

NILZA ALZIRA BATISTA

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO HIDROGEL ÁLCOOL
DE POLIVINIL (PVA) ACETALIZADO E IRRADIADO
COMO SUBSTITUTO DA CARTILAGEM ARTICULAR
IMPLANTADO EM JOELHOS DE RATOS**

CAMPINAS

Unicamp

2011



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO HIDROGEL ALCOOL
DE POLIVINIL (PVA) ACETALIZADO E IRRADIADO
COMO SUBSTITUTO DA CARTILAGEM ARTICULAR
IMPLANTADO EM JOELHOS DE RATOS**

NILZA ALZIRA BATISTA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Fisiopatologia Cirúrgica, sob orientação do Prof. Dr. William Dias Belangero e co-orientação da Profa. Dra. Vanessa Petrilli Bavaresco

Campinas

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B32a Batista, Nilza Alzira, 1964 -
Avaliação do comportamento do hidrogel álcool de polivinil (PVA) acetalizado e irradiado como substituto da cartilagem articular implantado em joelhos de ratos. / Nilza Alzira Batista. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : William Dias Belangero
Coorientador : Vanessa Petrilli Bavaresco
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hidrogel. 2. Álcool de Polivinil. 3. Defeitos. 4. Cartilagem Articular. 5. Biomateriais. I. Belangero, William Dias. II. Bavaresco, Vanessa Petrilli. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation behavior polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel acetalized and irradiated as substitute of articular cartilage implanted in wistar rat knees

Palavra-chave em inglês:

Hydrogel

Polyvinyl Acohol

Defetcs

Articular Cartilage

Biomaterials

Área de Concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

William Dias Belangero [Orientador]

Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Data da defesa: 21-12-2011

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Banca Examinadora da Defesa de Mestrado
Nilza Alzira Batista

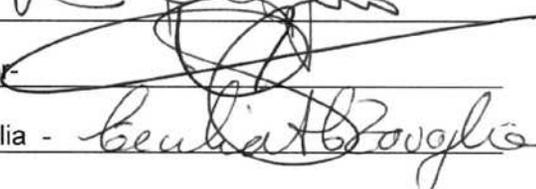
Orientador: Prof. Dr. William Dias Belangero

Membros:

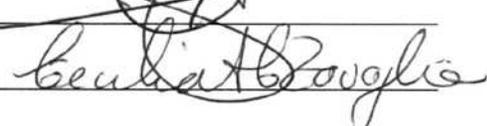
1. Prof. Dr. William Dias Belangero -



2. Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior -



3. Profa. Dra. Cecilia Amelia de Carvalho Zavaglia -



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/12/2011

À todos
que de maneira direta ou indireta
contribuíram para que este trabalho se tornasse real.

Ao meu companheiro de todos os dias,
Hamilton Cesar
pela paciência, compreensão, carinho e
incentivo ilimitados.

Aos meus queridos
João e André
que foram privados da minha atenção,
para esta realização.

Às minhas irmãs
Regina e Marisa
que, como sempre,
me “substituíram” na minha ausência
dando toda a atenção aos meus amados João e André.

AGRADECIMENTOS

Ao TODO PODEROSO por iluminar todos meus dias e ser motivo essencial para não deixar desistir jamais dos meus objetivos.

Ao Professor Dr. William Dias Belangero, pela paciência, orientação e disponibilização das dependências do LABIMO para a realização deste.

Ao Biólogo amigo William Adalberto Silva do Laboratório de Técnicas Cirúrgicas do NMCE/FCM por ter me feito “tomar gosto” em trabalhar com animais para o bom e confiante resultados aqui alcançados.

À minha amiga Ana Amélia autora co-adjuvante deste por colaborar diretamente nos experimentos e pela interminável discussão diante dos resultados obtidos.

À minha querida co-orientadora Vanessa pela amizade surgida nesses anos de trabalho em conjunto, pelos esclarecimentos e incentivo contínuo... Obrigada!

Ao mais recente companheiro de trabalho José Ricardo Lenzi Mariolani pelas sugestões aqui registradas.

À bióloga Claudenete Vieira Leal, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FEM pela execução da microscopia eletrônica de varredura.

Aos técnicos de Laboratório José Luiz Lisboa, Eder Sócrates da FEM/DEMA e Moisés do Cotuca pela disponibilidade em realizar os ensaios mecânicos.

Aos doutores Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr. da Universidade Federal do ABC e Luis Antonio Violin Dias do Instituto de Biologia da Unicamp pelas análises das lâminas de histologia.

*"Há muitas pessoas de visão perfeita que nada vêem...
O ato de ver não é coisa natural.
Precisa ser aprendido!"*

Rubem Alves



RESUMO

Hidrogel de álcool de polivinil (PVA) foi utilizado como potencial reparador de defeitos osteocondrais da cartilagem articular. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada com células Vero e células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos *Wistar-Kyoto*. Para análise *in vivo*, os implantes foram colocados em defeitos produzidos nos joelhos de ratos *Wistar*. Após tempos de seguimento de 0, 3, 6, 12 e 24 semanas, as amostras foram analisadas por microscopia óptica convencional, ensaio mecânico de fluência à indentação, espectrometria de fluorescência raio X e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados *in vitro* mostraram que o hidrogel de PVA não afetou a atividade metabólica de ambas as células estudadas, nem tampouco a diferenciação osteogênica das células mesenquimais. Atividade da enzima fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada foram identificadas. O PVA implantado não apresentou sinais de desgastes ou qualquer mudança de aspecto quando comparado com o dia do implante. A interface do implante/tecido mostrou a formação e manutenção de tecido conjuntivo denso e osso recém-formado em todos os grupos estudados. Foi observado um aumento no módulo de fluência e concentração de cálcio e fósforo no PVA longo do tempo. O desempenho do hidrogel de PVA irradiados e acetilizados foi considerado satisfatório para a aplicação proposta.

Palavras-chave: Hidrogel, álcool de polivinil, defeitos, cartilagem articular, biomateriais.



ABSTRACT

Irradiated and acetalized polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel was investigated as a potential material for osteochondral defect repair in articular cartilage. The in vitro cytotoxicity of the material was evaluated with Vero cells and mesenchymal stem cells from bone marrow of Wistar-Kyoto rats. For in vivo analyses, plugs of the material were implanted into defects produced in the knees of male Wistar rats-WH. After follow-up times of 0, 3, 6, 12 and 24 weeks, the samples were analyzed by conventional optical and scanning electron microscopy, X-ray fluorescence spectrometry and submitted to mechanical testing of creep indentation. The in vitro results suggest that the PVA hydrogel did not affect the viability and morphology of any of the cell types studied. The hydrogel affected neither the metabolic activity of both studied cells nor the osteogenic differentiation of the mesenchymal cells. Activity of alkaline phosphatase and mineralized organic matrix formation could be identified. The implanted plugs showed no sign of wear or aspect change. The interface plug/tissue exhibited dense connective tissue and newly formed bone in all groups. It was observed an increase in the creep modulus and in the concentration of calcium and phosphorus in the PVA over time. The performance of the irradiated and acetalized PVA was considered satisfactory for the proposed application.

Keywords: hydrogel, polyvynil alcohol, defects, articular cartilage, biomaterials.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARS	Vermelho de Alizarina-S
ALP	Fosfatase Alcalina
CA	Cartilagem Articular
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CNT	Controle Negativo de Toxicidade
CPT	Controle Positivo de Toxicidade
DEMA	Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco's
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EB	Elétron Beam
ECD	Ensaio Citotoxicidade Direta
ECI	Ensaio Citotoxicidade Indireta
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EDXRF	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X
EMFI	Ensaio Mecânico de Fluência à Indentação
FCM	Faculdade de Ciências Médicas

FDA	Food and Drug Administration (FDA)
FEM	Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GCs	Grupos Controles
GE00	Grupo Experimental Dia Zero
GEs	Grupos Experimentais
GI	Grau de Inchamento
HA	Ácido Hialurônico
HC	Hospital de Clínicas (HC)
HE	Hematoxilina e Eosina
IB	Instituto de Biologia
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
LABIMO	Laboratório de Biomateriais em Ortopedia
LAP	Laboratório de Anatomia Patológica (LAP)
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia Óptica
MSCs	Células-tronco Mesenquimais
MSCs/MO	Células-tronco Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea

MTT	Sal (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NMCE	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
AO	Osteoartrose
PBS	Tampão Fosfato Salino
pHEMA poli (MMA-co-AA)	Blenda de poli (2-hidroxi etil metacrilato) e poli (metacrilato de metila-co-ácido acrílico)
PIn	Peso Inchado
OS	Penicilina com Estreptomicina
PSe	Peso Seco
PVA	Poli-Álcool Vinílico
SBF	Soro Fetal Bovino
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VN	Vermelho Neutro

	Pág.
Tabela 1- Apresentação das análises realizadas nos Grupos Controle (GCs), Cartilagem Articular (CA) e dos Grupos experimentais (GEs).....	81
Tabela 2- Critérios e escores utilizados na avaliação por estereomicroscópio dos GEs.....	85
Tabela 3- Critérios e escores utilizados na avaliação por MO dos GEs.....	90
Tabela 4- Média da frequência relativa dos critérios atribuídos aos GEs.....	105
Tabela 5- Valores das médias das concentrações dos componentes minerais Cálcio, Fósforo e Enxofre dos GEs e do material não implantado (GOO).....	113
Tabela 6- Média da dos critérios atribuídos aos GEs sendo: 1 (+) ausência do item avaliado; 2 (++) moderada presença e 3 (+++) intensa presença.....	119

	Pág.
Figura 1- Esquema da estrutura morfológica da CA. Junqueira e Carneiro, 1999 modificada. (1) proteína de ligação; (2) proteoglicanos; (3) moléculas longas de ácido hialurônico; (4) cadeias de sulfatos de condroitina do proteoglicano e (5) fibras colágenas.....	54
Figura 2- Corte histológico demonstrando a estrutura da cartilagem articular de cão demonstrando as suas zonas. Coloração HE. Aumento 50X.....	59
Figura 3- Imagem da membrana de PVA (a) ; implante de PVA com 2 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (b)	74
Figura 4- Procedimento cirúrgico: (a) incisão de pele; (b) exposição côndilo - região intercondiliana; (c) confecção do defeito osteocondral; (d) implante PVA com trefina; (e) defeito com o implante de PVA; (f) sutura.....	83
Figura 5- Ensaio Mecânico de Fluência a Indentação. (a) máquina universal de ensaio mecânico com célula de carga de 100N e amostra fixada a um dispositivo especial durante a realização do teste. (b) detalhe do indentador de ponta esférica com 1,6 mm de diâmetro sobre o côndilo com implante de PVA.....	87
Figura 6- Esquema do côndilo dos GEs com implante de PVA para a análise por microscopia óptica. Linha pontilhada secção sagital côndilo após descalcificação.....	89

Figura 7-	Análise qualitativa da toxicidade do PVA com células Vero. (A) controle negativo; (B) controle positivo; (C) toxicidade indireta ao PVA (D) toxicidade direta ao PVA.....	95
Figura 8-	Resultado quantitativo da toxicidade direta e indireta do PVA com células Vero pelo Método MTT. Médias e desvios padrão: CPT 0,17 (0,26); CNT 0,57 (0,35); PVA (ECI) 0,42 (0,38); PVA (ECD) 0,43 (0,25). Nível de significância 0,05.....	96
Figura 9-	Resultado quantitativo da toxicidade direta e indireta do PVA com células Vero pelo Método VN. Médias e desvios padrão: CTP 2,47 (0,67); CNT 3,77 (0,09) e PVA 3,03 (1,16). Nível de significância 0,05.....	97
Figura 10-	Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas sobre o PVA por 24 horas. Observa-se na superfície do PVA: células em divisão (cd) ; agregado celular (ac) ; células aderidas (ca) e células em espalhamento (es)	98
Figura 11-	Resultado quantitativo da toxicidade indireta do PVA com células MSCs pelo Método MTT. Médias e desvios padrão: CTP 0,10 (0,07); CNT 0,25 (0,15); PVA 0,35 (0,18). Nível de significância 0,05.....	99
Figura 12-	Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície do PVA com células mesenquimais cultivadas por 24 horas. Células aderidas (*) sobre o PVA e seus prolongamentos (seta).....	100
Figura 13-	Quantificação da atividade da enzima ALP sobre MSCs cultivadas sobre substrato de PVA.....	101

Figura 14-	Imagens das MSCs após 21 dias de diferenciação osteogênica em contato com o PVA. Coloração com Vermelho de Alizarina S (ARS). Aumento 200x.....	102
Figura 15-	Quantificação da formação de matriz mineralizada avaliada pela incorporação do corante Vermelho de Alizarina S (ARS).....	103
Figura 16-	Imagens capturadas via estereomicroscópio dos cêndilos com implante de PVA dos GEs (a) e suas respectivas patelas (b) . Aumento 10x.....	104
Figura 17-	Gráfico da média dos valores referente ao aspecto da superfície do PVA dos GEs avaliados. Ótimo (86%); bom (13%) ruim (1%).....	106
Figura 18-	Gráfico referente à média dos valores referentes ao aspecto da superfície do PVA dos GEs avaliados. Ótimo (72%); bom (25%); ruim (3%).....	106
Figura 19-	Gráfico referente à média dos valores referentes ao aspecto da superfície da patela dos GEs avaliados. Ótimo (86%); bom (13%); ruim (1%).....	107
Figura 20-	Gráfico da média dos valores referente à presença e ou ausência de neotecido formado sobre a superfície do PVA dos GEs avaliados. Ótimo (82%); bom (17%); ruim (1%).....	107
Figura 21-	Gráfico da média dos valores referente ao colapso do implante de PVA dos GEs avaliados. Ausente (97%); presente (3%).....	108
Figura 22-	Gráfico da média dos valores referente à presença e ou ausência de desgaste do tipo adesivo sobre a superfície do PVA dos GEs avaliados. Ausente (96%); presente (4%).....	108

Figura 23-	Gráfico da média dos valores referente à presença e ou ausência de desgaste do tipo abrasivo sobre a superfície do PVA dos GEs avaliados. Ausente em 100% das amostras.....	109
Figura 24-	Gráfico referente à média dos valores referente ao desgaste do tipo abrasivo na superfície da patela dos GEs avaliados. Ausente (99%); presente (1%).....	109
Figura 25-	Gráfico da média dos valores referente ao desgaste do tipo adesivo na superfície da patela dos GEs avaliados. Ausente (99%); presente (1%).....	110
Figura 26-	Imagens observadas via estereomicroscópio dos cêndilos sem implante de PVA dos GCs e das suas respectivas patelas (B). Aumento 10x.....	110
Figura 27-	Gráficos referentes ao Ensaio Mecânico de Fluência à Indentação dos grupos CA, GE00 e dos GEs.....	111
Figura 28-	Gráfico do módulo médio de Fluência à Indentação em função do tempo de seguimento referente aos grupos de estudo CA, GE00 e GEs.....	112
Figura 29-	Gráfico referente às concentrações dos componentes minerais Cálcio, Fósforo e Enxofre presentes nas amostras do grupo GOO (não implantado) e nos GEs.....	114
Figura 30-	Microscopia Óptica do GE03. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (at) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (nt) ao redor do implante aumento 200x. Tecido de granulação (TG) aumento 400x. Coloração HE.....	115

Figura 31-	Microscopia Óptica do GE06. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (at) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (nt) ao redor do implante aumento 200x. Tecido de granulação (TG) aumento 400x. Coloração HE.....	116
Figura 32-	Microscopia Óptica do GE12. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (at) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (nt) ao redor do implante aumento 200x. Matriz óssea mineralizada (MO) aumento 400x. Coloração HE.....	117
Figura 33-	Microscopia Óptica do GE24. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (at) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (nt) ao redor do implante aumento 200x. Tecido ósseo neoformado (TN) aumento 400x. Coloração HE.....	118
Figura 34-	Gráfico da média referente ao critério células inflamatórias dos GEs avaliados. Ausente (81%); presença moderada (19%); presença intensa=0%.....	120
Figura 35-	Gráfico da média referente ao critério tecido de granulação dos GEs avaliados. Ausente (68%); presença moderada (32%); presença intensa (0%).....	120
Figura 36-	Gráfico da média referente ao critério fibras colágenas dos GEs avaliados. Ausente (9%); presença moderada (69%); presença intensa (22%).....	121
Figura 37-	Gráfico da média referente ao critério matriz óssea mineralizada dos GEs avaliados. Ausente (9%); presença moderada (61%) presença intensa (30%).....	121

Figura 38-	Gráfico da média referente ao critério tecido ósseo neoformado dos GEs avaliados. Ausente (37%); presença moderada (53%) presença intensa (10%).....	122
Figura 39-	Gráfico da média referente ao critério reabsorção óssea do tecido ósseo neoformado dos GEs avaliados. Ausente (88%); presença moderada (12%) presença intensa (0%).....	122
Figura 40-	Gráfico da média referente ao critério desabamento do tecido ósseo neoformado dos GEs avaliados. Ausente (100%) do total das amostras.....	123
Figura 41-	Microscopia Óptica dos GCs. Nota-se a formação e manutenção do tecido fibrocartilaginoso (TFC) preenchendo completamente o defeito ósseo osteocondral em todos os grupos. Coloração HE. Aumento 400x.....	124
Figura 42-	Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície do PVA dos GEs. Detalhe menor aumento de 10x. Maior aumento 1000x.....	125
Figura 43-	Detalhe da região medial da contra-superfície (patela) dos GEs.....	126
Figura 44-	Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície do defeito vazio dos GCs. Detalhe menor aumento de 10x. Maior aumento 1000x.....	127
Figura 45-	Detalhe da região medial da contra-superfície (patela) dos GCs.....	128

	Pág.
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvii
1- INTRODUÇÃO	51
1.1- Cartilagem articular - composição	53
1.1.1- Matriz Extracelular (MEC).....	55
1.1.2- Colágeno.....	55
1.1.3- Água.....	55
1.1.4- Condrócitos.....	56
1.1.5- Proteoglicanos.....	57
1.1.6- Cartilagem Articular - estrutura.....	58
1.1.6.1- Zona superficial tangencial.....	59
1.1.6.2- Zona de transição ou média.....	59
1.1.6.3- Zona profunda ou de cartilagem calcificada.....	60
1.1.6.4- Osso subcondral.....	60
1.2- Processo de degeneração e reparação da cartilagem articular	61
1.3- Uso de hidrogéis no reparo de defeitos osteocondrais	63

3.4- Método	81
3.4.1- Procedimento cirúrgico.....	81
3.4.2- Sacrifício dos animais.....	84
3.5- Avaliação da interação do PVA com o tecido receptor	84
3.5.1- Análise Macroscópica por Estereomicroscopia.....	84
3.5.2- Avaliação do comportamento mecânico do PVA por Ensaio Mecânico de Fluência à Indentação (EMFI).....	85
3.5.3- Análise dos Minerais nas Amostras de PVA por Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (EDXRF).....	87
3.5.4- Avaliação por Microscopia Óptica (MO).....	88
3.5.5- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Superfícies dos cêndilos dos GEs e GCs e das Patelas.....	90
4- RESULTADOS	93
4.1- Teste de inchamento dos implantes do hidrogel de PVA	95
4.2- Resultados análises <i>in vitro</i>	95
4.2.1- Avaliação da Citotoxicidade Indireta e Direta do PVA com Células Vero pelo Método MTT.....	95
4.2.2- Avaliação da Citotoxicidade Indireta do PVA com Células Vero pelo Vermelho Neutro (VN).....	97
4.2.3- Investigação da adesão e morfologia celular do PVA com células Vero por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	98

4.2.4- Avaliação da citotoxicidade indireta do PVA com células mesenquimais (MSCs) pelo método MTT.....	99
4.2.5- Investigação da adesão e morfologia celular do PVA com MSCs por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	100
4.2.6- Quantificação da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP).....	101
4.2.7- Coloração de vermelho de alizarina S (ARS).....	102
4.3- Resultados análises <i>in vivo</i>	104
4.3.1- Avaliação da Superfície do Implante de PVA e da Cartilagem Articular adjacente via Estereomicroscópio.....	104
4.3.2- Avaliação do comportamento mecânico do PVA por ensaio mecânico de fluência à indentação (EMFI).....	111
4.3.3- Análise dos minerais nas amostras de PVA por espectrometria de fluorescência de raios-X (EDXRF).....	113
4.3.4- Avaliação por microscopia óptica (MO).....	115
4.3.5- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies dos côndilos e das patelas.....	125
4.3.5.1- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies dos côndilos e patelas dos GEs.....	125
4.3.5.2- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies dos côndilos e patelas dos GCs.....	127
5- DISCUSSÃO	129
5.1- Análise dos resultados obtidos	131

5.1.1- Teste de inchamento das membranas de hidrogel de PVA.....	132
5.1.2- Ensaio <i>in vitro</i> do PVA.....	133
5.1.3- Avaliação por estereomicroscopia.....	135
5.1.4- Avaliação por EMFI.....	136
5.1.5- Avaliação EDXRF.....	137
5.1.6- Avaliação por MO.....	137
5.1.7- Avaliação dos cõndilos e patelas por MEV.....	138
6- CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	139
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143



1- INTRODUÇÃO

A cartilagem articular (CA) é um tecido altamente complexo, especializado, levemente elástico, que reveste as superfícies das articulações dos ossos longos e curtos.

Apresenta funções como absorver choques, minimizar o atrito e o desgaste, facilitar o deslizamento, mantendo assim os movimentos articulares repetitivos e indolores na articulação por várias décadas, distribuir a carga recebida, diminuir o contato entre as superfícies (devido à presença do fluido sinovial), reduzir a tensão mecânica sobre qualquer ponto de contato entre esta e ossos (13, 19, 30, 75).

1.1- Cartilagem articular - composição

A CA é um tecido conjuntivo denso de origem mesodérmica formado por cartilagem hialina que possui consistência elástica firme, aneural, alinfático e avascular que recebe nutrição por meio de difusão por meio dos condrócitos oriundos do fluido sinovial presente nas cavidades articulares (6, 13, 40, 76, 103).

Suas células, os condrócitos dispersos e distribuídos em toda extensão da CA, são constituídos de matriz extracelular (MEC) que por sua vez é composta por proteoglicanos e colágenos em menor quantidade outras proteínas e glicoproteínas. A grande quantidade de proteoglicanos atrai a água tornando a CA hidratada.

Conforme Figura 1, observa-se que as proteínas de ligação (1) estão unidas por covalescência à proteína central dos proteoglicanos (2) e estes ligados às moléculas longas de ácido hialurônico (HA) (3). As cadeias de sulfatos de condroitina do proteoglicano (4) estabelecem ligações eletrostáticas com as fibras colágenas (5), contribuindo assim para aumentar a resistência da matriz (40).

A CA é formada por cerca de 40% do seu peso seco por fibras de colágeno do tipo II que é formado por uma tripla hélice de glicoproteínas de até 300nm, sendo que a maioria delas possui tamanho médio de 67nm e peso

molecular de 67kDa. A molécula de colágeno e está relacionada principalmente com sua arquitetura e função da CA.

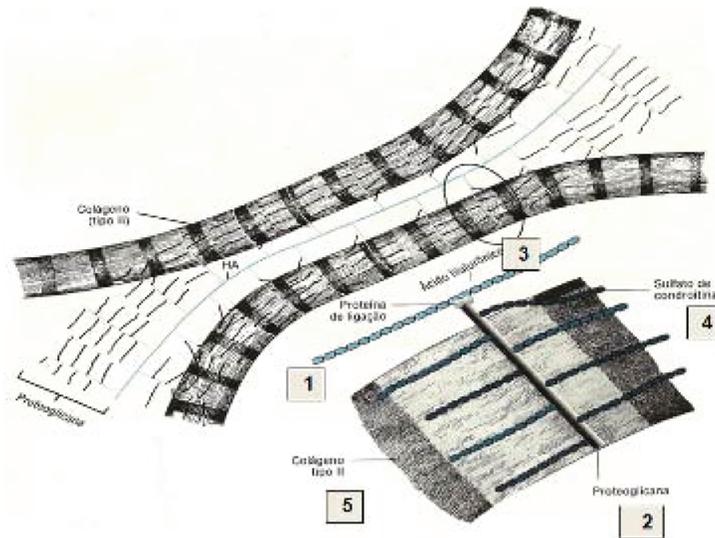


Figura 1- Esquema da estrutura morfológica da CA. **(1)** proteína de ligação; **(2)** proteoglicanos; **(3)** moléculas longas de ácido hialurônico; **(4)** cadeias de sulfatos de condroitina do proteoglicano e **(5)** fibras colágenas. Junqueira e Carneiro, 1999 modificada.

A complexa constituição da CA formada por proteoglicanos e colágeno do tipo II, confere a CA alta elasticidade, propriedades mecânicas de resistência a tração e a compressão (13, 40, 76, 103).

As propriedades biomecânicas da CA são conferidas principalmente pelos principais componentes presentes na MEC: as fibras colágenas do tipo II, que representam cerca de 95% do peso total do tecido cartilaginoso, além da presença de outros em menor quantidade dos tipos V, VI, IX, X e XI os quais estão associados à proteoglicanos hidratadas cerca de 10 a 20% e água cerca de 60 a 80% além de 1 % de proteínas (enzimas, lipídeos, fatores de crescimento, etc.) secretadas pelos próprios condrócitos dispersos na matriz.

Abaixo seguem descritos os principais componentes encontrados na cartilagem articular.

1.1.1- Matriz Extracelular (MEC)

A MEC possui característica de um gel, é composta por cerca de 70% a 80% de água e 30% da sua parte sólida é formada principalmente por colágeno e proteoglicanos (15, 56).

1.1.2- Colágeno

A principal função das fibras de colágeno é dar suporte estrutural para a matriz da cartilagem que, por sua vez, resiste de forma efetiva às forças de tração aplicadas sobre esta.

Conforme Figura 1(5), observa-se que a molécula de colágeno do tipo II possui forma de um pequeno bastão rígido, formado pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas alfa que são sintetizadas na forma de um precursor (pró-colágeno tipo II) e são codificadas por genes diferentes. Estas são unidas por pontes de hidrogênio que possibilita o tecido resista às forças de cisalhamento e servem de suporte para a adesão dos condrócitos justificada pelas propriedades físicas, biológicas e a rigidez e estabilidade conferida ao colágeno (15,67).

1.1.3- Água

A água é essencial para a manutenção e a sobrevivência do tecido avascular da CA, pois permite a difusão de gases, transporta nutrientes e produtos de degradação entre os condrócitos e o fluido da membrana sinovial. Ela é também responsável pelo desempenho mecânico da mesma. (56,96).

A água é considerada o componente presente em maior quantidade na CA, cerca de 65 a 80% do seu peso total. Sua concentração varia de acordo com a região da CA, variando de 80% na região superficial e cerca de 65% nas regiões mais profundas (48). Nos espaços intracelulares ela está presente em cerca de 30% e está associada com as fibras de colágeno. Encontram-se também dissolvidos na água os componentes minerais como Sódio, Cálcio, Cloro e Potássio entre outros (56).

A maior quantidade de água ocupa o espaço entre as moléculas e encontra-se livre para se mover quando gradientes de carga e pressão são aplicados sobre esse tecido. Quando o tecido cartilaginoso é submetido a uma determinada carga, 60% desse fluído pode se mover, representando assim um importante controle no comportamento mecânico da CA e da sua lubrificação (4,15,62,64).

1.1.4- Condrócitos

Derivados de Células Tronco-Mesenquimais (MSCs), apresentam diferenciação durante o desenvolvimento e formação do esqueleto, aumentando de volume e ocupam menos de 3 a 10% do volume do volume da porção sólida da CA. A formação e a manutenção da CA dependem da formação dos condrócitos que, utilizando-se tanto o metabolismo aeróbico como o anaeróbico e distribuído em camadas bem estruturadas, são os responsáveis pela síntese de Matriz Extra Celular (MEC) formada principalmente por proteoglicanos e colágeno.

Os condrócitos secretam colágeno principalmente do tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas, como a condronectina responsável pela manutenção da CA, e que possui atividade mitótica demonstrada pela síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) nas faixas etárias mais precoces, embora perca esta capacidade na idade adulta (15,77,93).

O citoplasma dos condrócitos variam de acordo com a atividade celular. Nos mais ativos o Retículo Endoplasmático e Complexo de Golgi são abundantes, enquanto em células inativas, estas organelas estão praticamente ausentes (87).

Por ser a CA avascular e alinfática, o ambiente onde se encontram os condrócitos possui baixa oxigenação, então ela degrada a glicose principalmente pelo mecanismo anaeróbio, tendo como produto final o ácido láctico. Dessa forma, os nutrientes trazidos pelo sangue penetram na matriz da cartilagem e vão até os condrócitos mais profundos.

Os fatores que determinam essa atividade metabólica, resultando na produção da matriz, não estão totalmente esclarecidos, mas provavelmente são influenciados pelas necessidades biomecânicas locais, por mediadores químicos e por fatores de crescimento celular (15,64).

1.1.5- Proteoglicanos

Os proteoglicanos Figura 1 (2) são macromoléculas complexas que consistem em uma proteína formada principalmente por carboidratos (polissacarídeos ou mucopolissacarídeos) conhecidas como regiões dos glicosaminoglicanos (GAGs) representadas por um complexo variado de moléculas onde se fixam uma ou várias cadeias de GAGs (64,88). Estas cadeias possuem carga negativa e se repetem, atraindo íons solúveis que atraem água e resultam em resistência à compressão.

A cartilagem pode conter diversas classes de proteoglicanos que variam de acordo com o tamanho e sua composição, sendo que os que possuem cadeias longas são chamados de agreganos que são unidos por ligações covalentes a uma proteína central com peso molecular que varia de 220 a 250kDa formando grandes agregados entrelaçados entre si não covalentes ligados ao HA. Estes, por sua vez, variam em quantidade e estrutura de acordo com o local em que se encontram e a idade do indivíduo.

Cerca de 87% dos proteoglicanos são constituídos por sulfato de condroitina além de 6% de sulfato de keratina que é encontrada apenas na CA, sendo responsável pela pressão osmótica da CA e desempenha o principal papel de inchar e hidratar a estrutura de colágeno.

Existem outros tipos de proteoglicanos de cadeias longas menos caracterizadas que possuem baixo peso molecular (entre 12 e 40kDa), como a decorina, biglicana e a fibromodulina encontradas em diferentes tipos de tecido conjuntivo, incluindo a cartilagem e os fragmentos de proteoglicanos que se acumulam com o passar dos anos e que permanecem unidos ao HA.

Há uma redução progressiva no conteúdo de água e proteínas com o aumento de idade do indivíduo (21,76) que está relacionada com a diminuição do conteúdo do sulfato de condroitina e no aumento do sulfato de queratina que variam na proporção de 10/1 no nascimento até 2/1 na idade adulta (15,91,94).

Atualmente, é aceito que a agregação dos proteoglicanos na rede do colágeno aumenta a rigidez estrutural da matriz extracelular (64,66).

1.1.6- Cartilagem articular - estrutura

A CA está dividida morfológicamente em quatro zonas distintas conforme Figura 2, as quais diferem uma da outra conforme a quantidade e arranjo dos seus componentes, o diâmetro das fibras de colágeno, a organização dos proteoglicanos e dos demais componentes presentes na MEC.



Figura 2- Corte histológico demonstrando a estrutura da cartilagem articular de cão demonstrando as suas zonas. Coloração HE. Aumento 50X.

1.1.6.1- Zona superficial tangencial

Chamada de superfície de deslizamento, ela é constituída por uma camada delgada com cerca de 10 a 20% da espessura total da CA. Possui fibras de colágeno tipo II situadas paralelamente à superfície da CA. Nessa porção, os condrócitos apresentam-se alongados e sintetizam alta concentração de colágeno do tipo II, baixa concentração de proteoglicanos e alta concentração de água.

1.1.6.2- Zona de transição ou média

Consiste na zona mais espessa da CA, com cerca de 40 a 60% da espessura total com alta concentração de proteoglicanos. Os condrócitos apresentam formas arredondadas e as fibras colágenas possuem diâmetros maiores estão dispostas aleatoriamente.

1.1.6.3- Zona profunda ou de cartilagem calcificada

Possui camada com espessura equivalente a 30% da espessura total da CA. As concentrações de água são muito baixas e de proteoglicanos bastante alta. As fibras de colágeno tipo II apresentam diâmetros bem maiores e estão dispostas perpendicularmente à superfície articular. Os condrócitos são esféricos e em maior quantidade que na zona de transição e formam colunas na mesma direção das fibras colágenas.

Neste nível, há uma espessa camada de fibras colágenas que separam um nível do outro atribuindo uma estabilidade entre a linha de transição conhecida como *tidemark* e a mais profunda de cartilagem calcificada (90).

Na zona que separa a cartilagem calcificada do osso subcondral (região de transição entre os dois tecidos), os condrócitos apresentam fenótipo hipertrófico, são pequenos e irregulares e encontram-se embebidos na matriz calcificada que é menos elástica que as zonas anteriores. Desse modo, as solicitações mecânicas da cartilagem articular para o osso subcondral ocorre de forma mais amena.

1.1.6.4- Osso subcondral

A interface entre a cartilagem calcificada fornece uma excelente integração estrutural com osso subcondral que está logo abaixo desta. Esta região consiste de uma placa de osso localizada diretamente sob a cartilagem articular calcificada que dá sustentação a esta placa óssea.

O osso subcondral é composto por trabéculas ósseas orientadas em diferentes direções e está extremamente dependente da situação de carga e apresenta propriedades mecânicas diferentes em diferentes planos.

A capacidade de deformação do osso subcondral contribui para o absorver cargas transmitidas sobre a articulação e distribuí-las proporcionando, assim, efeito amortecedor (30,33,78).

1.2- Processo de degeneração e reparação da cartilagem articular

Conforme Hunter, 1743, *“uma vez destruída, a cartilagem articular jamais será reparada”*, pois o potencial de regeneração é limitado devido à baixa atividade mitótica dos condrócitos e sua característica avascular.

Lesões que acometem a CA podem ocorrer como resultado de uma destruição mecânica traumática ou de uma degeneração mecânica progressiva (uso e desgaste). As lesões condrais são muito comuns e podem ser diagnosticadas entre 63 a 66% das artroscopias de joelho, enquanto aquelas que atravessam a camada calcificada da cartilagem e expõe o osso subcondral (osteocondrais) são encontradas em 19,6%.

O diagnóstico de imagem por ressonância magnética é considerado padrão para avaliação das lesões cartilaginosas, uma vez que permite uma avaliação morfológica da superfície, da espessura, do volume e osso subcondral (80,98).

A degeneração mecânica da CA ocorre com a perda progressiva de sua estrutura e funções normais que tem início na maioria das vezes com o seu amolecimento que evolui para uma fragmentação e, com esta perda é contínua o osso abaixo começa a sofrer danos, perde sua proteção durante as atividades diárias normais podendo evoluir para uma Osteoartrose (OA) (57,58). Lesões por torções de alto impacto, anatomia anormal da articulação, instabilidade articular, força e resistência muscular inadequada e fatores médicos ou genéticos podem também contribuir para a OA.

Degenerações que resultam em OA causam dores severas, deformidades e baixo movimento das articulações, surgindo, então, a necessidade de intervenções cirúrgicas para o tratamento. Esses efeitos degenerativos ocorrem comumente após trauma (como fratura articular), lesão ligamentar ou meniscal, lesão osteocondral isolada, doenças congênitas e metabólicas (9,81).

Nas lesões traumáticas, dependendo do tamanho e local da lesão, algumas vezes pode ocorrer à cura. No caso de uma lesão completa que atinge o osso subcondral, haverá sangramento no local, com a formação de um coágulo que irá preencher o defeito formado e desencadeará a formação do tecido fibroso que num período curto de tempo irá se deteriorar por não possuir as propriedades mecânicas ao da CA e do osso pré-existente.

Lesões que acometem o osso subcondral têm sido tratadas com microfraturas, artroplastia, debridamento, abrasão e enxertos osteocondrais autólogos. Os enxertos osteocondrais autólogos apresentam como principais desvantagens a limitada quantidade que pode ser doada, a pouca estabilidade mecânica do tecido formado além da morbidade produzida na área doadora (5,8,14,16). As condições para a escolha da técnica cirúrgica adequada para reparos de defeitos osteocondrais deve ser bastante criteriosa, levando-se em consideração as causas do defeito, idade do paciente, entre outras.

Apesar das várias técnicas utilizadas, estas são apenas paliativas, pois todas apresentam limitações que vão desde o comprometimento da área doadora, incompatibilidade genética, alto custo, dentre outros e, ao final, o tecido formado para substituir tais lesões apresenta propriedades mecânicas inferiores à CA normal e, cerca de 70% a 80% dos pacientes apresentam alguma melhora e com o passar do tempo o problema persiste.

Atualmente nenhum tratamento é capaz de reparar de maneira satisfatória e definitiva as lesões condrais e osteocondrais e, além disso, das técnicas frequentemente utilizadas, melhores resultados são geralmente encontrados em pacientes jovens com sintomas descobertos recentemente, que apresentam menor índice de massa corporal e com poucas intervenções cirúrgicas anteriores.

É constante a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos para o tratamento das lesões osteocondrais. De acordo com a literatura, inúmeros pesquisadores têm desenvolvido estudos em busca de novos métodos para potencializar a regeneração tecidual.

A engenharia tecidual tem sinalizado para a aplicação de células-tronco mesenquimais (MSCs) para se obter uma regeneração tecidual mais eficaz, podendo ser esta uma excelente alternativa terapêutica (36,85,97).

As principais fontes de MSCs são: a medula óssea, o tecido adiposo e o sangue do cordão umbilical. Estas, quando estimuladas por sinais específicos, são induzidas a se diferenciar em inúmeros tipos celulares com funções especializadas (29). Estudos têm demonstrado que MSCs derivadas da medula óssea (MSCs/MO) têm capacidade para se diferenciar em tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo (17).

A engenharia tecidual tem focado sua atenção no desenvolvimento de estudos sobre a utilização de suportes porosos tridimensionais e materiais biorreabsorvíveis que permitam a adesão e o crescimento das MSCs, bem como mecanismos de indução da diferenciação das mesmas, porém o sucesso destes métodos está sujeito ao melhor entendimento dos mecanismos de interações celulares e no seu potencial de diferenciação sobre os diferentes materiais desenvolvidos (34,52,97).

São vários e constantes os desafios pesquisados na área de biomateriais na tentativa de desenvolver novas metodologias e implantes com propriedades mecânicas, físicas e químicas similares àquelas da CA e do osso subcondral para reparar de modo satisfatório e definitivo esses defeitos (19,22, 23,24,37,65,83,95,97).

1.3- Uso de hidrogéis no reparo de defeitos osteocondrais

A engenharia tecidual tem se utilizado de polímeros reabsorvíveis ou não que podem ser origem natural (proteína, celulose, amido, borracha) ou sintéticos obtidos em laboratório (hidrogel de polietileno, álcool de polivinil, poliestireno), entre outros, os quais são bastante promissores para reparação de defeitos da CA e do osso subcondral (12, 18,75,102).

Vários são os biomateriais desenvolvidos pela engenharia de materiais para serem utilizados para reparação de defeitos ósseos, onde destacam as biocerâmicas como os biovidros, hidroxiapatita, fosfatos de Cálcio (39,82); dos polímeros sintéticos biodegradáveis a base de poli (alfa-hidroxi ácidos), poli (etileno glicol) (PEG) e poli (caprolactona) (PCL) (49,53) os quais são amplamente incorporados a outros materiais sintéticos e utilizados na engenharia tecidual para reparo de CA e do osso subcondral devido a sua capacidade de processamento, baixo custo, biodegradabilidade controlada e além disso já são aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (46).

Os hidrogéis poliméricos são elásticos, macios e estáveis por apresentarem ligações covalentes fortes e forças coesivas fracas na forma de ligações iônicas, determinadas pelo monômero hidrofílico básico e pela concentração de agentes de reticulação, mas quando secos tornam-se quebradiços (26,68,79).

Para a aplicação específica como reparo da CA, ele deve ser produzido de maneira a apresentar um comportamento viscoelástico compressivo, semelhante ao da mesma, mantendo suas propriedades mecânicas mesmo quando inchado.

Com o intuito de melhorar suas propriedades mecânicas quando inchado, os hidrogéis poliméricos utilizados no estudo como reparadores da CA são geralmente obtidos por copolimerização, isto é, pelo uso de mais de um monômero ou até mesmo mudanças no processo de reticulação (26,62).

Os hidrogéis poliméricos podem ser sintetizados dentro de uma grande variedade de formas como esponjas, géis não esponjosos, filmes, líquidos que podem ser polimerizados na forma de géis e como recobrimentos de matrizes (substratos) sem alterar as propriedades físicas.

Há também um grupo de hidrogéis reticulados obtidos via radiação ionizante onde pode controlada a concentração de sítios de reticulação o que influencia a sua capacidade de absorção de água (inchamento), fator importante

para seu comportamento mecânico para uso em articulações (99). Além disso, todo o processo de reticulação e esterilização é realizado em uma única etapa, e o produto na sua forma final é obtido de modo simples e rápido se comparado ao convencional o qual apresenta alto grau de impurezas resultantes dos agentes de reticulação ou de iniciadores químicos utilizados durante a síntese (7, 25, 43, 45, 91,78, 89).

Os hidrogéis a base de Álcool de Polivinil (PVA) apresentam boa biocompatibilidade, baixo coeficiente de atrito, boa absorção de água, são insolúveis na presença de líquido e apresentam ótima viscoelasticidade (2,10). Eles são amplamente utilizados como laringe artificial, suporte para cultura de tecidos e dispositivos controladores de liberação de drogas, tubos e artefatos que ficam em contato com sangue, como membranas de diálise, prótese valvares cardíacas testes preliminares como substituto pericárdio e recentemente como reparador de defeitos osteocondrais (21,31,38,70,71,84,100).

Bavaresco (2004) estudou o processo de obtenção de membranas de PVA reticuladas via radiação ionizante para uso como substitutas da cartilagem articular. A pesquisa desenvolvida mostrou a importante diminuição dos valores de coeficiente de atrito (μ) com o aumento da concentração de água absorvida pelo PVA e a dependência deste comportamento com o aumento da velocidade de deslizamento, sugerindo a ocorrência de lubrificação hidrodinâmica semelhante à observada nas articulações naturais.

Características consideradas biocompatíveis quando utilizados em ensaios *in vivo* associados à praticidade de síntese e manuseio dos hidrogéis os torna interessantes e, além disso, são elásticos, macios e estáveis por apresentarem ligações covalentes fortes e forças coesivas fracas na forma de ligações iônicas, determinadas pelo monômero hidrofílico básico e pela concentração de agentes de reticulação (26,68).

Dentre as diversas classes de hidrogéis poliméricos pesquisados para aplicações biomédicas, aqueles à base de PVA, obtidos via radiação ionizante com feixe de elétrons tem merecido destaque devido às suas características

físico-químicas, além das vantagens que o método de obtenção apresenta (7,11,44,73).

Hermann e colaboradores (1924), foram os pioneiros na sua obtenção, mas somente após a II Guerra Mundial pesquisadores estudaram extensivamente suas propriedades básicas e aplicações, principalmente na tecnologia de filmes e fibras. Sua produção e caracterização em grande escala se deu mais tarde com pesquisadores americanos e russos (74) utilizando-se de técnicas de tratamento térmico melhoraram as propriedades mecânicas desse biomaterial, confirmando, assim, sua viabilidade como substituto da cartilagem articular.

Bray e Merryl (1973) foram os primeiros a sugerir o desenvolvimento de hidrogéis de PVA para reconstrução de juntas articulares e a continuidade do trabalho foi dada por Kobayashi (2001) com técnicas de tratamento térmico melhoraram as propriedades mecânicas desse biomaterial, confirmando, assim, sua viabilidade como substituto da cartilagem articular.

Resultados de testes *in vitro realizados* com hidrogel de pHEMA/poli (MMA-co-AA) demonstraram a potencialidade destes materiais para uso no reparo das articulações conforme (50,51) e também *in vivo* (54,55). Resultados de testes *in vivo* foram confirmados ao utilizar o hidrogel como reparador de defeitos osteocondrais em ratos quando foi possível mimetizar o comportamento mecanoelétrico-químico do mesmo associado ao bom desempenho biológico apresentado (54).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o comportamento do hidrogel de PVA acetalizado e irradiado como substituto da cartilagem articular implantados em joelhos de ratos *Wistar*.



2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Avaliar o comportamento do hidrogel de PVA acetalizado e irradiado como substituto da cartilagem articular implantados em joelhos de ratos *Wistar*.

2.2- Específicos

- ✓ avaliar a citotoxicidade dos materiais frente células Vero e MSCs/MO;
- ✓ avaliar o cultivo e diferenciação das MSCs/MO em células osteogênicas;
- ✓ avaliar o comportamento do PVA ao longo do tempo como substituto da cartilagem articular e
- ✓ avaliar a interação do PVA com o tecido receptor subjacente.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

3.1.1- Preparo dos do hidrogel de PVA

O hidrogel de PVA foi sintetizado a partir do polímero comercial álcool de polivinil, hidrolizado 99+%, código 341584 Aldrich®.

Pesou-se 100g do polímero e colocou-o em balão volumétrico contendo 900 ml de água destilada, e produziu-se uma solução aquosa na concentração de 10% (p/p), seguida do aquecimento magnético em banho-maria por 30 minutos sob temperatura de 70°C até a completa homogeneização. Em seguida, a solução foi resfriada e armazenada em refrigerador sob temperatura de 4°C.

Para a confecção das membranas conforme Figura 3A, retirou-se a solução do refrigerador e, ao atingir a temperatura de 25°C, 20ml foram vertidos em placas de Petri® com 10cm de diâmetro previamente silanizadas para a confecção das membranas com 1mm de espessura. Estas eram mantidas sob temperatura 25°C por um período de 72h para a total evaporação da água.

Após este período, as membranas foram submetidas ao processo químico de acetalização (que consiste em aumentar a resistência mecânica do PVA), onde foram imersas em um Becker contendo solução composta por água destilada, formaldeído 40% (v/v) (Aldrich®), ácido sulfúrico concentrado 50% (v/v) (Aldrich®) e sulfato de sódio anidro 300g (Aldrich®). Nessa solução e sob constante agitação e temperatura de 70°C foram mantidas por 24 horas (7, 59,104).

Para remoção dos resíduos oriundos do processo de acetalização, as membranas foram lavadas em água corrente destilada por 24 horas, o excesso de água foi eliminado com a utilização de papel filtro e embaladas individualmente e submetidas ao processo de irradiação por reticulação radioativa.

As membranas foram irradiadas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), utilizando-se radiação ionizante de feixes de elétrons em ambiente livre de oxigênio (elétron beam - EB) emitido por acelerador de elétrons Dynamitron (E=1,5 MeV) Radiation Dynamis®, Inc com dose de 25kGy (7).

Após reticuladas e irradiadas, sob capela de segurança biológica as amostras foram mergulhadas em solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9% por 2h para atingir o grau de inchamento de 43% e foram obtidas amostras com 0,2g para os testes *in vitro* (citotoxicidade indireta e direta) e, para o *in vivo* (implante nos animais) com um cortador de biópsia (*punch*) nº 2, implantes de 2mm de diâmetro e 1mm de espessura foram cortados (Figura 3B) e colocados em frascos previamente autoclavados e mantidos em geladeira até o momento do implante.

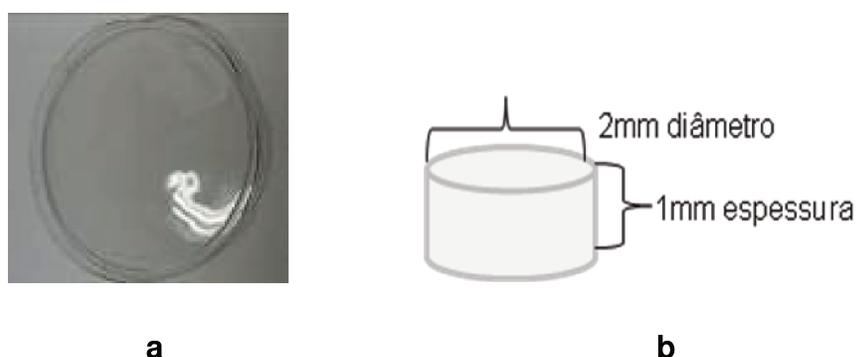


Figura 3- Imagem da membrana de PVA (a); implante de PVA com 2mm de diâmetro e 1mm de espessura (b).

3.1.2- Teste de inchamento dos implantes de hidrogel de PVA

O controle do grau de inchamento pode ser realizado através de variações das condições externas como pH, resistência iônica, temperatura, tipo de agente de reticulação ou do tipo de monômeros e métodos de síntese. Além disso, para certos hidrogéis, são desenvolvidas teorias as quais predizem o grau de inchamento baseado na temperatura e peso molecular entre reticulações (3).

Hidrogéis de PVA são considerados termorrígidos, onde as ligações entre cadeias são primárias, de alta energia e não são passíveis de rompimento pela ação de solventes, tornando-os insolúveis. O grau de inchamento do hidrogel

termorrígido é resultado do nível de afinidade química entre o grau de reticulação, o fluido e a densidade de ligações cruzadas ali presentes. Portanto, quanto maior for a densidade das ligações cruzadas presentes no hidrogel, menor será a o grau de inchamento do mesmo.

Para avaliar o grau de inchamento (GI) foram utilizados seis implantes de PVA secos que variaram entre 0,09 a 0,14g. As amostras foram colocadas em solução de NaCl 0,9% com pH 7 por 24h e, após este período calculado o GI utilizando-se a relação existente entre o peso seco (PSe) e o peso inchado (PIn) condição e tempo acima e sob temperatura ambiente média de 25°C.

A pesagem das amostras foi realizada após período de estabilização de 48h e os resultados calculados conforme equação abaixo:

$$GI (\%) = (PIn - PSe) \rightarrow PS \times 100 \text{ onde:}$$

GI= porcentagem do grau de inchamento de cada amostra;

PIn= peso de cada amostra inchada;

PSe= peso de cada amostra seca.

3.2- Ensaios *in vitro*

Para a avaliação da citotoxicidade do PVA utilizou-se células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos originária de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. As células foram cultivadas em meio nutriente celular (HAM F-12) Nutricell[®] contendo L-glutamina, D-Glicose, NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) Gibco[®] e mais 1% de penicilina com estreptomicina (PS) Gibco[®] e mantidas em incubadora de CO₂ (Sanyo Scientific[®]) sob temperatura de 37°C. Esta linhagem celular foi adotada neste estudo por ser recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais (35,42,86).

3.2.1- Cultura celular

3.2.1.1- Avaliação da citotoxicidade indireta e direta do PVA com células VERO pelo método MTT

O extrato do PVA foi obtido por meio da incubação na proporção de 0,2g/ml de meio HAM F-12 com 10% SFB por 48 horas sem agitação sob 37°C.

Decorrido o tempo acima, o meio foi removido para avaliar o possível efeito de substâncias liberadas pelo material que pudessem estar presentes no meio de cultura. O teste de citotoxicidade indireta e obtenção dos extratos foram realizados e testados conforme recomendações internacionais e testes já comprovados (36, 60).

Após obtenção do extrato utilizou-se para o cultivo as células VERO e como controle positivo de toxicidade (CPT) utilizou-se solução de Fenol 0,5% em meio de cultura e como controle negativo de toxicidade (CNT) meio de cultura (HAM F-12) suplementado com 10% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina (PS).

As células foram inoculadas a uma concentração de 3×10^6 células/ml de meio de cultivo celular (HAM F-12) suplementado com 10% SFB em placas de 96 poços. Após 24 horas, considerado como tempo suficiente para a adesão celular, o meio de cultura foi substituído pelo extrato dos materiais e mantidos sob as mesmas condições de cultura por 24 horas.

A avaliação da toxicidade por contagem direta foi feita pela adição de sal (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MTT) de acordo com método descrito (60). A análise estatística foi realizada utilizando-se o método One Way Anova®, com nível de significância de 0,05.

3.2.1.2- Avaliação da citotoxicidade indireta do PVA com células VERO pelo Vermelho Neutro (VN)

Para a realização do teste de toxicidade pelo método de incorporação do Vermelho neutro utilizou-se protocolo estabelecido por Rogero et al (86).

Neste ensaio foi avaliada a viabilidade de células VERO frente ao extrato dos materiais por meio da incorporação do vermelho neutro (VN), onde uma suspensão celular na concentração de 3×10^6 células/ml foi inoculada em placa de cultura de 96 poços (n=5) e incubada por 24 horas a 37°C. Utilizou-se como controle a solução de meio HAM F-12 com 10% de fenol controle positivo de toxicidade (CPT) e o extrato de poliestireno como controle negativo de toxicidade (CNT).

Após 24 horas o meio de cultura presente na placa foi substituído pelo extrato dos materiais e a placa foi incubada por um período de 24 horas. Decorrido o período de incubação, o extrato foi desprezado e foram adicionados em cada poço 200µl em meio mínimo de Eagle (MEM) contendo 50µg de VN por mililitro (ml).

Após 3 horas o meio foi removido e os poços foram lavados com 200µl de PBS e outra solução contendo cloreto de Cálcio 1% (CaCl_2) em formaldeído 0,5%. Foram adicionados 200µl de Ácido Acético 1% (CH_3COOH) em Etanol 50%. A placa foi mantida sob agitação por 10 minutos em temperatura ambiente.

Foi feita leitura de absorbância em leitor de Microplacas BioTek® modelo Power Wave X52 com software adaptado versão Gen 5 109 em comprimento de onda de 540nm.

3.2.1.3- Investigação da adesão e morfologia celular do PVA por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta análise foi utilizada para verificar o crescimento e espalhamento das células aderidas cultivadas sobre o PVA.

Sob uma placa de cultura de 24 poços, foi colocada uma lamínula circular com 13mm de diâmetro e sobre ela o implante de PVA. Realizou-se a inoculação da suspensão celular na concentração de 3×10^6 células/ml a qual foi incubada por 24 h a 37°C e, após o período acima, as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído Aldrich® 2,5%, glutaraldeído Aldrich® 2,5% dissolvidos em solução tampão de Cacodilato 0,1M com pH de 7,4 por 2 horas em temperatura ambiente seguida da lavagem com solução de PBS por três banhos de 15 minutos cada um deles.

A pós-fixação foi feita com Tetróxido de Ósmio 1% Sigma® e a placa envolvida em papel alumínio foi mantida em geladeira por 15 minutos, em seguida realizadas três lavagens de 15 minutos cada uma delas com água destilada e a desidratação por concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%) de 60 minutos cada uma.

Após desidratação final as lamínulas e o PVA foram submetidos à metalização com ouro em *sputter* modelo CTD-050 Balzers®. A observação das superfícies da lamínula e do PVA foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL 5800 para aumentos de 500X.

Os ensaios toxicidade foram realizados no Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (LABIMO) localizado no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3.2.1.4- Indução da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais (MSCs) sobre o PVA

Após o isolamento das células mononucleares da medula óssea de ratos Wistar Kyoto (85), na quarta passagem as MSCs em cultura foram estimuladas a se diferenciar em osteoblastos conforme protocolo estabelecido (69).

Para a indução de diferenciação osteogênica utilizou-se placas de cultura de 24 poços contendo células numa densidade de 3.000 células/cm². Dois dias após a inoculação celular o PVA foi colocado nos poços e o meio de cultura foi substituído por meio de indução osteogênica constituído por Meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) baixa glicose suplementado com de 15% SBF mais 1% de OS, 100nM Dexametasona, 50µM Ascorbato-2-fosfato e 10mM de Glicerol-fosfato, o qual era substituído a cada 3 dias por um período de 21 dias (85).

A análise da diferenciação foi feita por meio da quantificação da atividade da enzima Fosfatase Alcalina (ALP), impregnação e extração colorimétrica do corante vermelho de alizarina (ARS) conforme método descrito por Gregory et al. (28).

Para a quantificação da atividade da ALP, foi utilizado kit Fast p-Nitrophenyl phosphatase Tablets N189 Sigma®, onde 50µl do meio de indução de diferenciação osteogênica contido na placa em diferenciação foram transferidos para placa de 96 poços e mantida em incubadora de CO₂ a 37°C por 2 horas e, após este período, adicionou-se 200µl da solução substrato da ALP e a placa foi mantida no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente para a realização da leitura de absorbância em leitor de microplacas BioTek® modelo Power Wave X52 com software adaptado versão Gen 5 109 para comprimento de onda de 540nm.

Para avaliar a impregnação do corante ARS, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 20 minutos e coradas por 10 minutos e as imagens analisadas em microscópio óptico Leica® modelo DMLB para aumentos de 100 e 200 vezes.

Para quantificar da coloração por ARS, por foram adicionados 280µl de ácido acético 10% em cada poço corado com ARS e a placa foi mantida em agitador por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos Eppendorf®, aquecidos a 85°C por 10 minutos seguidos do resfriamento rápido com gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 16.000g por 20 minutos e 100µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 40µl de hidróxido de amônio 10%. A solução final (cerca de 140µl) foi transferida para placa de 96 poços para leitura de absorbância em comprimento de onda de 405nm.

3.2.1.5- Análise estatística

Para a avaliação da diferença entre as médias dos valores dos testes de citotoxicidade realizadas nos implantes de PVA, foi utilizado o teste estatístico One Way Anova® com nível de significância de p igual a 0,05.

3.3- Ensaios *in vivo*

Para avaliar a interação do PVA com o tecido receptor, utilizou-se um total de 80 (oitenta) ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albina, *Rodentia*, *Mammalia*) da linhagem *Wistar* com de idade 10(±2) semanas e massa corpórea de 380g (±20) fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) Unicamp, divididos em dez grupos conforme descrito na Tabela 1 de acordo com os objetivos e análises propostos.

Tabela 1- Apresentação das análises realizadas nos Grupos Controle (GCs), Cartilagem Articular (CA) e dos Grupos experimentais (GEs).

Grupos Experimentais - 80 Ratos			
Grupos	Tempo seguimento (semanas)	Animais/grupo (nº)	Análises (nº amostras)
PVA (GEs)	3	10	
	6	10	EMFI (24) EDRFX (12)
	12	10	MO (60)
	24	10	MEV (20)
PVA(GE00)	-	03	EMFI (06)
Defeito vazio (GCs)	3	08	
	6	08	MO(16) MEV (16)
	12	08	
	24	08	
Cartilagem articular (CA)	-	03	EMFI (06)

*análise estereoscópica foi realizada em todas as amostras de côndilos

3.4- Métodos

3.4.1- Procedimento cirúrgico

Conforme Protocolo nº1047-1/2008, aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB) da Unicamp, os animais foram pesados e anestesiados com Tiopental Sódico Cristália[®], na dose de 25mg/100g de peso do animal, via endovenosa caudal.

Conforme Figura 4, realizou-se a tricotomia dos membros posteriores (terço distal do fêmur e terço proximal da tíbia), seguida da assepsia com solução alcoólica de Iodo 1%. Sobre uma prancha, os animais foram colocados em decúbito ventral com os membros anteriores fixados e os posteriores (direito e

esquerdo) livres, expostos e isolados com por campo cirúrgico fenestrado estéril, onde por meio de acesso parapatelar lateral, realizou-se uma incisão na pele com 2,5cm no sentido longitudinal (porção distal do fêmur e proximal da tíbia) dos lados direito e esquerdo de cada animal. Em seguida, a patela foi luxada medialmente e com auxílio de espátulas odontológicas modelo Millenium[®], a região intercondiliana (sulco troclear) de cada um dos côndilos foi exposta.

No centro da região exposta e, com auxílio de uma broca helicoidal confeccionada com um limitador e acoplada a uma furadeira Bosch[®] sob velocidade 130rpm, foram realizados os defeitos osteocondrais com 2mm de diâmetro e 1mm de profundidade, ou seja; nas mesmas dimensões do implante de PVA a ser implantado.

Com auxílio de uma trefina e sob pressão o implante de PVA era introduzido ficando no mesmo nível da cartilagem articular adjacente. Em seguida, a cápsula articular e pele eram reposicionadas e suturadas com mononylon 000 Ethycon[®].

Após procedimento cirúrgico, os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas para cinco animais cada uma e locados no Biotério para animais em experimentação NMCE onde nas primeiras 24 horas receberam solução de Paracetamol[®] 25mg/kg e ração e após este período, ração e água foram oferecidas à vontade até o dia do sacrifício.



Figura 4- Procedimento cirúrgico: **(a)** incisão de pele; **(b)** exposição cômulo - região intercondiliana; **(c)** confecção do defeito osteocondral; **(d)** implante PVA com trefina; **(e)** defeito com o implante de PVA; **(f)** sutura.

3.4.2- Sacrifício dos animais

Decorrido cada tempo de seguimento pré-determinado para os GEs e GCs, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico pela mesma via já citada, os joelhos desarticulados e realizou-se a osteotomia do terço médio da diáfise femoral.

3.5- Avaliação da interação do hidrogel de PVA com o tecido

3.5.1- Análise macroscópica por estereomicroscopia

Imediatamente após o sacrifício, todas as amostras (n=160) dos fêmures bem como suas respectivas patelas foram imersas e mantidas em solução fisiológica de NaCl a 0,9% e mantidas sob temperatura entre zero e +1°C para evitar a autólise tecidual, até o momento da captura das imagens com luz incidente para aumento 10x.

Após análises via estereomicroscopia, foram fixadas em solução de Formaldeído 10% (v/v) tamponado com Fosfato de Sódio Monobásico e Dibásico com pH igual a 7,0 por 48 horas para a realização das demais análises propostas.

Em posse das imagens capturadas por estereomicroscopia, as imagens foram numeradas e encaminhadas juntamente com uma ficha com os critérios a serem avaliados e os referidos escores a um grupo composto por três avaliadores onde as imagens apresentavam-se sem identificação de qual dos GEs pertencia.

A partir dos resultados dos escores apresentados por cada um dos avaliadores foi elaborado uma tabela contendo valores numéricos simples. Em seguida os valores foram compilados em uma planilha do tipo exilou e obteve-se a porcentagem média de cada um dos critérios analisados e, finalmente construiu-se um gráfico para cada critério avaliado.

Abaixo segue Tabela 2 referente aos critérios e escores que foram utilizados na análise por estereomicroscopia.

Tabela 2- Critérios e escores utilizados na avaliação por estereomicroscópio dos GEs.

CRITÉRIOS	ESCORES
Aspecto PVA	ruim(+)
Aspecto CA	bom(++)
Aspecto Patela	ótimo(+++)
Tecido Neoformado sobre PVA	sem crescimento (+) crescimento <50% crescimento >50%
Colapso PVA	
Desgaste Abrasivo PVA	
Desgaste Adesivo PVA	ausente (%)
Desgaste Abrasivo Patela	presente (%)
Desgaste Adesivo Patela	

3.5.2- Avaliação do comportamento mecânico do PVA por Ensaio Mecânico de Fluência à Indentação (EMFI)

O EMFI costuma ser utilizado para a caracterização mecânica *in situ* da cartilagem articular natural, com intuito de avaliar seu comportamento viscoelástico em função do tempo (41,101). Para tanto foram utilizadas seis amostras GE00; seis amostras da CA e seis amostras de cada um dos GEs (n=24), as quais se encontravam refrigeradas até o momento do ensaio, conforme descrito no item 3.5.1.

Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de ensaios mecânicos EMIC® modelo DL300, Figura 5a com uma célula de carga de capacidade para 100N (10kgf) e, acoplada a esta, um penetrador (indentador) de ponta esférica com 1,6 mm de diâmetro.

Conforme Figura 5b, o indentador era posicionado perpendicularmente ao implante de PVA e movimentado para baixo a uma velocidade de 0,1mm/s até que a força de compressão atingisse o valor pré-determinado de 0,5kgf. Uma vez atingida a força pré-determinada, a carga era mantida por 180 segundos e a distância de penetração do indentador (h), e o tempo (t) eram registrados pelo software de aquisição de dados TESC® versão 3.04. Ao final do ensaio de cada amostra, obtinha-se o respectivo gráfico de penetração *versus* tempo.

A partir do valor da penetração do indentador após 180 segundos, calculou-se o módulo de fluência à indentação (dureza) conforme método descrito por (101), modificado por (41) conforme equação abaixo:

$$E = \frac{9 \cdot 10^4 \cdot p}{16 \cdot \sqrt{r}} \cdot \left[\frac{1 - e^{\left(\frac{-0,42 \cdot e}{a}\right)}}{h} \right]^{\frac{3}{2}} \quad a = \sqrt{(2 \cdot r \cdot h - h^2)} \quad [cm]$$

Onde: **E**= módulo de fluência [kgf/m²]; **p**= carga aplicada [kgf]; **r**= raio do indentador [cm]; **e**= espessura da amostra [cm]; **h**= altura de indentação (penetração do indentador) (cm).

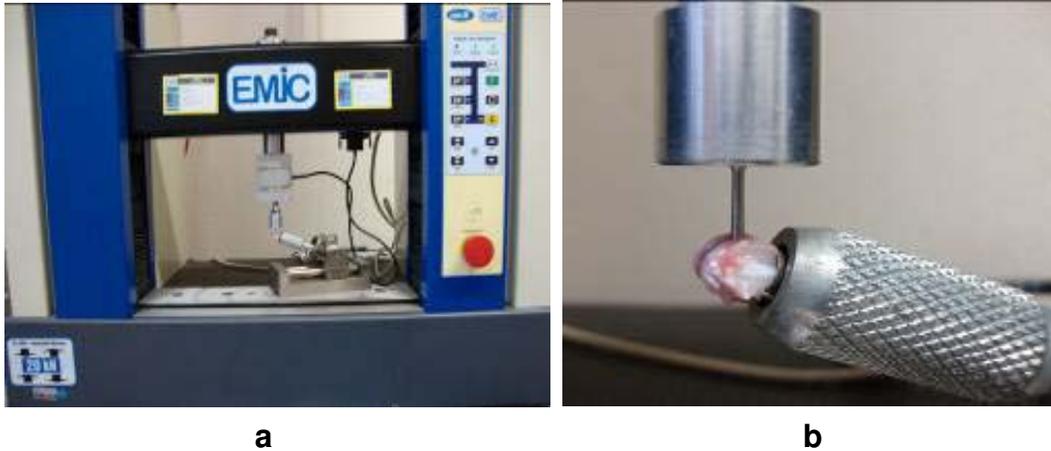


Figura 5- Ensaio Mecânico de Fluência a Indentação. **(a)** máquina **universal de** ensaio mecânico com célula de carga de 100N e amostra fixada a um dispositivo especial durante a realização do teste. **(b)** detalhe do indentador de ponta esférica com 1,6mm de diâmetro sobre o côndilo com implante de PVA.

3.5.3- Análise dos minerais nas amostras de PVA por espectrometria de fluorescência de raios-X (EDXRF)

Com o objetivo de se quantificar os elementos minerais Cálcio (Ca), Fósforo (P) e Enxofre (S) nas amostras de PVA, retiraram-se aleatoriamente três amostras dos defeitos de cada um dos GEs (n=12), mais três amostras (n=3) de PVA não implantadas totalizando 15 amostras.

Em espectrofotômetro de fluorescência de Raios-X por dispersão em energia equipado com um tubo de Ródio e um detector de semicondutor Silício, com resolução de energia de 165 eV (linha Mn Ka) marca Shimadzu®, modelo EDX 700, as amostras do PVA foram depositadas em celas específicas de polietileno Chemplex® e submetidas à irradiação por 100 segundos.

As condições selecionadas no momento da irradiação foram: 3mm de colimação do feixe incidente, voltagem aplicada ao tubo de Raios-X de 15 kV por 100 s de irradiação e 25% de tempo morto do detector. Os espectros de RX foram interpretados utilizando-se o programa AXIL[®] e para as determinações quantitativas dos componentes analisados, as intensidades das linhas características dos elementos foram usadas para correlações com as concentrações (20).

3.5.4- Avaliação por microscopia óptica (MO)

Para a análise de MO foram selecionadas aleatoriamente 15 amostras de cada um dos GEs (n=60) e quatro amostras de cada um dos GCs (n=16) que após fixadas, realizou-se a descalcificação com solução de Ácido Etilenodiaminotetra Acético Sal Dissódico (EDTA), Ácido Clorídrico (HCl), Tartarato de Sódio e de Potássio mais água destilada por 15 dias, conforme protocolo utilizado pelo Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) do Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp.

Concluído o processo acima, as amostras foram lavadas em água destilada corrente por 60 minutos para retirada do sal de Cálcio residual e excesso do descalcificador e foram mergulhadas em álcool 70%.

Conforme Figura 6, para cada amostra dos GEs e dos GCs, com auxílio de navalha descartável e obteve-se uma secção transversal na região da diáfise proximal de cada fêmur (a) a qual foi desprezada e foram mantidos apenas os côndilos direito e esquerdo com tamanho aproximado de 30 mm e, neles realizou-se um corte sagital (b) que resultou em duas amostras iguais (c), as quais foram colocadas em porta amostras identificados para o preparo dos cortes para a inclusão em parafina e confecção dos cortes histológicos.

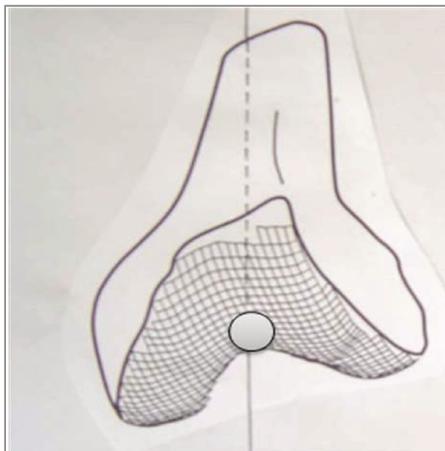


Figura 6- Esquema do côndilo dos GEs com implante de PVA para a análise por microscopia óptica. Linha pontilhada secçõo sagital côndilo após descalcificaçõo.

Utilizando-se equipamento automático programável denominado “tratador de tecidos” Shandon[®] modelo Citadel 1000, realizou-se a desidrataçõo em gradientes de àlcool 70%, 80%, 90%, 100% e 100% (v/v) por 60 minutos cada banho e diafanizaçõo com Xilol (dois banhos) de 60 minutos cada um deles e, finalmente, as amostras foram embebidas em dois banhos de parafina (60 minutos cada um), sob temperatura de 65°C e realizada a confecçõo dos blocos.

Foram obtidos cortes histológicos com 4µm de espessura utilizando-se micrótomo rotatório automático Leica[®] modelo RM2155 que foram corados e contra-corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e visualizados por microscópio óptico Leica[®] modelo DMLB 100S com software de captura das imagens Leica[®] IM 50 para aumentos de 25x, 200x e 400x respectivamente.

As imagens obtidas foram numeradas e sem identificaçõo de qual GE pertenciam e foram encaminhadas juntamente com ficha confeccionada com os critérios e escores para a serem avaliadas por dois avaliadores.

Tabela 3- Critérios e escores utilizados na avaliação por MO dos GE's.

Critérios de Avaliação	Escore
células inflamatórias (CI)	
tecido de granulação (TG)	
fibras colágenas (FC)	ausência (+)
matriz óssea (MO)	presença moderada (++)
neotecido ósseo (TN)	presença intensa (+++)
reabsorção óssea (RO)	
desabamento neotecido (DN)	

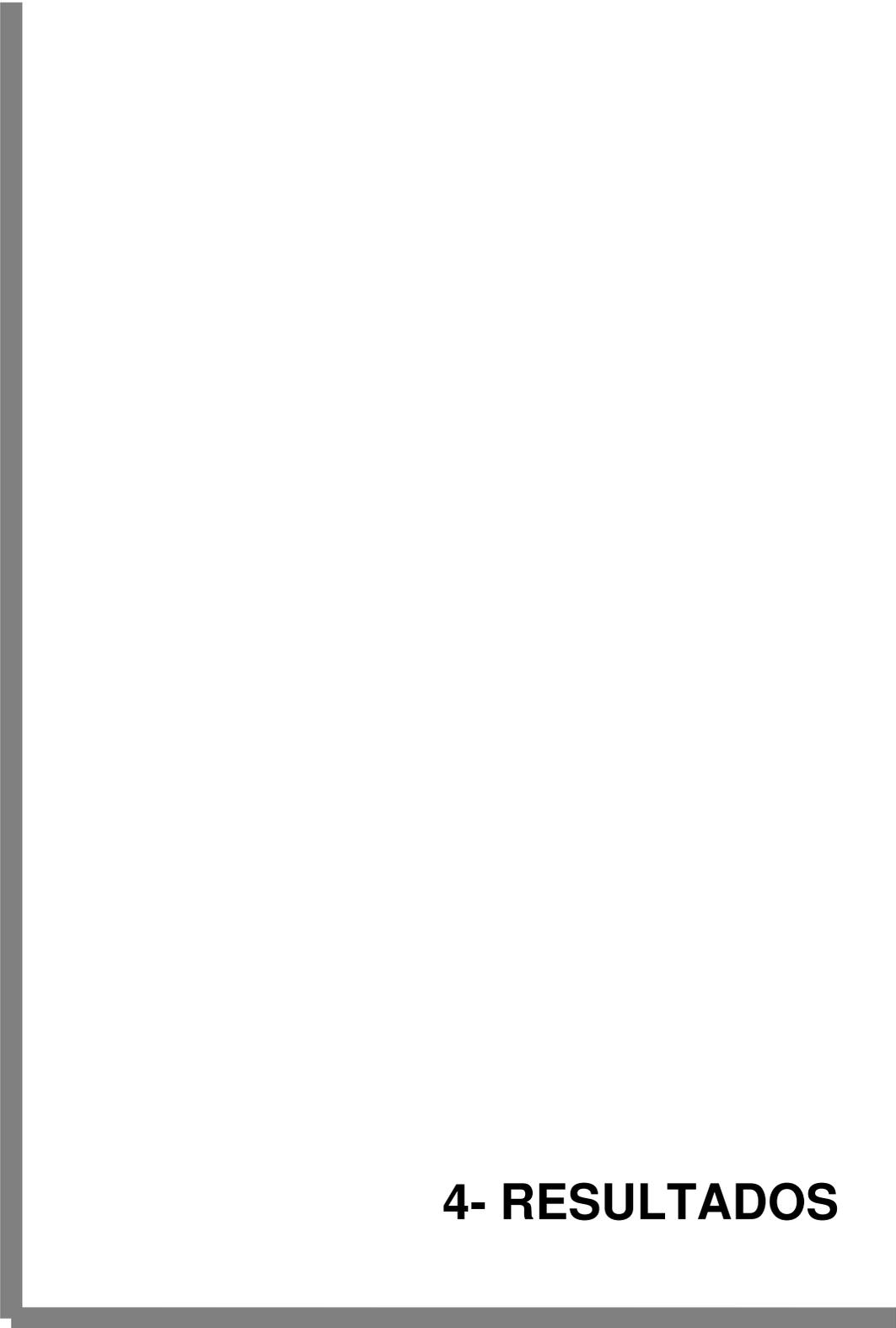
3.5.5- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Superfícies dos cõndilos dos GEs e GCs e das Patelas

Procedeu-se à análise por MEV em cinco amostras dos cõndilos e suas patelas de cada um dos GEs (n=20) e também quatro amostras de cada um dos GCs (n=16) selecionadas aleatoriamente e desidratadas parcialmente em gradientes de álcool 70, 80, 90 e 100% (v/v) por 60 minutos cada banho.

O processo de desidratação total das amostras foi atingido utilizando-se de equipamento de ponto-crítico Balzers® modelo CPD 030, onde as mesmas foram submetidas ao resfriamento pré-estabelecido de 5°C em atmosfera com CO₂ por 15 minutos seguida de aquecimento máximo de 45°C por mais 12 minutos até atingir a pressão de 80 bar, onde se alcançava o ponto crítico e a total desidratação de cada amostra.

Em seguida, as amostras foram fixadas com fita condutora em porta amostras e metalizadas com Ouro por meio do equipamento *Sputter Coater*[®] modelo Bal-Tec SCD.

A análise das amostras dos condilos e das patelas dos GEs e GCs foi realizada em equipamento JEOL JXA[®] modelo 860 para aumentos de 100 até 1000x. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do DEMA da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp.



4- RESULTADOS

4.1- Teste de inchamento dos implantes do hidrogel de PVA

Os resultados obtidos do teste de inchamento do PVA na concentração utilizada de 10% e após reticulação na dose de 25K Gy apresentaram grau de entumescimento de 43% (± 2) após 24 horas em solução de NaCl 0,9% sob temperatura ambiente de 23°C (± 2) com a manutenção do módulo de fluência conforme descrito por Bavaresco (2004) (7).

4.2- Resultados análises *in vitro*

4.2.1- Avaliação da citotoxicidade e direta do PVA com Vero pelo Método MTT

A Figura 7 apresenta os resultados qualitativos da toxicidade direta e indireta do hidrogel de PVA com células Vero, em contraste de fase após 24 horas de cultivo.

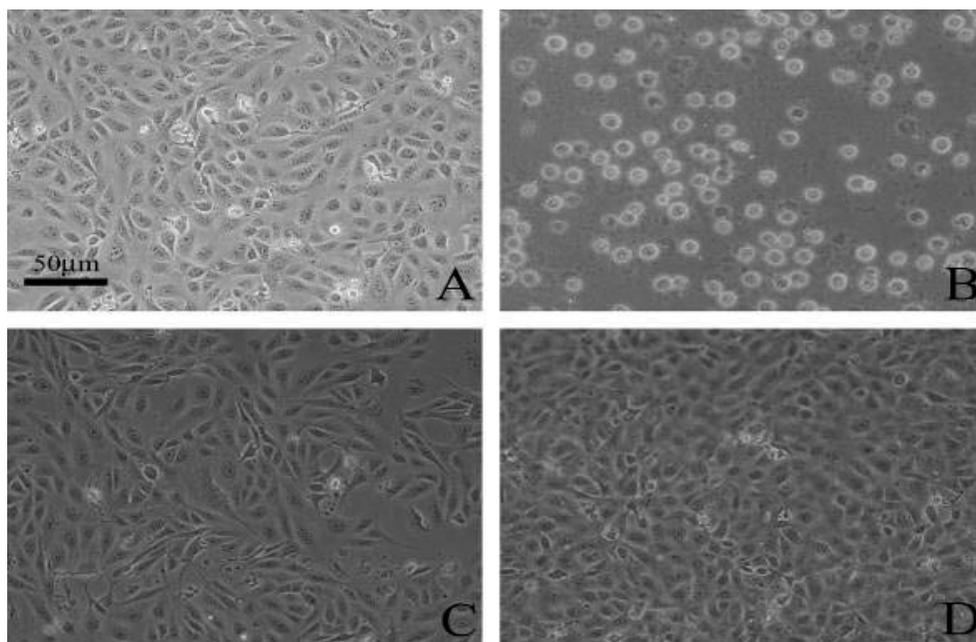


Figura 7- Análise qualitativa da toxicidade do PVA com células Vero. **(A)** controle negativo; **(B)** controle positivo; **(C)** toxicidade indireta ao PVA **(D)** toxicidade direta ao PVA.

O gráfico da Figura 8 apresenta os resultados quantitativos da toxicidade direta e indireta do hidrogel de PVA com células Vero pelo método do MTT.

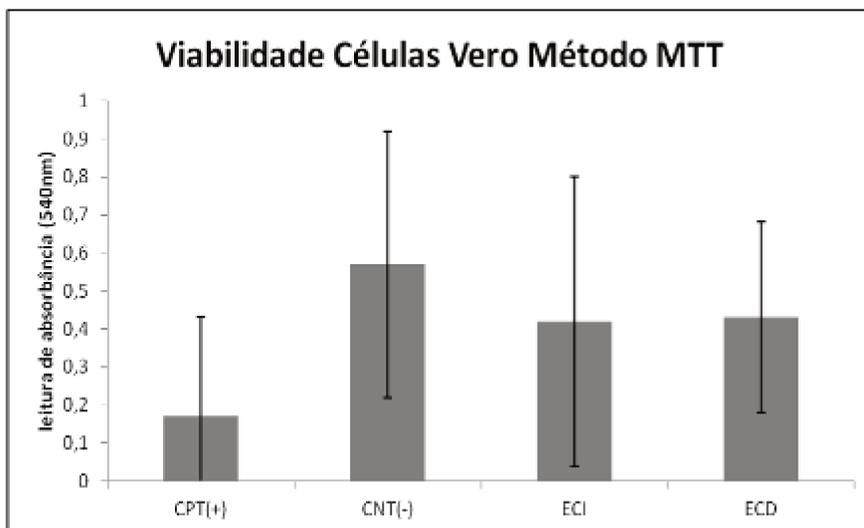


Figura 8- Resultado quantitativo da toxicidade direta e indireta do PVA com células Vero pelo Método MTT. Médias e desvios padrão: CPT 0,17 (0,26); CNT 0,57 (0,35); PVA (ECI) 0,42 (0,38); PVA (ECD) 0,43 (0,25). Nível de significância 0,05.

4.2.2- Avaliação da Citotoxicidade Indireta do PVA com Células Vero pelo Vermelho Neutro (VN)

A Figura 9 refere-se ao resultado do teste de toxicidade direta do PVA com células Vero avaliada pelo método do VN.

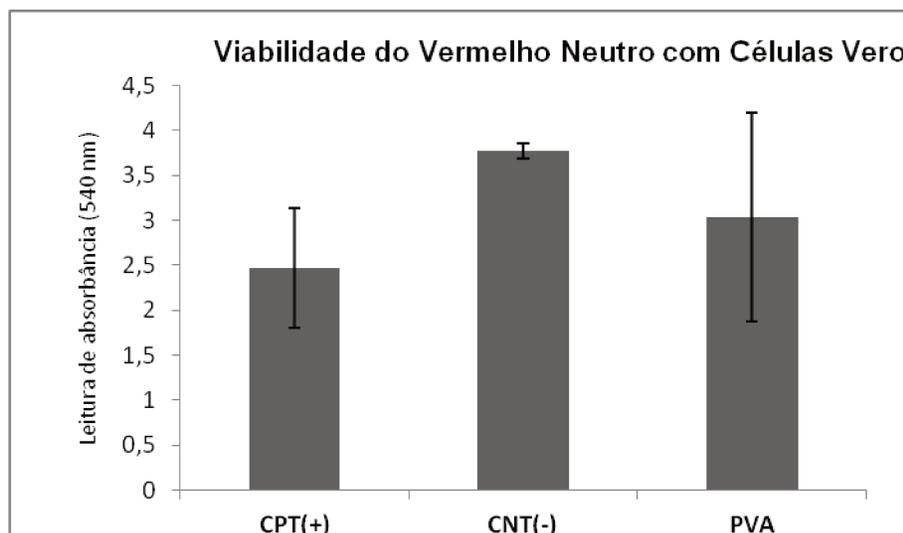


Figura 9- Resultado quantitativo da toxicidade direta e indireta do PVA com células Vero pelo Método VN. Médias e desvios padrão: CTP 2,47 (0,67); CNT 3,77 (0,09) e PVA 3,03 (1,16). Nível de significância 0,05.

De maneira geral, os resultados obtidos pelos testes de toxicidade realizados utilizando-se de células Vero pelos métodos MTT e VN mostraram que o PVA foi considerado atóxico.

4.2.3- Investigação da adesão e morfologia celular do PVA com células Vero por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 10 apresenta os resultados e o padrão morfológico de crescimento das células Vero sobre o PVA. Pode-se observar a intensa presença de células aderidas e espalhadas sobre o PVA com morfologia irregular, ora alongada ora mais retraídas e, na maioria das vezes achatadas. Em algumas delas observa-se vesículas e/ou micro vilosidades na superfície e sinais de divisão celular sobre as amostras. Em algumas situações observamos também células interligadas por finos prolongamentos.

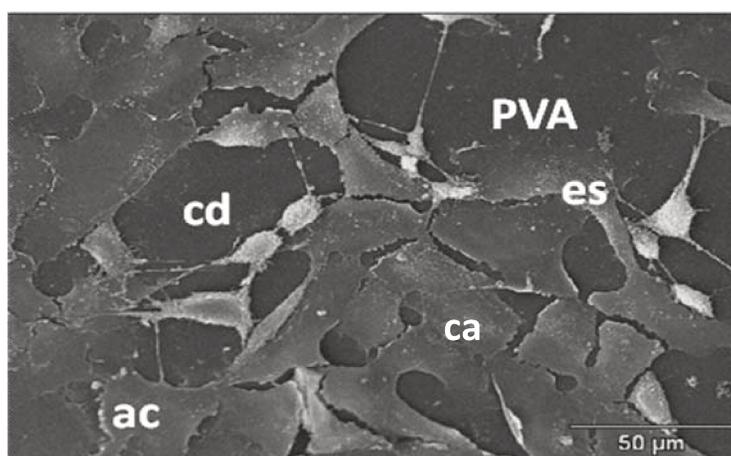


Figura 10- Microscopia Eletrônica de Varredura das células Vero cultivadas sobre o PVA por 24 horas. Observa-se na superfície do PVA: células em divisão (**cd**); agregado celular (**ac**); células aderidas (**ca**) e células em espalhamento (**es**).

Nas imagens obtidas por meio da MEV foi possível observar que o padrão morfológico de crescimento das células Vero sobre o PVA foi mantido.

De maneira geral, os resultados obtidos pelos testes de toxicidade realizados utilizando-se de células Vero mostraram que o PVA foi considerado atóxico para os testes ECI e ECD, indicando-o para a realização de testes preliminares *in vivo*.

4.2.4- Avaliação da Citotoxicidade Indireta do PVA com Células Mesenquimais (MSCs) pelo Método MTT

A Figura 11 apresenta os resultados do teste de toxicidade indireta com MSCs pelo método MTT.

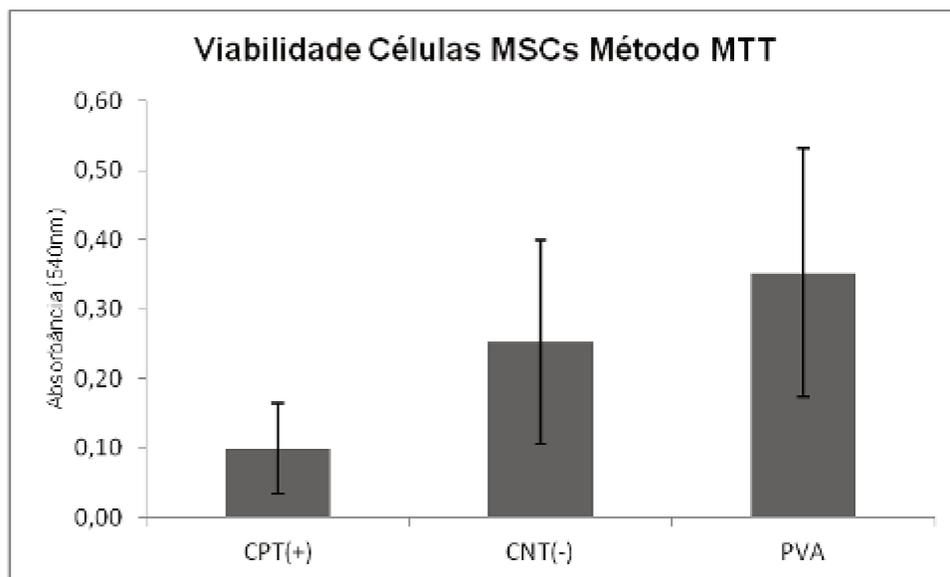


Figura 11- Resultado quantitativo da toxicidade indireta do PVA com células MSCs pelo Método MTT. Médias e desvios padrão: CTP 0,10 (0,07); CNT 0,25 (0,15); PVA 0,35 (0,18). Nível de significância 0,05.

O teste quantitativo de toxicidade indireta do PVA frente às MSCs apontou que o PVA foi caracterizado como atóxico.

4.2.5- Investigação da adesão e morfologia celular do PVA com MSCs por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 12 apresenta as imagens de MEV do PVA onde é possível observar as células aderidas e espalhamento das MSCs sobre o mesmo e também a presença células com morfologia irregular, sendo que ora apresentavam-se alongadas, ora mais retraídas e na maioria das vezes achatadas sobre as superfícies e, em algumas delas, observou-se vesículas e/ou microvilosidades na superfície e sinais de divisão celular sobre as amostras.

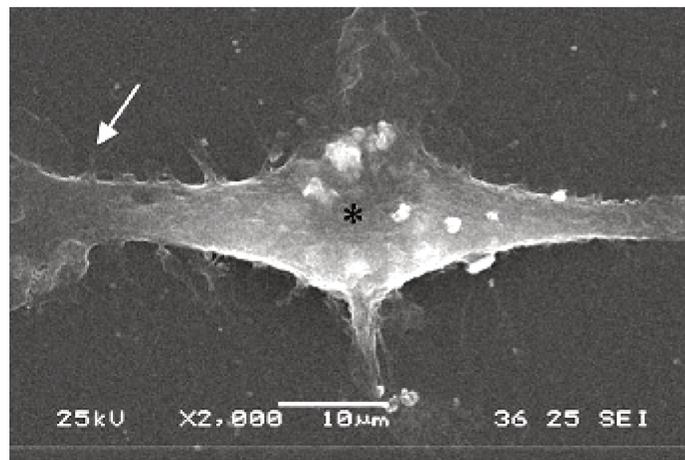


Figura 12- Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície do PVA com células mesenquimais cultivadas por 24 horas. Células aderidas (*) sobre o PVA e seus prolongamentos (seta).

Observou-se menor quantidade de células sobre o PVA na presença das MSCs quando comparadas com as células Vero da Figura 10. O aspecto característico das MSCs foi mantido com células bipolares estreladas e alongadas com prolongamentos partindo de vários pontos da célula.

4.2.6- Quantificação da Atividade da Enzima Fosfatase Alcalina (ALP)

A Figura 13 apresenta os resultados referente à análise semi-quantitativa relativa à produção da mesma frente às células MSCs.

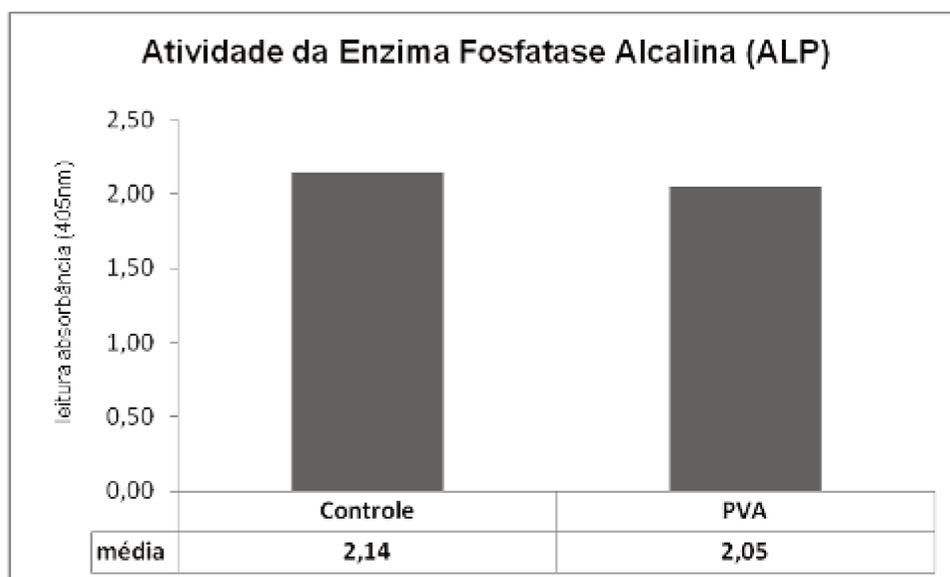


Figura 13- Quantificação da atividade da enzima ALP sobre MSCs cultivadas sobre substrato de PVA.

4.2.7- Coloração de Vermelho de Alizarina S (ARS)

A Figura 14 apresenta os dados qualitativos para as células que cresceram sobre o PVA. Observa-se formação de nódulos de mineralização com incorporação do corante ARS nas MSCs após 21 dias de diferenciação osteogênica, o que indica formação de matriz óssea mineralizada.



Figura 14- Imagens das MSCs após 21 dias de diferenciação osteogênica em contato com o PVA. Coloração com Vermelho de Alizarina S (ARS). Aumento 200x.

A Figura 15 representa os dados semi-quantitativos para as células que cresceram sobre o PVA de acordo com a extração colorimétrica do corante Vermelho de Alizarina.

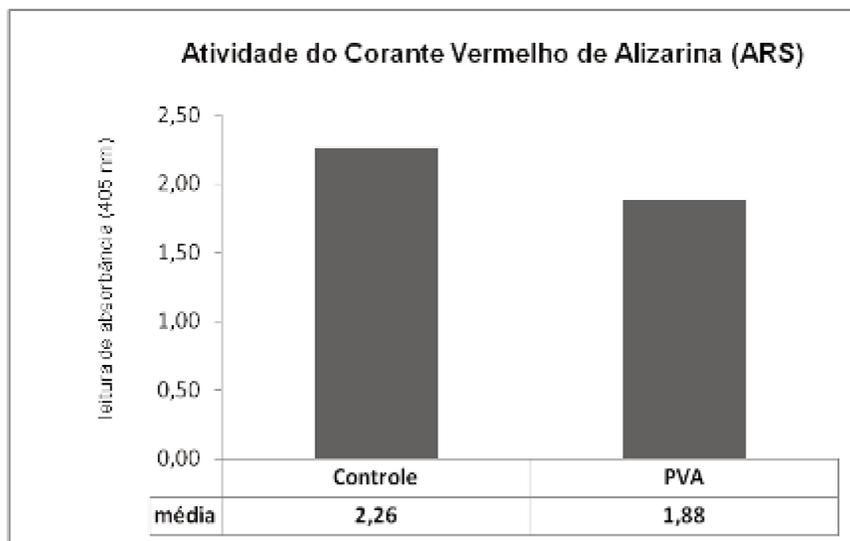


Figura 15- Quantificação da formação de matriz mineralizada avaliada pela incorporação do corante Vermelho de Alizarina S (ARS).

4.3- Resultados análises *in vivo*

4.3.1- Avaliação da superfície do implante de PVA e da cartilagem articular adjacente via estereomicroscópio

As imagens da Figura 16 correspondem às amostras dos côndilos e suas respectivas patelas dos grupos dos GEs. As amostras foram fotografadas por estereomicroscópio Leica® modelo MZ 7.5 com luz incidente para aumentos de 10x respectivamente.

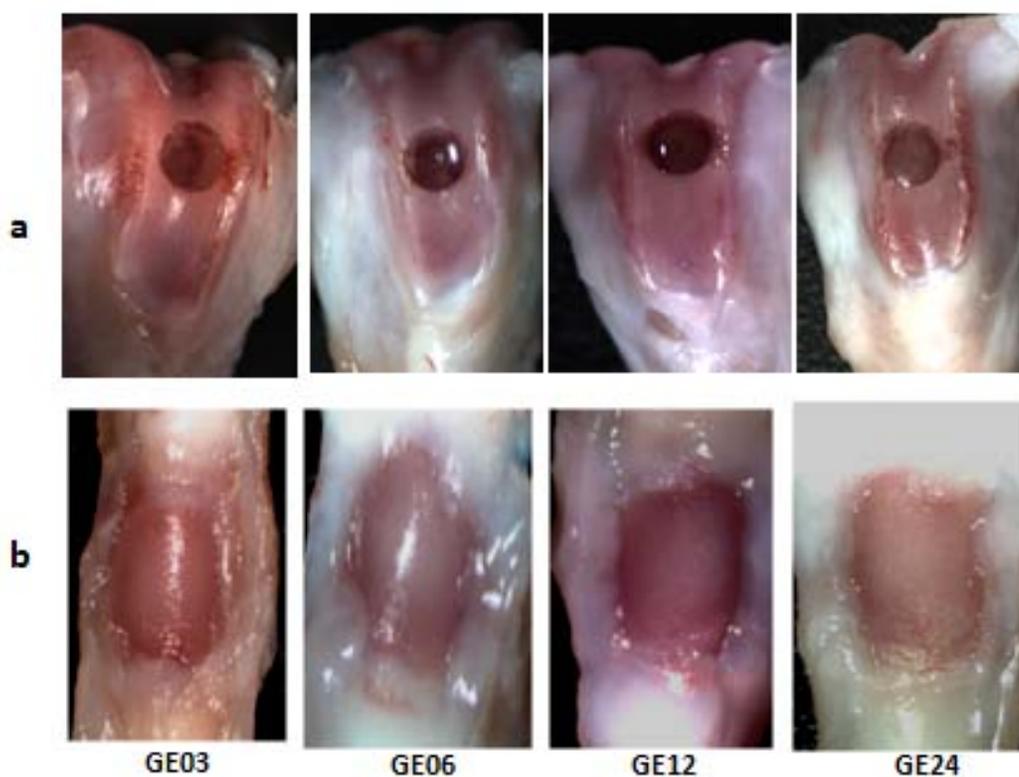


Figura 16- Imagens capturadas via estereomicroscópio dos côndilos com implante de PVA dos GEs (a) e suas respectivas patelas (b). Aumento 10x.

A Tabela 4 apresenta os resultados dos GEs referente a frequência média relativa dos critérios atribuídos analisados por estereomicroscopia.

Tabela 4 - Média da frequência relativa dos critérios atribuídos aos GEs

Média da Frequência Relativa dos GEs																																						
Critérios Avaliados	Ótimo%				Bom%				Ruim%																													
	GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24																										
PVA																																						
superfície	83	71	93	98	17	25	7	2	0	4	0	0																										
CA																																						
adjacente	60	69	70	89	38	27	26	7	2	4	4	4																										
Patela																																						
superfície	83	71	93	98	17	25	7	2	0	4	0	0																										
<table border="0" style="width:100%; text-align:center;"> <tr> <td></td> <td colspan="4">sem crescimento</td> <td colspan="4">crescimento < 50%</td> <td colspan="4">crescimento > 50%</td> </tr> <tr> <td></td> <td>GE03</td> <td>GE06</td> <td>GE12</td> <td>GE24</td> <td>GE03</td> <td>GE06</td> <td>GE12</td> <td>GE24</td> <td>GE03</td> <td>GE06</td> <td>GE12</td> <td>GE24</td> </tr> </table>														sem crescimento				crescimento < 50%				crescimento > 50%					GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24
	sem crescimento				crescimento < 50%				crescimento > 50%																													
	GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24																										
Formação Neotecido																																						
	85	94	78	70	13	6	22	26	2	0	0	0																										
<table border="0" style="width:100%; text-align:center;"> <tr> <td></td> <td colspan="4">Presente%</td> <td colspan="4">Ausente%</td> </tr> <tr> <td></td> <td>GE03</td> <td>GE06</td> <td>GE12</td> <td>GE24</td> <td>GE03</td> <td>GE06</td> <td>GE12</td> <td>GE24</td> </tr> </table>														Presente%				Ausente%					GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24								
	Presente%				Ausente%																																	
	GE03	GE06	GE12	GE24	GE03	GE06	GE12	GE24																														
Colapso PVA																																						
	0	0	0	14	100	100	100	86																														
Desgaste Abrasivo PVA																																						
	0	0	0	0	0	0	0	0																														
Desgaste Adesivo PVA																																						
	0	4	11	0	100	96	88	100																														
Desgaste Adesivo Patela																																						
	5	0	0	0	95	100	100	100																														
Desgaste Abrasivo Patela																																						
	5	0	0	0	95	100	100	100																														

Abaixo seguem os gráficos gerados de acordo com os critérios e escores avaliados na Tabela 2 referente aos GEs.

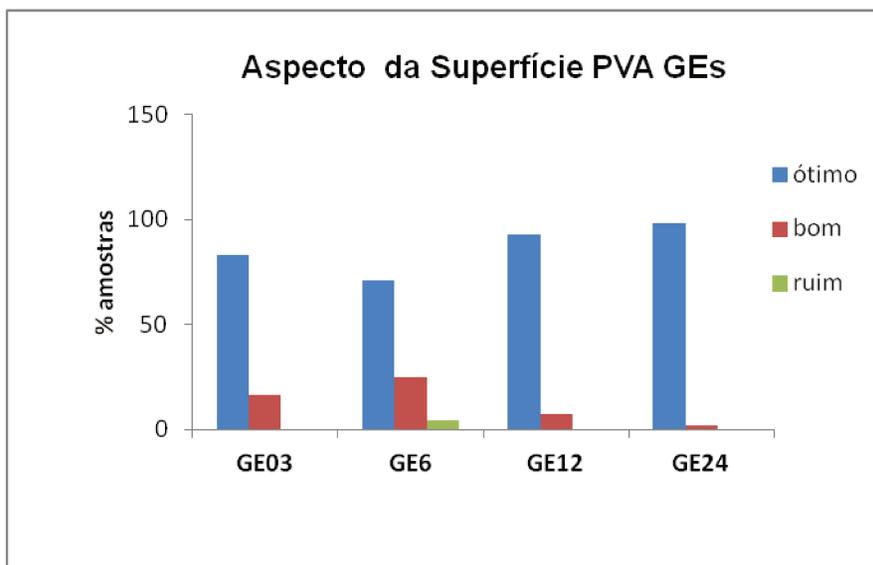


Figura 17- Gráfico da média dos valores referente ao aspecto da superfície do PVA dos GEs avaliados. Ótimo (86%); bom (13%) ruim (1%).

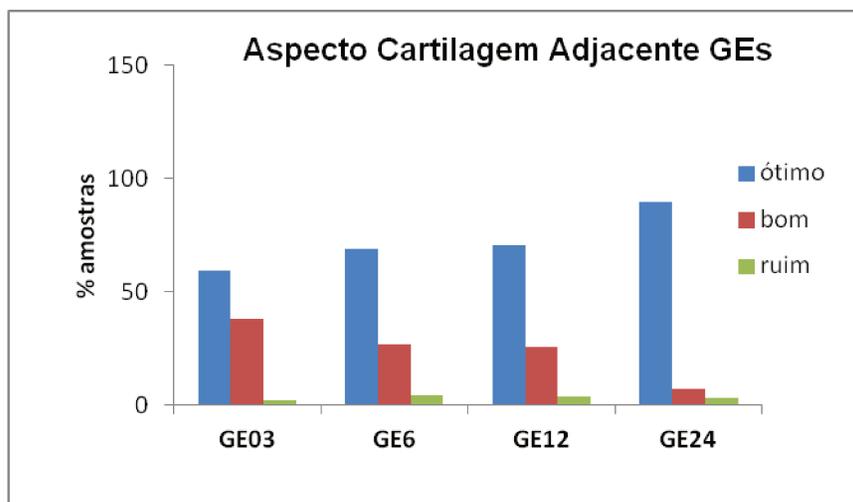


Figura 18- Gráfico referente à média dos valores referentes ao aspecto da superfície do PVA dos GEs avaliados. Ótimo (72%); bom (25%); ruim (3%).

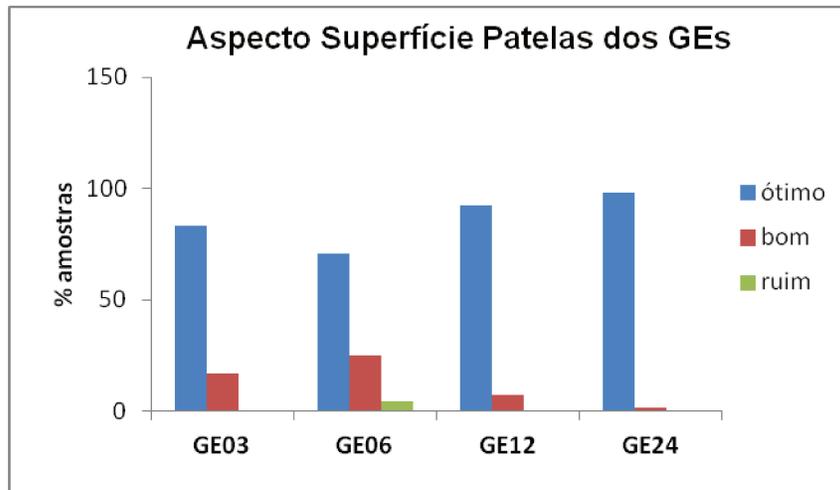


Figura 19- Gráfico referente à média dos valores referentes ao aspecto da superfície da patela dos GEs avaliados. Ótimo (86%); bom (13%); ruim (1%).

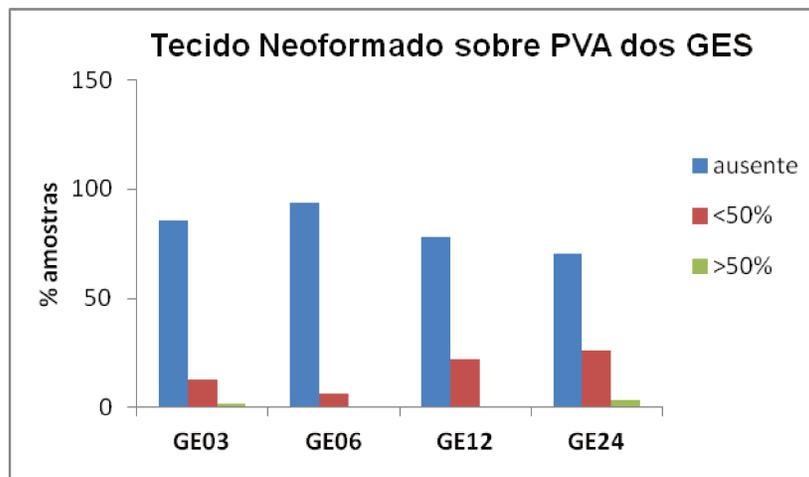


Figura 20- Gráfico da média dos valores referente à presença e ou ausência de neotecido formado sobre a superfície do PVA dos GEs avaliados. Ótimo (82%); bom (17%); ruim (1%).

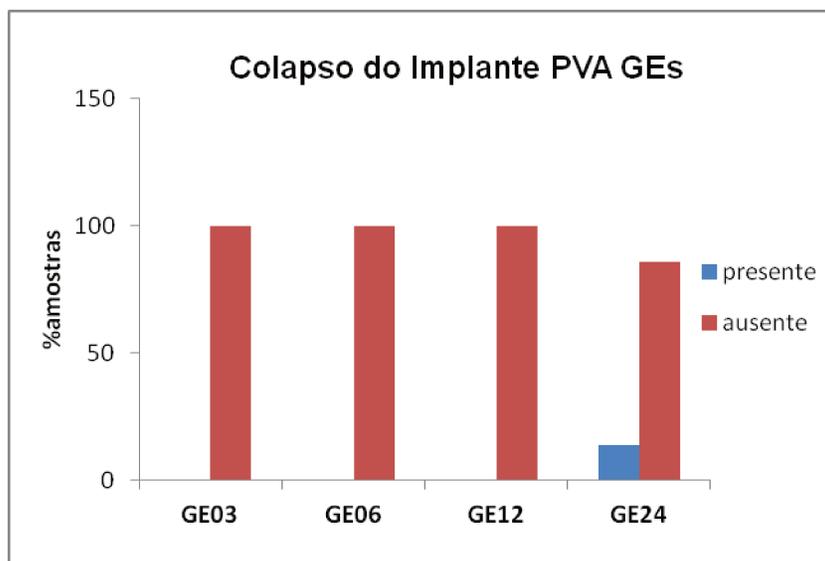


Figura 21- Gráfico da média dos valores referente ao colapso do implante de PVA dos GEs avaliados. Ausente (97%); presente (3%).

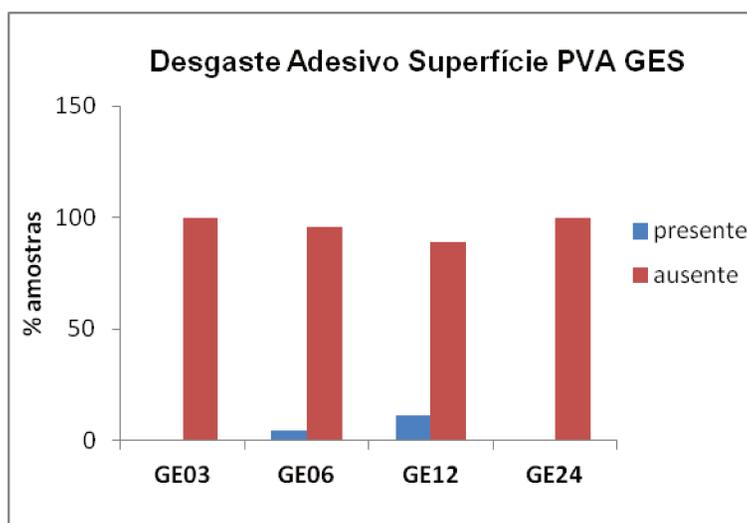


Figura 22- Gráfico da média dos valores referente à presença e ou ausência de desgaste do tipo adesivo sobre a superfície do PVA dos GEs avaliados. Ausente (96%); presente (4%).

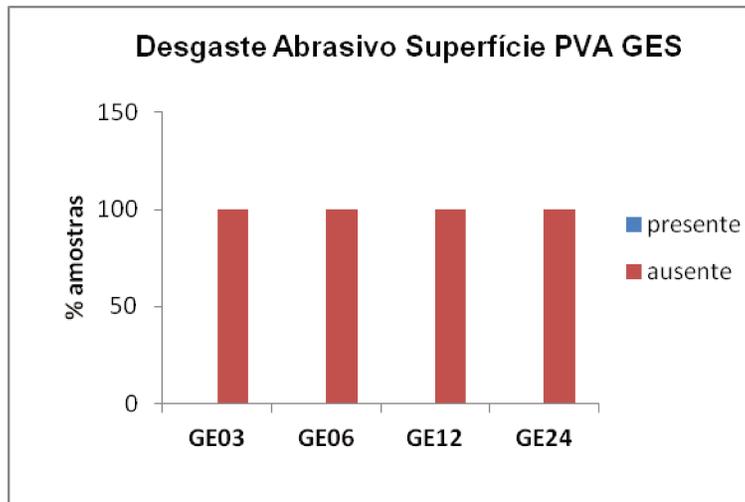


Figura 23- Gráfico da média dos valores referente à presença e ou ausência de desgaste do tipo abrasivo sobre a superfície do PVA dos GEs avaliados. Ausente em 100% das amostras.

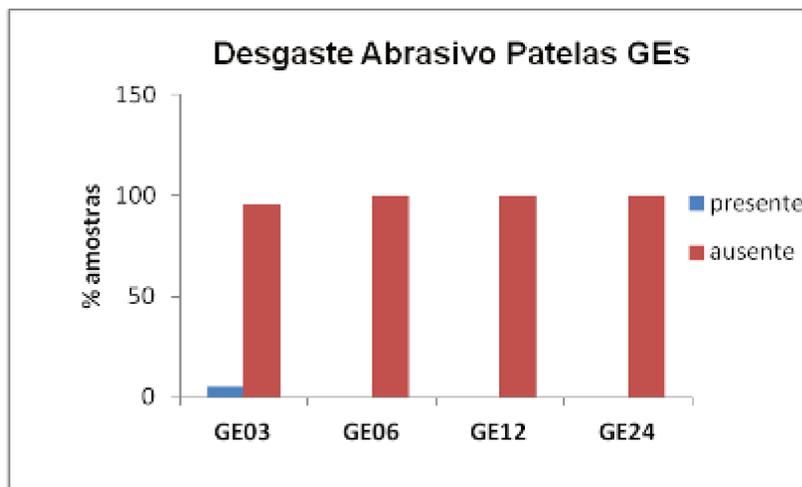


Figura 24- Gráfico referente à média dos valores referente ao desgaste do tipo abrasivo na superfície da patela dos GEs avaliados. Ausente (99%); presente (1%).

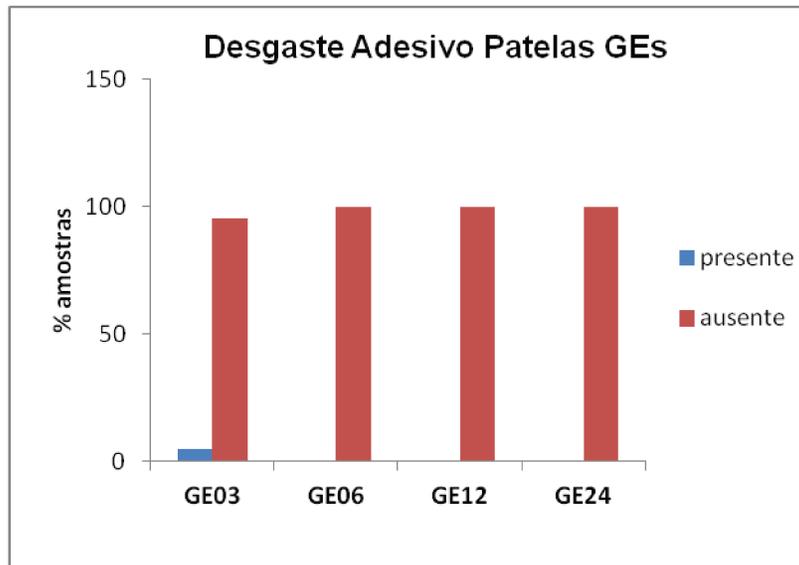


Figura 25- Gráfico da média dos valores referente ao desgaste do tipo adesivo na superfície da patela dos GEs avaliados. Ausente (99%); presente (1%).

A Figura 26 apresenta o resultado dos côneilos dos GCs **(a)** e suas respectivas patelas **(b)**.

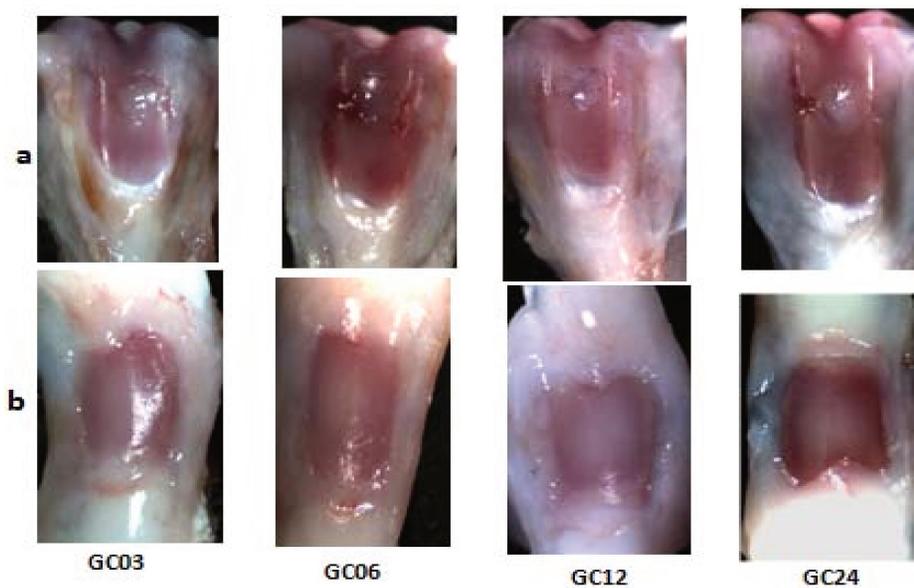


Figura 26- Imagens observadas via estereomicroscópio dos côneilos sem implante de PVA dos GCs e das suas respectivas patelas (B). Aumento 10x.

4.3.2- Avaliação do comportamento mecânico do PVA por Ensaio Mecânico de Fluência à Indentação (EMFI)

Os gráficos da Figura 27 referem-se aos resultados obtidos no EMFI referente ao CA, GE00 e GEs.

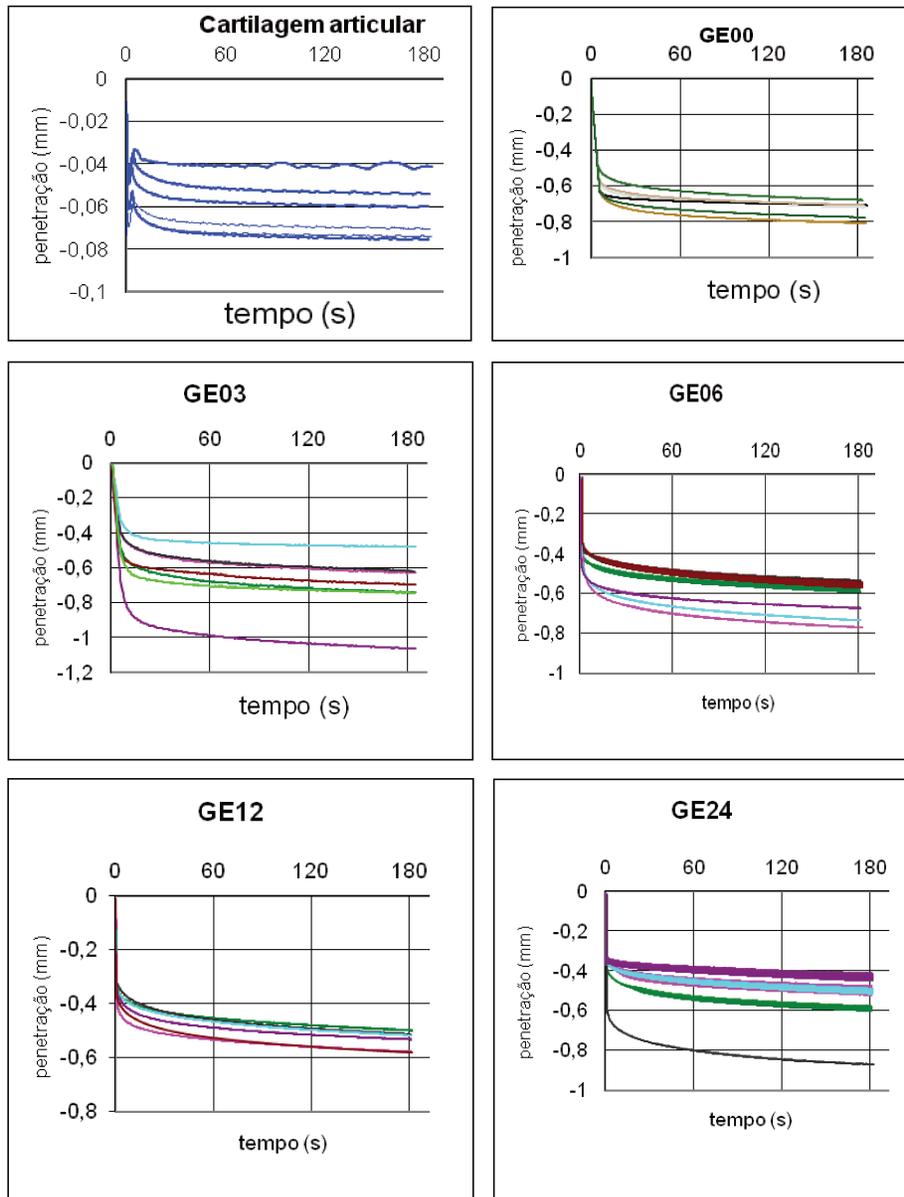


Figura 27- Gráficos referentes ao ensaio mecânico de fluência à Indentação dos grupos CA, GE00 e dos GEs.

Abaixo segue gráfico com os valores médios dos módulos de fluência à indentação referentes aos grupos de estudo.

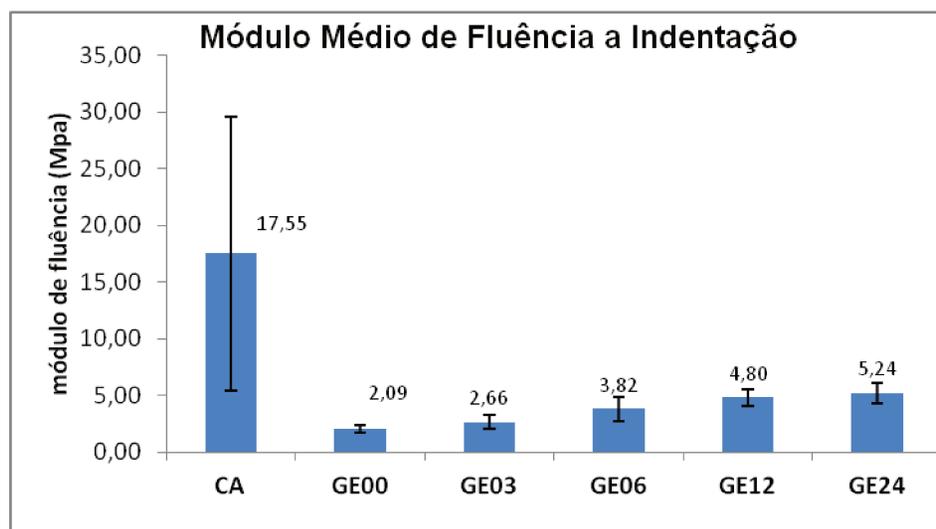


Figura 28- Gráfico do módulo médio de fluência à indentação em função do tempo de seguimento referente aos grupos de estudo CA, GE00 e GEs.

4.3.3- Análise dos minerais nas amostras de PVA por espectrometria de fluorescência de Raios-X (EDXRF)

A Tabela 5 apresenta os valores médios e o desvio padrão referente a absorção dos componentes CA, P e S presentes nas amostras de PVA dos GEs e do grupo controle GOO.

Tabela 5- Valores das médias das concentrações dos componentes minerais Cálcio, Fósforo e Enxofre dos GEs e do material não implantado (GOO).

Tabela Absorção Minerais: média e desvio padrão ()			
Seguimento	Cálcio	Fósforo	Enxofre
GOO	0,016 (0,001)	0,028 (0,002)	0,043 (0,013)
GE03	0,057 (0,060)	0,053 (0,034)	0,051 (0,004)
GE06	0,049 (0,033)	0,044 (0,015)	0,059 (0,014)
GE12	0,061 (0,043)	0,054 (0,031)	0,045 (0,011)
GE24	0,236 (0,225)	0,104 (0, 090)	0,048 (0,005)

O gráfico da Figura 29 apresenta os valores médios das concentrações de Cálcio, Fósforo e Enxofre presentes no implante de PVA e no GOO.

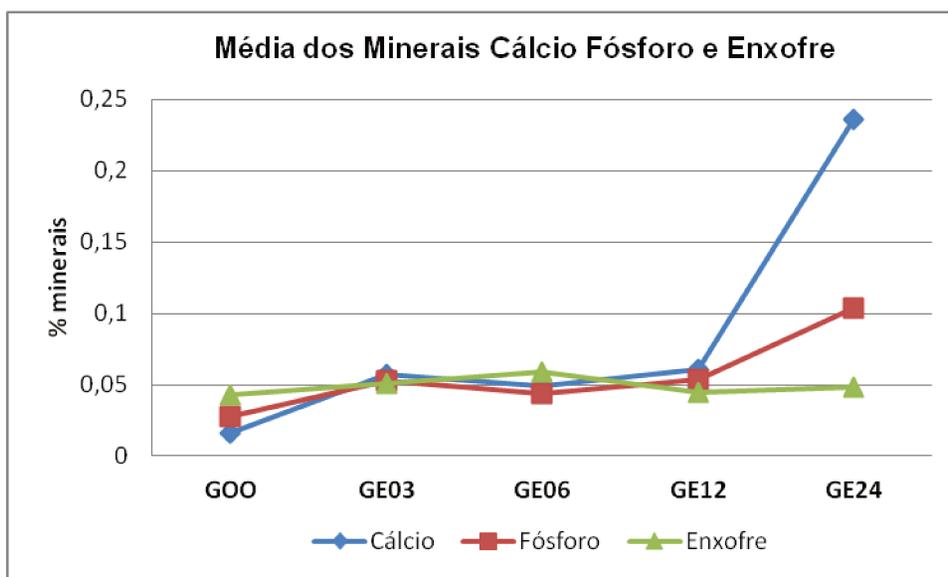


Figura 29- Gráfico referente às concentrações dos componentes minerais Cálcio, Fósforo e Enxofre presentes nas amostras do grupo GOO (não implantado) e nos GEs.

4.3.4- Avaliação por Microscopia Óptica (MO)

As Figuras 30, 31, 32 e 33 apresentam os resultados da análise histológica por microscopia óptica dos GEs estudados.

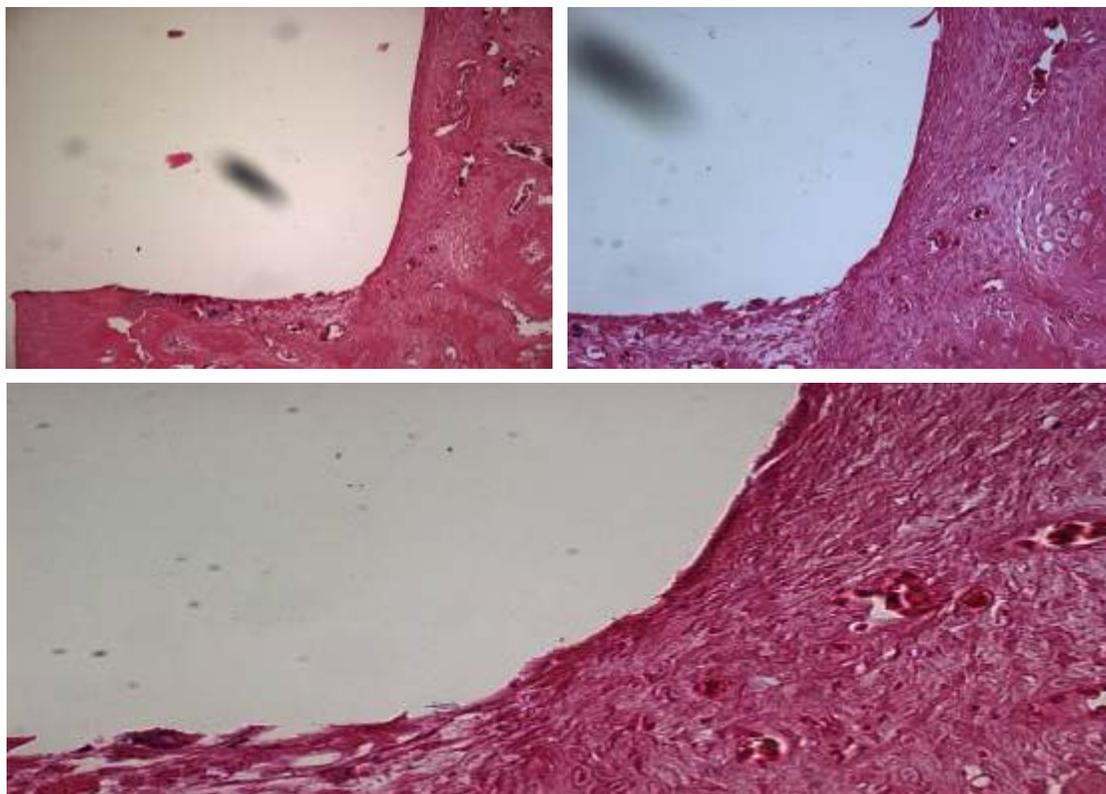


Figura 30- Microscopia Óptica do GE03. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (**at**) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (**nt**) ao redor do implante aumento 200x. Tecido de granulação (**TG**). Aumento 400x. Coloração HE.

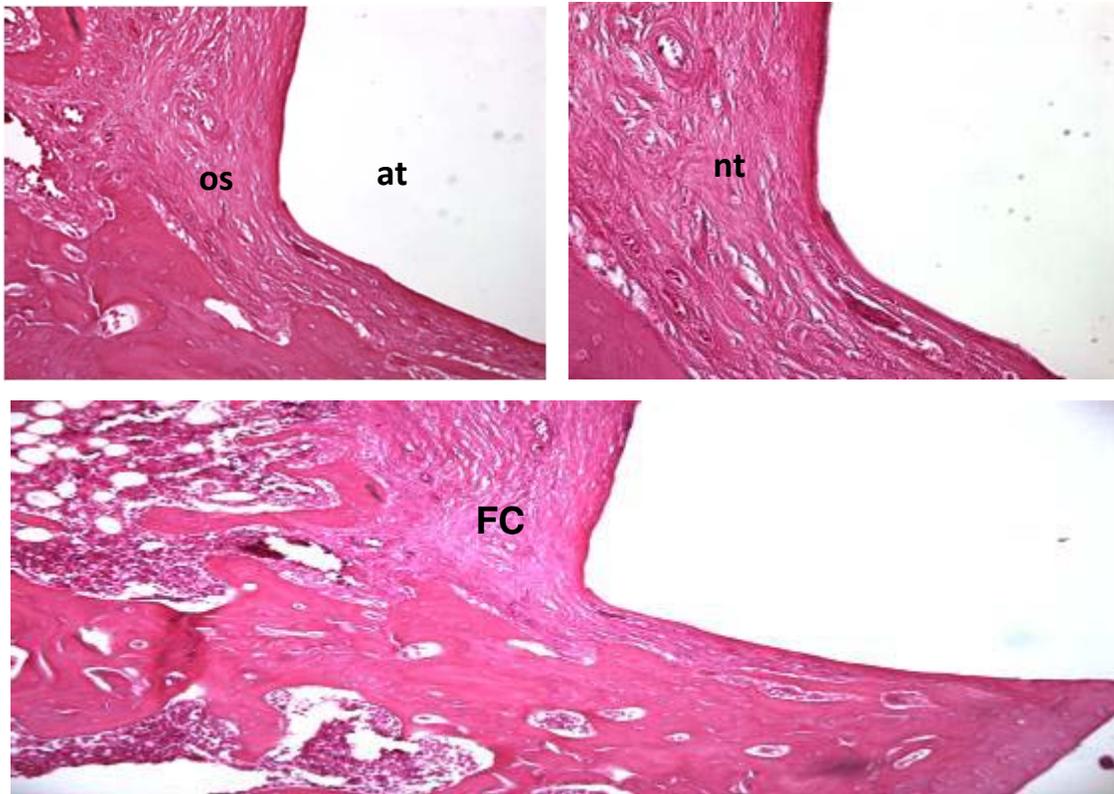


Figura 31- Microscopia Óptica do GE06. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (**at**) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (**nt**) ao redor do implante aumento 200x. Tecido de granulação (**TG**). Aumento 400x. Coloração HE.

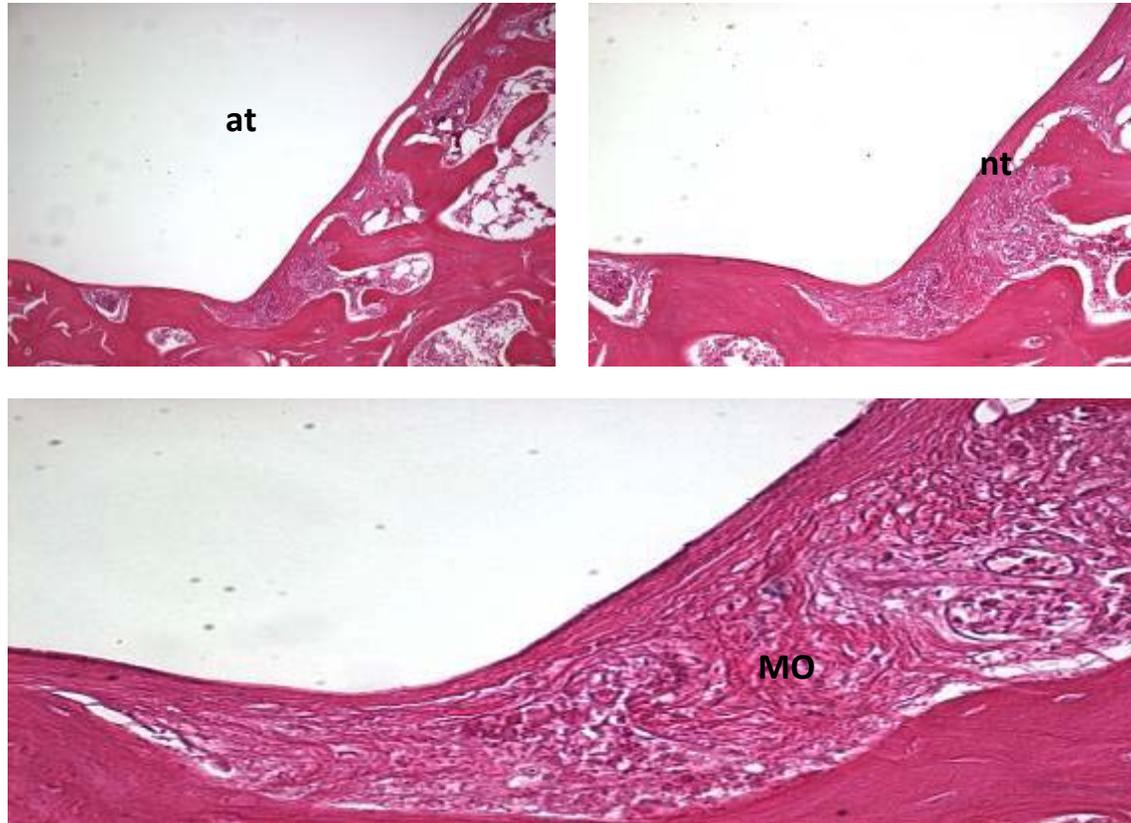


Figura 32- Microscopia Óptica do GE12. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (**at**) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (**nt**) ao redor do implante aumento 200x. Matriz óssea mineralizada (**MO**). Aumento 400x. Coloração HE.

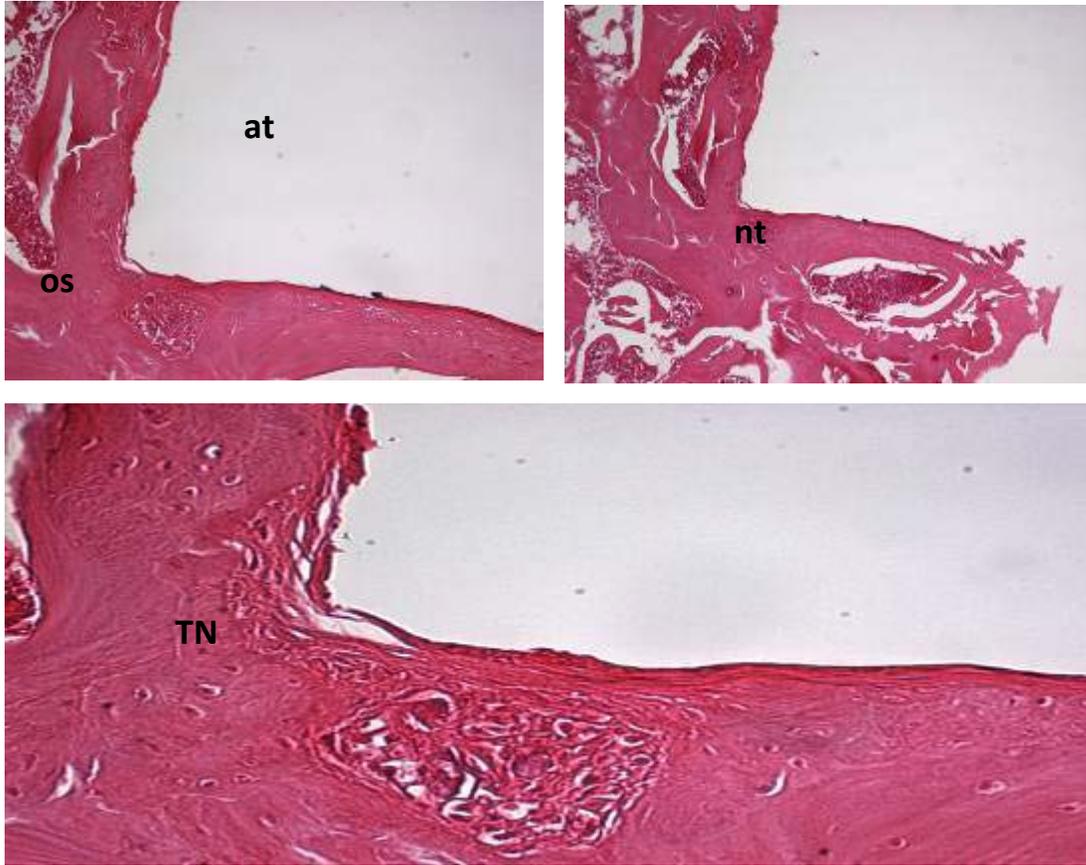


Figura 33- Microscopia Óptica do GE24. Visão panorâmica do defeito osteocondral com PVA ausência de neotecido (**at**) sobre o mesmo aumento 25x. Detalhe da formação de neotecido (**nt**) ao redor do implante aumento 200x. Tecido ósseo neoformado (**TN**). Aumento 400x. Coloração HE.

A Tabela 6 apresenta os resultados dos escores referente aos critérios dos GEs.

Tabela 6- Média da dos critérios atribuídos aos GEs sendo: **um(+)** ausência do item avaliado; **2(++)** moderada presença e **3(+++)** intensa presença.

Média Critérios e Escores Atribuídos aos GEs					
Critérios Avaliação	GE03	GE06	GE12	GE24	Escores*
Células inflamatórias (CI)	100	83	55	88	(+)
	0	17	45	12	(++)
	0	0	0	0	(+++)
Tecido de granulação (TG)	83	83	73	100	(+)
	17	17	27	0	(++)
	0	0	0	0	(+++)
Fibras colágenas (FC)	0	83	91	38	(+)
	50	17	9	50	(++)
	50	0	0	12	(+++)
Matriz Óssea (MO)	17	17	0	0	(+)
	83	83	27	50	(++)
	0	0	73	50	(+++)
Neotecido ósseo (TN)	17	25	0	63	(+)
	83	50	45	25	(++)
	0	25	55	13	(+++)
Reabsorção óssea (RO)	100	83	83	88	(+)
	0	17	17	12	(++)
	0	0	0	0	(+++)
Desabamento neotecido (DN)	100	100	100	100	(+)
	0	0	0	0	(++)
	0	0	0	0	(+++)

Abaixo segue sequência dos gráficos com as médias relativas de acordo com os critérios e escores (Tabela 6) e dos GEs.

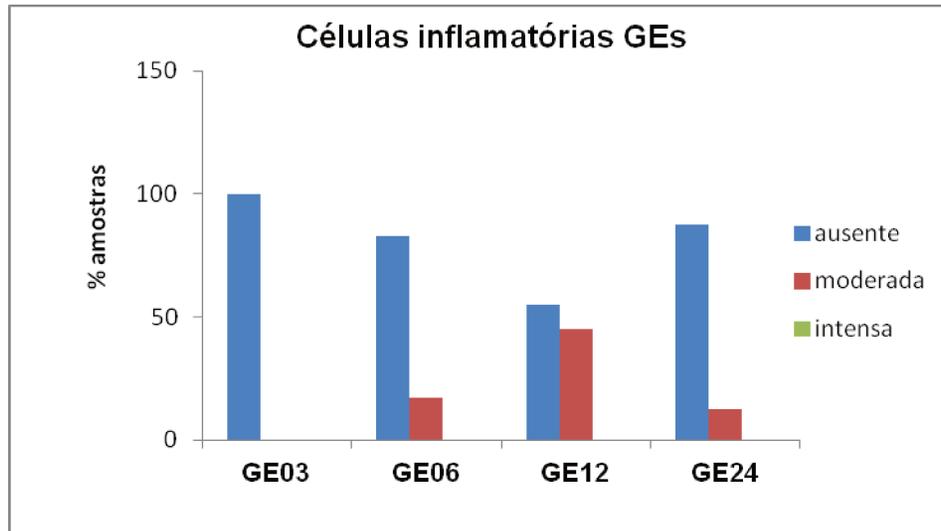


Figura 34- Gráfico da média referente ao critério células inflamatórias dos GEs avaliados. Ausente (81%); presença moderada(19%); presença intensa = 0%.

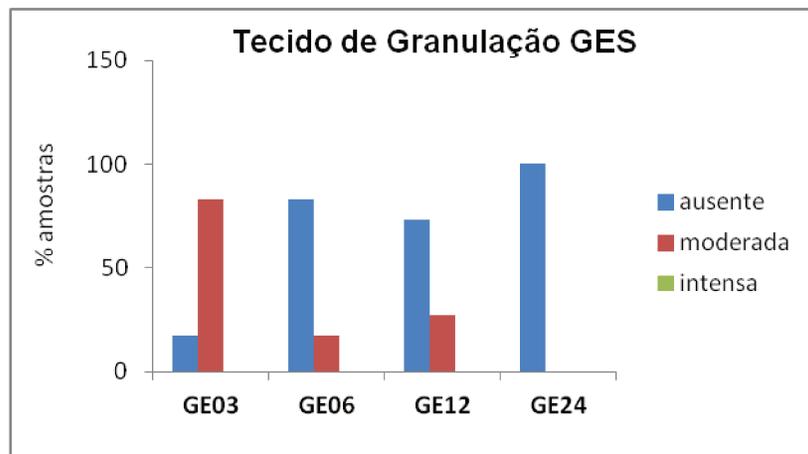


Figura 35- Gráfico da média referente ao critério tecido de granulação dos GEs avaliados. Ausente (68%); presença moderada (32%); presença intensa (0%).

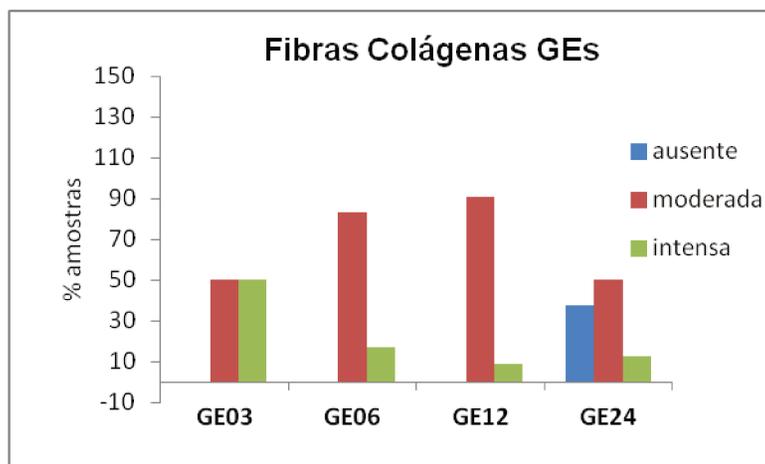


Figura 36- Gráfico da média referente ao critério fibras colágenas dos GEs avaliados. Ausente (9%); presença moderada (69%); presença intensa (22%).

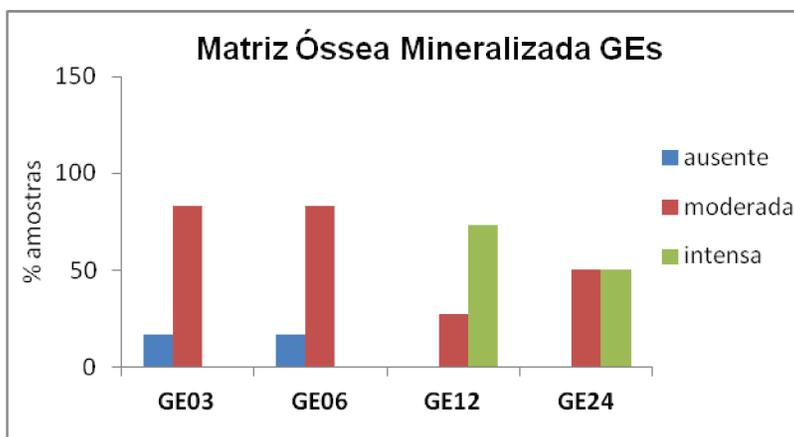


Figura 37- Gráfico da média referente ao critério matriz óssea mineralizada dos GEs avaliados. Ausente (9%); presença moderada (61%) presença intensa (30%).

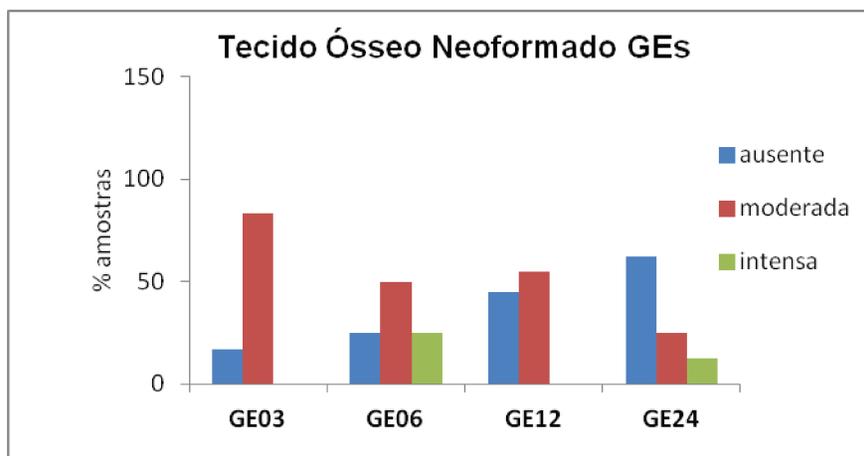


Figura 38- Gráfico da média referente ao critério tecido ósseo neoformado dos GEs avaliados. Ausente (37%); presença moderada (53%) presença intensa (10%).

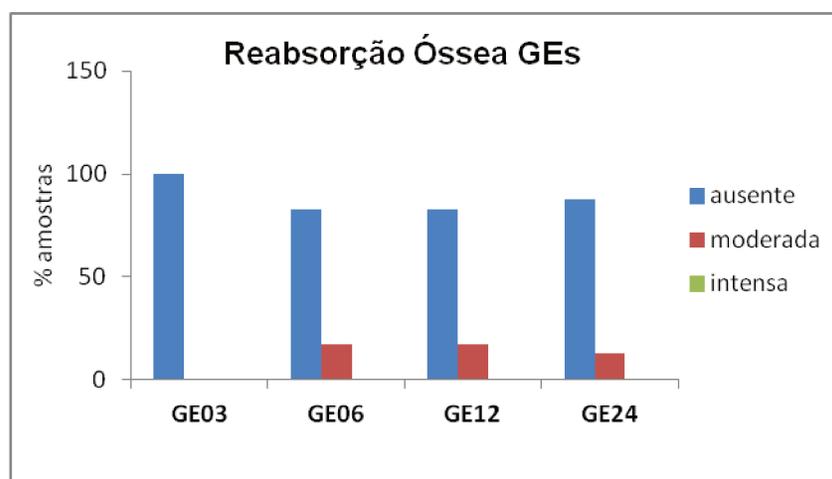


Figura 39- Gráfico da média referente ao critério reabsorção óssea do tecido ósseo neoformado dos GEs avaliados. Ausente (88%); presença moderada (12%) presença intensa (0%).

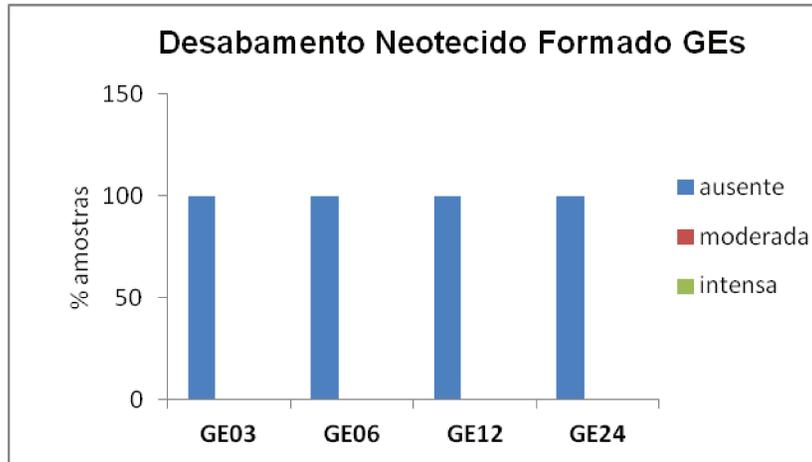


Figura 40- Gráfico da média referente ao critério desabamento do tecido ósseo neoformado dos GEs avaliados. Ausente (100%) do total das amostras.

A Figura 41 apresenta os resultados da análise histológica por microscopia óptica dos GCs estudados.

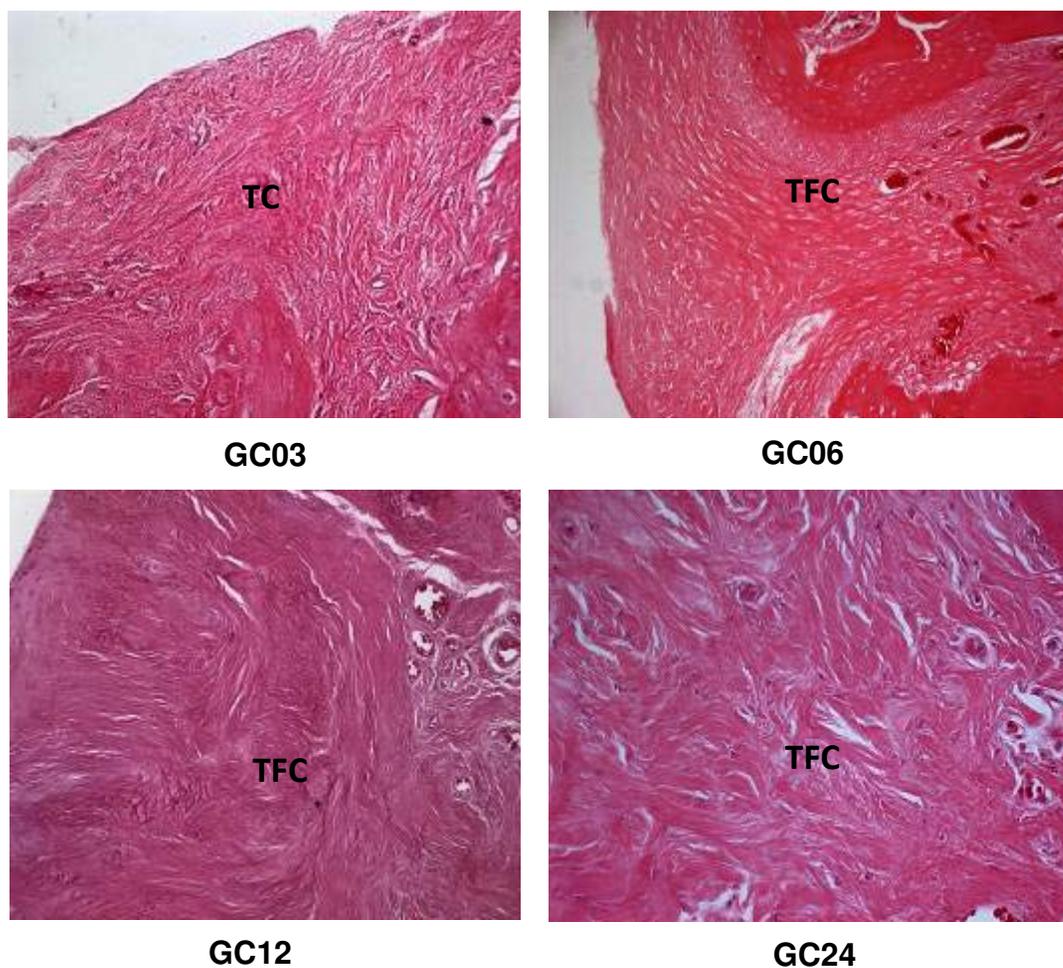


Figura 41- Microscopia Óptica dos GCs. Nota-se a formação e manutenção do tecido fibrocartilaginoso (TFC) preenchendo completamente o defeito ósseo osteocondral em todos os grupos. Coloração HE. Aumento 400x.

4.3.5- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Superfícies dos côneilos e das Patelas

Para a realização da MEV, os côneilos dos GEs e GCs foram desidratados em equipamento de ponto crítico sob temperaturas que variavam de 5 a 45°C e pressão de zero a 80 bar em atmosfera contendo CO₂, portanto em todos os GEs observa-se dimensão original reduzida.

4.3.5.1- MEV das Superfícies dos Côneilos e das Patelas dos GEs

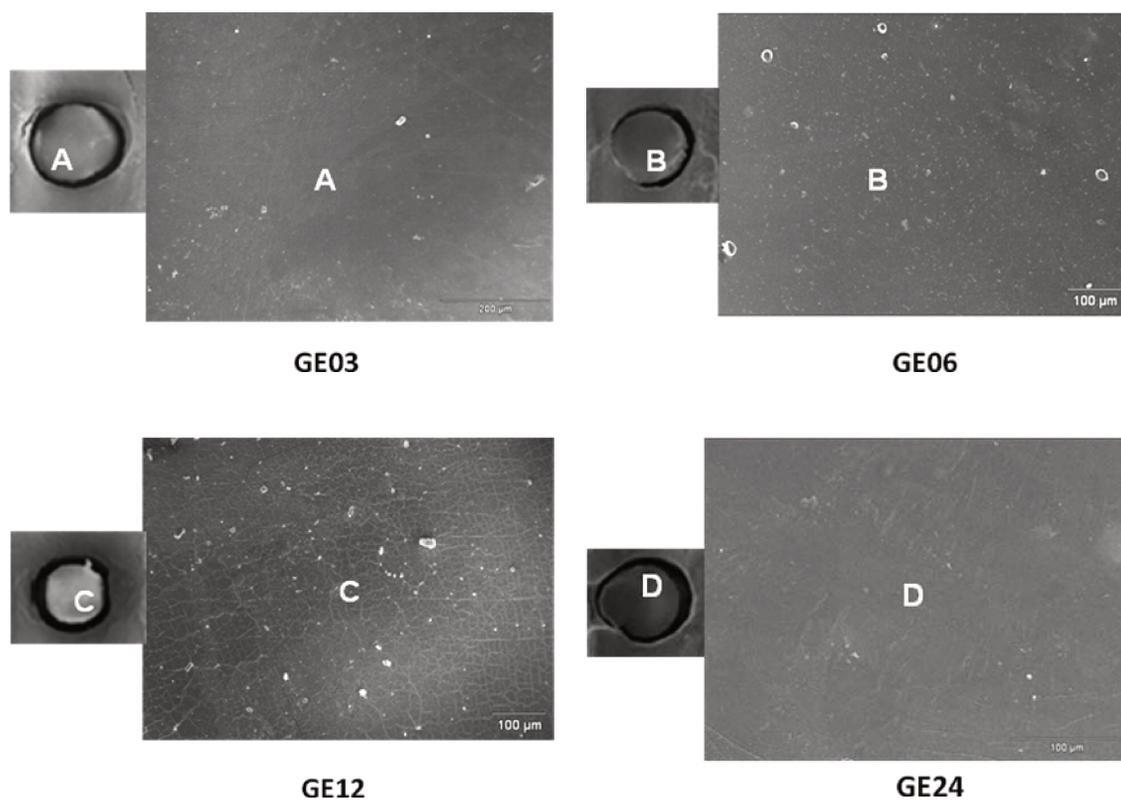
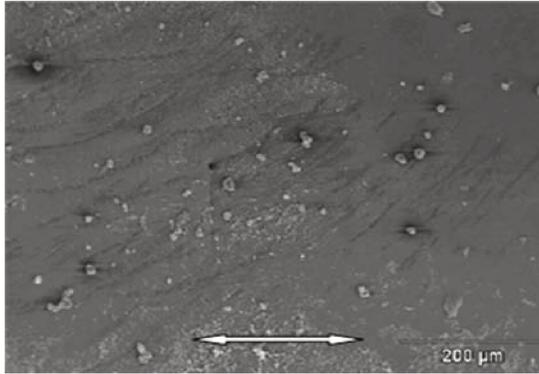
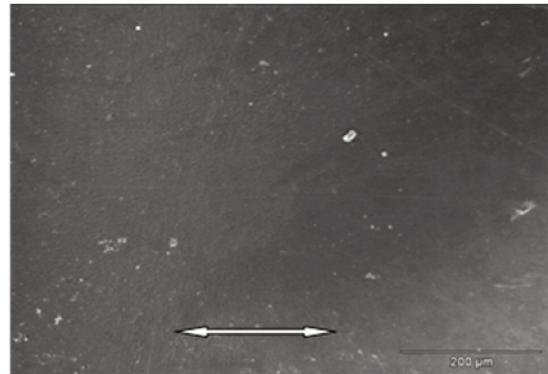


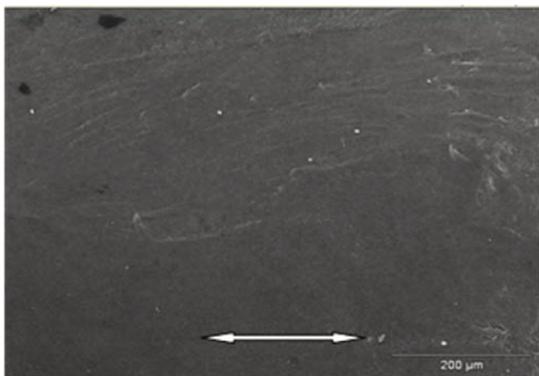
Figura 42- Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície do PVA dos GEs. Detalhe menor aumento de 10x. Maior aumento 1000x.



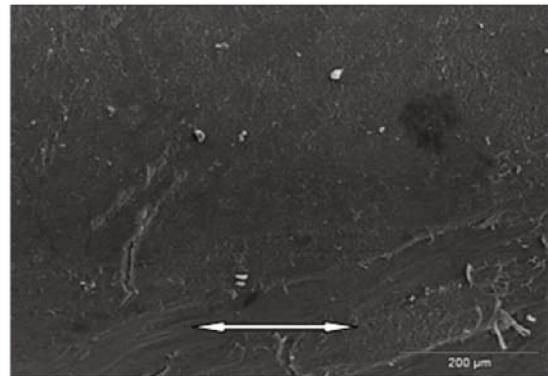
GE03



GE06



GE12



GE24

Figura 43- Detalhe da região medial da contra-superfície (patela) dos GEs.

4.3.5.2- MEV Superfícies dos Côndilos e Patelas dos GCs

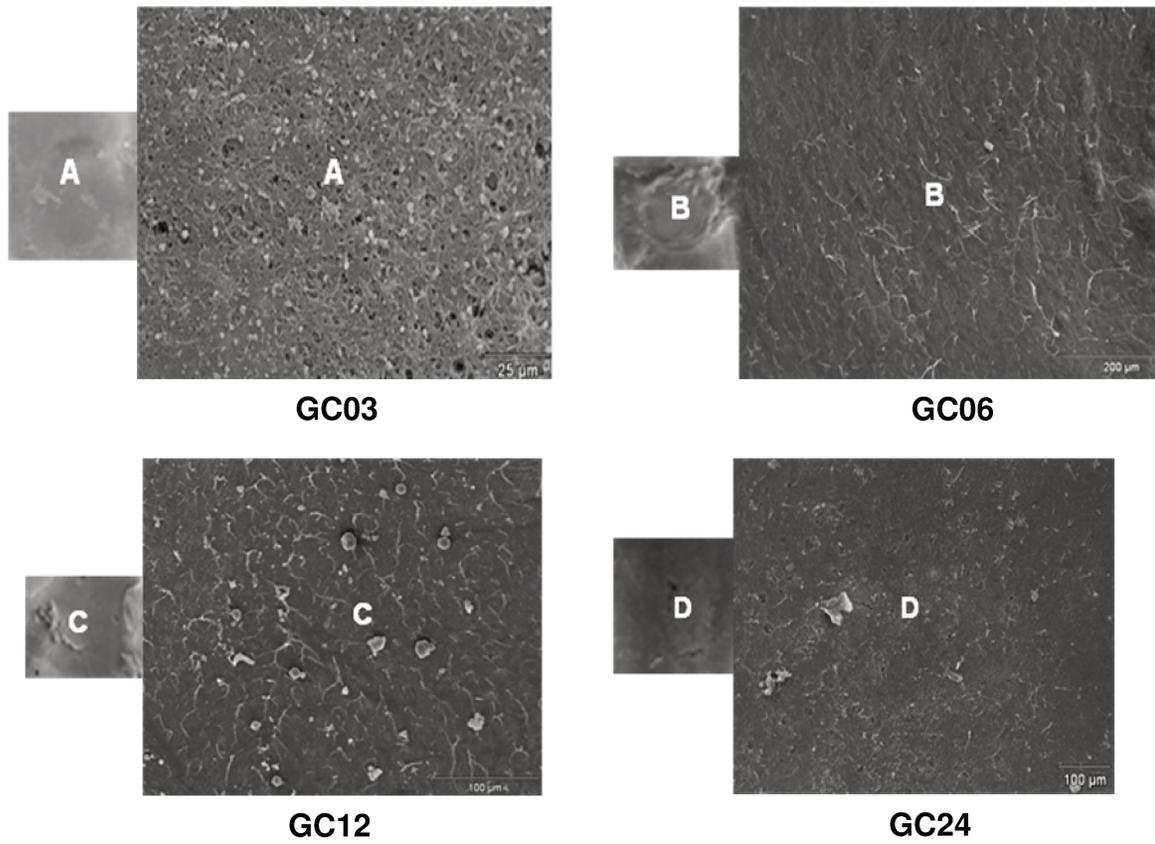


Figura 44- Microscopia Eletrônica de Varredura da superfície do defeito vazio dos GCs. Detalhe menor aumento de 10x. Maior aumento 1000x.

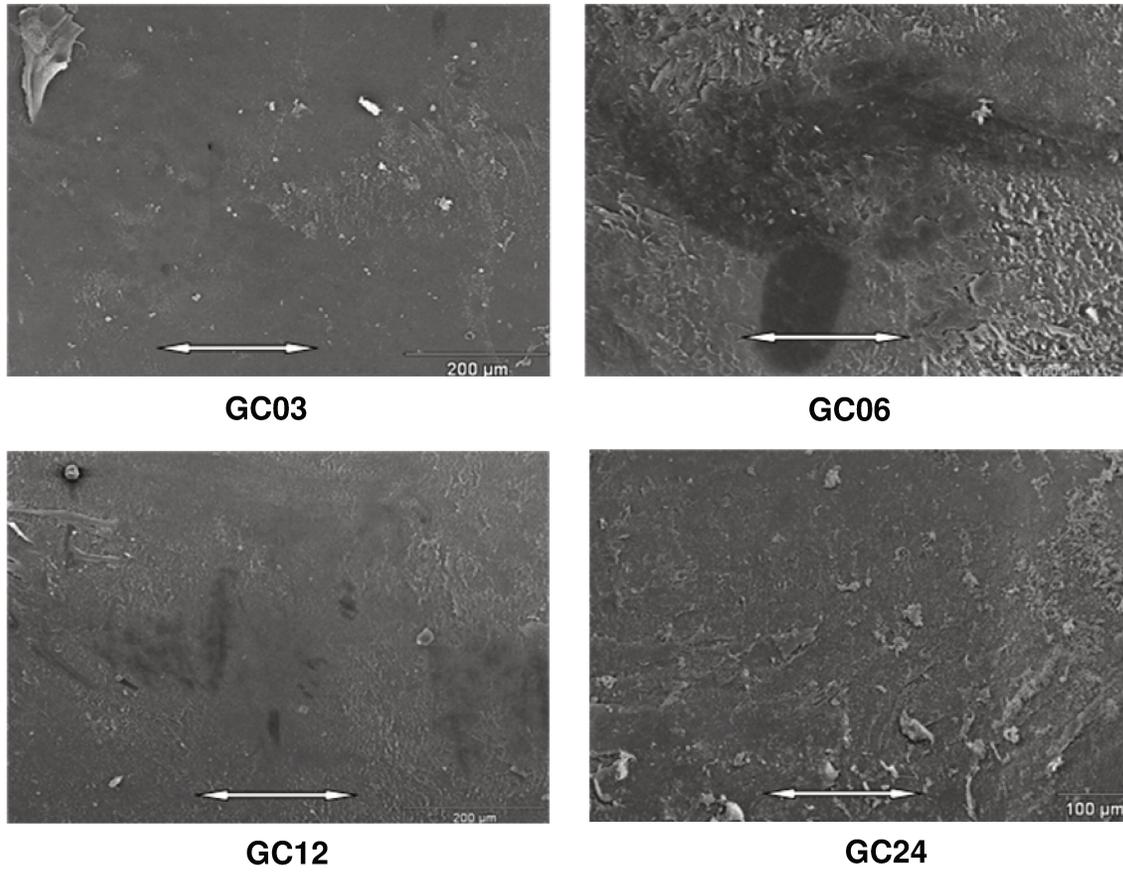


Figura 45- Detalhe da região medial da contra-superfície (patela) dos GCs.



5- DISCUSSÃO

5.1- Análise dos resultados obtidos

Todos os procedimentos utilizados em todas as etapas do presente estudo foram realizados de maneira adequada e seguiram os padrões cirúrgicos essenciais.

O comportamento viscoelástico da cartilagem articular não depende apenas das propriedades mecânicas intrínsecas da matriz extracelular, mas, também, da resistência ao escoamento da água intersticial através desta quando o tecido é deformado.

É importante ressaltar que, *in vitro*, a cartilagem articular se comporta mecanicamente de modo diferente se comparada com seu comportamento *in vivo*, ou seja, *in vitro* ela não recupera o equilíbrio e sua dimensão originais após a retirada da carga de compressão, porque essa recuperação *in vivo* é resultado de uma série de fatores como a concentração e tipos de íons dissolvidos na água intersticial, sua viscosidade, temperatura e conteúdo macromolecular que governam a elasticidade e a capacidade de absorção de água de sua estrutura (48, 63, 64).

Dentre vários pesquisadores LIPSHITZ, (2005) e MOW, (1989), comprovaram que a maior porcentagem de carga aplicada é suportada pelo líquido sinovial responsável pela lubrificação natural da junta articular e, depois, pela matriz extracelular.

Observou-se neste trabalho que, independentemente dos tempos de seguimento estudados, o hidrogel de PVA manteve-se íntegro com ausência de células gigantes, não foi observado processo inflamatório que poderia ter sido causado pela presença do biomaterial.

O método de reticulação via radiação promove a formação de estruturas fortes, porém complacentes com a formação de sítios capazes de absorver e reter o líquido sinovial para todos os GEs estudados, o que se acredita ter favorecido o bom desempenho mecânico observado.

Graindorge et al. (2000), avaliaram as alterações na morfologia superficial da cartilagem articular quando ocorrem processos de desgaste a fim de entender a sua degeneração em casos de osteoartrite, e concluíram que o processo de desgaste articular sem a presença do líquido sinovial pode ocorrer já nos primeiros intervalos de tempo justamente pela ausência de regime de lubrificação, tornando-se catastrófico ao longo do tempo devido ao aumento da área de contato entre as cartilagens.

Observou-se ausência de processos de desgaste em todos os GEs, o que nos levou a concluir que a estrutura reticulada do PVA tenha garantido a presença de líquido sinovial promovendo a manutenção do processo de lubrificação, o que impede o contato entre as superfícies e, conseqüentemente, o desgaste.

Por meio do ensaio de fluência a indentação a carga submetida esta é suportada e distribuída pela matriz sólida sendo possível determinar o comportamento de deformação da matriz da cartilagem (4,32,47,61,62,63).

Da mesma maneira que na cartilagem articular, quando é aplicada uma carga de compressão sobre um polímero, esta se distribui, neste caso, entre as macromoléculas emaranhadas, provocando o deslizamento entre as mesmas. A facilidade com que se dá esse deslizamento intercadeias é influenciada pela estrutura polimérica ou, ainda, pela força de ligação entre as macromoléculas.

5.1.1- Teste de inchamento do PVA

Conforme Bavaresco (2004), amostras de PVA não reticuladas, ou seja, com dose de zero KGy, apresentam-se solúveis em água e, conforme resultados obtidos, em doses que variaram de 0 a 150 KGy, o módulo de fluência a indentação (dureza) (E (MPa) e grau de equilíbrio de intumescimento ou da capacidade de absorção de água (Equilibrium Water Content - EWC (%)) foram

obtidos na dose de 25K Gy, com módulo de fluência de 3,0 ($\pm 0,4$) MPa com grau de intumescimento de 45 ($\pm 0,5$) demonstrando assim a importância da reticulação para a melhora do comportamento mecânico do PVA.

Soluções aquosas de PVA reticuladas via radiação ionizante sem que haja nenhum tipo de tratamento químico prévio, obtém-se um hidrogel menos resistente mecanicamente que aqueles reticulados via processo químico.

Isso ocorre porque devido à liberação de gás hidrogênio durante o processo, obtém-se uma estrutura macromolecular porosa o que diminui sua resistência mecânica a compressão e tração. A etapa de acetalização altera significativamente as propriedades mecânicas do PVA quando comparado ao processo de reticulação sem este tratamento químico. As amostras obtidas após a acetalização apresentaram um ótimo aspecto sem presença de bolhas.

O aumento da resistência mecânica do hidrogel de PVA pode ser atribuído a reticulação intermolecular formada pelas ligações C-O-C geradas na formação de diéteres (acetais) por meio da reação de aldeídos com alcoóis sob condição de catálise, durante o processo de acetalização.

As cadeias reticuladas formadas durante o processo de acetalização, quando submetidas à posterior reticulação por irradiação ionizante são conectadas umas com as outras por meio de ligações fortes do tipo covalentes. Estes tratamentos além de aumentar a resistência mecânica impedem que ocorra o processo denominado radiólise, evitando a formação de bolhas no produto final (7).

5.1.2- Ensaios *in vitro* do PVA

Os testes de viabilidade celular pelos métodos do MTT, VN e o teste de adesão por MEV, indicaram que não houve interferência do PVA na viabilidade, adesão e morfologia indicando atividade celular adequada. Tais resultados foram confirmados conforme já descrito por Rodrigues et al. (2012) e Chen (2009).

Os resultados obtidos relativos ao ensaio de ECI e ECD ao PVA utilizando-se células Vero avaliada pelos métodos de microscopia de luz e do MTT, não foram observados sinais qualitativos de toxicidade quando comparados com o CPT. Mesmos resultados foram obtidos no teste do método VN, Figura 9.

Na análise por MEV, pode-se observar células aderidas, espalhadas e em sua maioria com morfologia irregular (ora mais retraídas) e, na maioria das vezes achatadas. De maneira geral, foi possível observar que o padrão morfológico e de crescimento das células Vero sobre o PVA foram mantidos conforme Figura 10.

Resultados semelhantes aos obtidos do PVA na presença das células Vero foram encontrados na presença das MSCs avaliadas pelo método MTT, Figura 11, de modo que o PVA também foi considerado atóxico quando comparado com o CPT.

A cinética de adesão e proliferação observadas nas células em condições de manutenção e rotina foi mais lenta quando comparadas com as células Vero utilizadas nesse estudo. Os achados são condizentes com os descritos pela literatura (50).

Nas imagens por MEV, Figura 12, o aspecto das células MSCs sobre o PVA foi mantido. As mesmas encontravam-se espalhadas, aderidas e com morfologia irregular (alongadas ou retraídas) e, na maioria das vezes, achatadas com a presença de vesículas e/ou microvilosidades na superfície e sinais de divisão celular.

A análise da diferenciação osteogênica pela ação da enzima ALP e pelo corante ARS mostraram ausência da interferência na diferenciação de MSCs/MO de ratos (Chen 2009), confirmando assim sua diferenciação osteogênica, Figuras 13 e 14.

Por estar envolvida diretamente no processo de mineralização da matriz orgânica pelas células ósseas, a enzima ALP é comumente utilizada como marcador da diferenciação óssea. Conforme Figura 13, os resultados indicaram que o PVA não interferiu na capacidade das MSCs produzirem ALP.

A Figura 14 apresenta imagens das MSCs marcadas com ARS após 21 dias de diferenciação osteogênica sobre o PVA. Foi possível observar (setas) os nódulos de mineralização pela incorporação do corante, mostrando que houve formação de matriz óssea mineralizada. A Figura 15 apresenta os resultados quantitativos obtidos, confirmando que o PVA não interferiu no processo de diferenciação das MSCs após 21 dias de diferenciação osteogênica.

5.1.3 - Avaliação por Estereomicroscopia

De acordo com Graindorge (2000), a ausência de líquido sinovial acelera rapidamente o processo de desgaste da CA.

Observou-se que a média da frequência relativa dos GEs avaliados por especialistas, Tabela 4, que o aspecto da superfície do PVA, da cartilagem adjacente e da contra-superfície (patela) em todos os GEs foram mantidos. Foram observadas na maioria das amostras ausências de: colapso do implante, crescimento de neotecido sobre o mesmo, desgastes do tipo abrasivo e ou adesivo nas amostras avaliadas, Figura 16.

A manutenção das superfícies adjacentes (PVA e patela) foi observada em todos os GEs, indicativo de que o fluido sinovial esteve presente em todos eles.

De acordo com os resultados obtidos por microscopia estereoscópica conforme Figuras de 17 a 25 foram considerados satisfatórios para todos os tempos de seguimento estudados.

Na Figura 26 dos GCs, observa-se que todos os defeitos foram totalmente preenchidos por tecido fibrocartilagenoso. Presença de indícios de desgastes do mesmo, das contra-superfícies (patelas) e da cartilagem articular adjacente foram observados. Tais indícios podem ser justificados pela ausência de lubrificação suficiente e ou irregularidade do neotecido formado.

5.1.4 - Avaliação por EMFI

Aumento no módulo de fluência ao longo do tempo pode ser justificado pelo adensamento do tecido ósseo no fundo do defeito Kempson (1971), Malmonge et al. (1997).

A Figura 27 refere-se aos gráficos individuais de cada um dos GEs. Os resultados mostraram que os valores obtidos foram da mesma ordem de grandeza da cartilagem articular natural.

A Figura 28 apresenta resultados dos grupos CA, GE00 e GEs, onde se observa maior módulo de fluência foi obtido na CA com significativa resistência mecânica do comportamento visco elástico quando comparada com os demais grupos estudados.

Os valores de penetração do indentador foram maiores nos GEs. Tal resultado pode ser justificado pela deformação da rede polimérica do PVA quando foi submetido à força de compressão.

Foi observada menor resistência mecânica no GE00 quando comparado aos GEs. Esse resultado é justificado pelo fato de o implante encontrar-se “solto” no interior do defeito que foi confeccionado e o PVA implantado e realizado o EMFI no mesmo dia, ou seja; não havia formação de qualquer tipo de tecido ao redor do mesmo.

Os valores de MPa apresentaram crescentes variações conforme aumento do tempo de seguimento em todos os GEs, ou seja; o PVA suportou a carga recebida, não sofreu ruptura e além disso ofereceu ambiente estável e adequado para a formação e manutenção do neotecido cavidade receptora.

5.1.5- Avaliação EDXRF

A Tabela 5 apresenta os resultados da avaliação por EDXRF, onde se observa a incorporação dos minerais Cálcio e Fósforo em todos os GEs de acordo com o aumento do tempo de seguimento quando comparados às amostras não implantadas, Figura 29.

Os resultados confirmam aqueles obtidos nas Figuras de 30 a 33 da MO, onde houve a diferenciação do tecido inicial de granulação no GE03 em osso ao final de 24 semanas. O Enxofre manteve-se inalterado em todos dos grupos.

5.1.6 - Avaliação por MO

De maneira geral é sabido que todo implante, mesmo os inertes quando implantados são envolvidos por cápsula de tecido fibroso Mow et al. (1984).

A Tabela 6 referente às médias dos critérios atribuídos aos GEs e analisados por especialistas, apresentam resultados que, em sua maioria confirmaram o bom desempenho do PVA em todos os GEs, com ausência de células gigantes e inflamatórias, presença e manutenção do neotecido formado, demonstrando que o implante de PVA ofereceu superfície propícia às interações celulares em todos os GEs.

Os resultados obtidos pela MO de acordo com as Figuras 30, 31, 32 e 33, observou-se a formação e manutenção do neotecido em todos os GEs estudados, demonstrando o comportamento inerte do PVA avaliado.

A Figura 41 refere-se aos GCs. Observa-se formação e manutenção de tecido fibroso conjuntivo denso desorganizado preenchendo totalmente os defeitos em todos os GES.

5.1.7- Avaliação dos côndilos e patelas por MEV

Graindorge (2000), estudando as alterações da morfologia superficial da cartilagem articular em casos de osteoartrite, conclui que esse processo de desgaste ocorre rapidamente na ausência do líquido sinovial e que mudanças no mecanismo de lubrificação aceleram de modo drástico a degeneração articular pelo aumento da área de contato e do atrito entre superfícies cartilaginosas.

A Figura 42 mostra que no presente estudo não foi observado desgaste do PVA por adesão ou por abrasão na superfície do PVA de todos os GEs. A integridade das superfícies da região medial das patelas, Figura 43, foram mantidas.

Os resultados sugerem que a presença e exudação do líquido sinovial entre as mesmas durante o processo de movimentação da articulação tenha sido essencial para a manutenção do PVA após tempos de seguimento.

Além disso, podemos ressaltar que o processo de acetalização e reticulação via radiação do PVA promoveu a formação de estruturas fortes, porém complacentes com sítios capazes de absorver e reter o líquido sinovial minimizando o atrito e desgaste entre as superfícies de contato.

A avaliação microscópica por MEV foi de grande importância para identificar a presença ou não de mecanismos de desgaste que pudessem ser gerados durante o processo de cicatrização ou mesmo após este pela movimentação da superfície da patela sobre o PVA.

As Figuras 44 e 45 referem-se às imagens dos côndilos e patelas dos GCs. Alterações significativas em todos os grupos foram observadas, ou seja; presença de mecanismo de desgaste do tipo adesivo e ou abrasivo em todos os grupos.

Os resultados confirmam que a presença do neotecido formado gerou mecanismos catastróficos nas superfícies, sugerindo que o processo de lubrificação não foi eficiente na presença do neotecido formado.



6- CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Nas condições em que foi realizado este estudo e baseando-se nos resultados obtidos, concluiu-se que o PVA:

- 1) estimulou ou não interferiu com a proliferação celular na presença de células Vero e MSCs mostrando-se não citotóxico;
- 2) permitiu a adesão celular, a diferenciação das células da linhagem osteogênica com manutenção da morfologia celular;
- 3) suportou a carga e não sofreu desgaste ou abrasão pela contra superfície da patela;
- 4) apresentou boa interação com o tecido ósseo receptor em todos os grupos e adsorveu cálcio e fósforo em todos os GEs.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- testar o PVA em defeitos críticos confeccionados rente e abaixo da CA em modelo animal de maior porte;
- associar o PVA à MSCs indiferenciadas e testar *in vitro* e *in vivo*.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Abdallah BM, Kasem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008; 15:109-116.
- 2- Adebí G, Sotoudeh A, Soleymani M, Shafíee A, Mortazavi P, Aflatoonian MR. A Collagen-Poly(vinyl alcohol) Nanofiber Scaffold for Cartilage Repair. *J Biomater Sci Polym.* 2010 DOI: 10.1163/092050610X540503.
- 3- Anseth KS, Bowman CN, Peppas IB. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials.* 1996; (17): 1647-1657.
- 4- Armstrong CG, Mow C. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J Bone Joint Surg,* 1982; 64: 88-94.
- 5- Baumgaertner MR', Cannon WD, Vittori JM, Schmidt ES, Maurer RC. Arthroscopic debridement of the arthritic knee. *Clin Orthop* 1990; 253:197–202.
- 6- Bavaresco VP, Machado LDB, Zavaglia CAC, Reis MC. Caracterização mecânica de hidrogéis de PVAI para ser utilizado como cartilagem articular artificial reticulados por radiação. *Rev Bras Pesq Des.* 2002; 4: 1679.
- 7- Bavaresco, VP. Estudo tribológico de hidrogéis Poliméricos para ser utilizado como cartilagem articular artificial. Unicamp. 2004; 166p.
- 8- Bayne O, Langer F, Pritzker KP, Gross AE. Osteochondral allografts in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Orthop Clin North Am.* 1985; 16:727-40.
- 9- Beris AE, Lykissas MG, Papageorgiou CD, Georgoulis AD. Advances in articular cartilage repair. *Injury.* 2005; 36 (4): S14-23.
- 10- Bichara DA, Xing Z, Hwang NS, Bodugoz-Snturk H, Yaremchuck MJ, Randolph MA, et al. Porous poly (vinyl alcohol)-alginate gel hybrid construct for neocartilage formation using human nasoseptal cells. *J Surg Res* 2010; (163): 331-336.

- 11- Bodugoz H, Pekel N, Guven O. Preparation of poly (vinyl alcohol) hydrogels with radiation grafted citric and succinic acid groups. *Radiation Physics and Chemistry*. 1999; 55: 667-671.
- 12- Bray JC, Merryl EW. Poly (vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular cartilage material - *J. Biomed. Mater. Res*. 1973; 7: 431-443.
- 13- Buckwalter JA, Mow VC, Boden SD, Eyre DR, Weidenbaum M. Intervertebral disc structure, composition and mechanical function. In: JA Buckwalter TA, Einhorn SR, editors. *Orthopaedic Basic Science: Biology and biomechanics of the musculoskeletal system*, 2nd ed. Rosemont Il: Amer Acad Orthop Surg. 2000: 557-556.
- 14- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage. Part I: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J. Bone Joint Surg*. 1997; 79-A: 600-611.
- 15- Camargo JCSF. Caracterização da cartilagem articular do joelho de ratos submetidos a esforços de repetição em esteira rolante. Unicamp. 2006; 99p.
- 16- Chen RS, Chen MH, Young TH. Induction of differentiation and mineralization in rat tooth germ cells on PVA through inhibition of ERK1/2. *Biomaterials* 2009; 30: 541-547.
- 17- Chiu RC. Bone marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail Rev* 2003;8:247-51.
- 18- Corkhill PH, Trevett AS, Tighe BJ. The Potential of Hydrogels as Synthetic Articular Cartilage. *Proc Inst Mech Engrs. Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 1990; 204:147-155.
- 19- Costa ALD, Oliveira CRG, Leopizzi N, Amatuzzi MM. O uso da matriz óssea desmineralizada na reparação de lesões osteocondrais. Estudo experimental em coelhos. *Acta Ortop Bras*. 2001; 9:27.
- 20- Criss JW, Birks LS. Calculation Methods for fluorescent x-ray spectrometry: emprirical coefficients vs. fundamental parameters. *Anal Chem*. 1968; 40:1080.

- 21- Darwis D, Syasica P, Razzak MT, Rosiaki JM. Characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic ontervertebral disc nucleus. *Radiat Phys Chem.* 2002; 63: 539-42.
- 22- Dirk B, Michaela E, Ina K, Anja B, Jurgen Z, Ingo W, et al. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials.* 2006; 27: 2882-2889.
- 23- Frenkel SR, Bradica G, Brekke JH. Regeneration of articular cartilage - Evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. *Osteoarth Cart.* 2005; 13: 798-807.
- 24- Garg HG, Swann DA. Age-related changes in the chemical composition of bovine articular cartilage. *Biochem.* 1981; 193: 459
- 25- Giménez V, Reina JA, Mantecón A, Cadiz V. Unsaturated modified poly (vinyl alcohol). Crosslinking through double bonds. *Polymer.* 1999; 40: 2759-2767.
- 26- Gonzalez N, Vadillo I, Blanco MD, Trigo RM, Teijon JM. Hidrogeles: Sintesis, propiedades y aplicaciones. *Revista Iberoamericana de Polym.* 1992; 1:79-92.
- 27- Graindorge SL, Stachowiak GW. Changes occurring in the surface morphology of articular cartilage during wear. *Wear.* 2000; 241: 143-150.
- 28- Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin redbased assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004; 329:77-84.
- 29- Guillot P, Cui W, Fisk NM. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications and tissue engineering. *JCell Mol Med.* 2007; 11:935-44.
- 30- Hall SJ. *Biomecânica Básica.* Department of Kinesiology, Northridge, California, 1991: 78-91.
- 31- Hassan CM, Ward JH, Peppas NA. Modeling of crystal dissolution of poly (vinyl alcohol) gels produced by freezing/thawing processes. *Polymer.* 1999; 41: 6729-6739.

- 32- Holmes MH, Lai WM, Mow VC. Singular perturbation analysis of the nonlinear flow independent compressive stress relaxation behavior of articular cartilage”, J Biom Engineering. 1985; 207:206-218.
- 33- Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthr Cartil. 2002;10:432-63.
- 34- Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 2000; 21:2529-43.
- 35- ISO 10993-5 I - (E). Biological evaluation of medical devices Part 5: 1992. Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
- 36- Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (L-lactic-coglycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. JBiomed Mater Res. 1997;36:1.
- 37- Jackson DW, Simon TM, Aberman HM. The articular cartilage repair dilemma Clin Orthop Rel Res. 2001; 391-S:14-25.
- 38- Jiang H, Campbell G, Boughner D, Wan WK, Quantz M. Med Eng Phys 2004. 26(4): 269-77.
- 39- Jones JR, Ehrenfried LM, Hench LL. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 2006; 27: 964.
- 40- Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica: In Tecido Cartilaginoso. Rio de Janeiro: 11^a Edição: Guanabara Koogan, 2008.
- 41- Kempson GE, Freeman MAR, Swanson SAV. The determination of o creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head. J Biomech. 1971; 4: 239.
- 42- Kirkpatrick CJ. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. Regulatory Affairs., 1992; 4:13-32.

- 43- Kobayashi M, Chang YS, Oka M. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVAL-H) artificial meniscus. *Biom.* 2005; 26:3243.
- 44- Krumova M, López D, Benavente R, Mijangos C, Perenã JM. Effect of crosslinking on the mechanical and thermal properties of poly (vinyl alcohol), *Polymer.* 2000; 41: 9265-9272.
- 45- Kudela V. Hydrogels in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Jacqueline IK (Editor), Wiley Interscience. 1990; 783-807.
- 46- Li LP, Herzog W, Korhonen RK, Jurvelin JS. The role of viscoelasticity of collagen fibers in articular cartilage: axial tension versus compression. *Med Eng Phys*, 2005; 27(1):47-53.
- 47- Lipshitz H, Etheredge R, Glimcher MJ. Changes in the hexosamine content and selling ratio of articular cartilage as functions of depth from the surface *J Bone Joint Surg.* 1976; 58a: 1149.
- 48- Lipshitz H. Wear Characteristics of Articular Cartilage - Effects of time-varying loads and intermittent sliding. In: *ACS Symposium Series 287 - Polymer Wear and Its Control*. Meeting of the American Chemical Society, St. Louis. Missouri: Ed. Lieng-Huang Lee. 1984; 8: 229.
- 49- Liu CB. Synthesis and characterization of a thermosensitive hydrogel based on biodegradable amphiphilic PCL-Pluronic(L35)-PCL block copolymers. *Colloids Surf A.* 2007; 302:430.
- 50- Lombello CB, Malmonge SM, Wada MLF. PolyHEMA and Poly-HEMA-poly(MMA-co-AA) as substrates for culturing Vero cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2000;11: 541.
- 51- Lombello CB, Malmonge SM, Wada MLF. Análise Morfológica de Condrócitos sobre Hidrogéis de poliHEMA, apresentado no 5º Congresso da Associação Brasileira de Polímeros Águas de Lindóia. 1999a.

- 52- Lombello CB, Malmonge SM, Wada MLF. Scanning Electron Microscopy of Chondrocytes Cultured on PolyHEMA Hydrogels, XVII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis, Santos, Ata Microscópica. 1999b. 8 Supl A:7.
- 53- Lucchesi C, Barbanti SH, Joazeiro PP, Duek EAR. Cell Culture on PCL/PLGA Blends. J Ap Polym Sc. Vol. 2010; 115: 2609-2615.
- 54- Malmonge SM, Zavaglia CAC, Belangero WD. Biomechanical and histological evaluation of hydrogel implants in articular cartilage. Braz J Med Biol Res. 2000; 33: 307.
- 55- Malmonge SM. Hidrogéis sintéticos para o reparo de defeitos de cartilagem articular. Unicamp. 1997: 156.
- 56- Mankin H, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A. Articular cartilage structure, composition and function. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR. Orthopaedic Basic Science. Biology and biomechanics of the musculoskeletal system. AAOS. 2000. p443.
- 57- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biomechanical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. J Bone J Surg, Am. 1971; 53: 523.
- 58- Mankin HJ. The response of articular cartilage to a mechanical injury. The Journal of Bone and Joint Surgery. 1982; 64(A):460-466.
- 59- Mondino AV, Gonzalez ME, Romero GR, Smolko EE. Physical properties gamma irradiated poly(vinyl alcohol) hydrogel preparations. Rad Phys Chem. 1999; 55:723-726.
- 60- Mossman TJ. A rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65:55-63.

- 61- Mow VC, Ateshian GA. Lubrication and wear of diarthrodial joint. Basic Orthopaedic Biomechanics. 1997; 275.
- 62- Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. J Biom. 1984; 17:377.
- 63- Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments. J Biomech Eng. 1980; 102(1):73-84.
- 64- Mow VC, Proctor CS, Kelly MA. Biomechanics of articular cartilage. In: Nordin M, Frankel VH. Biomechanics of the knee. In: Nordin M, Frankel VH. Basic biomechanics of the musculoskeletal system. 2a. edição, Filadelfia (Londres), Editora Lea & Febiger. 1989. 31-57.
- 65- Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage diarthrodial jointes as paradigms for hierarchical materials and structures. Biomaterials. 1982; 13: 67.
- 66- Muir H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. Biochem Soc Trans. 1983; 11(6):613-22.
- 67- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: bioquímica. 1994; 7^a ed. São Paulo: Atheneu.
- 68- Netti PA, Shelton JC, Revell PA, Pirie C, Smith S, Ambrosio L, et al. Hydrogels as interface between bone and an implant. Biomaterials, 1993; 14: 1098-1104.
- 69- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. Exp Hematol 2008;36:1176-85.
- 70- Oka M. Development of artificial articular cartilage. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H. J Eng Med. 2000; 214(H1): 59-68.
- 71- Oliveira PPM. Uso de membrana de poli (álcool vinílico) - PVAI como substituto pericárdico - Trabalho Experimental. Campinas, SP: [s.n.], 2008.
- 72- Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. Biomateriais Fundamentos e Aplicações - Cultura Médica. 2006.

- 73- Peppas NA, Hassan CM. Cellular OVA hydrogels produced by freeze thawing. *J App Pol Scien*, 1999; 76: 2075-2079.
- 74- Peppas NA, Merrill EW. Development of semicrystalline poly (vinylalcohol) hidrogels for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res.* 1977; 11:123-434.
- 75- Peretti GM, Pozzi A, Ballis R, Deponti D, Pellacci F. Current surgical options for articular cartilage repair. *Acta Neurochir.* 2011; Suppl: 108:213.
- 76- Piermattei D, Flo GL, De Camp CE. *Handbook of Small Animal orthopedics and Fracture Repair.* Saunders fourth Edition. 2006.
- 77- Qi W, Scully SP. Type II collagen modulates the composition of extracellular matrix synthesized by articular chondrocytes. 2001.
- 78- Radin E, Paul O. Response of joints to impact load- around implanted materials. In *Clinical Biomechanics and Arthritis Rheum.* 1971; 14: 356-362.
- 79- Ratner BD, Hoffman AS. Synthetic hidrogels for biomedical applications, *ACS Symposium Series.* 1976; 31:1-36.
- 80- Recht M, Bobic V, Burstein D. Magnetic resonance imaging of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 2001; S379-96.
- 81- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur. Cell Mater.* 2005; 9: 23-32.
- 82- Rezwan QZ, Chen JJ, Blaker AR, Boccaccini. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27: 3413.
- 83- Ribeiro JL, Camanho LC, Takita LC. Macroscopic and histological study of biologically acceptable osteochondral repairs. *Acta Ortop Bras.* 2004; 12: 16.
- 84- Rodrigues AA. Avaliação do hidrogel de polivinil álcool associado a duas diferentes nanopartículas de carbono implantados em defeitos osteocondrais de ratos wistar. *Unicamp.* 2011: 131p.

- 85- Rodrigues AA, Batista NA, Bavaresco VP, Baranauskas V, Ceragioli H, Peterlevitz AC, et al. Polyvinyl alcohol associated with carbon nanotube scaffolds for osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. *Carbon*, 50(2): 450-459, 2012.
- 86- Rogero SO, Benevolo AL, Ikedab TI, Cruz AS. Teste *in vitro* citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *J Mater Res*. 3 (6): 317-320, 2003.
- 87- Ross MH, Pawlina W. *Histologia Texto e Atlas em correlação com Biologia Celular e Molecular*. 5a. edição Rio de Janeiro, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008. 928p.
- 88- Roughley PJ, White RJ. Age related changes in the structure of the preoglycan subunits from human articular cartilage. *J Biol Chem*, 1980; 255:217.
- 89- Sawae Y, Murakami T, Higaki H, Moriyama S. Lubrication property of total knee prostheses with PVAL hydrogel layer as artificial cartilage. *JSME Intern J Series C*. 1996; 39: 356.
- 90- Shirazi R, Shirazi AA. Deep vertical collagen fibrils play a significant role in mechanics of articular cartilage. *J Orthop Res*, 2008; 26:608-15.
- 91- Simunek A, Muir H. Changes in the proetin-polysaccharides of pig articular cartilage during prenatal life, development and old age. *Biochim J*. 1972; 126: 515.
- 92- Stammen JA, Williams S, Ku DN, Goldberg RE. Mechanical properties of a novel PVAL hydrogel in shear and unconfined compression. *Biomaterials*. 2001; 22:799.
- 93- Stockwell RA. *Biology of cartilage cells*. Cambridge University Press. 1979.
- 94- Sweet MBE, Thonar EJMA, Marsh J. Age related changes in proeoglycan structure. *Arc Bichem Biophys*. 1979; 198: 439.
- 95- Swieszkowski W, Ku DN, Bersee HE, Kurzydowski KJ. Na elastic material for cartilage replacement in an arthritic shoulder joint. *Biomaterials* 2006; 27(8), 1534-1541.

- 96- Thaxter TH, Mann RA, Anderson, CE. Degeneration of knee joints in rats. *J. Bone Joint Surg*, 1965; 47: 567-85.
- 97- Timothy M, O'Shea B, Xigeng M. Bilayered Scaffolds for Osteochondral Tissue Engineering. *Tiss Eng*: 2008; Part B (4):14.
- 98- Trattnig S, Huber M, Breitenseher MJ. Imaging articular cartilage defects with 3D fat-suppressed echo planar imaging: comparison with conventional 3D fat-suppressed gradient echo sequence and correlation with histology. *J Comput Assist Tomogr*. 1998; 22: 8-14.
- 99- Ulanski P, Bothe E, Rosiak JM, Sonntag C. OH-radical-induced crosslinking and strand breakage of poly(vinyl alcohol) in aqueous solution in the absence and presence of oxygen. A pulse radiolysis and product study, *Macr Chem Phys*. 1994; 1443-1461.
- 100- Wan WK, Campbell G, Zhang ZF, Hui AJ, Boughner DR. Optimizing the tensile properties of polyvinil alcohol hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve stent. *J Biomed Mater Res*. 2002; 63(6):854-61.
- 101- Waters NE. The indentation of thin rubber sheets by spherical indenteres. *Br. J. Appl Phys*. 1965; 16: 557.
- 102- Wiley J. *Encyclopedia of Polymer Science and Enginenering*, New York, v.7, 1989; 783-805.
- 103- Witte F, Reifenrath Müller PP, Bormann D, Rudert M. Cartilage repair on magnesium scaffolds used as a subchondral bone replacement. *Mat-wiss. U. Werkstofftech*, 2006; 37: 504-508.
- 104- Yoshi F, Makuuchi K, Darwis D, Iriawan D, Razzar MT, Rosiak JM. Heat resistance poly (vinyl alcohol) hydrogel. *Rad Ohys Chem*. 1995; 46:169-174.