteoglicanos, estas apresentam menor peso molecular do que o naturalmente encontrado. Do mesmo modo, as fibras de colágeno do tipo II têm menor diâmetro e disposição mais irregular. Esse arranjo, associado ao fato de não haver perfeita integração do tecido neoformado com o tecido cartilaginoso, favorece a permeabilidade à água. Além disso, o tecido fibrocartilaginoso neoformado apresenta menor módulo de elasticidade, quando comparado ao tecido cartilaginoso (HENDERSON *et al.*, 2005; HATTORI, 2005).

O estudo da cicatrização das lesões cartilaginosas tem sido efetuado em diversos modelos experimentais animais. Provavelmente nenhum outro experimento tenha sido executado tão freqüentemente, quando se trata de estudo sobre cartilagem do ponto de vista macroscópico, radiológico, bioquímico, biomecânico, biomolecular e ultraestrutural (CALANDRUCCIO e GILMER, 1962; CAMPBELL, 1972; FULLER e GHADIALLY, 1972; MANKIN, 1962).

O coelho é um animal amplamente utilizado em modelos para reparação da superfície articular (RIBEIRO, CAMANHO e TAKITA, 2004; Souza *et al.*, 2000; O'Driscoll *et al.*, 1988; Mow *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 2001; Rudert *et al.*, 2005; Hasegawa *et al.*, 1999; Shahgaldi *et al.*, 1998; Diduch *et al.*, 2000; Mierish *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2003; Frenkel *et al.*, 2005; Uematsu *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2006; Witte *et al.*, 2006; Suominen *et al.*,

2006; Ohyabu *et al.*, 2008). Porém, na literatura encontram-se diversos trabalhos com diferentes modelos animais como cães (Welsing *et al.*, 2008), cabras (Custers *et al.*, 2009), porcos (Chiang *et al.*, 2005; Vassara *et al.*, 2006), cavalos (Sams e Nixon, 1995), ovelhas (Erggelet *et al.*, 2009), ratos (Kondo *et al.*, 2005), carneiros (Kandel *et al.*, 2006) e bugios (Malinin *et al.*, 2006).

A articulação do joelho foi escolhida por ser uma articulação que sofre elevada solicitação mecânica e por apresentar características anatômicas, que facilitam a abordagem cirúrgica e a avaliação do desempenho dos implantes. Optou-se pela região do sulco troclear, e não pela região dos côndilos femorais, pela facilidade de abordagem do primeiro, tornando desse modo procedimento cirúrgico seguro e reprodutível. Além disso, a região troclear também está sujeita a solicitações mecânicas repetidas durante a marcha do coelho, do mesmo modo que a região dos côndilos (REIFF, 2010).

Na literatura consultada, constatou-se que tanto a região dos côndilos femorais (Mitchell e Sheperd, 1976; Inouye *et al.*, 2002; Sakihama *et al.*, 2006; RIBEIRO, CAMANHO e TAKITA, 2004; O'Driscoll *et al.*, 1988; Mow *et al.*, 1991; Messner e Gillquist, 1993; Diduch *et al.*, 2000; Frenkel *et al.*, 2005) como a região do sulco troclear Souza *et al.*, 2000; Rudert *et al.*, 2005; Hasegawa *et al.*, 1999; Shahgaldi *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2003; Uematsu *et al.*, 2005; Witte *et al.*, 2006; Suominen *et al.*, 2006; Kandel *et al.*, 2006) foram sede para estudos sobre reparo de cartilagem.

Optou-se pelo tamanho da lesão do defeito osteocondral com diâmetro de 3 mm, porque segundo Rudert *et al.*, (2005) tendem a ser reparados espontaneamente por tecido fibrocartilaginoso e 4 mm de profundidade para fixação biológica (ósseo integração) e menor que 5 mm de profundidade, pois acima disso provoca a destruição medular óssea e pode alterar a sensibilidade do modelo experimental e logicamente os resultados esperados (Wakitani *et al.*, 1994).

Nem todas as lesões cartilaginosas são progressivas e nem todas são clinicamente assintomáticas, podendo a articulação retornar ao seu estado normal (Campbel, 1969; Mankin, 1982). Permanece a dúvida sobre qual lesão necessitaria de reparo cirúrgico e se o tratamento profilático alteraria para melhor a evolução particular de cada lesão.

As lesões focais da cartilagem articular requerem tratamento cirúrgico que vão desde métodos clássicos de estimulação da medula óssea como desbridamento, perfurações múltiplas, abrasões, microfraturas (Kim, Moran e Salter, 1991; Pridie, 1959; Salter, 1980; Steadman *et al.*, 1997), até métodos biológicos modernos como transplantes periosteais e pericondriais, implante de condrócitos autólogos cultivados, e enxertos autólogos osteocondrais (Amiel *et al.*, 1985; Hangody *et al.*, 1997; O'Driscoll *et al.*, 1986; Peterson *et al.*, 2000; Rubak, Poussa e Ritsilä, 1982). Por causa do alto custo e de restrições técnicas

impostas a vários métodos biológicos de tratamento das lesões osteocondrais, alguns autores buscaram métodos também eficazes, porém de maior facilidade de execução. Um desses métodos simples e direto é sem dúvida o transplante ou enxerto autólogo osteocondral que representa uma boa alternativa para reparação biológica da lesão focal da superfície articular. Consiste em preencher o defeito com cilindro osteocondral único, ou conforme o tamanho da lesão, com uma série de pequenos enxertos osteocondrais, técnica que ficou conhecida como mosaicoplastia.

O periósteo tem se mostrado como uma fonte alternativa para revestimento de lesões da cartilagem. As células progenitoras encontradas na camada interna do periósteo são estimuladas pelos fatores ambientais do sítio da lesão a se diferenciarem em tecido cartilaginoso, servindo o próprio periósteo como suporte para o crescimento destas células. No entanto, problemas como hipertrofia tecidual tardia devido a formação de colágeno do tipo X colocam em dúvida a eficácia deste método (ISOGAI et al., 2000).

O aprimoramento técnico-científico na área médica faz-se necessário devido à busca incansável do ser humano pela longevidade e por padrões de vida superiores, o que gera a necessidade de alternativas para reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas, patologias, fraturas, dentre outros (PEREIRA, CLARK e HENCH, 1994).

Os biomateriais têm contribuído significativamente para o avanço da medicina moderna. A partir da colaboração entre engenheiros biomédicos, cientistas de materiais, químicos, físicos, biólogos e médicos; a área de biomateriais tem amadurecido, tornando-se uma área de pesquisa multidisciplinar, que envolve a utilização de conceitos fundamentais no desenvolvimento de materiais para aplicação na prática clínica. Um rápido progresso vem sendo conseguido nessa área, resultando na síntese de novos biomateriais poliméricos e cerâmicos, na aquisição de conhecimentos sobre interações entre biomateriais e tecidos biológicos, desenvolvimento de órgãos artificiais, envolvendo cultivo de células, além do avanço dos sistemas para liberação controlada de drogas, enxertos e dispositivos cardiovasculares, miniaturização de próteses, enxertos ósseos e dispositivos ortopédicos. A caracterização de um biomaterial é de fundamental importância para a determinação de seu desempenho e conseqüente definição de requisitos mínimos a serem atendidos pela indústria.

Com este estudo, foi buscado um aspecto essencial no desenvolvimento de um biomaterial e a interação com os tecidos. Sendo assim, desenvolveu-se um implante que apresenta um conceito que ao ser aplicado *in vivo* mantenha as propriedades mecânicas e as características tribológicas, e simultaneamente garanta a boa adesão celular à superfície óssea da região intercondiliana do joelho. Uma vez implantado, é esperado que se estabeleça um compromisso entre: propriedades mecânicas x biocompatibilidade. Elaborou-

se a combinação de materiais (biomaterial composto de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5), técnicas de manufatura disponíveis, reprodutíveis e tecnicamente funcionais.

Reiff (2010) descreve que o fenômeno de reparo envolve os processos de indução de uma resposta inflamatória à lesão inicial, proliferação de células teciduais, formação de novos vasos sanguíneos, síntese de matriz extracelular e deposição de colágeno, remodelação tecidual, contração da ferida e aquisição de resistência mecânica. Porém, nem sempre ocorrem todos esses eventos no processo de reparação. Este processo é influenciado por fatores que incluem o ambiente, a extensão do dano tecidual, a intensidade e a duração do estímulo.

Com a metodologia aplicada neste estudo, os aspectos macroscópicos encontrados em ambos os grupos foi considerado biologicamente aceitável. O termo “biologicamente aceitável”, segundo Amiel *et al.*, (1985) é utilizado para definir reparos, que à observação macroscópica, se apresentam como tecido neo-formado semelhante a fibrocartilagem, liso, brilhante, firme, em continuidade com a cartilagem adjacente. Trata-se de um critério macroscópico de avaliação, não podendo se estabelecer uma correlação exata com as características histológicas, bioquímicas ou biomecânicas do reparo (RIBEIRO, CAMANHO e TAKITA, 2004). O grupo experimental com 90 dias de seguimento apresentou as características acima citadas.

Os resultados encontrados na análise histológica aos 15 dias do grupo controle (defeito vazio) notaram-se a presença de tecido ósseo, tecido fibroso com fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos e ausência de processo inflamatório. No período experimental de 90 dias foi possível observar a presença de condrócitos próximo à região do implante, tecido ósseo, tecido fibrocartilaginoso e rico em vasos sanguíneos. De acordo com Hasegawa *et al.*, (1999) o fato dos implantes terem ficados firmes e imóveis desde a sua implantação favoreceu a formação de tecido ósseo adjacente ao osso subcondral. Além disso, relatam que houve formação de um tecido de aspecto macroscópico semelhante ao tecido cartilaginoso sobre uma parte da superfície do implante e isso provavelmente ocorreu devido ao atrito do implante contra a superfície da patela. O estudo histológico evidenciou o tipo de tecido neoformado nos diferentes tipos de períodos de experimentação em ambos os grupos.

A fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) após 30 dias de seguimento cirúrgico foi notada a reabsorção local com a remodelação dos tecidos. Após 90 dias de experimentação foi observada através de MEV a consolidação da formação óssea com preenchimento densificado da área porosa e formação de osteon.

Procurou-se, com este estudo, contribuir para pesquisas futuras, pois o biomaterial composto de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5 se comportou como um material

promissor devido a biocompatibilidade aos 90 dias de experimentação, ausência de reação inflamatória e estável.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O biomaterial composto de poliuretano e microfibra biovidro 45S5 para aplicação como substituto de cartilagem articular foi obtido e validado com sucesso através da metodologia empregada e dos resultados obtidos através de ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo*, análise histológica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica;
- ✓ O biomaterial composto de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 não apresentou toxicidade direta ou indireta da amostra e ainda promoveu o crescimento e o espalhamento celular, estando habilitado para continuidade nos estudos com experimentos *in vivo* em coelhos;
- ✓ O implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 foi analisado *in vivo* por histologia e MEV apresentou preenchimento e formação de tecido ósseo total nos poros do implante e a presença de condrócitos e,
- ✓ Independente do tempo de seguimento, conclui-se que o implante de poliuretano e microfibra de biovidro 45S5 é um material promissor devido a biocompatibilidade aos 90 dias de experimentação, ausência de reação inflamatória, é estável e observou-se a presença de fibroblasto, condrócitos e tecido osteíode, satisfazendo a condição desejável e quase pouco publicada de regeneração cartilaginosa.

PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS:

- ✓ Repetição desta metodologia com um período de maior seguimento de tempo;
- ✓ Implantes de poliuretano e microfibras de biovidro com condrócitos;
- ✓ Quantificar valores de penetração do tecido ósseo na estrutura porosa do implante em gradiente funcional;
- ✓ Realizar ensaios mecânicos *Push in* e *Push out*;
- ✓ Analisar a qualidade do osso neoformado;
- ✓ Estudo do comportamento mecânico dos corpos de prova em diferentes concentrações dos constituintes seja módulo elástico, dureza, alongamento, ruptura e tensão de ruptura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, I.; NEWMAN, H.; WILSON, M. **Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra and subgingival bacteria.** Biomaterials 2001; 22:1638-1687.

ALLAN, I.; NEWMAN, H.; WILSON, M. **Particulate Bioglass® reduces the viability of bacterial biofilms formed on its surface in a *in vitro* model.** Clin Oral. Impl. Res 2002;23:53-58.

AMIEL, D.; COUTSS. R.D.; ABEL, M.; STEWART, W.; HAILWOOD, F.; AKESON, W. H. **Rib perichondrial grafts for the repair of full thickness articular cartilage defects. A morphological and biochemical study in rabbits.** J Bone Joint Surg Am 67:911- 920, 1985.

ANGEL, J.; RAZZANO, P.; GRANDE, D. **Defining the challenge: the basic science of articular cartilage repairs and response to injury.** Sports Med Artrosc Rev. 2003. 11 (3): 168-81.

ANUSAVICE, K.J. Philips: **Materiais Dentários.** 10th Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

AOKI, H. **Hydroxyapatite of great Promise for Biomaterials.** Transactions of the JWRI, vol.17, n.1, p.107-112. 1998.

AROKOSKI, J.P.A.; JURVELIN, J.S.; VÄÄTÄINEN, V.; HELMINEN, H.J. **Normal and pathological adaptation of articular cartilage to joint loading.** Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, Copenhagen, v.10, p.186-198, 2000.

ATHANASIOU, K.A.; ROSENWASSER, M.P.; BUCKWALTER, J.A. *et al.*, **Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage.** J Orthop Res 1991; 9:330-340.

AUSTIN, S. **Biological monitoring of TDI-derived amines in polyurethane foam production.** Occup. Med. 2007; 54:444-48.

BAVARESCO, V.P. **Recobrimento de substratos rígidos com hidrogel para utilização como superfície articular** – Dissertação de Mestrado, faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. **Bone graft materials. An overview the basic science.** Clin Ortop Relat Res 10-27, 2000.

BENTLEY, G.; BIAST, L.C.; CARRINGTON, R.W.J.; AKMAL, M.; GOLDBERG, A.; WILLIAMS, A.M.; SKINNER, J.A.; PRINGLE, J. **A prospective, randomized comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee.** J Bone Joint Surg [Br] 2003; 85-B:223-30.

BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L.H.C. **Estudos de polímeros por microscopia de força atômica.** Comunicado Técnico 53. ISSN 1517-4786, São Carlos, SP.

BITTENCOURT, R.A.C. **Cultura de condrócitos para o uso terapêutico: reconstituição de cartilagem** – Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008. Botucatu:[s.n.], 2008.

BLOYER, D.R.; GOMEZ-VEJA, J.M.; SAIZ, E.; MCNAMEY, J.M.; CANNON, R.M.; TOMSIA, P. **Fabrication and characterization of a bioactive glass coating on titanium implant alloys**. *Acta Mater.* 1999;47:4221-4224.

BOCCACCINI, A.R.; MAQUET, V. **Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications**. *Composites Science and Technology*, artigo em impressão, 2003.

BOJRAB, M.J., **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia de Pequenos Animais**. – Editora Manole – 1996.

BONFIELD, W.; GRYNPAS, M.D.; TULLY, A.E.; BOWMAN, J.; ABRAM, J. (1981). **Hydroxyapatite reinforced polyethylene--a mechanically compatible implant material for bone replacement**. *Biomaterials*, Jul;2 (3):185-6, 1981.

BORETOS, J.W. **Bioceramics come of age**, *Chemtech*, April, 1987, p.2223-231.

BORGES, A. P. D.; REZENDE, C. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MELO, E. G.; NOBREGA NETO, P. I.; *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 2000, 52, 616.

BOROVVOY, M.; ZIRKIN, R.M.; ELSON, L.M. *et al.*, (1989). **Healing of laser-induced defects of articular cartilage: preliminary studies**. *J Food Surg*, 1989; 28: 95-99.

BOSS, J.H. *et al.* **The relativity of biocompatibility. A critical of the concept of biocompatibility**. *Israel Journal Medical Science*, v.31, n.4, p.203-209. 1995.

BRANDT, K.D.; MANKIN, H.J. **Pathogenesis of osteoarthritis**. In: KELLEY, W.N.; HARRIS, E.D., Jr.; RUDDY, S.; SLEDGE, C.B. *Textbook of rheumatology*. 4. ed. Philadelphia, Saunders, 1993. p. 1355-84. (Section XV _ Osteoarthritis and Polychondritis).

BRAY, J. C.; MERRYL, E. W., **Poly (vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular cartilage material** - *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 7:431-443, 1973.

BREINAN, H.A.; MINAS, T., HSU; H., NEHRER, S.; SLEDGE, C.B.; SPECTOR, M. **Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model**. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.79, p.1439-1451,1997.

BRINTON, L.A.; BROWN, S.L. **Breast implants and cases**. *Review. J. Natl Cancer Inst.* 1997; 89:1341-9.

BRITTBERG, M.; LINDAHL, A.; NILSSON, A.; OHLSSON, C.; ISAKSSON, O.; PETERSON, L. **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation**. *N Engl Med*, 1994; 331: 889-95.

BUCKWALTER, J.A. **Orthopaedic Basic Science-Biology and Biomechanics of the musculoskeletal system** – American Academy of Orthopaedic Surgeons – 2nd Edition - 2000.

BURELLI *et al.* **Mechanical properties of flo-deflocculated and milled powders in the Al₂O₃/ZrO₂ (CeO₂) system**. *J. of Materials Science*, vol.33, p.441-444, 1988.

BURNY, F. et al. **Materials Science and Engineering A199**. Biomaterials Education: a challenge for medicine and industry in the late 1990s. p.53-59. 1995.

CALIXTO, R.F.E. **Implante de um floculado de resina derivada de óleo de mamona (*Ricinus communis*) em alvéolo de rato imediatamente após a extração dental. Avaliações histológicas e histométrica da biocompatibilidade e da cronologia do reparo ósseo**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo –USP – Ribeirão Preto, SP, 2001.

CALLISTER JR, W.D. **Materials Science and Engineering**. Introduction, 1999.

CALANDRUCCIO, R.A.; GILMER, W.S. Jr. **Proliferation, regeneration, and repair of articular cartilage of immature animals**. J Bone Joint Surg Am 44:431-455, 1962.

CAMARGO, P.M.; LEKOVIC, V.; WEINLAENDER, M.; KLOKKEVOLD, P.R.; KENNEY, E.B.; DIMITRIJEVIC, B.; NEDIC, M.; JANCOVIE, S.; ORSINI, M. **Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontias**. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 200;90:581-586.

CAMILO, C.C.(2006). **Escafoides para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro: análises mecânicas e *in vitro***. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 145p. São Carlos, SP.

CAMPBELL, A.A. **Bioceramics for implant coating**. Materials today, p. 26-30. 2003.

CAMPBELL, C.J. **The healing of cartilage defects**. Clin Orthop 64:45-63, 1969.

CARVALHO, A.C.C. **Células-tronco: a medicina do futuro**. Ciênc Hoje. 2001; 29: 27-31.

CASTRO, L.A.S. **Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 37p. - (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 93).

CHANG, K-Y *et al.*, **Fabrication and characterization of poly(γ -glutamic acid)-graft-chondroitin sulfate/polycaprolactone porous scaffolds for cartilage tissue engineering**. Acta Biomater (2009), doi:10.1016/j.actbio.2009.02.002

CHEN, I.; WANG, M. **Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer**. Biomaterials 2002;23:2631-2639.

CHIANG, H.; KUO, T.F.; TSAI, C.C.; LIN, M.C.; SHE, B.R.; HUANG, Y.Y.; LEE, H.S.; SHIEH, C.S.; CHEN, M.H., RAMSHAW, J.A.M., WEIRKMEISTER, J.A., TUAN, R.S., JIANG, C.C. **Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation**. Journal of Orthopaedic Research, v.23,p.584-593,2005.

COHEN, M.; NERY, C.; PECCIN, M.S.; RÉRIO, C.R.; ASAUMI, J.D.; LOMBELLO, C.B. **Implante autólogo de condrocitos para o tratamento de lesão do côndilo femoral e talo**. Einstein (2008); 6(1): 37-41.

COHEN, S.B.; MEIRISCH, C.M.; WILSON, A.; DIDUCH, D.R. **The use of absorbable copolymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits**. Biomaterials, v.24, p.2653-2660, 2003.

COIMBRA, I.B.; PASTOR, E.H.; GREVE, J.M.A.; PUCCINELLI, M.L.C.; FULLER, R.; CAVALCANTI, F.S. *et al.* **Consenso brasileiro para o tratamento da osteoartrite (artrose).** Rev Bras Reumatol. 2002; 6: 371-74.

CONVERY, F.R.; AKESON, W.H.; KEOWN, G.H. **The repair of large osteochondral defects: an experimental study in horses.** Clin Orthop 82:253-262, 1972.

COOK, S.D.; PATRON, L.P. **Repair of articular cartilage defects with osteogenic protein -1 (BMP -7) in dogs.** J. Bone Joint Surg. Am. 85:116-123, 2003.

CORKHILL, P.H.; TREVETT, A.S.; TIGHE, B. J. **The Potential of Hydrogels as Synthetic Articular Cartilage** - Proc. Inst. Mech. Engrs. Part H: Journal of Engineering in Medicine, v.204:147-155, 1990.

CORNELL, C.; LANE, J.M. **Current understanding of osteoconduction in Bone Regeneration.** Clinical Orthopaedic & Related Research: Fracture Healing Enhancement, s355, p.267-273. 1998.

COSTA, A.L.D.; OLIVEIRA, C.R.G.; LEOPIZZI, N.; AMATUZZI, M.M. **O uso da matriz óssea desmineralizada na reparação de lesões osteocondrais. Estudo experimental em coelhos.** Acta Ortop. Bras., vol.9, p.27-38, 2001.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional.** Ed. Guanabara Koogan. 6ªed. Rio de Janeiro, RJ.

CUSTERS, R.J.H.; SARIS, D.B.F.; DHERT, W.J.A.; VERBOUT, A.J.; VAN RIJEN, M.H.P.; MASTBERGEN, S.C.; LAFEVER, F.P.J.G.; CREEMERS, L.B. **Articular cartilage degeneration following the treatment of focal cartilage defects with ceramic metal implants and compared with microfracture.** J Bone Joint Surg Am. Apr; 91(4):900-10.

DEL CARLO, R.J.; RODRIGUES, C.B.S.; NATALI, A.J.; MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, K.N.; SOUZA, T.D.; LIMONGE, C.R. **Terapia laser de baixa potência ($\lambda = 904\text{nm}$) na reparação de defeito osteocondral experimental da cabeça umeral de cães.** Revista Ceres, 54(311): 073-079, 2007.

DIDUCH, D.R.; JORDAN, L.C.M.; MIERISCH, C.M.; BALIAN, G. **Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects.** Arthroscopy: The Journal and Related Surgery, v.16,p.571-577,2000.

DOWNES, S; ARCHER, R.S.; KAYSER, M.V.; PATEL, M.P.; BRADEN, M. - **The Regeneration of Articular Cartilage Using a New Polymer System,** Journal of Materials Science - Materials In Medicine, v.5: 88-95, 1994.

DOYLE, C.; TANNER, E.T.; BONFIELD, W. **In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite.** Biomaterials 1991; 12:841-847.

EHLERS, E.M.; FUB, M.; ROHWEDEL, J.; RUSSLIES, M.; KICHNEL, W.; BEHRENS, D. **Development of a biocomposite to fill out articular cartilage lesions. Light, scanning and transmission electron microscopy of sheep chondrocytes cultured on a collagen I/III sponge.** Annals of Anatomy. Accepted June 17, 1999.

EID, K.; ZELICOF, S.; PERONA, B.P.; SLEDGE, C.B.; GLOWACKI, J. (2001). **Tissue reactions to particles of boné-substitute materials in intraosseous and heterotopic**

sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. Journal of Orthopaedic Research, 19:962-969.

ELBATAL, H.A.; AZOOZ, M.A.; KHALI, E.M.A.; MONEM, A.S.; HAMDY, Y.M. (2003). **Characterization of some bioglass-ceramics.** Materials Chemistry and Physics, 80:599-609.

ERGGELET, C.; ENDRES, M.; NEUMANN, K.; MORAWIETZ, L.; RINGE, J.; HABERSTROH, K.; SITTINGER, M.; KAPS, C. **Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants.** Journal of Orthopaedic Research, February, 2009.

FELICE, J.C.; COSTA, L.F.C.; DUARTE, D.G.; CHAHADE, W.H. **Elementos Básicos de Diagnóstico de Osteoartrose.** Temas de Reumatologia Clínica. 2002; 3:68-81.

FELISBINO, S.L.; CARVALHO, H.F. Condrócito. In: Carvalho, H.F. Collares-Buzato CB, Células: uma abordagem multidisciplinar. Barueri: Manole; 2005. p. 11-21.

FERNANDEZ, R.N.; XIMENES, A.C.; RASSI, C.M.; SILVA, N.A. **Perspectivas terapêuticas para osteoartrose.** Rev Bras Reumatol, 1997; 37: 97-102. 20.

FISHER, J.P.; REDDI, A.H. **Functional Tissue Engineering of a Bone: Signals and Scaffolds.** In: ASHAMMAKHI, N. FERRETI, P. Topic in Tissue Engineering, v.1, Chapter 8. 2003.

FONSECA, F. **Mosaicoplastia revestida com periósseo no tratamento de perda osteocondral do joelho.** Rev. Bras. Ortop., vol.44, no.2. São Paulo, mar/abr, 2009.

FRENKEL, S.R.; BRADICA, G.; BREKKE, J.H. **Regeneration of articular cartilage – Evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants.** Osteoarthritis and cartilage, v13, p.798-807, 2005.

FUKUDA, A.; KATO, K.; HASEGAWA, M.; HIRATA, H.; SUDO, A.; OKAZAKI, K.; TSUDA, K.; SHIKINAMI, Y.; UCHIDA, A. **Enhanced repair of large osteochondral defects using a combination of artificial cartilage and basic fibroblast growth factor.** Biomaterials v.26, p. 4301, 2005.

FULLER, J.A.; GHADIALLY, F.N. **Ultrastructural observation on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage.** Clin Orthop 86:193-205, 1972.

GARRIDO, L.F. (2007), “**Avaliação do desempenho de implantes de polietileno e de fosfato tricálcico, recobertos por hidrogel, em defeitos osteocondrais no joelho de cães**”. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas, Unicamp, Campinas, SP.

GERARD, C.; CATUOGNO, C.; AMARGIER-HUIN, C.; GROSSIN, L.; HUBERT, P.; GILLET, P.; NETTER, P.; DELLACHERIE, E.; PAYAN, E. **The effect of alginate, hyaluronate and hyaluronate derivatives biomaterials on synthesis of non-articular chondrocyte extracellular matrix.** Journal Of Materials Science: Materials In Medicine 16 (2005) 541–551.

GIANNINI, S.; VANNINI, F.; BUDA, R. (2002). **Osteoarticular grafts in the treatment of OCD of the talus: mosaicplasty versus autologous chondrocyte transplantation.** Foot Ankle Clin N Am 7 (2002) 621-633.

GOMEZ-VEJA, J.M.; SAIZ, E.; TOMSIA, A.P.; MARSHALL, G.W.; MARSHAL, S.J. **Bioactive glass coatings with hydroxyapatite and Bioglass® particles on Ti-based implants. 1. Processing.** *Biomaterials* 2000;21:105-111.

GOMIDE, V. S. **Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos.** Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas: [s.n.], 2005. 121p. Dissertação (Mestrado).

GONZALEZ, N.; VADILLO, I.; BLANCO, M.D.; TRIGO, R.M.; TEIJON, J.M. **Hidrogels: Síntesis, propiedades y aplicaciones.** *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.1, p.79-92, 1992.

GOODING, C.R.; BARTLET, T W.; BENTLEY, G.; SKINNER, J.A.; CARRINGTON, R.; FLANAGAN, A. **A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered.** *Knee* 2006;13:203–210.

GOSAIN, A.K.; PERSING, J.A. **Biomaterials in the face: benefits and risks.** *J Craniofac Surg* 10: 404-414, 1999.

GUNATILLAKE, P.A.; MARTIN,D.J.; MEIJS, G.F.; MCCARTHY, S.J.; ADHIKARI, R. **Designing biostable polyurethane elastomers for biomedical implants.** *Aust. J. Chem.* 56, 545–557, 2003.

HAAPALA J, AROKOSKI JPA, HYTTINEN MM, LAMMI M, MARKKU T, KOVANEN V, HELMINEN HJ, KIVIRANTA I. **Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy.** *Clin Orthop* 1999; 1: 218-29.

HAN, S.H.; KIM, Y.H.; PARK, M.S.; KIM, I.A.; SHIN, J.W.; YANG, W.I.; JEE, K.S.; PARK, K.D.; RYU, G.H.; LEE, J.W. **Histological and biomechanical properties of regenerated articular cartilage using chondrogenic bone marrow stromal cells with a PLGA scaffold *in vivo*.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* DOI: 10.1002/jbm.a.31828.

HANGODY, L.; KISH, G.; KARPATI, Z.; EBERHART, R. **Osteochondral plugs: autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral articular defects.** *Oper Tech Orthop* 7:312, 1997.

HARDIE, E.M.; CARLSON, C.S.; RICHARDSON, D.C. (1989). **Effect of Nd: YAG laser energy on articular cartilage healing in the dog.** *Lasers in Surgery and Medicine*, 9: 595-601.

HARDIN, C.K. **Banked bone.** *Otolaryngol Clin North Am* 27:911-925, 1994.

HASEGAWA, M.; SUDO, A.; SHIKINAMI, Y.; UCHIDA, A. **Biological performance of a three-dimensional fabric as artificial cartilage in the repair of large osteochondral defects in rabbit.** *Biomaterials*, v.20, p.1969-1975,1999.

HATTAR, S.; ASSELIN, A.; GREESPAN, D.; OBOEUF, M.; BERDAL, A.; SAUTIER, J.M. (2005). **Potential of biomimetic surfaces to promote *in vitro* osteoblast-like cell differentiation.** *Biomaterials* 26:839-848.

HATTORI, K. *et al.* (2005). **Novel ultrasonic evaluation of tissue-engineered cartilage for large osteochondral defects-non invasive judgment of tissue-engineered cartilage.** Journal of Orthopaedic Research, v.23, p.1179-1183, 2005.

HEIKKILÄ, J.T.; AHO, A.J.; KANGASNIEMI, I.; YLI-URPO, A. **Polymethylmethacrylate composites: disturbed bone formation at the surface of bioactive glass and hydroxyapatite.** Biomaterials 1996;17:1755-1760.

HENCH, L. L.; WILSON, J.; **Introduction to Bioceramics,** World Scientific: Singapore, 1993.

HENCH, L.L. *et al.*, **An investigation of bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials.** J Biomed. Mater. Res., vol. 2, n.1, 117-141.1972.

HENCH, L.L.; SPLINTER, R.J.; ALLEN, W.C.; GREENLEE, T.K. **Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials.** J. Biomed Mater Res Symp 1971;36:117-141.

HENDERSON, I; FRANCISCO, R.; OAKES, B.; CAMERON, J. **Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal chondral defects of the knee – a clinical, arthroscopic, MRI and histologic evaluation at 2 years.** The Knee, v.12, p. 209-216, 2005.

HODGES, C. S. **Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids.** Advances in Colloid And Interface Science, Amsterdam, v. 99 p. 13-75, 2002.

HORAS, M.D.; PELINKOVIC, D.; HERR, G.; AIGNER, T.; SCHNETTLER, R. **Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in cartilage repair.** The journal of Bone & Joint Surgery · JBJS.ORG VOLUME 85-A · NUMBER 2 · February 2003.

HULBERT, S.F.; HENCH, L.L.; FORBES, D.; BOWMAN, L.S. **Ceramics in Surgery.** 1983:3-25.

HUNTLEY, J.S.; MCBIRNIE, J.M.; SIMPSON, A.H. – **Cutting-edge design to improve cell viability in osteochondral grafts.** Osteoarthritis and Cartilage, v.13, p. 665-671, 2005.

HUNZIKER, E.B. **Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects.** Osteoarthritis Cartilage 2002, 10: 432-463.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C.H.; CHIERICE, G.O. **Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães.** Revista brasileira de ortopedia. Maio – 2002.

ILAN, D.I.; LADD, A.L. (2003). **Bone graft substitutes of a Porous Hydroxyapatite Ceramic.** Journal Of Dentistry Research, 61:1458-1460.

INOUE, C. M.; FAGUNDES, D. J; FALOPPA, F.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y.; FIGUEIREDO, A. S.; TAHA, M. O. **Estudo morfológico da articulação do joelho de coelhos após a reparação de um defeito osteocondral / Morfologic study of rabbits knee articulation after a reparation of an osteochondral defect.** Acta cir. bras;17(6):403-409, 2002.

IRRGANG, J.J.; PEZZULLO, D. **Rehabilitation following surgical procedures to address articular cartilage lesions in the knee.** JOSPT. V.28, p. 232-40, 1998.

ISO 10993 – 1. “International Standard. Biological evaluation of medical devices – part 1 – Evaluation and testing”, 1997.

JACKSON, B.W.; PEGGY, A.L.; ABERMAN, H.A.; SIMON, T. **Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model.** The Journal of the Bone and Joint Surgery, v.83-A, p.53-64, 2001.

JANDT, K. D. **Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials.** Materials Science and Engineering R.: Reports, Lausanne, v. 21, p. 221-295, 1998.

JUKES, J.M.; MORONI, L.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; DE BOER, J. **Critical steps toward a tissue-engineered cartilage implant using embryonic stem cells.** Tissue engineering: Part A, v.14, n.1, 2008.

KANDEL, R.A.; GRYPAS, M.; PILLIAR, R.; LEE, J.; WANG, J.; WALDMAN, S., ZALZAL, P.; HURTIG, M. **Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model.** Biomaterials, v.27, p.4120-4131, 2006.

KARATZAS, S.; ATHANASIOS, Z.; GREESPAN, D.; AMAR, S. (1999). **Histologic observations of periodontal wound healing after treatment with Perioglass in nonhuman primates.** The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 19:489-499.

KATTI, K. (2004). **Biomaterials in total joint replacement.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v. 39, p.133–142.

KEY, J. **Experimental arthritis: the changes in joints produced by creating defects in the articular cartilage.** J Bone Joint Surg Am 13:725, 1931.

KIM, H.K.; MORAN, M.E.; SALTER, R.B. **The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits.** J Bone Joint Surg Am 73:1301-1315, 1991.

KINNUNEN, I.; AITASALO, K. PÖLLÖNEN, M.; VARPULA, M. **Reconstruction of orbital floor fractures using bioactive glass.** Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2000;28:229-234.

KIRKPATRICK, C.J. (1992). **Biological testing of materials and medical devices – A critical review of current and proposed methodologies for biocompatibility testing cytotoxicity in vitro.** Regulatory Affairs, 4, p. 13-32.

KIVIRANTA I, TAMMI M, JURVELIN J, AROKOSKI J, SÄÄMÄNEN AM, HELMINEN HJ. **Articular Cartilage Thickness and Glycosaminoglycan Distribution in the Young Canine Knee Joint After Remobilization of the Immobilized Limb.** J Orthop Res 1994; 12 (2): 161-7.

KNECHT, S.; ERGGELET, C.; ENDRES, M.; SITTINGER, M. **Mechanical testing of fixation techniques for scaffold-based tissue engineered grafts.** Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.

KNUTSEN, G.; DROGSET, J.O.; ENGBRETSSEN, GRØNTVEDT, T.; ISAKSEN, V.; LUDVIGSEN, T.C.; ROBERTS, S.; SOLHEIM, E.; STRAND, T.; JOHANSEN, O. **A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Finding at five years.** J Bone Joint Surg Am, 2007; 89: 2105-12.

KO, C.S.; HUANG, J.P.; HUANG, C.W.; CHU, M. **Type II collagen-chondroitin sulfate-hyaluronan scaffold cross-linked by genipin for cartilage tissue engineering.** Journal of Bioscience and Bioengineering. V.107, n.2, 177-182, 2009.

KON, M.; DE VISSER, A. C. **A Poly (HEMA) Sponge For Restoration of Articular Cartilage Defects, Plastic and Reconstructive Surgery**, v.67, n.5:289-293, 1981.

KONDO, N.; OGOSE, A.; TAKUNAGA, K. **Bone formation and resorption of highly purified β -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle.** Biomaterials, v.26, p. 5600-5608, 2005.

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. ROBBINS E COTRAN – **Patologia – Bases Patológicas das Doenças** – Elsevier Editora LTDA. 7a edição, 2005.

KUNDU, P. P.; BISWAS, J.; KIMA, H.; CHOE, S. **Influence of film preparation procedures on the crystallinity, morphology and mechanical properties of LLDPE films.** European Polymer Journal, New York, v. 39, n. 8, p. 1585-1593, 2003.

LAMMI, P.E.; LAMMI, M.J.; TAMMI, R.H.; HELMINEN, H.J.; ESPANHA, M.M. (2001) **Strong hyaluronan expression in the fullthickness rat articular cartilage repair tissue.** Histochemistry and Cell Biology, 115:301-308.

LANCE, E.M. **Some observations on bone graft technology.** Clin Orthop. 1985; 200, 114-124.

LAPRADE, R.F.; BOTKER, J.; HERZOG, M.; ABEL, J. **Refrigerated osteoarticular allografts to treat articular cartilage defects of the femoral condyles. A prospective outcomes study.** The Journal of Bone & Joint Surgery. V.91, n.4. 2009.

LE ROUX, MA; CHEUNG, HS; BAU, JL; WANG, JY; HOWELL, DS; SETTON, LA. **Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization.** Osteoarthritis and Cart 2001; 9: 633- 40.

LEMOES, C.; FILHO, J.S.A.; AYMORÉ, I.L.; BARBOSA, C.S.P. **Sistema ósteo-articular.** In: Brasileiro FILHO, G.; BOGLIOLO, L. Bogliolo: patologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 873-927.

LI, L.H.; KOMMAREDDY, K.P.; PILZ, C.; ZHOU, C.R.; FRATZL, P.; MANJULABA, I. **In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres.** Acta Biomater (2009b), doi:10.1016/j.actbio.2009.03.028

LI, W.J.; CHIANG, H.; KUO, T.F.; LEE, H.S.; JIANG, C.C.; TUAN, R.S. **Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study.** J Tissue Eng Regen Med 2009a; 3:1-10.

LIEN, S.M.; CHIEN, C.H.; HUANG, T.J. **A novel osteochondral scaffold of ceramic-gelatin assembly for articular cartilage repair.** Materials Science and Engineering C29 (2009) 315-321.

LOMBELLO C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F. **Morphology of Fibroblastic Cells Cultured on Poly (HEMA-co-AA)**. Cytobios, v.101: 115-122, 2000a.

LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F. **Polyhema and Polyhema-Poly (MMA-co-AA) as Substrates for Culturing Vero Cells**. Journal of Materials Sciences: Materials In Medicine, v.11: 1-6, 2000b.

LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F., **Análise Morfológica de Condrócitos sobre Hidrogéis de poliHEMA**, apresentado no 5º Congresso da Associação Brasileira de Polímeros, Águas de Lindóia, novembro de 1999b.

LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F., **Scanning Electron Microscopy of Chondrocytes Cultured on PolyHEMA Hydrogels**, XVII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, Santos, Ata Microscópica 8 (Supl A):7, october, 1999a.

LUNARDELLI, P.; AOKI, A.; JERVÁSIO, A.C.; ZAGUI, R.M.B.; MATAYOSHI, S. **Implante de ducto nasolacrimal de poliuretano: relato de caso**. Arq. Bras. Oftalmol. vol.71 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2008.

MALININ, T.; TEMPLE, H.T.; BUCK, B.E. **Transplantation of osteochondral allografts after cold storage**. The Journal of Bone and Joint Surgery, v.88,p.762-770,2006.

MALMONGE, S.M., **Hidrogéis sintéticos para o reparo de defeitos de cartilagem articular**. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

MALMONGE, S.M.; ARRUDA, A.C. **Artificial Articular Cartilage: Mechano-electro-Chemical Behavior**. Artificial Organs, v.24, n.3:174-178, 2000.

MALMONGE, S.M.; BELANGERO, W.D.; ZAVAGLIA, C.A.: **Articular cartilage repair using a polyHEMA-poly (MMA-co-AA) sIPN Blend – A Biomechanical Evaluation**. Medical and Biological Engineering and Computing, v.35, n° 1, p.80-80, 1997a.

MALMONGE, S.M.; BELANGERO, W.D.; ZAVAGLIA, C.A.: **Avaliação biomecânica do reparo tecidual de cartilagem articular - Um modelo experimental**. Anais do VII Congresso Brasileiro de Biomecânica, Campinas, 28 a 30 de maio de 1997 b.

MALMONGE, S.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; BELANGERO, W.D., **Hydrogel in Articular Cartilage Repair. A Biomechanical Evaluation in Rats**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.33:307-312, 2000.

MALMONGE, S.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; SANTOS JR., A.R.; WADA, M.L.F. (1999). **Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo *in vitro***. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 15, n. 1-2, p. 49-54, jan/ago.

MANDELBAUM, B.R.; BROWNE, J.E.; FU, F.; MICHELI, L.; MOSELY, J.C.; ERGGELET, C. *et al.*, **Articular cartilage lesions of the knee**. Am J Sports Med 1998; 26: 853-861.

MANKIN, H.J. **The response of articular cartilage to a mechanical injury**. The journal of Bone and Joint Surgery, v.64-A, p. 460-466, 1982.

MANKIN, H.J.; LIPIELLO, L. **The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage**. J Clin Invest 1971: 50:1712-19.

MANKIN, H.J. **Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits II: Repair in immature cartilage.** J Bone Joint Surg Am 44:688-698, 1962.

MARCHAND, C.; RIVARDI, G.E.; SUN, J.; HOLMANN, C.D. **Solidification mechanism of chitosan-glycerol phosphate/blood** (2009), doi:10.1016/j.joca.2008.12.002.

MATOS, M. A.; GONÇALVES, R. R.; ARAÚJO, F. P. 2001. **Modelo experimental de osteotomia em coelhos imaturos.** Acta Ortopédica Brasileira, 9 (4): 21-26.

Mc DEVITT, C.A.; MUIR, H. (1974). **Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog.** The Journal of Bone and Joint Surgery, v.58, n.1, p. 94-101, 1976.

MELLONIG, J.T.; NEVINS, M.; SANCHEZ, R. **Evaluation of a bioasorbable physical banier for guided boné regeneration. Part II. Material and a boné replacement graft.** Inst J Periodontics Restorative Dent. 1998, 18: 129-37.

MESSNER, K.; GILLQUIST, J. **Synthetic implants for the repair of osteochondral defects of the medial femoral condyle: a biomechanical and histological evaluation in the rabbit knee.** Biomaterials, v.14,513-520,1993.

MEYER, E. **Atomic force microsocopy.** Progress in Surface Science, Oxford, v. 41, p. 3-49, 1992.

MIERISCH, C.; COHEN, S.B.; JORDAN, L.C.; ROBERTSON, P.G.; BALIAN, G.B.; DIDUCH, D.R. **Transforming growth factor- β in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit.** Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery, v.18,p.892-900,2002.

MITCHELL, N.; SHEPARD, N. (1976). **The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone.**The Journal of Bone and Joint Surgery, v.58, p.230-233,1976.

MORRIS, V. J.; MACKIE, A. R.; WILDE, P. J.; KIRBY, A. R.; MILLS, E. C. N.; GUNNING P. **Atomic force microscopy as a tool for interpreting the rheology of food biopolymers ate molecular level.** Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, London, v. 34, p 3-10, 2001.

MOW, V. C.; RACTLIFFE, A.; ROSENWASSER, M. P.; BUCKWALTER, J.A., **Experimental studies on repair of large osteochondral defects at a heigh weight bearing area of the knee joint: A tissue engineering study, Transactions of ASME.** J. of Biomechanical Engineering, v.113, p.193-207, 1991.

NBR ISSO 10993 - ABNT – “Associação Brasileira de Normas Técnicas. Avaliação Biológica de produtos para saúde. Parte 1 Avaliação e Ensaio”, 1999.

NETTI, P.A.; SHELTON, J.C.; REVELL, P.A.; PIRIE, C.; SMITH, S.; AMBROSIO, L.; NICOLAIS, L.; BONFIELD, W. **Hydrogels as interface between bone and an implant.** Biomaterials, v.14, p.1098-1104,1993.

NI, J.; WANG, M. **In vitro evaluation of hydroxybutyrate reinforced polyhydroxybutyrate composite.** Mat. Sci and Eng. 2002:20:101-109.

NOGUEIRA, M.P. **Uso do silicone e do poliuretano na uretoplastia dorsal: estudo experimental em coelhos**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. 213p. 2008.

O'DRISCOLL, S.W.; KEELEY, F.W.; SALTER, R.B. **Durability of regenerated articular produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year**. The Journal of Bone and Joint Surgery, v.70, p.595-606,1988.

O'DRISCOLL, S.W.; KEELEY, F.W.; SALTER, R.B. **The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit**. J Bone Joint Surg Am 68:1017-, 1986.

OH, J. S.; ISAYEV, A. I.; ROGUNOVA, M. A. **Continuos ultrasonic process for in situ compatibilization of polypropylene/natural rubber blends**. Polymer, Oxford, v. 44, p. 2337-2349, 2003.

OHYABU, Y.; TANAKA, J.; IKADA, Y.; UEMURA, T. **Cartilage tissue regeneration from bone marrow cells by RWM bioreactor using collagen sponge scaffold**. Materials Science and Engineering C29 (2009) 1150-1155.

OLIVEIRA, J.M.; CORREIA, R.N.; FERNANDES, M.H. **Surface modifications of a glass and a glass-ceramic of the MgO-3CaO.P₂O₅-SiO₂ system in a simulated body fluid**. Biomaterials 1995;16:849-854.

ORÉFICE, R.L. et al., (2000). **In vitro bioactivity of polymer matrices reinforced with a bioactive glass phase**. J Braz. Chem. Soc. 2000;11:78-85.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais – Fundamentos e Aplicações**. Cultura Médica – 2006.

PAIVA, A.O. **Obtenção, caracterização e estudo in vitro do vidro bioativo VH30 e compósitos vidro bioativo/polihidroxibutirato**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, MG.2005.

PATEL, M.P.; BRADEN, M.; DOWNES, S. **Heterocyclic methacrylate-based drug release polymer system**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v.5, p. 338-229, 1994.

PEARCE, A. I.; RICHARDS, R. G.; MILZ, S.; SCHNEIDER, E.; PEARCE, S. G. 2007. **Animal models for implant biomaterial research in bone: a review**. European Cells and Materials, 13: 1-10.

PEITL, O.; ZANOTTO, E.D. e HENCH, L.L. **Higly bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 glass-ceramics**. J. Non-Cryst Solids 2001;292:115-126.

PEPPAS, N. A.; MERRIL, E. W.; **Development of semicrystalline poly (vinylalcohol) hidrogels for biomedical applications**. J. Biomed. Mater. Res., v.11, p.123-434, 1977.

PEREIRA, M. M.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L.; J. Biomed. Mater. Res. 1994, 28, 693.

PETERSON, L.; MINAS, T.; BRITTBURG, M.; NILSSON, A.; STOGREN-JANSSON, E.; LINDAHL, A. **Two to nine years outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee**. Clin Orthop 374:212-234, 2000.

PIECUCH, J.F. (1982) **Extraskeletal Implantation of a Porous Hydroxyapatite Ceramic**. Journal of Dentistry Research, 61:1458-1460.

PIENTKA, Z.; BROZOVA, L.; BLEHA, M.; PURI, P. **Preparation and chacterization of ultrathin polymeric films**. Journal of Membrane Science, Amsterdam, v. 214, p. 157-161, 2003.

PIERMATTEI, D.; FLO, G.L.; DeCAMP, C.E. **Handbook of Small Animal Othopedics and Fracture Repair**. Saunders – Fourth Edition – 2006.

PLATT, D.; BAYLISS, M.T. **An investigation of the proteoglycan metabolismo f mature equine articular cartilage and its regulation by interleukin-1**. Equine Veterinary Journal, v.26, n.4, p. 297-303, 1994.

POLMANTEER, K. E., in **Handbook of Elastomers** (Eds A. K. Bhowmick, H. L. Stephens) p. 551, 1988, (Marcel Dekker: New York, NY).

PRIDIE, K.H. **A method of resurfacing osteoarthritis knee joints**. In: Proceedings of the British Orthopaedic Association. J Bone Joint Surg Br 41:618-619, 1959.

QIAN, R. Y.; SHEN, J. S.; BEI, N. J.; BAI, C. L; ZHU, C. F.; WANG, X. W. **Morphological observations of single-chain glassy polystyrene by means of tapping mode atomic force microscopy**. Macromolecular Chemistry and Physics, Basel, v. 197, n. 7, p. 2165-2174, 1996.

QUINTAVALLA *et al.* **Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) mountain multilineage potential can be detected following implantation into articular cartilage defects**. Biomaterials 23 (2002) 109-119.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E.; **An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press: New York, 1996.

RAVEN, P.H. **Biology of plants**. New York: Worth Publisher, 1996, 728 p.

REIFF, R.B.M. (2010). **Reparo de defeito osteocondral no joelho de coelhos utilizando centrifugado de medula óssea autóloga**. 2010. Tese (Doutorado). 100 p. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

REISSIS, N.; KAYSER, M.; BENTLEY, G.; DOWNES, S. **A Hydrophylic Polymer System Enhanced Articular Cartilage Regeneration *in vivo***. Journal of Materials Science - Materials In Medicine, v.6:768-772, 1995.

RENNER, A.F.; CARVALHO, E.; SOARES, E.; MATTIELLO-ROSA, S. **The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage**. Osteoarthritis and Cartilage 2006, 14 (2), 196-202.

RIBEIRO, J.L.; CAMANHO, G.L.; TAKITA, L.C. **Estudo Macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis**. Acta Orthop Bras 2004; 12: 16-24.

RING M.E. **História Ilustrada da Odontologia**. 1ª ed. Editora Manole: São Paulo.

ROETHER, J. et al., (2002). **Development and in vitro characterization of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications.** *Biomaterials* 2002;23:3871-3878.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. **Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias.** *Materials Research*, vol.6, no. 3, 317-329, 2003.

RUBAK, J.M.; POUSSA, M.; RITSILÄ, V. **Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits.** *Acta Orthop Scand* 53:181-186, 1982.

RUDERT, M.; WILMS, U.; HOBERG, M.; WIRTH, C.J. **Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome.** *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, v.125, p.598-608, 2005.

SAKIHAMA, A.K.; FAGUNDES, D.J.; INOUE, C.M.; AYDOS, R.D.; JULIANO, Y.; ARAKAKI, J.C.; ODASHIRO, M.; CARVALHO, P.T.C. **O uso do adesivo resorcina na reparação de defeito osteocondral em joelho de coelhos.** *Acta Cirurgica Brasileira*, v.21 (Supl.4), 2006.

SALTER, R.B.; SIMMONDS, D.F.; MALCOLM, B.W.; RUMBLE, E.J.; MACMICHAEL, D. (1975). **The effects of continuous passive motion on the healing of articular cartilage defects.** *J. Bone Joint Surg* 57-A, 570-571.

SALTER, R.B.; SIMMONDS, D.F.; MALCOM, B.W.; RUMBLE, D.J.; MACMICHAEL, D.; CLEMENTS, N.D. **The biological effect of continuous passive motion on the healing of full thickness defects on articular cartilage. An experimental investigation in the rabbits.** *J Bone Joint Surg Am* 62:1232-1251, 1980.

SALTER, R.B.; SIMMONDS, D.F.; MALCON, B.W.; RUMBLE, D.J.; MACMICHAEL, D.; CLEMENTS, N.D. **The biological effect of continuous passive defects on articular cartilage. An experimental investigation in the rabbits.** *J Bone Joint Surg Am* 62: 1232-1251, 1980.

SALVATORE, J.E.; MANDARINO, M.P. Polyurethane Polymer. **Its use in osseous lesions: an experimental study.** *Am Surg.*1959; 149 (1): 107-9.

SAMS, A.E.; NIXON, A.J. **Chondrocyte-laden collagen scaffolds for resurfacing extensive articular cartilage defects.** *OA Cartilage* 1995, 3:47-59.

SARIS, D.B.; DHERT, W.J.; VERBOUT, A.J. **Joint homeostasis: the discrepancy between old and fresh defects in cartilage repair.** *J Bone Joint Surg Br.* 2003; 85 (7): 1067-1076.

SAWAKI, A.T.; KAWASAKI, J.M.; ZILIO, A.R.B. (1992). **Desenvolvimento de alumina para próteses de fêmur.** In: XXXVI Congresso Brasileiro de Cerâmica. Caxambu, *Anais*, p.975-982.

SCHAGEMANN, J.C.; ERGGELET, C.; CHUNG, H.W.; LAHM, A.; KURZ, H.; MROSEK, E. **Cell-laben and cell-free biopolymer hydrogel for the treatment of osteochondra; defects in a sheep model.** *Tissue Engineering: Part A.* v.15, n.1, 2009.

SCHNEIDER, K.; HERRMANN, V. **Semi-quantitative mechanical characterizations of fibre composites in the sub-micron-range by SFM.** *Composites: Part A*, Kidlington, v. 32, p. 1679-1687, 2001.

SCHROOTEN, J.; ROEBBEN, G.; HELSEN, J.A. **Young's modulus of bioactive glass coated oral implants: porosity corrected bulk modulus versus resonance frequency analysis.** Scripta Materialia 1999;41:1047-1053.

SCHULTZ, R.J.; KRISHNAMURTHY, S.; THELMO, W.; RODRIQUEZ, J.E., HARVEY, G. **Effects of varying intensities of laser energy on articular cartilage: a preliminary study.** *Lasers Surg Med* 1985;5:577-88.

SEGAL, M. **A status report on breast implant safety FDA.** Consum. 1995. N. Publication n. (FDA) 97-4262.

SHAH, M.R.; KAPLAN, K.M.; MEISLIN, R.J.; BOSCO, J.A. **Articular cartilage restoration of the knee.** Bull NYU Hosp Joint Dis. 2007; 65: 51-60.

SHAHGALDI, B.F. **Coral graft restoration of osteochondral defects.** Biomaterials, v.19, p.205-213, 1998.

SHAO, X.X.; HUTMACHER, D. W.; HO, S.T. **Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load bearing osteochondral defects in rabbits.** Biomaterials (27) 1071-1080, 2006.

SHAPOFF, C.A.; ALEXANDER, D.C.; CLARK, A.E. (1997). **Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects.** Compendium, 18:352-363.

SILVA, G.R. **Desenvolvimento de Implantes Intra-Oculares constituídos de poliuretanos biodegradáveis e acetato de dexametasona.** Tese (Doutorado). 124 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2009.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental.** 5ª Ed. Bookman, 2002.

SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais.** Ed. Manole, Rio de Janeiro, 1998.

SOARES, G.A. **Fórum de Biotecnologia Biomateriais.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e pesquisa de Engenharia. Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Dez/2005.

SOUSA, T.H.S. **Projeto conceitual de implante bioativo com gradiente funcional em poli (metacrilato de metila) e hidroxiapatita. Análises: in vitro e in vivo.** Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo – USP, São Carlos/SP.

SOUZA, T.D.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. (2001) **Efeitos da eletroterapia no processo da reparação da superfície articular de coelhos.** Ciência Rural, 31:819-824.

SOUZA, T.D.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. **Avaliação Histológica do processo de reparação de superfície articular de coelhos.** Ciênc. Rural, v.30, n.3. Santa Maria, maio/jun., 2000.

STEADMAN, J.R.; RODKEY, W.G.; BRIGGS, K.K.; SINGLETON, S.B. **Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results.** Oper Tech Orthop 7:300-304, 1997.

STEVENSON, S. **Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts.** Clin Orthop Relat Res S239-S246, 1998.

STOCUM, D.L. **Stem cells in regeneration biology and medicine.** Wound Repair and Regeneration. v.9(6); p. 429-442. Nov. 2000.

STREHL, R.; TALLHEDEN, T.; JANSSON, E.S.; MINUTH, W.W.; LINDAHL, A. **Long-term maintenance of human articular cartilage in culture for biomaterial testing.** Biomaterials, v.26, p. 4540-4549, 2005.

STREICHER, R.M.; SCHO, R. **Ceramic surface as wear partners for polyethylene.** Bioceramics 4, 1991.

SUOMINEN, E.; AHO, A.; VEDEL, E.; KANGASNIEMI, I.; USIPAIKKA, E.; YLI-URPO, A. **Subchondral bone and cartilage repair with bioactive glasses, hydroxyapatite, and hydroxyapatite-glass composite.** Journal of Biomedical Materials Research, v.32, p.543-551, 1996.

TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. **Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage.** Biomaterials 21 (2000), 431-440.

THOMANN, Y.; CANTOW, H. J.; BAR, G.; WHANGBO, M. H. **Investigation of morphologies and nanostructures of polymer blends by tapping mode phase imaging.** Applied Physics A, Berlin, v. 66, p. 1233-1236, 1998.

THRONDSO, R.R.; SEXTON, S.B.; TEX, G. **Grafting mandibular third molar extraction sites: A comparison of bioactive glass to a nongrafted site.** Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002;94:413-9.

TOOLAN, B.C.; FRENKEL, S. R.; PEREIRA, D. S.; ALEXANDER, H. **Development of a novel osteochondral graft for cartilage repair.** Journal of Biomedical Materials Research, V. 41, Issue 2 (p 244-250).

TRIPPEL, S.B.; MANKIN, H.J. **Consolidação da cartilagem articular.** In: **Bojrab, M.J. Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais.** 2ªed. São Paulo, Manole, 1996.

TUAN, R. **A second-generation autologous chondrocyte implantation approach to the treatment of focal articular cartilage defects.** Arthritis Research & Therapy. 2007, 9:109.

TUREK, S.L. **Ortopedia: Princípios e Aplicação.** Manole, 1999.

UEMATSU, K.; HATTORI, K.; ISHIMOTO, Y.; YAMAUCHI, J.; HABATA, T.; TAKAKURA, Y.; OHGUSHI, H.; FUKUCHI, T.; SATO, M. **Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold.** Biomaterials, v.26, p.4273-4279, 2005.

VACHON, A.; BRAMLAGE, L.R.; GABEL, A.A.; WEISBRODE, S. (1986). **Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation.** Am. J. Vet. Res., 47, 2637-2645.

VALLET-REGI, M.; GONZALÉZ-CELLBET, J. **Calcium phosphates as substitution of bone tissues.** Elsevier Science Pub, 31p. 2004.

VAN VLACK, L.H. Propriedades dos materiais cerâmicos. 1ª. Ed. Editora Edgard Blucher: São Paulo, 1973.

VASSARA, A.L.; HYTTINEN, M.M.; PULLIAINEN, P.; LAMI, M.J.; JURVELIN, J.S.; PETERSON, L. **Immature porcine knee cartilage lesions show good healing with or without autologous chondrocyte transplantation.** Osteoarthritis Cartilage 2006; 14; 1066-74.

VAZQUEZ, G.; PELLON, A. **Polyurethane-coated silicone-gel breast implants used for 18 years.** Aesth. Plast. Surg. 31, 330-336. 2007.

VINATIER, C.; MRUGALA, D.; JORGENSEN, C.; GUICHEUX, J.; NOËL, D. **Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors.** Trends in Biotechnology doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.2005.

VIŠŇA, P.; PAŠA, L.; ČIŽMĚŘ, I.; HART, R.; HOCH, J. **Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive technique – A Randomized Controlled Study.** Acta Chir belg, 2004, 104, 709-714.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S. J.; YOUNG, R. G.; MANSOUR, J. M.; CAPLAN, A. I.; AND GOLDBERG, V. M.: **Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage.** J. Bone and Joint Surg., 76-A: 579-592, April 1994.

WANG, M. **Developing bioactive composite materials for tissue replacement.** Biomaterials 2003; 24:2133-2151.

WEI, Y.; HU, Y.; HAO, W.; HAN, Y.; MENG, G.; ZHANG, D.; WU, Z.; WANG, H. **A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells.** Journal of Orthopaedic Research. January 2008.

WELSING, R.T.C.; VAN TIENEN, T. G.; RAMRATTAN, N.; HEIJKANTS, R.; SCHOUTEN, A.J.; VETH, R.H.; BUMA, P. **Effect on tissue differentiation and articular cartilage degradation of a polymer meniscus implant. A 2-Year Follow-up Study in Dogs.** The American Journal of Sports Medicine, vo.36, no.10, 2008.

WHEELER, D.I.; STOKES, K.E.; HOLELLRICH, R.G. CHAMBERLAND, D.L.; MCLOUGHLIN, S.W. **Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects.** J Biomed Mater Res 1998; 41:527-533.

WHITING, W.C.; ZERNICKE, R.F. **Biomecânica das lesões musculoesqueléticas.** Ed. Guanabara, 1ªed., 2001.

WILEY, J., **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**, New York, v.7, p.783-805, 1989.

WILLIAMS, D.F. **Definition in Biomaterials. Proceedins of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England.** Progress in Biomedical Engineering 4. Elsevier, 1987.

WILLIAMS, D.F. **The science and applications of biomaterials.** Advances in materials Technology Monitor. V.1, n2, p.1-10, 1994.

WITTE, F.; REIFENRATH, J.; MÜLLER, P.P.; BORMANN, D.; RUDERT, M. **Cartilage repair on magnesium scaffolds used as a subchondral bone replacement.** Mat-wiss. U. Werkstofftech, v.37, p.504-508, 2006.

WREGE, P.A.S. (2000). Tese (Doutorado). **Metodologia para obtenção de esferas de cerâmica para próteses de quadril.** 186p. Engenharia Mecânica – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, SP.

WROBLE, R.R. **Articular cartilage injury and autologous chondrocyte implantation.** Phys Sports Med. [serial on the internet] 2000; 28. Available from: <http://physsportsmed.com.issues>.

XYNOS, I.D.; HUKKANEN, M.V.J.; BATTEN, J.J.; BUTTERY, L.D.; HENCH, L.L.; POLAK, J.M. (2001). **Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering.** Calcified Tissue International, 55:151-157.

ZAVAGLIA, C.A. **Curso de Introdução as cerâmicas.** Campinas, São Paulo, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, (2003). Apostila de Biocerâmicas.

ZAVAGLIA, C.A. de C. **Aplicações de biocerâmica em próteses ortopédicas.** Tese de Livre docência. UNICAMP. 1993.

ZDRAHALA, R.J.; ZDRAHALA, I.J. (1999). **Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future.** J Biomater Appl. 1999 Jul;14(1):67-90.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética para Análises de Projeto de Pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal
nº 031/2010

Protocolo nº. 024/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar em sua 43ª. Reunião **APROVOU** o projeto "Desenvolvimento e aplicação de um biomaterial composto para reparo de cartilagem articular" apresentado pelo pesquisador Karen Cristina Laurenti.

São Carlos, 15 de junho de 2010.

Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

ANEXO B – Composições de biovidros (% vol) (HENCH e WILSON, 1993).

Designação	SiO ₂	Na ₂ O	CaO	CaF ₂	P ₂ O ₅	B ₂ O ₃	Al ₂ O ₃
45S5.4F	46,1	24,4	16,2	10,8	2,6	-	-
45S5	46,1	24,4	24,1	-	2,6	-	-
#1(S63.5P6)	65,7	15,0	15,5	-	2,6	0,4	0,6
#9(S53P4)	53,9	22,6	21,8	-	1,7	-	-
#10(S45P7)	46,6	24,1	24,4	-	3,0	1,8	-
52S4.6	52,1	21,5	23,8	-	2,6	-	-
55S4.3	55,1	20,1	22,2	-	2,6	-	-
60S3.8	60,1	17,7	19,6	-	2,6	-	-
42SF	42,1	26,3	17,4	11,6	2,6	-	-
46SF	46,1	24,4	16,1	10,8	2,6	-	-
49SF	49,1	23,0	15,2	10,1	2,6	-	-
52SF	52,1	21,5	14,3	9,5	2,6	-	-
55SF	55,1	20,1	13,3	8,9	2,6	-	-
60SF	60,1	17,7	11,7	7,8	2,6	-	-
49S(gg)	50,0	-	46,0	-	4,0	-	-
54S(gg)	55,0	-	41,0	-	4,0	-	-
58S(gg)	60,0	-	36,0	-	4,0	-	-
63S(gg)	65,0	-	31,0	-	4,0	-	-
68S(gg)	70,0	-	26,0	-	4,0	-	-
72S(gg)	75,0	-	21,0	-	4,0	-	-
77S(gg)	80,0	-	16,0	-	4,0	-	-
86S(gg)	90,0	-	6,0	-	4,0	-	-

(gg) = gel-glass

ANEXO C – Caracterização do poliuretano Lubrizol®

Coloração. Poliuretanos em seus estados naturais, tanto aromáticos quanto alifáticos são claras para amarelo muito claro na cor. Aromáticos, no entanto, pode virar amarelo a âmbar escuro como resultado da fusão do processamento ou esterilização, ou mesmo com a idade. Embora a principal objeção à descoloração da tubulação claro aromática ou injeção de peças moldadas é estética, o amarelinho, que é causada pela formação de um cromóforo na porção MDI do polímero, não parece afetar outras propriedades físicas do material.

Graus radiopacos do TPU Tecothane® também apresentam algumas manchas durante o processamento ou esterilização. No entanto, ambos, padrão e personalizado combinados com graus radiopacos do TPU Tecothane® foram especificamente formulados para minimizar esta descoloração.

Resistência a Solventes. Poliuretanos aromáticos apresentam maior resistência a solventes orgânicos e óleos alifáticos - especialmente quando comparado com dureza baixa (80 - 85 Shore A) alifáticos, onde o contato prolongado pode levar ao inchaço do polímero e em curto prazo pode levar à superfície grudenta. Embora estes efeitos tornam-se menos perceptíveis em durezas mais elevadas, os aromáticos apresentam pouca ou nenhuma sensibilidade sobre a exposição de solventes orgânicos comuns utilizados na indústria de cuidados de saúde.

Amolecimento na Temperatura Corporal: Ambos, poliéster alifático e aromático baseado em poliuretanos suavizam consideravelmente em poucos minutos de inserção no corpo. Muitos fabricantes de dispositivos promovem essa característica de seus produtos de poliuretano por causa da vantagem do conforto do paciente, bem como a redução do risco de trauma vascular. No entanto, este efeito é menos pronunciado com resinas aromáticas que com resinas alifáticas.

De produtos cancerígenos: Se poliuretanos aromáticos são processados inapropriadamente, como quando a tubulação é extrusado da resina com muita umidade ou os componentes finais são esterilizados a vapor, é possível experimentar a formação de quantidades mensuráveis de metileno dianilina (MDA). O MDA está listado como uma substância cancerígena. Não é possível a formação de MDA com um poliuretano alifático. Além disso, a diamina análoga que poderiam ser formados a partir HMDI não está listada como uma substância cancerígena.

Processamentos de Temperaturas de Fusão: As resinas TPUs Tecothane®, Tecoplast® e Carbothane® são fundidos a temperaturas consideravelmente superiores que o Tecoflex® e Tecophilic®. Assim, o processamento por extrusão ou de moldagem por injeção ou colocado mais calor em produtos fabricados a partir de TPUs Tecothane®, Tecoplast® e Carbothane®. Por exemplo, Tecoflex® EG-80A e EG-60D molde resinas em temperaturas de pico de aproximadamente 154°C e 171°C, respectivamente. Os produtos Tecothane® e Carbothane® equivalem a durômetros de temperaturas de pico na faixa de 193°C a 223°C.

Produtos TPU: Em 1983, TPU Tecoflex®, um poliéter poliuretano alifático altamente versátil, entrou no mercado de saúde. Desde então tem sido expandido para atender às exigências em constante mudança nos mercados industriais e médicos. Esta extensa linha de produtos também inclui poliéter Tecothane® (aromáticos base de poliuretano), policarbonato Carbothane® (com base de poliuretano alifático), Tecophilic® (poliéster alta absorção de umidade com base de poliuretano alifático) e poliéter Tecoplast® (aromáticos base de poliuretano).

ANEXO D – Irradiação das amostras de poliuretano e microfibras de biovidro 45S5.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
 Departamento de Engenharia Mecânica

São Carlos, 21 de outubro de 2010

Ref.: Solicitação de Colaboração do IPEN no serviço de Irradiação em amostras de pesquisas.

À

Dra Margarida Mizue Hamada (mmhamada@ipen.br)

Gerente Adjunto de P&D, Planejamento e Inovação

Centro de Tecnologia das Radiações – CTRD

IPEN/CNEN – SP

Prezada Dra Margarida Mizue Hamada, solicitamos de Vossa Senhoria a autorização para colaboração do IPEN na esterilização de amostras aplicadas no projeto de Pesquisa de minha orientada Karen Crístina Laurent, cujo trabalho é intitulado: *Desenvolvimento e aplicação de um biomaterial composto para reparo de cartilagem articular: um estudo experimental*. Apresento informações sobre o material e local de emprego:

- Material a ser irradiado: Compósito Poliuretano/fibras de biovidro 45S5;
- Quantidade de material: 10 cilindros de 23x4mm;
- Tipo de fonte: CO-60 Panorâmica;
- Objetivo da Irradiação: esterilização;
- Tipo de Trabalho: Doutorado;
- Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan;
- Instituição: Departamento de Engenharia Mecânica, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo;
- Requeremos o Suporte do Pesquisador do IPEN: Dr. Francisco José Comella Braga;
- Endereço: Av. Trabalhador São-carlense, 400 - centro; 13566-590; São Carlos - SP. Tel.: 16 3373 9422; email: cfortula@sc.usp.br;

Agradeço a atenção dispensada.

Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan