

*LUIZ FERNANDO GARRIDO*

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE IMPLANTES DE  
POLIETILENO E DE FOSFATO TRICALCIO,  
RECOBERTOS POR HIDROGEL,  
EM DEFEITOS OSTEOCONDRAIS  
NO JOELHO DE CÃES**

*CAMPINAS*

*2007*

**LUIZ FERNANDO GARRIDO**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE IMPLANTES DE  
POLIETILENO E DE FOSFATO TRICALCIO,  
RECOBERTOS POR HIDROGEL,  
EM DEFEITOS OSTEOCONDRAIS  
NO JOELHO DE CÃES**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Cirurgia, área de concentração Cirurgia*

***Orientador: Professor Doutor William Dias Belangero***

**CAMPINAS**

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G193a Garrido, Luiz Fernando  
Avaliação do desempenho de implantes de polietileno e de fosfato tricalcio, recobertos por hidrogel, em defeitos osteocondrais no joelho de cães / Luiz Fernando Garrido. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: William Dias Belangero  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Polietileno. 2. Próteses e implantes. 3. Implantes ortopédicos.  
4. Materiais biocompatíveis. I. Belangero, William Dias.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Performance evaluation in implants of polyethylene and tricalcium phosphate, covered by hydrogels, in Osteochondral defects in Dogs' knees**

**Keywords:** • Polyethylene  
• Protheses and Implants  
• Orthopaedic Implants  
• Biocompatible materials

**Titulação: Mestrado em Cirurgia**

**Área de concentração: Cirurgia**

**Banca examinadora: Prof Dr William Dias Belangero**

**Prof Dr Paulo Iamaguti**

**Prof Dr Vitor Baranauskas**

**Data da defesa: 27 - 02-2007**

---

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

---

---

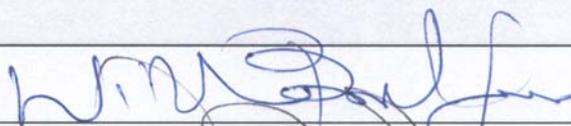
Orientador: Prof. Dr. William Dias Belangero

---

---

### Membros:

1. Prof. Dr. William Dias Belangero



2. Prof. Dr. Paulo Iamaguti



3. Prof. Dr. Vitor Baranauskas



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

---

Data: 27/02/2007

---

*À minha esposa  
Lucia Helena e  
meu filho,  
Rodrigo Henrique  
que permaneceram  
ao meu lado  
em todos os momentos difíceis  
incentivando e apoiando.....*

## *AGRADECIMENTOS*

---

Ao Professor Doutor William Dias Belangero, por ter permitido a realização deste estudo e pelos conhecimentos adquiridos no decorrer destes três anos.

À Faculdade de Ciências Médicas, pela oportunidade de poder usufruir de toda a sua estrutura física e dos conhecimentos nela adquiridos.

À Vanessa Petrilli Bavaresco e Nilza Alzira Batista pela paciência e companheirismo ilimitados, no decorrer destes três anos. Que a nossa amizade se fortaleça a cada dia.

Ao Dr. Waldo Lino Junior, pelo auxílio na execução da análise artroscópica.

Ao colega José Murashima Jr., pelo auxílio na execução das radiografias.

À Sra. Claudinete Vieira Leal, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Engenharia Mecânica - Unicamp, pela execução da microscopia eletrônica de varredura.

A todos os integrantes do Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (FCM-Unicamp): Ana Amélia Rodrigues, Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior, Sônia D. Rodrigues, enfim, a todos que direta ou indiretamente participaram deste estudo, seja na redação de um trabalho para congresso, ou mesmo com uma palavra de incentivo.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pela dedicação, carinho e atenção para comigo.

Ao Laboratório Ouro Fino pelos medicamentos cedidos para nossos cães.

Ao amigo Fernando Rodrigues, pelo companheirismo e lealdade durante estes anos juntos, nessa louca rotina de longas viagens pelas cidades da nossa região, operando nossos pacientes.

Ao amigo Armando Frasson, pelo riso nas horas boas e incentivo nas horas difíceis.

Aos amigos da Clínica Veterinária Jaguariúna, que suportaram de forma alegre e eficiente as minhas constantes ausências.

Ao meu cunhado Marcio Alexandre Alberto, por seu carinho e amizade sincera e leal.

Aos animais, que são a origem de toda a minha motivação, pela constante busca por seu bem estar.

*Nunca deixe que lhe digam que  
não vale a pena acreditar  
no sonho que se tem.....  
Quem acredita  
sempre alcança.....*

***(Renato Russo)***

	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xix</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxi</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>1.1- Cartilagem hialina: Anatomia, fisiologia e histologia</b> .....	24
<b>1.2- Processo de reparação da cartilagem hialina</b> .....	27
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	40
<b>2.1- Geral</b> .....	41
<b>2.2- Específico</b> .....	41
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1- Material</b> .....	43
3.1.1- Implantes osteocondrais.....	43
3.1.2- Avaliação da citotoxicidade do $\beta$ -TCP.....	43
3.1.2.1- Cultura Celular.....	43
3.1.2.2- Ensaio de Citotoxicidade Indireta.....	44
3.1.2.3- Ensaio de Citotoxicidade direta.....	44
3.1.2.4- Detalhes Experimentais.....	45
3.1.3- Animais.....	45
<b>3.2- Método</b> .....	45
3.2.1- Procedimento cirúrgico.....	45
3.2.2- Sacrificio dos animais.....	51

<b>3.3- Avaliação das amostras</b> .....	51
3.3.1- Análise macroscópica da superfície articular.....	52
3.3.1.1- Artrosopia.....	52
3.3.1.2- Macroscopia estereoscópica.....	53
3.3.2- Análise da interface implante - osso.....	53
3.3.2.1- Radiografia.....	53
3.3.2.2- Microscopia eletrônica de varredura (MEV - módulo retroespalhado).....	54
3.3.3- Análise Mecânica - ensaio de fluência à Indentação.....	55
3.3.4- Análise do mecanismo de desgaste.....	56
3.3.4.1- Microscopia eletrônica por varredura.....	56
3.3.5- Análise histológica.....	57
3.3.5.1- Microscopia óptica.....	57
3.3.6- Análise estatística.....	58
<b>4- RESULTADOS</b> .....	59
<b>4.1- Avaliação macroscópica <i>in vivo</i></b> .....	60
4.1.1- Artrosopia.....	60
4.1.2- Radiografia.....	61
<b>4.2- Avaliação macroscópica <i>in vitro</i></b> .....	63
4.2.1- Macroscopia Estereoscópica.....	63
<b>4.3- Avaliação mecânica <i>in vitro</i></b> .....	66
<b>4.4- Avaliação microscópica</b> .....	68
4.4.1- Microscopia eletrônica de varredura (módulo retroespalhado).....	68
4.4.2- Microscopia eletrônica de varredura.....	70
4.4.3- Microscopia óptica.....	74

<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	80
<b>5.1- Análise dos resultados obtidos</b> .....	80
5.1.1- Superfície articular.....	80
5.1.2- Interface implante/osso subcondral.....	81
5.1.3- Comportamento viscoelástico.....	83
5.1.4- Mecanismo de desgaste.....	83
5.1.5- Histologia.....	84
<b>6- CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	88

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

---

<b><math>\beta</math>-TCP</b>	$\beta$ -tricálcio fosfato
<b>pHEMA/poli(MMA-co-AA)</b>	Blenda de poli(2-hidroxi etil metacrilato) e pol(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)
<b>PEUAPM</b>	Polietileno de ultra-alto peso molecular
<b>MEC</b>	Matriz Extra Celular
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>MTS</b>	Máquina Universal de Ensaios Mecânicos

	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1</b> Apresentação dos grupos de estudo.....	48
<b>Tabela 2</b> Apresentação dos tipos de análises realizadas nos Grupos Experimental e Controle, em função do tipo e dos objetivos a serem atingidos.....	52
<b>Tabela 3</b> Apresentação dos resultados obtidos na avaliação da vascularização (membrana sinovial e ao redor do implante), do colapso do implante no seu sítio receptor (abaixo da superfície articular) e presença de tecido neoformado sobre o implante, em função do tipo de implante.....	60
<b>Tabela 4</b> Apresentação dos dados relativos à dimensão do leito receptor (cavidade óssea), presença de esclerose e de radioluscência, do Grupo Experimental, em função do tipo de implante.....	62
<b>Tabela 5</b> Apresentação dos dados relativos à dimensão do leito receptor (cavidade óssea), do Grupo Controle, em função do tipo de implante.....	62
<b>Tabela 6</b> Apresentação dos dados relativos à presença de vascularização (membrana sinovial e ao redor do implante), do implante e de tecido neoformado, em função do tipo de implante, realizado por meio da macroscopia estereoscópica, em função do tipo de implante.....	65
<b>Tabela 7</b> Apresentação dos dados relativos aos valores médios de deformação em milímetros, sofrida pelos implantes osteocondrais, sob a ação da carga do indentador.....	66
<b>Tabela 8</b> Apresentação dos dados relativos à presença de interface entre o implante e o osso, realizado por meio da microscopia eletrônica de varredura (módulo retro-espalhado), em função do tipo de implante.....	69

		<b><i>Pág.</i></b>
<b>Figura 1</b>	Apresentação da composição da cartilagem hialina.....	24
<b>Figura 2</b>	Apresentação de um corte histológico da cartilagem de joelho de cão, corado por hematoxilina eosina (HE), com objetiva de 5 vezes, notando-se a disposição das zonas que constituem a cartilagem articular.....	26
<b>Figura 3</b>	Imagem dos implantes osteocondrais: (A) $\beta$ -TCP pHEMA/poli(MMA-co-AA); (B) PEUAPM pHEMA/poli(MMA-co-AA) - 12x.....	43
<b>Figura 4</b>	Visualização da região intercondiliana do joelho, após a luxação medial da patela.....	46
<b>Figura 5</b>	Visualização da broca metálica com 5mm de diâmetro apresentando anel fixado a 5mm de sua extremidade.....	47
<b>Figura 6</b>	Visualização da intercondiliana do joelho, após a luxação medial da patela, com perfuração por meio de broca com 5mm de diâmetro.....	47
<b>Figura 7</b>	Visualização da região intercondiliana do joelho, após a luxação medial da patela, com o defeito osteocondral preenchido pelo implante de PEUAPM/HEMA/poli(MMA-co-AA).....	49
<b>Figura 8</b>	Visualização da região intercondiliana do joelho, após a luxação medial da patela, com o defeito osteocondral preenchido pelo implante de $\beta$ -TCP/HEMA/poli(MMA-co-AA).....	50
<b>Figura 9</b>	Esquema do dispositivo utilizado para o ensaio de indentação dos implantes osteocondrais de $\beta$ CP/pHEMA-(MMA-co-AA) e de PEUAPM/pHEMA-(MMA-co-AA). (A) Célula de carga; (B) indentador com ponta esférica; (C) água destilada (temperatura ambiente); (D) amostra inchada em água; (E) base do equipamento universal de ensaios (MTS).....	56

<b>Figura 10</b>	Esquema dos cortes realizados no cubo contendo os implantes osteocondrais para confecção das lâminas histológicas: (A) cubo de parafina com dimensão aproximada de 1cm <sup>2</sup> ; (B) Implante osteocondral; (C) Cortes efetuados.....	58
<b>Figura 11</b>	(A) Imagem artroscópica mostrando intensa neoformação vascular da membrana sinovial e colapso do implante composto por $\beta$ -TCP; (B) Imagem artroscópica mostrando ausência de Neoformação vascular e ausência do colapso do implante composto por PEUAPM.....	61
<b>Figura 12</b>	(A) Visualização radiográfica do implante composto por $\beta$ -TCP. Nota-se halo radioluscente ao redor do implante com aumento de diâmetro do defeito osteocondral; (B) Visualização radiográfica do implante composto por PEUAPM. Nota-se halo esclerótico ao redor do implante, com aumento de densidade óssea (scanner 2x).....	63
<b>Figura 13</b>	Visualização do sulco abrasivo na patela, avaliado por meio de macroscopia estereoscópica (A: aumento de 7x; e B: aumento de 12 x); (C) Patela - controle negativo (aumento de 7x).....	64
<b>Figura 14</b>	(A) Visualização de colapso do implante composto por $\beta$ -TCP, em relação à superfície articular adjacente; (B) Visualização da manutenção da integridade do implante composto por PEUAPM, em relação à superfície articular adjacente.....	65
<b>Figura 15</b>	(A) Visualização de acentuado crescimento tecidual e colapso do implante composto por $\beta$ -TCP; (B) visualização de crescimento tecidual ao redor e sobre o implante composto por PEUAPM.....	66
<b>Figura 16</b>	(A) Visualização da interface entre o implante composto por $\beta$ -TCP e o osso subcondral (MEV-modulo retroespalhado) - aumento de 15x; (B) Nota-se ausência de interface entre o implante composto por PEUAPM e o osso subcondral MEV-modulo retroespalhado) - aumento de 15x.....	69

<b>Figura 17</b>	(A) Detalhe da Figura 14-A, evidenciando a perda do formato original do implante $\beta$ -TCP, bem como a existência de interface entre o implante composto por $\beta$ -TCP e o osso subcondral (MEV-módulo retroespalhado) - aumento de 50x; (B) Detalhe da Figura 14-B, evidenciando a manutenção do formato original do implante composto por PEUAPM e a ausência de interface com o osso Subcondral (MEV-módulo retroespalhado) - aumento de 50x.....	70
<b>Figura 18</b>	(A) Microscopia Eletrônica de Varredura (côndilo). Imagem geral - aumento de 10x - $\beta$ -TCP- Verifica-se artefato gerado pela desidratação do hidrogel não contida pela matriz de $\beta$ -TCP; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (côndilo). Imagem geral - aumento de 10x - PEUAPM - Não se observa artefato devido a secagem do implante osteocondral.....	71
<b>Figura 19</b>	(A) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela) (controle positivo - sem mecanismo de desgaste) - aumento 500x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela) (controle negativo - com mecanismo de desgaste) - aumento 150x.....	71
<b>Figura 20</b>	(A) Microscopia Eletrônica de Varredura - patela submetida ao tempo de seguimento de 9 meses Matriz PEUAPM. Verificam-se nitidamente duas regiões morfológicamente distintas (I e II) - aumento 10x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura - patela. Controle positivo (sem mecanismo de desgaste - aumento 10x).....	72
<b>Figura 21</b>	(A) Microscopia Eletrônica de Varredura - patela. Detalhes região I da micrografia da Figura 18-A - aumento 500x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela). Detalhes região Ida micrografia da Figura 18-A - aumento 1500x.....	72

<b>Figura 22</b>	(A) Microscopia Eletrônica de Varredura - patela submetida ao tempo e seguimento de 9 meses matriz de $\beta$ -TCP - Verificam-se nitidamente duas regiões morfológicamente distintas (I e II) aumento 10x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura - patela controle positivo (sem mecanismo de desgaste - aumento 10x).....	73
<b>Figura 23</b>	(A) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela) Detalhes região I da micrografia da figura 20-A aumento 500x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela). Detalhes região I da micrografia da Figura 20-A - aumento 1500x.....	73
<b>Figura 24</b>	(A) Visão panorâmica do implante composto por $\beta$ -TCP. Nota-se mesmo em menor aumento a presença significativa de tecido fibroso ao redor do implante (HE: Fotografado com objetiva de 2,5x); (B) Visão panorâmica do implante composto por PEUPM. Observa-se uma quantidade bastante discreta de material fibroso ao redor do implante (HE: Fotografado com objetiva de 2,5x).....	74
<b>Figura 25</b>	(A) Região de contato entre o implante composto por $\beta$ -TCP e o osso subcondral. Observa-se material fibroso espesso (HE: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de contato entre o implante composto por PEUPM e o osso subcondral. Observa-se praticamente somente tecido ósseo (HE: Fotografado com objetiva de 5x).....	75
<b>Figura 26</b>	(A) Região de transição entre a cartilagem hialina, e o implante composto por $\beta$ -TCP e o tecido fibroso neoformado (HE: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de transição entre a cartilagem hialina, e o implante composto por PEUPM e o tecido fibroso neoformado (HE: Fotografado com objetiva de 5x).....	75

- Figura 27** (A) Visão panorâmica do implante composto por  $\beta$ -TCP. Nota-se mesmo em menor aumento a presença significativa de tecido fibroso ao redor do implante (TM: Fotografado com objetiva de 2,5x); (B) Visão panorâmica do implante composto por PEUPM. Observa-se uma quantidade bastante discreta de material fibroso ao redor do implante (TM: Fotografado com objetiva de 2,5x)..... 76
- Figura 28** (A) Região de contato entre o implante composto por de  $\beta$ -TCP e o osso subcondral. Observa-se nesse aumento material fibroso espesso (TM: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de contato entre o implante composto por PEUPM e o osso subcondral. Observa-se praticamente somente tecido ósseo (TM: Fotografado com objetiva de 5x)..... 76
- Figura 29** (A) Região de transição entre a cartilagem hialina e o implante composto por  $\beta$ -TCP e o tecido fibroso neoformado (TM: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de transição entre a cartilagem hialina e o implante composto por PEUPM e o tecido neoformado (TM: Fotografado com objetiva de 5x)..... 77

	<i>Pág.</i>
<b>Gráfico 1</b> Relação da deformação apresentada pelo implante composto por matriz polimérica, quando submetido à carga, em função do tempo.....	67
<b>Gráfico 2</b> Relação da deformação apresentada pelo implante composto por matriz cerâmica, quando submetido à carga, em função do tempo. Evidente ausência de resistência mecânica apresentada por esta matriz.....	68

***RESUMO***

Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho *in vivo*, de implantes cilíndricos com altura e diâmetro de 5mm formados por cerâmica  $\beta$ -tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) ou polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM) todos recobertos com hidrogel de poli (2-hidroxi etil metacrilato) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (75:25) (pHEMA/poli (MMA-co-AA)) para preencher defeitos osteocondrais nos joelhos direito e esquerdo de cães. Foram operados treze cães machos com peso entre 15 e 25 kg fornecidos pelo Canil do Centro Multi Institucional de Bioterismo da Unicamp, sem raça definida, em bom estado de nutrição, vacinados após período prévio de quarentena. Cinco cães foram utilizados como controle e oito foram seguidos por nove meses após a colocação dos implantes. Os implantes de cerâmica foram colocados no sulco troclear do joelho direito e os de polietileno no joelho esquerdo. Foram realizadas análises da superfície do implante macroscópica (*in vivo* e *in vitro*), mecânica e microscópica, com a finalidade de avaliar a formação de tecido sobre o implante, o seu desgaste, o seu desempenho viscoelástico e a interface formada entre o implante e o tecido ósseo. Os implantes de cerâmica apresentaram desempenho inferior ao polimérico, em todos os critérios avaliados. Embora não tenha havido desgaste significativo na superfície do hidrogel os dois implantes estudados produziram abrasão na superfície da patela.

**Palavras-chave:** Defeito osteocondral, pHEMA, Biomateriais.

***ABSTRACT***

This study had the purpose of evaluating “in vivo” the performance of  $\beta$ -TCP ceramic or extreme high molecular weight polyethylene cylindrical implants, with height and diameter of 5mm, all covered with poly(2-HEMA) – poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid) hydro gel (polyHEMA/poly(MMA-co-AA) (75:25) in order to fill in bone defects in both the right and left knees of dogs. Thirteen male dogs weighting between 15 and 25kg, supplied by UNICAMP’s Centro Multi Institucional de Bioterismo, were operated. All the dogs were well nourished, vaccinated and the operation took place after a previous quarantine period. Five dogs were used as control and eight were followed for nine months after putting the implants. The ceramic implants were placed in the right knees and the polyethylene ones in the left knees. Macroscopic, mechanic and microscopic analyses of the implant surface, (both in vivo and in vitro) were performed, in order to evaluate the tissue formation on the implant, the wearing off of the implant, the viscoelastic performance and the interface between the implant and the bone tissue. The ceramic implants presented an inferior performance when compared to the polymeric ones, in all of the evaluated aspects. Although there was no significant degradation on the hydro gel surface, both studied implants produced erosion on the kneecap surface.

**Key words:** Osteochondral defect, pHEMA, Biomaterials.

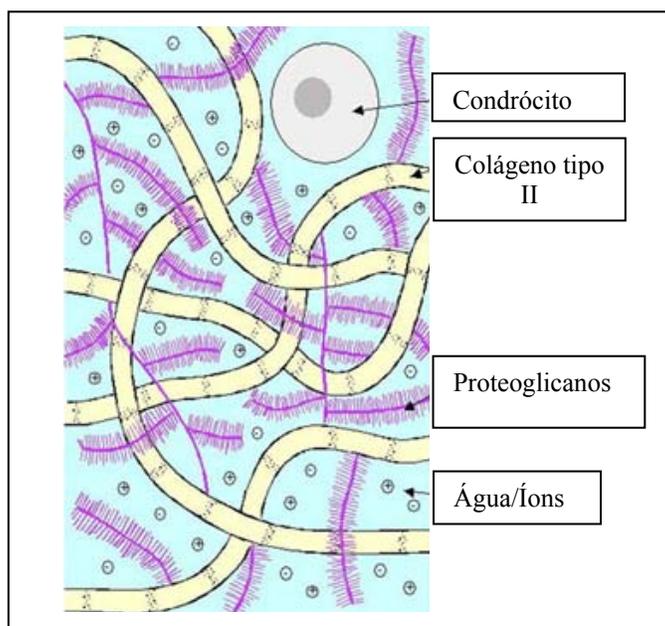
# ***1- INTRODUÇÃO***

## 1.1- Cartilagem hialina: Anatomia, fisiologia e histologia

A cartilagem hialina é um tecido denso, translúcido, de consistência firme com aspecto macroscópico branco-azulado, situado principalmente nas extremidades dos ossos longos que compõem as articulações diartrodiais (COTRAN, 2000). Nos mamíferos, a sua espessura média é de 5 mm, sendo que esta medida varia em função da espécie, da articulação avaliada e da região onde se efetua a mensuração (BOJRAB,1996).

A principal função da cartilagem hialina é absorver e distribuir a carga recebida sobre o osso subcondral e isso ocorre porque sua constituição cria um ambiente intra articular de baixa fricção, com lubrificação, o que possibilita movimentos articulares repetitivos indolores por até oito décadas, ou mais, em seres humanos (BUCKWALTER, 2000).

Basicamente, a cartilagem hialina compõe-se de condrócitos (em torno de 10%) e de uma densa matriz extracelular, constituída por fibras de colágeno tipo II (10-20%), proteoglicanos (10-15%) e água (60-80%). Essa constituição é que confere à cartilagem hialina sua estrutura e propriedades mecânicas (BUCKWALTER, 2000; PIERMATTEI, 2006; WITTE, 2006) (Figura 1).



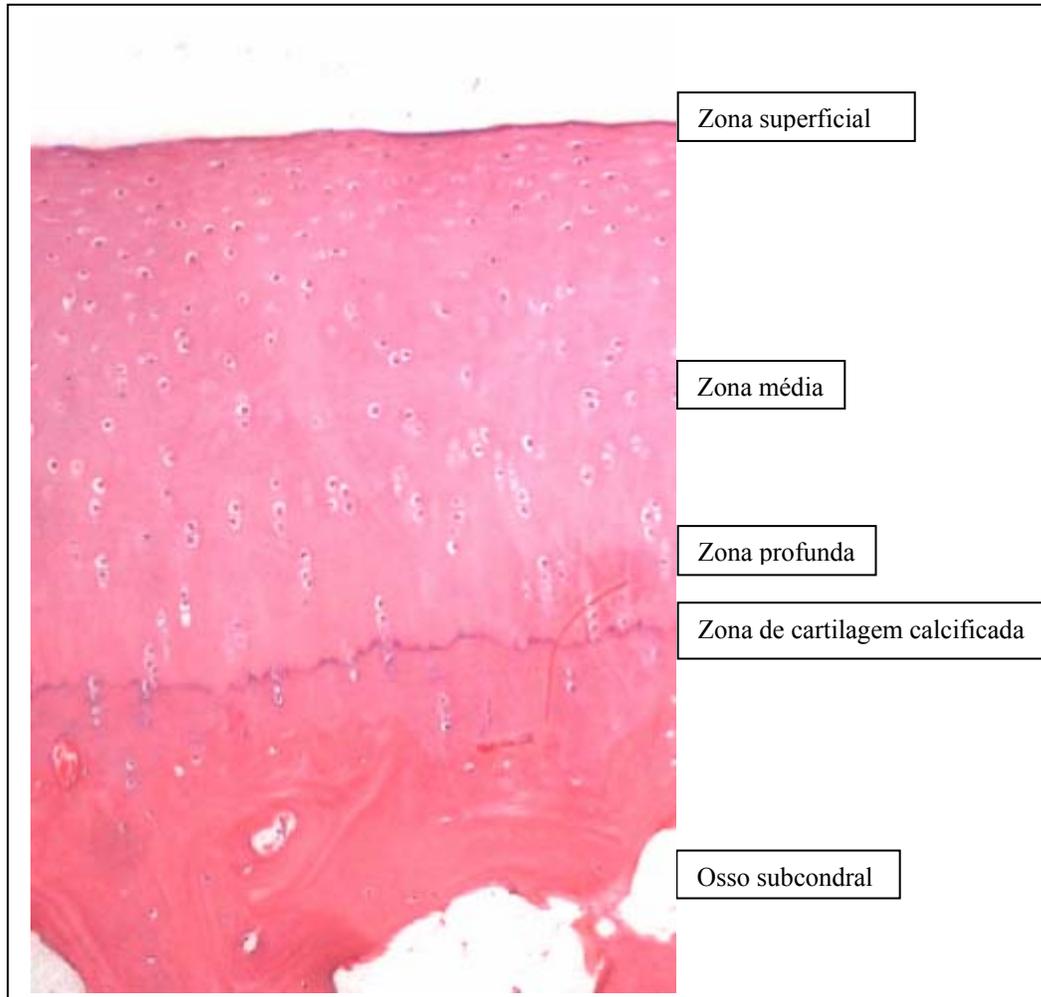
**Figura 1-** Apresentação esquemática da composição da cartilagem hialina (Modificado de [www. bidmc.harvard.edu](http://www.bidmc.harvard.edu)).

Por se tratar de um tecido avascular, a nutrição dos condrócitos ocorre por difusão, ou seja, a partir do líquido sinovial, passando pela matriz extracelular, até atingir os condrócitos. Em animais jovens, a linha de crescimento que separa o tecido ósseo do tecido cartilaginoso ainda não está calcificada e, desse modo, é possível que a nutrição dos condrócitos ocorra também a partir do osso subcondral (BUCKWALTER, 2000).

No caso de lesões, decorrentes principalmente de atividade física exacerbada e traumas, a baixa capacidade de regeneração pode ser justificada, em parte, por esse tecido ser avascular. Além disso, por não ser um tecido inervado, a percepção da dor e da propriocepção depende das terminações nervosas da cápsula articular e do osso subcondral (BOJRAB, 1996; FOSSUM, 2002).

Quanto à organização da cartilagem articular, esta pode ser subdividida, para fins didáticos, em quatro zonas distintas (PIERMATTEI, 2006):

- 1) **Zona Superficial:** Camada delgada (10-20% da espessura total), denominada de superfície de deslizamento, constituída por finas fibras de colágeno tipo II, situadas paralelas à superfície da cartilagem hialina, com condrócitos de forma achatada, dispostos paralelamente à superfície articular. Nessa camada há baixa concentração de proteoglicanos e água.
- 2) **Zona de Transição ou média:** Camada mais espessa, com 40-60% da espessura total. Os condrócitos têm forma arredondada e as fibras de colágeno têm maior diâmetro, dispostas aleatoriamente.
- 3) **Zona Profunda:** Camada com espessura equivalente a 30% da espessura total. Do mesmo modo que na zona anterior, as fibras de colágeno tipo II também têm grande diâmetro, porém aqui elas estão organizadas e dispostas perpendicularmente à superfície articular. Os condrócitos são arredondados e encontrados em maior número que na zona de transição. Além disso, na zona profunda há maior concentração de proteoglicanos e menor teor de água, especialmente na sua camada mais profunda.
- 4) **Zona de Cartilagem Calcificada:** Composta por condrócitos pequenos e irregulares, essa pode ser considerada uma região de transição entre o tecido cartilaginoso, propriamente dito, e o osso subcondral. Por ser calcificada, ela é menos elástica que a cartilagem hialina e menos rígida que o osso subcondral, transferindo assim de forma mais amena as solicitações mecânicas da cartilagem articular para o osso subcondral.



**Figura 2-** Apresentação de um corte histológico da cartilagem de joelho de cão, corado por hematoxilina eosina (HE), com objetiva de 5 vezes, notando-se a disposição das zonas que constituem a cartilagem articular.

A matriz extracelular da cartilagem hialina pode ser subdividida em três regiões (pericelular, territorial e interterritorial), disposta ao redor do condrócito. Essas regiões diferem entre si em função do conteúdo, diâmetro e organização das fibras de colágeno.

A região pericelular, como o próprio nome diz, circunda o condrócito e é formada por proteoglicanos e poucas fibras de colágeno. Já a região territorial, circunda a região pericelular e é constituída por finas fibras de colágeno, que formam uma rede.

A região interterritorial é a maior das regiões e contribui com a maior parte das propriedades mecânicas da cartilagem hialina. Nela estão contidas as fibras de colágeno maiores e a maioria dos proteoglicanos (BUCKWALTER, 2000).

## **1.2- Processo de reparação da cartilagem hialina**

A inflamação é uma reação de defesa do organismo, frente a vários agentes externos. A principal característica do processo inflamatório é a alteração vascular local, mediada por fatores químicos, derivados de proteínas ou células plasmáticas, que acarreta migração e ativação de leucócitos e alterações sistêmicas que levam ao acúmulo de fluidos ao redor da região afetada (KUMAR et al., 2005).

A reação inflamatória está intimamente associada ao processo de reparo de um tecido. Durante a fase de reparação cabe a ela, isolar, destruir e diluir o agente, desencadeando uma série de eventos. O tecido danificado é substituído pela regeneração de células parenquimatosas nativas e pelo seu preenchimento por tecido fibroso (KUMAR et al., 2005).

A cicatrização é, em geral, uma resposta tecidual (1) a um ferimento, (2) aos processos inflamatórios nos órgãos internos, ou (3) à necrose celular em órgãos incapazes de regeneração. A cicatrização consiste em dois processos distintos: regeneração e deposição de tecido fibroso ou formação cicatricial. A regeneração requer uma arquitetura de tecido conjuntivo intacto. Ao contrário, é possível ocorrer cicatrização mesmo estando a estrutura da matriz extracelular (MEC) danificada. A regeneração envolve a restituição dos componentes teciduais idênticos aqueles removidos ou destruídos. Ao contrário, a cicatrização, é uma resposta proliferativa de tecido fibroso, apenas preenchendo o local de lesão (KUMAR et al., 2005).

O processo de reparação é um fenômeno complexo, que envolve os seguintes processos: indução de um processo inflamatório em resposta à lesão inicial, com remoção de tecido danificado; proliferação e migração de células teciduais parenquimatosas e conjuntivas; formação de novos vasos sanguíneos; síntese de matriz extracelular (MEC) e deposição de colágeno; remodelação tecidual; contração da ferida e aquisição de resistência da ferida.

Nem todos esses eventos ocorrem em toda reação de reparação. Este processo é influenciado por muitos fatores, incluindo o ambiente e a extensão do dano tecidual; a intensidade e duração do estímulo; condições que inibem a reparação, como por exemplo, a presença de corpos estranhos e doenças, como o diabetes.

Órgãos como pele, rim, pulmão e cérebro, são reparados pela formação de um tecido cicatricial, constituído por fibras de colágeno, ao passo que o osso, e eventualmente o tendão, se reparam formando o tecido original (MANKIN, 1982; JACKSON, 2001).

Didaticamente, é possível subdividir o processo de regeneração de um tecido, em três fases: necrose, inflamação e reparo (MANKIN, 1982; COOK, 2003). Assim sendo, torna-se nítida a capacidade limitada da cartilagem hialina em se restabelecer, por ser este tecido avascular e não possibilitar a instalação do processo inflamatório no foco de lesão.

Lesões superficiais da cartilagem hialina que não atinjam o osso subcondral, normalmente não cicatrizam (SLATTER, 1998). Nesse tipo de lesão, a degeneração da cartilagem hialina ocorre a partir da zona superficial, onde se visualiza finas porções de fibras de colágeno com aspecto descamativo. Com o tempo, o dano progride e é possível visualizar fissuras verticais na cartilagem articular, produzindo macroscopicamente aspecto irregular e sem brilho da mesma (FRENKEL, 2005).

Por outro lado, o reparo do defeito da cartilagem hialina que atinge a região do osso subcondral (defeitos osteocondrais) difere da anterior por desencadear um processo inflamatório, mediado por células presentes na corrente sanguínea, já que a região atingida é ricamente vascularizada. Defeitos osteocondrais são preenchidos imediatamente por sangue, que evolui para a formação de um coágulo de fibrina, com hemácias, leucócitos, plaquetas e outras células da medula óssea. A população de células mesenquimais e indiferenciadas multiplicam-se, a fim de formar um tecido fibrovascular. Esse tecido rico em fibras de colágeno e brotos vasculares evolui para tornar-se um tecido fibrocartilaginoso e, eventualmente, dependendo dos estímulos mecânicos e biológicos, um tecido cartilaginoso. Na base do defeito, na região em contato com o osso subcondral, ocorre neoformação óssea, que se estende na direção da articulação. Por razões ainda não esclarecidas, a formação de tecido ósseo geralmente é interrompida na zona de transição, permitindo que o defeito remanescente seja preenchido com o tecido fibrocartilaginoso (MANKIN, 1982; BOJRAB, 1996; BUCKWALTER, 2000; WITTE, 2006).

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

O processo de reparação de defeitos osteocondrais, produzidos artificialmente, são uma forma de se estudar e de se entender o processo de cicatrização da cartilagem hialina.

Em geral os defeitos osteocondrais podem se auto-reparar e isso depende do animal, dimensão e localização do defeito. Para o estudo de procedimentos de materiais que possam substituir o tecido cartilaginoso na sua função, é fundamental que se testem materiais e procedimentos em defeitos osteocondrais produzidos artificialmente.

As alternativas para se solucionar as perdas ou falhas da cartilagem articular seguem duas linhas: a primeira visa restabelecer a falha por meio de um tecido fibrocartilaginoso (ou eventualmente cartilaginoso), proveniente da perfuração do osso subcondral na região lesada e, a segunda, visa substituir o tecido cartilaginoso por um material inerte, com características físico-químicas semelhantes esse tecido.

Com relação à primeira alternativa, vários procedimentos cirúrgicos experimentais com o uso de animais foram desenvolvidos nas últimas décadas.

MITCHELL et al. (1976), por exemplo, realizaram experimento no côndilo femoral do joelho de 25 coelhos. Em um dos lados fizeram curetagem e, no lado oposto, além da curetagem foram feitas perfurações de 20 a 30 perfurações, com 1 mm de diâmetro cada. Após o período de seguimento (um, dois, quatro, oito e doze meses), os animais foram sacrificados e foi realizada análise histológica. Os autores verificaram que no lado em que foi realizada a curetagem mais a perfuração do osso subcondral, os defeitos foram

preenchidos por tecido fibrocartilaginoso, enquanto que no lado oposto isso não ocorreu. Esse achado pode ser justificado pela falta de aporte vascular na região em que foi realizada somente a curetagem.

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

Utilizando a mesma espécie para experimentação, MOW et al (1991) realizaram defeito osteocondral de 4 mm no côndilo medial do fêmur de 55 animais e esses foram preenchidos com periósteo autólogo. Segundo os autores, em 70% dos animais os implantes apresentaram propriedades biomecânicas e bioquímicas semelhantes à cartilagem articular normal, porém os resultados não se mantiveram ao longo do tempo.

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

COSTA et al. (2001) produziram defeitos de 3,5 mm diâmetro e 5,0 mm de profundidade nos joelhos direito e esquerdo de 15 coelhos adultos, com os objetivos de: a) avaliar a utilização da matriz óssea desmineralizada (MOD) no processo de reparação

das lesões osteocondrais, b) analisar a capacidade de neoformação óssea e integração com o tecido ósseo subcondral adjacente e, c) analisar sua capacidade de indução condrogênica. Nos joelhos esquerdos o defeito foi preenchido com matriz óssea desmineralizada de cadáveres humanos, enquanto que nos joelhos direitos o defeito permaneceu vazio. Os animais foram seguidos por 2, 4 e 6 semanas de pós-operatório. A análise dos dados demonstrou que houve predomínio de formação de tecido de reparação e preenchimento total da lesão, com características planas e regulares nos grupos experimentais. No grupo controle os autores observaram a produção de um tecido de reparação que preenchia parcialmente a lesão. Concluíram os autores que a MOD é um tecido firme, com características elásticas, que pode ser moldado facilmente, o que facilita o preenchimento de lesões osteocondrais.

CHIANG et al. (2005) avaliaram o preenchimento de defeitos osteocondrais com 7 mm de diâmetro, produzidos em 48 cêndilos femorais de joelhos de porcos adultos, seguidos por um período de seis meses. Os defeitos foram preenchidos com gel de colágeno contendo condrócitos, utilizando a seguinte técnica: primeiro os enxertos de periósteo foram suturados nas bordas do defeito osteocondral com fio absorvível, depois o mesmo foi preenchido com o gel contendo condrócitos e , por fim foi utilizada uma cola de fibrina como selante sobre o enxerto de periósteo. Os autores referem que a fibrose intra articular foi um achado comum em todas as articulações, principalmente ao redor do local do implante e, além disso, que foi evidenciado tecido cartilaginoso firme, branco e elástico nos defeitos produzidos. Não fica evidente no estudo a profundidade do defeito osteocondral, porém, como os autores relatam que não houve sangramento na confecção do defeito, pode-se pressupor que o mesmo não atingiu o osso subcondral. Também não fica claro como foi realizada a formação dos grupos. Sabe-se apenas que esses foram constituídos por três grupos, sendo um experimental, outro com defeito vazio e um terceiro era nulo.

RUDERT et al. (2005) compararam o uso de dois implantes (matriz biológica e matriz polimérica de ácido poli láctico, ambos preenchidos com condrócitos) no preenchimento de defeitos osteocondrais com 3 mm de diâmetro, produzido no sulco troclear dos joelhos de 33 coelhos. Após 6 semanas de seguimento, a maior parte dos defeitos havia sido preenchido com tecido mais claro, até nível do tecido cartilaginoso

vizinho, independente do tipo de implante utilizado. A análise macroscópica após 12 meses de estudo não mostrou diferença significativa entre o desempenho biológico dos dois implantes. A avaliação microscópica demonstrou variabilidade no desempenho dos implantes, sendo que implante de matriz biológica apresentou desempenho superior. Tais resultados satisfatórios foram percebidos até 6 meses de seguimento do estudo, quando os implantes começaram a se degenerar.

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

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

MESSNER & GILLQUIST (1993), compararam o desempenho de dois polímeros diferentes [poliéster e poliuretano tetrafluoretileno (PTFE)] no preenchimento de defeitos osteocondrais (3 mm de diâmetro), produzidos no côndilo

femoral dos joelhos de 30 coelhos adultos. Ao final do tempo de seguimento (três meses), os autores referem que todos os reparos foram associados à sinovite, sendo que nos joelhos preenchidos com o PTFE essa inflamação foi mais freqüente. Soltura do polímero na região intra-articular foi verificada em alguns reparos e, além disso, referem que a maioria dos implantes apresentou frouxidão em relação às bordas do defeito osteocondral. Por esses motivos, os autores concluíram que nenhum implante possibilitou a restauração adequada da superfície articular.

HASEGAWA et al. (1999), por outro lado, avaliaram o desempenho biológico de um implante osteocondral tridimensional, composto de polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM) e hidroxiapatita pulverizada em sua superfície. O defeito osteocondral, com dimensão de 5 x 10 x5 mm, foi produzido no sulco troclear de um dos joelhos de coelhos adultos. O lado contralateral foi utilizado como controle. Os animais foram divididos em cinco grupos e seguidos por um período de 2, 4, 8, 12 e 24 semanas. Segundo os autores, o fato dos implantes terem ficado firmes e imóveis desde a sua implantação favoreceu a formação de tecido ósseo adjacente ao osso subcondral. Além disso, relatam que houve formação de um tecido de aspecto macroscópico semelhante ao cartilaginoso sobre uma parte da superfície do implante e concluem que esse resultado foi decorrente do atrito do implante com a contra superfície da patela.

A qualidade do reparo osteocondral com o uso de enxerto composto por coral foi avaliada por SHAHGALDI (1998). Os autores produziram 48 defeitos osteocondrais (4 mm de diâmetro), no sulco troclear do joelho de 24 coelhos adultos. Em vinte e quatro defeitos osteocondrais foi introduzido o implante composto por coral e os demais permaneceram vazios. Cortes histológicos foram obtidos com 3 e 6 meses de seguimento e após análise os autores constaram que houve reabsorção gradativa do coral, com preenchimento de tecido ósseo local. Aos 6 meses, o aspecto macroscópico da superfície do implante era semelhante ao tecido cartilaginoso vizinho.

Em 2000, DIDUCH et al. preencheram defeitos osteocondrais (3 x 6 mm), produzidos no côndilo femoral do joelho de 12 coelhos adultos, com três diferentes substratos, embebidos por células mesenquimais: agarose, alginato de cálcio e colágeno tipo I. Após seguimento de oito semanas os autores relataram aumento na concentração de

proteoglicanos e de fibras de colágenos tipo II nas suspensões que continham agarose e alginato de cálcio e, além disso, havia nesses grupos maior potencial condrogênico que os demais.

MIERISH et al. (2002) utilizaram fator  $\beta$  de crescimento de fibroblastos (TGF- $\beta$ ), disperso em gel de alginato de cálcio, para avaliar defeitos osteocondrais de 4 x 3 mm de diâmetro. Foram operados 33 coelhos, subdivididos em 3 grupos: no primeiro, com 9 animais, os defeitos foram preenchidos com gel de alginato de cálcio; no segundo, com 18 animais, os defeitos foram preenchidos com gel de alginato de cálcio e TGF- $\beta$ ; no terceiro, com 8 animais, os defeitos permaneceram vazios. Após período de 6 e 12 semanas de seguimento os autores encontraram aumento significativo na qualidade do tecido de reparo no grupo que continha TGF- $\beta$ . Esses resultados são semelhantes aos obtidos por FUKUDA et al. (2005), que avaliaram defeito osteocondral em joelhos de coelhos (com 6 mm de diâmetro), preenchidos com poli etileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM) embebido em TGF- $\beta$ .

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

COOK et al. (2003) desenvolveram defeitos osteocondrais de 5 x 6 mm de diâmetro no côndilo femoral dos joelhos de 65 cães adultos e avaliaram a capacidade de preenchimento de dispositivos que continham proteína osteogênica recombinante humana (OP-1). No total foram realizados 76 defeitos, que receberam o implante com ou sem a adição de carboximetilcelulose, como auxiliar para retenção do implante. Outros 54 defeitos (denominados controle) foram preenchidos com osso bovino, sem colágeno, com ou sem a adição de carboximetilcelulose. Os implantes foram avaliados macroscópica e histologicamente após períodos de 16, 26 e 52 semanas. Analisando os

resultados obtidos, os autores concluíram que o OP-1 induziu o crescimento de um tecido com aspecto semelhante ao tecido cartilaginoso, com preenchimento completo do defeito osteocondral e sem apresentar degradação significativa ao término do estudo.

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

FRENKEL et al. (2005), implantaram ácido poliláctico recobertos por colágeno ou por ácido hialurônico/quitosan em defeitos osteocondrais de 3 x 2,8 mm, produzidos no côndilo femoral de coelhos. Após 24 semanas de estudo concluíram que os dois dispositivos foram capazes de estimular a formação de tecido semelhante ao tecido cartilaginoso.

Já UEMATSU et al. (2005), implantaram ácido poli-láctico glicólico (PLGA) embebido por células tronco mesenquimais (MSC) em defeitos osteocondrais de 5 x 1,5 mm, produzidos no sulco troclear de ambos os joelhos de 20 coelhos adultos. Em um dos lados foi implantado o dispositivo composto por MSC/PLGA. No lado contralateral, 10 animais receberam um dispositivo composto apenas por MSC e os outros 10 animais foram utilizados como grupo controle, persistindo o defeito vazio durante as 12 semanas de estudo. Os resultados mostraram que nos defeitos onde se utilizou MSC/PLGA houve formação de um tecido branco, liso e brilhante, macroscopicamente semelhante à cartilagem articular.

Mais recentemente, SHAO et al. (2006) também utilizaram células tronco mesenquimais sobre a matriz polimérica em coelhos. Inicialmente, os resultados foram semelhantes aos relatados por UEMATSU et al. (2005), porém, após 6 meses de seguimento os implantes apresentaram perda da integração com a margem de cartilagem articular vizinha, além de fissura.

A reparação anatômica do osso subcondral, por oferecer estabilidade mecânica e suporte vascular, é uma etapa importante para a regeneração da cartilagem articular. WITTE et al. (2006) compararam o desempenho mecânico de implantes osteocondrais, compostos por magnésio (com poros de diferentes tamanhos) e enxerto ósseo autólogo. Os defeitos foram realizados no sulco troclear do joelho de 26 coelhos adultos e o tempo de seguimento foi de 24 semanas. Os autores concluíram que o implante composto por magnésio, mesmo sendo reabsorvido, apresentou suporte mecânico semelhante ao enxerto ósseo no decorrer das primeiras 12 semanas do estudo.

SUOMINEN et al. (2006) compararam o uso de implantes de hidroxiapatita e de vidro bioativo de 4 mm de diâmetro, introduzidos em defeitos osteocondrais produzidos no sulco troclear dos joelhos de 18 coelhos adultos. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos em três grupos: o primeiro grupo recebeu implante de hidroxiapatita, o segundo vidro bioativo e o terceiro um compósito formado por ambos os materiais. Os autores relatam que os três implantes apresentaram capacidade inicial de restauração da superfície da cartilagem articular, com formação de tecido semelhante ao tecido cartilagenoso. No entanto, referem que, por ter sido degradado rapidamente, o implante contendo compósito não ofereceu sustentação mecânica duradoura.

KANDEL et al. (2006) desenvolveram um dispositivo básico composto por polifosfato de cálcio, recoberto por cultura autóloga de condrócitos. Neste estudo, foram produzidos 29 defeitos osteocondrais (4 x 6 mm de diâmetro) no sulco troclear de joelhos de 12 carneiros. Em cada um dos joelhos um dos defeitos permaneceu vazio e foi utilizado como controle. Os animais foram seguidos por 9 meses e ao final desse tempo os autores concluíram que os implantes apresentaram evidências de fusão do implante ao tecido cartilagenoso adjacente, com fixação ao osso subcondral.

A procura por novas opções de materiais possíveis de serem utilizados para preenchimento de defeitos osteocondrais, persiste, tendo em vista que nenhum material pesquisado até os dias de hoje, apresentou desempenho mecânico satisfatório em longo prazo.

O uso de biomateriais poliméricos como enxerto no reparo de defeitos osteocondrais, dentre estes os hidrogéis, iniciou-se na década de 70, continuando até os dias atuais. Trata-se de uma classe de materiais com grande potencial para ser estudada para o

reparo de defeitos osteocondrais, pois são biocompatíveis, fáceis de produzir e manusear (BRAY & MERRYL, 1973; PEPPAS & MERRYL, 1977; KON & DE VISSER, 1981; CORKHILL, 1990; MOW, 1991; PATELL, 1994; DOWNES, 1994; REISSIS, 1995; MALMONGE et al. 1997(a); MALMONGE et al.1997(b); MALMONGE et al, 2000).

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

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

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

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

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

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

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

O polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) é um homopolímero linear de etileno com densidade em torno de 0,93g/cm<sup>3</sup> e peso molecular acima de um milhão de gramas por mol. Sua estrutura molecular é composta por ligações covalentes C-C, e quando em estado sólido, são semicristalinos (ORÉFICE, 2006). Além das características de superfície não aderente, baixo coeficiente de atrito e boa resistência mecânica, o PEUAPM apresenta alta resistência ao impacto e ao desgaste devido as grandes extensões de regiões amorfas (WANG,1998).

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

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

## ***2- OBJETIVOS***

## **2.1- Geral**

Avaliar o desempenho biológico e mecânico de implantes osteocondrais compostos por PEUAPM e  $\beta$ -TCP recobertos por hidrogel de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) no reparo de defeitos osteocondrais no joelho de cães.

## **2.2- Específico**

- Avaliar a interface entre os implantes e o tecido ósseo;
- Avaliar a superfície dos implantes em relação à cartilagem articular adjacente;
- Avaliar a complacência dos implantes;
- Avaliar o desgaste dos implantes e das patelas.

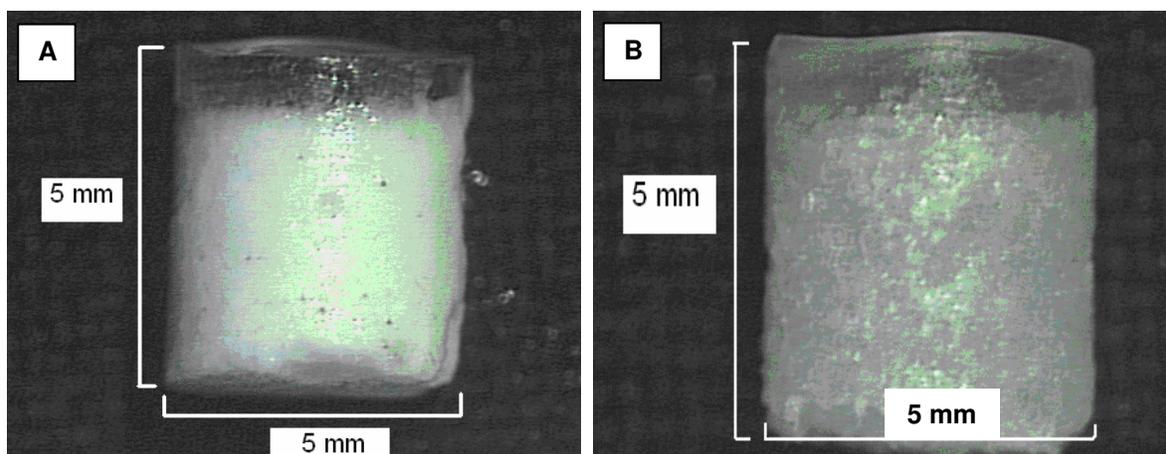
### ***3- MATERIAL E MÉTODOS***

### 3.1- Material

#### 3.1.1- Implantes osteocondrais

Foram confeccionados implantes compostos por matrizes de  $\beta$ -TCP (beta tricálcio fosfato) e PEUAPM (poli etileno de ultra alto peso molecular) com recobrimento de pHEMA/poli(MMA-co-AA) [(poli(2-hidroxi etil metacrilato) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (75:25), com 5 mm de altura x 5 mm de diâmetro, desenvolvidos por BAVARESCO (2003) para o preenchimento de defeitos osteocondrais de joelhos de cães.

Após a confecção, os implantes foram devidamente lavados em água deionizada e, a seguir, foram imersos em solução de NaCl 0,15M, até que atingissem valor de pH constante (igual a 7,0) e esterilizados em autoclave (100°C/30 min) (Figura 3).



**Figura 3-** Imagem dos implantes osteocondrais: (A)  $\beta$ -TCP pHEMA/poli(MMA-co-AA); (B) PEUAPM pHEMA/poli(MMA-co-AA) - 12x

#### 3.1.2- Avaliação da cito toxicidade do $\beta$ -TCP

##### 3.1.2.1- Cultura Celular

Foram utilizadas as células VERO, uma linhagem celular tipo fibroblastos originários do rim do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) obtidas originalmente junto ao Instituto Adolfo Lutz, localizado na cidade de São Paulo-SP.

Estas células foram mantidas em meio Ham F-10<sup>1</sup> suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino<sup>2</sup> a 37°C. As células VERO são uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais (ISO, 1992, KIRKIPATRIC, 1992), foram utilizadas para o desenvolvimento do Ensaio de Citotoxicidade Indireta e Direta.

### 3.1.2.2- Ensaio de Citotoxicidade Indireta

As amostras a serem estudadas foram incubadas em meio Ham F-10 com 10% de Soro fetal bovino à 37°C na proporção de 0,2g/ml de meio por 48 horas, segundo normas internacionais. O objetivo foi a extração de possíveis substâncias tóxicas solúveis eliminadas pelas amostras. Após a obtenção dos extratos para testes, uma suspensão celular na concentração de  $3 \times 10^5$  células/ml foi inoculada em placas de 96 poços<sup>3</sup> e as células cultivadas por 24 horas a 37°C. Após este período o meio de cultura presente na placa foi trocado pelos respectivos extratos adquiridos da maceração das amostras. As células foram cultivadas nestas condições por um período de mais 24 horas a 37°C. Foi utilizada como Controle Positivo (+) de toxicidade uma solução de meio Ham F-10 com 10% SFB e 10% de Fenol e como Controle Negativo (-) de toxicidade o Extrato de Poliestireno. Decorrido o período de cultivo de 24 horas foram feitas imagens das células vivas em Contraste de Fase utilizando Microscópio Invertido Olympus IX-50.

### 3.1.2.3- Ensaio de Citotoxicidade direta

Este ensaio visou a observação dos possíveis efeitos deletérios sobre as células a partir do contato direta das mesmas com o material estudado. Para avaliação da citotoxicidade direta, células VERO foram cultivadas em contato direto com a amostra testada em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37° por 24h. Após este tempo de incubação, foram feitas imagens das células vivas em Microscópio Invertido Olympus IX-50.

---

<sup>1</sup>Sigma Chemical Co., St Louis, MO- USA

<sup>2</sup>SFB - Nutricell, Campinas-SP-Brasil

<sup>3</sup>Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA

Em seguida as amostras foram fixadas em metanol:ácido acético (3:1) ou formol 10% e coradas com azul de toluidina em pH 4,0 e xylydine ponceau em pH 2,0. O azul de toluidina é um corante basófilo que em pH 4,0 se liga em radicais aniônicos  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  e  $\text{COO}^-$  presentes em DNA, RNA e açúcares ácidos (glicosaminoglicanos). O xylydine ponceau é um corante acidófilo que em pH 2,5 interage com radicais catiônicos  $\text{NH}_3^+$  presentes em proteínas (Lison, 1960; Módis, 1991; Mello, 1997; Mello e Vidal, 1980 ).

#### 3.1.2.4- Detalhes Experimentais

Todos os procedimentos adotados nos ensaios de ECI e ECD “*in vitro*” foram realizados no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de BC do IB da UNICAMP.

As amostras de  $\beta$ -TCP na forma de partículas foram analisadas a partir dos ensaios acima citados para caracterizar sua biocompatibilidade quando adicionados em cultura de células fibroblásticas.

#### 3.1.3- Animais

Foram utilizados treze cães machos, com peso entre 15 e 25 quilos, sem raça definida, fornecidos pelo Canil do Centro Multi Institucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os cães foram vacinados, tinham bom estado de nutrição e foram utilizados somente depois do período de quarentena<sup>4</sup>.

### 3.2- Método

#### 3.2.1- Procedimento cirúrgico

Os animais foram pré-medicados com acepromazina<sup>5</sup> (0,1mg/kg) e, transcorrido um tempo de 15 minutos, anestesiados com Tiopental Sódico<sup>6</sup> (17,5 mg/kg), submetidos à colocação de sonda oro-traqueal apropriada, mantidos em circuito anestésico semi-aberto com concentração de oxigênio a 100%. Utilizou-se como anestésico inalatório

---

<sup>4</sup>O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), do Instituto de Biologia da Unicamp, sob número 670-1.

<sup>5</sup>Syntec do Brasil LTDA.

<sup>6</sup>Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

o isofluorano<sup>7</sup> (2 CAM- concentração alveolar mínima) e potencializou-se a analgesia com o uso de Citrato de Fentanila Sódico<sup>8</sup>, (0,05mg/kg).

Após a tricotomia dos membros posteriores (terço distal de fêmur e terço proximal de tibia) e assepsia com solução alcoólica de iodo, foram colocados campos estéreis, deixando expostos os joelhos direito e esquerdo. Por meio de acesso parapatelar lateral, com luxação medial da patela, a região intercondiliana do joelho era exposta (Figura 4).



**Figura 4-** Visualização da região intercondiliana do joelho após a luxação medial da patela.

No centro da região intercondiliana (sulco troclear) era realizada perfuração, com parafusadeira de baixa rotação (marca Black & Decker, modelo 9018/9072) e broca de 5 mm de diâmetro, com anel fixado a 5 mm de sua ponta, para delimitar a penetração no osso subcondral (Figura 5).

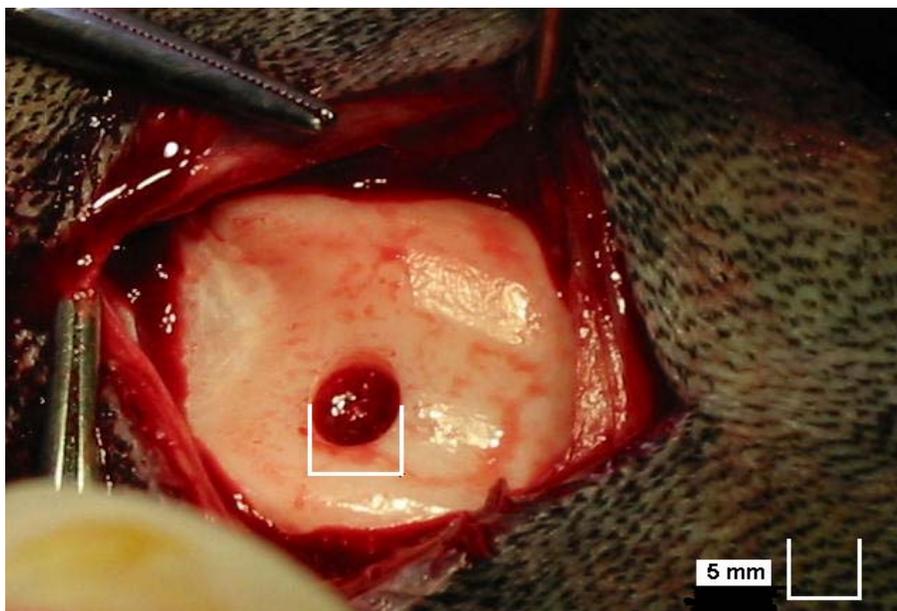
---

<sup>7</sup>Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

<sup>8</sup>Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.



**Figura 5-** Visualização da broca metálica com 5 mm de diâmetro apresentando anel fixado a 5 mm de sua extremidade.



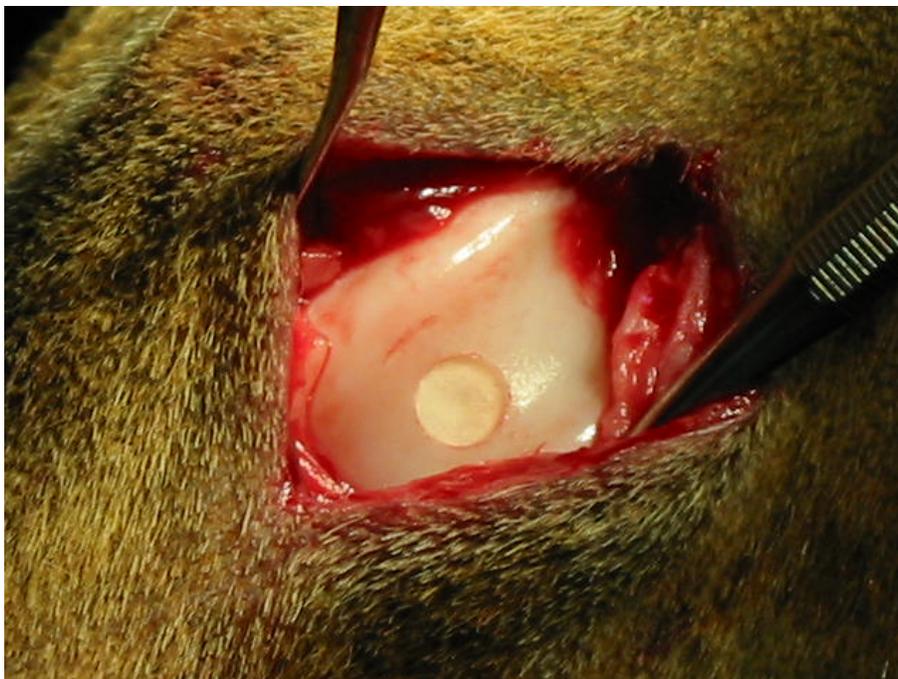
**Figura 6-** Visualização da região intercondiliana do joelho, após a luxação medial da patela, com perfuração por meio de broca com 5 mm de diâmetro.

A perfuração era irrigada com solução fisiológica, para a retirada dos fragmentos ósseos produzidos e posterior introdução do implante, com diâmetro de 5 mm de diâmetro e altura. No joelho direito foi introduzido o implante osteocondral de matriz cerâmica ( $\beta$  TCP) e no joelho esquerdo o de matriz polimérica PEUAPM.

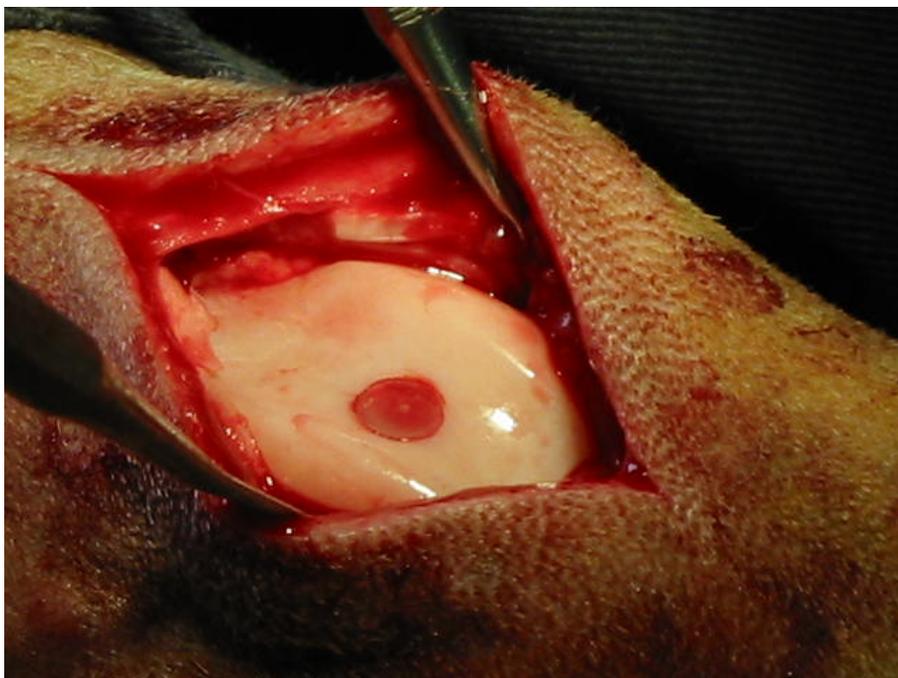
**Tabela 1-** Apresentação dos Grupos de estudo

<b>Animal</b>	<b>Tipo de implante colocado no joelho direito</b>	<b>Tipo de implante colocado no joelho esquerdo</b>	<b>Grupo a que pertencia</b>
1	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
2	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
3	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
4	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
5	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
6	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
7	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
8	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GE
9	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GC
10	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GC
11	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GC
12	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GC
<b>13</b>	$\beta$ TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA)	PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA)	GC

Legenda:  $\beta$  TCP= beta tricálcio fosfato; PEUAPM= poli etileno de ultra alto peso molecular; pHEMA-(MMA-co-AA)= [(poli (2-hidroxi etil metacrilato) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)]; GE= Grupo experimental; GC= Grupo controle.



**Figura 7-** Visualização da região intercondiliana do joelho, após a luxação medial da patela, com o defeito osteocondral preenchido pelo implante de PEUAPM/HEMA/poli(MMA-co-AA).



**Figura 8-** Visualização da região intercondiliana do joelho, após a luxação medial da patela, com o defeito osteocondral preenchido pelo implante de  $\beta$ -TCP/HEMA/poli(MMA-co-AA).

Após o procedimento cirúrgico, a cápsula articular e a pele foram suturadas com fio mononylon 000<sup>9</sup>. Dos treze cães operados, cinco (cães nos. 9, 10, 11, 12 e 13) compuseram o grupo controle e foram sacrificados imediatamente após o procedimento cirúrgico. Os oito restantes (nos. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) compuseram o grupo experimental e foram medicados com antibiótico profilático (Benzilpenicilina<sup>10</sup>) e analgésico (Meloxicam<sup>11</sup>) durante 5 dias.

No Grupo controle, para se avaliar o desgaste decorrente da presença do implante sobre a superfície articular da patela, fixou-se uma lixa (n° 220) com 5 mm de diâmetro sobre o implante. Cinco movimentos de flexão e extensão no joelho foram realizados para a verificação da abrasão produzida sobre a superfície articular da patela pela lixa. Essa avaliação foi realizada por meio da macroscopia estereoscópica.

---

<sup>9</sup>ethycon®

<sup>10</sup>Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge LTDA

<sup>11</sup>Maxicam - Ouro Fino LTDA

Os oito animais mantidos em seguimento (Grupo Experimental) foram deixados livres em gaiolas apropriadas, com ração e água oferecida à vontade. Após 48 horas, em média, do procedimento cirúrgico os cães foram transferidos para o Canil comum do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental.

### 3.2.2- Sacrifício dos animais

Decorrido o tempo de seguimento previsto (nove meses), os 8 animais foram sacrificados pela administração de 2 ml de Citrato de Fentanila<sup>12</sup>, em associação com Tiopental sódico<sup>13</sup> e cloreto de potássio<sup>14</sup> a 19,1%. Após a desarticulação dos joelhos (direito e esquerdo), era retirada a região que continha os côndilos do fêmur.

### 3.3- Avaliação das amostras

Para a análise da superfície articular *in vivo*, *in vitro*, macroscopicamente, microscopicamente, da interface implante-osso e do comportamento viscoelástico do implante foram realizados ensaios, que estão apresentados na tabela 2.

---

<sup>12</sup>Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

<sup>13</sup>Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

<sup>14</sup>Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA

**Tabela 2-** Apresentação dos tipos de análises realizadas nos Grupos Experimental e Controle, em função do tipo e dos objetivos a serem atingidos.

<b>Análise</b>	<b>Tipo</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Grupo</b>
<b>Por imagem macroscópica (in vivo)</b>	a) Artroscopia	Análise da superfície articular	GE (16 amostras)
	b) Radiografia	Análise da interface implante/ osso subcondral	GE (16 amostras) GC (8 amostras)
<b>Por Imagem macroscópica (in vitro)</b>	a) Macroscopia estereoscópica	Análise da superfície articular	GE (16 amostras) GC (6 amostras)
<b>Mecânica (in vitro)</b>	a) Teste de indentação	Análise do comportamento viscoelástico e resistência mecânica	GE (4 amostras)
<b>Por imagem microscópica</b>	a) MEV	a) Análise do mecanismo de desgaste	GE (6 amostras)
	b) MEV - módulo retroespaldado	b) Análise da interface implante/ osso subcondral	GE (6 amostras)
	c) Microscopia óptica	c) Análise histológica	GE (6 amostras)

Com relação aos objetivos das análises realizadas, serão apresentados abaixo com detalhes o procedimento e os equipamentos envolvidos, assim como os critérios utilizados para se avaliar os resultados obtidos.

### 3.3.1- Análise macroscópica da superfície articular

#### 3.3.1.1- Artroscopia

Esta análise foi efetuada após 4 meses de seguimento, nos oito animais (16 amostras) do grupo experimental, com a finalidade de se avaliar as condições da superfície articular e do implante.

Após a anestesia dos animais, foi utilizado o Artroscópio *Stryker Endoscopy 810 Medical - Vídeo Câmera OR-5000 Light Source*. Este procedimento foi realizado com a colaboração do Dr. Waldo Lino Júnior.

As imagens mais significativas foram capturadas e gravadas em um sistema digital. Os critérios utilizados para a análise dessas imagens levaram em consideração: a presença (ou não) de vascularização aumentada (na membrana sinovial e ao redor do implante), a presença (ou não) de afundamento do implante no seu sítio (abaixo da superfície articular) e a presença ou não de tecido neoformado sobre o implante.

Todas as demais análises, abaixo apresentadas, foram realizadas após o sacrifício dos animais.

### 3.3.1.2- Macroscopia Estereoscópica

A análise da superfície dos implantes por macroscopia estereoscópica (microscópio estereoscópico marca Olympus, modelo SZ 40) dos animais do Grupo Experimental teve como objetivo avaliar o crescimento de tecido ao redor (ou sobre) os implantes e o colapso desses em relação à superfície articular.

Dezesseis amostras da região dos côndilos dos fêmures dos animais do Grupo Experimental foram analisadas, segundo o seguinte critério:

	<b>Sem crescimento</b>	<b>Menor que 50% de crescimento</b>	<b>Maior que 50% de crescimento</b>
<b>Crescimento ao redor do implante</b>	+	++	+++
<b>Colapso do implante na superfície articular</b>		Sim	Não

### 3.3.2- Análise da interface implante - osso

#### 3.3.2.1- Radiografia

O estudo radiográfico foi realizado em 12 animais (16 amostras do GE e 8 amostras do GC) no Centro de Medicina Veterinária Diagnóstica (SCAN), sob anestesia geral. Os cães foram posicionados em decúbito lateral, com os membros posteriores

semi-fletidos e colocados sobre o filme (Kodak, 18x24cm), para se obter radiografia em perfil da articulação do joelho. As radiografias foram realizadas em um aparelho da marca CDK de 220w, com 130Kv por 500 Mas. A revelação foi feita em aparelho da marca Macrotec MX-2.

Para a análise das radiografias foi considerado se houve (ou não) presença halo esclerótico ou radioluscente ao redor dos implantes e se houve mudança do diâmetro do orifício ósseo que continha o implante osteocondral, quando comparado o do Grupo Controle. A medida do diâmetro foi realizada sobre a radiografia, utilizando-se um paquímetro e considerando-se as superfícies ósseas como parâmetros de medida, obtendo-se assim valores da largura em milímetros.

#### 3.3.2.2- Microscopia eletrônica de varredura (MEV - módulo retroespalhado)

Essa análise foi realizada em 3 animais (06 amostras) do Grupo Experimental (seguidos por 9 meses). O microscópio eletrônico de varredura utilizado era da marca JEOL, modelo JXA-840-A. A região dos côndilos do fêmur foi fixada em uma morsa para ser confeccionado um cubo com diâmetro médio de 15 mm de largura x 10 mm de profundidade, utilizando-se uma serra de aço convencional. Este cubo contendo o implante no centro foi submetido à desidratação e secagem a ponto crítico (Balzers, modelo CPD 030). Para a secagem ao ponto crítico os espécimes sem descalcificação foram imersos em solução de concentração crescente de álcool etílico durante o período de 72h. A seguir, ainda úmidos em álcool etílico foram colocados em “cestos” específicos que, por sua vez, foram posicionados no interior de uma câmara hermeticamente fechada resfriada por volta de 5 a 6°C. Esta câmara dotada de um manômetro com conexão com uma válvula de CO<sub>2</sub> que, em contato com o espécime, se liquefaz deixando-os imersos. Este processo permite seu “enxague” retirando do meio algum resíduo de álcool presente. A câmara então foi aquecida a 30°C onde ocorreu o ponto crítico. A seguir, foi despressurizada eliminando-se o CO<sub>2(g)</sub> lentamente para que as amostras fossem secas sem ter sofrido problemas de tensão superficial. Posteriormente, os cubos foram cortados em um equipamento de corte utilizando-se um disco de diamante e velocidade baixa a fim de se obter cortes transversais

com 2mm de espessura. As amostras foram então fixadas em suporte metálico, com fita dupla face condutora de carbono e recoberto com ouro (Sputter Coater, da marca Bal Tec, modelo SCD 050), utilizando corrente de 40 mA e tempo de 200 segundos. Essa amostra foi introduzida no microscópio eletrônico e submetida à tensão de 25 Kv, para a obtenção das imagens que foram digitalizadas.

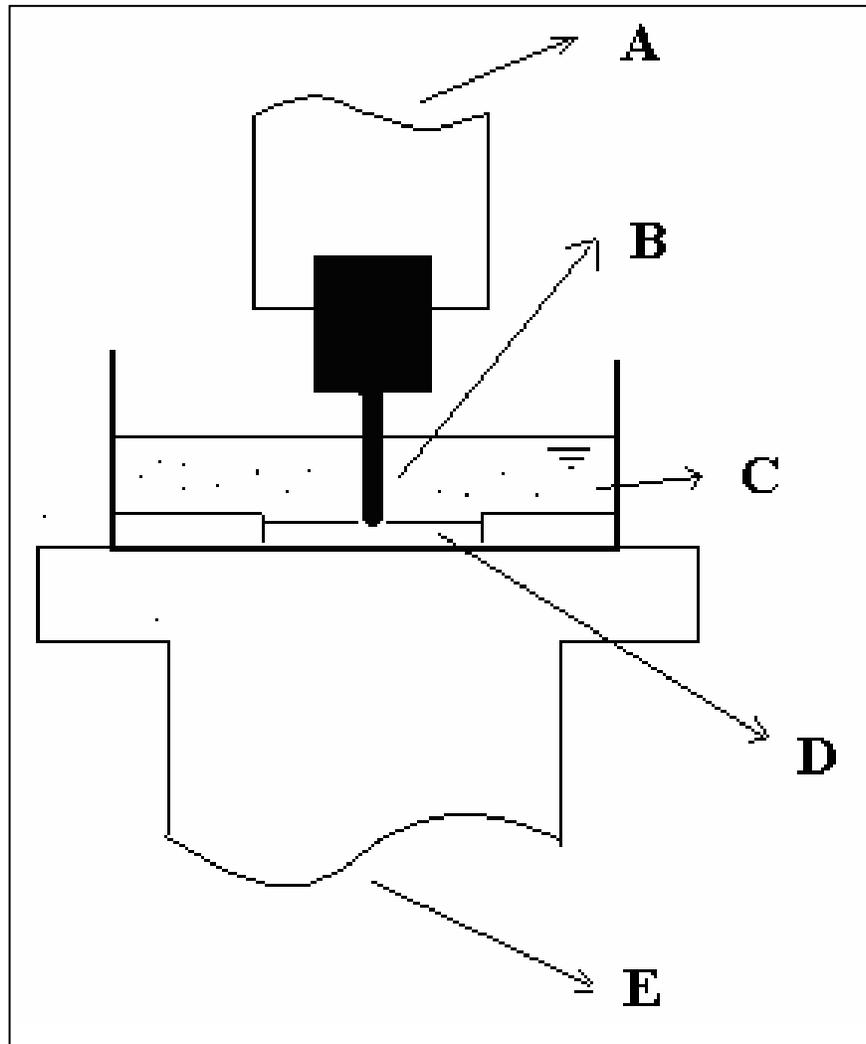
O critério utilizado para a avaliação dos resultados levou em consideração a presença de tecido neoformado na interface entre o osso e o implante.

### 3.3.3- Análise Mecânica - Ensaio de Fluência à Indentação

O ensaio de fluência à indentação foi realizado em 2 animais (4 amostras). Para tanto uma carga de 4,935 N (0,5kgf) foi aplicada sobre o implante, por meio de uma ponta esférica de raio 1,6 mm durante 180 segundos sendo imediatamente retirada. Esta ponta esférica foi acoplada a uma máquina universal de ensaios mecânicos MTS - modelo 810. Trata-se de um procedimento bastante utilizado para caracterização *in situ* de cartilagem natural podendo-se avaliar seu comportamento viscoelástico em função do tempo (KEMPSON et al, 1971).

O ensaio de fluência a indentação foi realizado utilizando-se uma ponta esférica. Os ensaios foram realizados em triplicata sendo registrada a altura da indentação (h) ao longo do tempo (t). O esquema do dispositivo utilizado no ensaio está apresentado na Figura 9.

Os critérios de análise desse teste consideraram o valor médio de deslocamento da ponta esférica no hidrogel (em milímetros) em função da carga recebida. Pelo fato desses implantes terem sido recobertos por um mesmo material (hidrogel), foi possível obter valores para confecção de um gráfico, que possibilitou avaliar a capacidade de absorção de carga pelas matrizes estudadas. Os dados obtidos foram tratados em planilha excel, sendo calculada a média e o desvio padrão.



**Figura 9-** Esquema do dispositivo utilizado para o ensaio de indentação dos implantes osteocondrais de  $\beta$  TCP/ pHEMA-(MMA-co-AA) e de PEUAPM/ pHEMA-(MMA-co-AA). (A) Célula de carga, (B) indentador com ponta esférica, (C) água destilada (temperatura ambiente), (D) amostra inchada em água, (E) base do equipamento universal de ensaios (MTS)

### 3.3.4- Análise do mecanismo de desgaste

#### 3.3.4.1- Microscopia eletrônica por varredura (MEV)

A avaliação microscópica da superfície dos implantes e da patela foi feita em 3 animais (6 amostras), para se avaliar a presença ou não de mecanismos de desgaste.

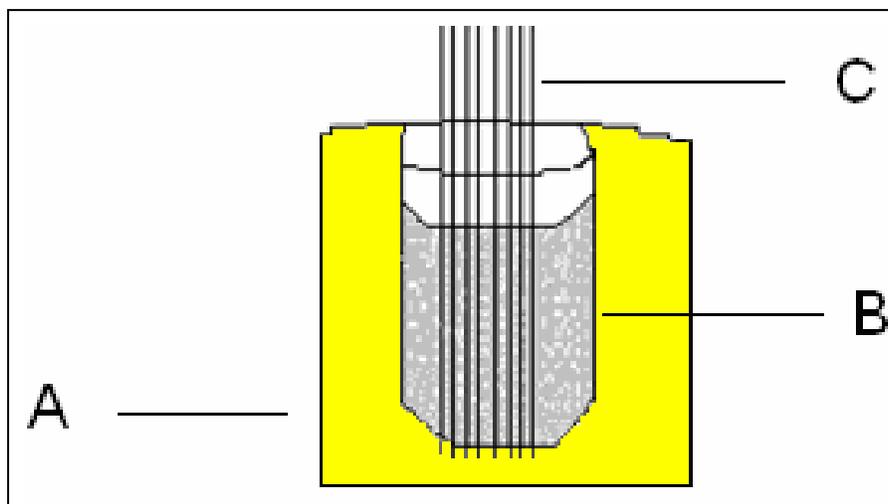
Utilizou-se para essa análise o microscópio eletrônico de varredura (MEV), da marca JEOL (modelo JXA-840-A), conforme procedimento descrito no item 4.3.2.1.

O critério utilizado para se efetuar esta análise foi a verificação da presença ou não de mecanismo de desgaste no implante osteocondral e em sua contra-superfície (patela).

### 3.3.5- Análise histológica

#### 3.3.5.1- Microscopia Óptica

Foram selecionados aleatoriamente 3 animais (cães no. 1, 7 e 8) do Grupo Experimental para análise histológica. Foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.2.1, para a obtenção de um cubo contendo o implante em seu centro. Estes cubos foram fixados em solução de paraformaldeído a 10% tamponado, por um período de 7 dias. Em seguida, foram submetidos à descalcificação com solução de ácido nítrico a 7%, durante 30 dias. Após esse período, foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes, em temperatura ambiente, diafanizadas em xilol e embebidas em parafina a 65<sup>0</sup>C. Após inclusão, foram fixados em suportes plásticos e o excesso de parafina foi retirado. De cada bloco, foram realizados cortes sagitais de 5 µm de espessura utilizando-se um micrótomo rotatório (Leica RM 2155), de acordo com a figura 10, seguindo-se a seguinte rotina: De cada dez cortes desprezados, tomava-se um para análise. Desse modo, foram selecionados quatro cortes, corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson. O critério utilizado para a análise das lâminas considerou a presença ou não de tecido fibroso entre o tecido ósseo e o implante.



**Figura 10-** Esquema dos cortes realizados no cubo contendo os implantes osteocondrais para confecção das lâminas histológicas: (A) cubo de parafina com dimensão aproximada de 1cm<sup>2</sup>, (B) Implante osteocondral, (C) Cortes efetuados.

### 3.3.6- Análise estatística

Para a avaliação da diferença entre as médias da medida da largura do orifício realizada nas radiografias, foi utilizado teste estatístico não paramétrico (Wilcoxon) com nível de significância de p igual ou menor que 0,05.

## ***4- RESULTADOS***

Dentre os 8 animais do Grupo Experimental, um foi excluído (cão no. 2) pelo fato do mesmo ter apresentado, no pós-operatório, deiscência da sutura. Além disso, na artroscopia, realizada com quatro meses de seguimento, foi identificado alterações vasculares da cápsula articular, intensa sinovite e crescimento de tecido sobre o implante nesse animal. Desse modo, o Grupo Experimental passou a ser constituído por 7 animais.

#### 4.1- Avaliação macroscópica *in vivo*

##### 4.1.1- Artroscopia

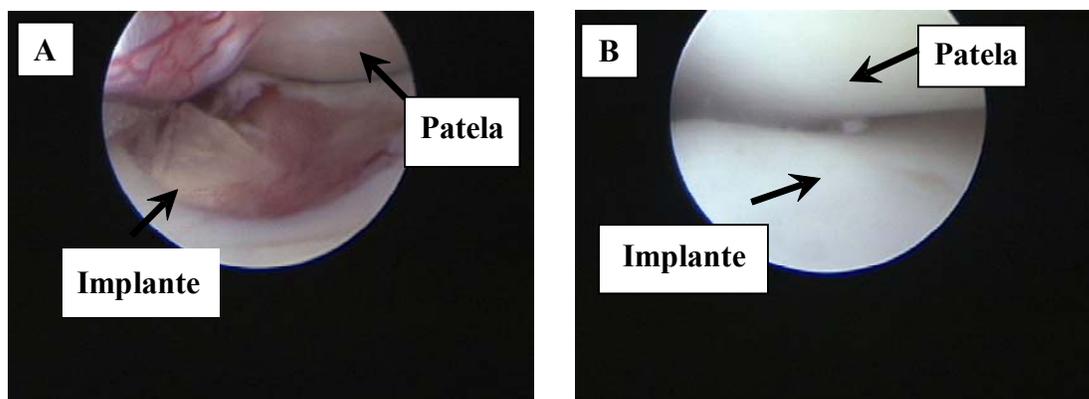
A análise macroscópica da superfície articular (*in vivo*) foi realizada com o uso da artroscopia. Na Tabela 3 são apresentados os dados relativos à vascularização (membrana sinovial e ao redor do implante), colapso do implante no seu sítio (abaixo da superfície articular) e presença de tecido neoformado sobre o implante, em função do tipo de implante.

**Tabela 3-** Apresentação dos resultados obtidos na avaliação da vascularização (membrana sinovial e ao redor do implante), colapso do implante no seu sítio (abaixo da superfície articular) e presença de tecido neoformado sobre o implante, em função do tipo de implante.

ANIMAL	VMSD ( $\beta$ -TCP)	VMSE (PEUAPM)	VRID ( $\beta$ -TCP)	VRIE (PEUAPM)	CID ( $\beta$ -TCP)	CIE (PEUAPM)	TND ( $\beta$ -TCP)	TNE (PEUAPM)
1	+++	+	+++	+	Sim	Não	++	++
3	++	+	++	+	Sim	Não	++	+++
4	++	++	++	+	Não	Não	++	++
5	++	+	++	+	Não	Não	++	+++
6	++	++	++	++	Sim	Não	++	++
7	++	+	++	+	Não	Não	++	+++
8	+++	++	+++	+	Sim	Não	+++	+++

**Legenda:** VMS= vascularização na membrana sinovial; VRI= vascularização ao redor do implante, CI= Colapso do implante; TN= tecido neoformado; += sem crescimento; ++= crescimento menor do que 50%; +++= crescimento maior do que 50%, D= Direito; E= esquerdo;  $\beta$  TCP= beta tricálcio fosfato; PEUAPM= poli etileno de ultra alto peso molecular.

Conforme observado na avaliação artroscópica, os aspectos macroscópicos observados entre os dois implantes apresentaram diferenças nítidas, como se nota figura 11.



**Figura 11-** (A) Imagem artroscópica evidenciando intensa neovascularização da membrana sinovial e colapso do implante composto de  $\beta$ -TCP, achados estes, não constatados nas imagens obtidas do implante composto por PEUAPM (B).

#### 4.1.2- Radiografia

As radiografias foram avaliadas pela observação da presença de halo radioluscente ou de aumento de densidade óssea e pela medida da largura dos orifícios para os implantes de  $\beta$ -TCP e PEUAPM( por meio da utilização de um paquímetro) com seus resultados e apresentados nas tabelas 4 e 5 e figura 10. A média das medidas da largura dos orifícios para os implantes de  $\beta$ -TCP foi de 7,5mm enquanto que para a dos implantes de PEUAPM foi de 5,4mm. Esses dois valores apresentaram diferenças significativas entre si ( $p= 0,001$ ).

**Tabela 4-** Apresentação dos dados relativos à dimensão do leito receptor (cavidade óssea), presença de esclerose e de radioluscência, do Grupo Experimental, em função do tipo de implante.

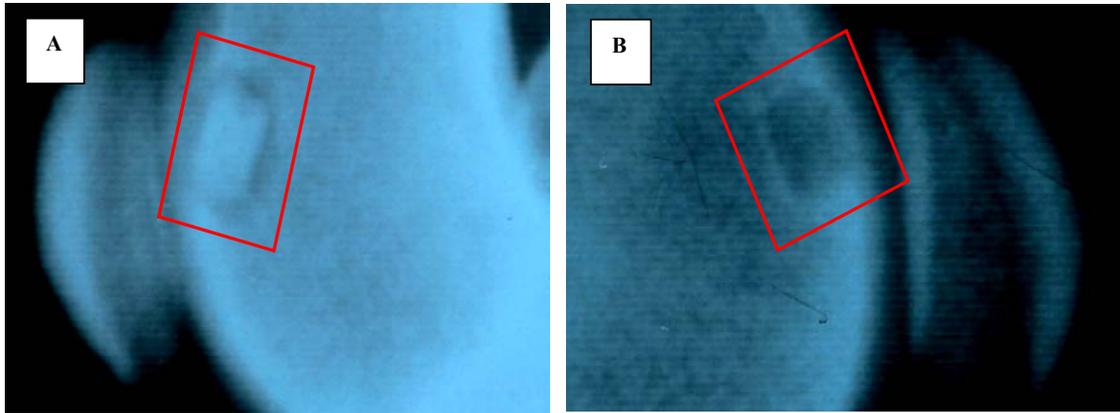
<b>Animal</b>	<b>Diâmetro do orifício à D (mm) (β-TCP)</b>	<b>Diâmetro do orifício à E (PEUAPM)</b>	<b>Esclerose à D (β-TCP)</b>	<b>Esclerose à E (PEUAPM)</b>	<b>Radio-luscência à D (β-TCP)</b>	<b>Radio-luscência à E (PEUAPM)</b>
1	8,5	5,1	Não	Sim	Sim	Não
3	6,1	5,2	Não	Sim	Sim	Não
4	8,5	5,7	Não	Sim	Sim	Não
5	7,1	5,4	Não	Sim	Sim	Não
6	5,9	5,7	Não	Sim	Sim	Não
7	8,1	5,9	Não	Sim	Sim	Não
8	8,3	5,4	Não	Sim	Sim	Não
<b>Média</b>	<b>7,5</b>	<b>5,4</b>				

**Legenda:** β TCP= beta tricálcio fosfato; PEUAPM= poli etileno de ultra alto peso molecular

**Tabela 5-** Apresentação dos dados relativos à dimensão do leito receptor (cavidade óssea), do Grupo Controle, em função do tipo de implante.

<b>Animal</b>	<b>Largura do orifício à D (mm) (β-TCP)</b>	<b>Largura do orifício à E (mm) (PEUAPM)</b>
10	5,1	5,1
11	5,2	5,0
12	5,1	5,1
13	5,3	5,1
<b>Média</b>	<b>5,1</b>	<b>5,0</b>

**Legenda:** β TCP= beta tricálcio fosfato; PEUAPM= poli etileno de ultra alto peso molecular

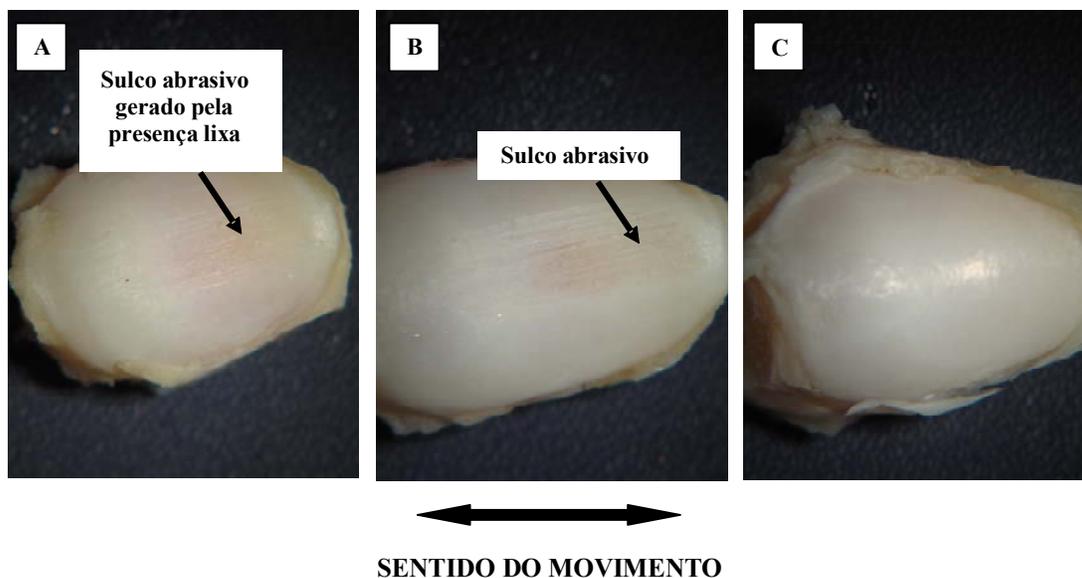


**Figura 12-** (A) Imagem radiografia do implante composto por  $\beta$ -TCP. Nota-se halo radioluscente ao redor do implante com aumento de diâmetro do defeito osteocondral (scanner - 2x); (B) Imagem radiografia do implante composto por PEUAPM. Nota-se halo esclerótico ao redor do implante, com aumento de densidade óssea (scanner - 2x).

## 4.2- Avaliação macroscópica *in vitro*

### 4.2.1- Macroscopia Estereoscópica

Na análise do desgaste decorrente da presença da lixa sobre o implante contra a superfície articular da patela, avaliada por meio da macroscopia estereoscópica em três animais do grupo controle, evidenciou-se formação de sulcos na região avaliada (Figura 13).



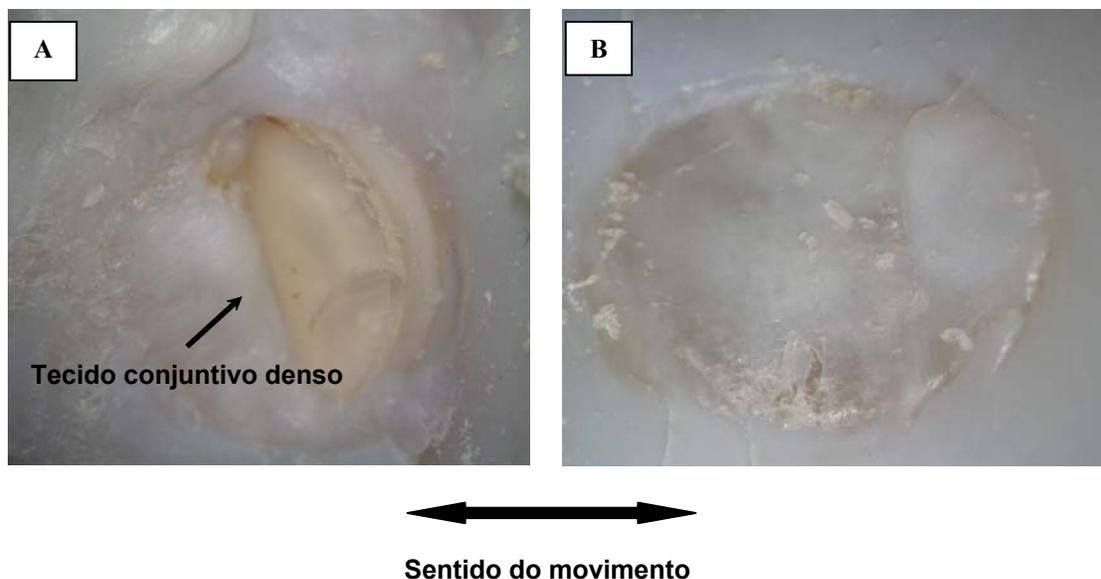
**Figura 13-** A e B: Visualização do sulco abrasivo na patela, avaliado por meio de macroscopia estereoscópica (A: aumento de 7 x; e B: aumento de 12 x); (C): Patela - controle negativo (aumento de 7x).

Pela macroscopia estereoscópica também se avaliou a superfície articular (*in vitro*) dos animais do grupo experimental, cujos resultados são apresentados na Tabela 6 e nas Figuras 14 e 15.

**Tabela 6-** Apresentação dos dados relativos à presença de vascularização (membrana sinovial e ao redor do implante), colapso do implante e de tecido neoformado, em função do tipo de implante, realizado por meio da macroscopia estereoscópica, em função do tipo de implante.

ANIMAL	CI D ( $\beta$ -TCP)	CI (E) (PEUAPM)	TN (D) ( $\beta$ -TCP)	TN (E) (PEUAPM)
1	Sim	Não	++	++
3	Sim	Não	++	+++
4	Não	Não	++	++
5	Não	Não	++	+++
6	Sim	Não	++	++
7	Não	Não	++	+++
8	Sim	Não	+++	+++

**Legenda:** CI= Colapso do implante, TN= tecido neoformado; += sem crescimento; ++= crescimento menor que 50%; +++= crescimento maior que 50%, D= Direito; E= esquerdo;  $\beta$  TCP= beta tricálcio fosfato/; PEUAPM= poli etileno de ultra alto peso molecular; acrílico.



**Figura 14-** (A): Visualização de colapso parcial do implante de  $\beta$ -TCP, em relação à superfície articular adjacente, com pouco crescimento de tecido; (B): Visualização da manutenção da integridade do implante de PEUAPM, em relação à superfície articular adjacente.



**Figura 15-** (A) Visualização de crescimento tecidual e colapso central do implante de  $\beta$ -TCP (seta); (B) Visualização de crescimento tecidual ao redor e sobre todo implante de PEUAPM.

#### 4.3- Avaliação mecânica *in vitro*

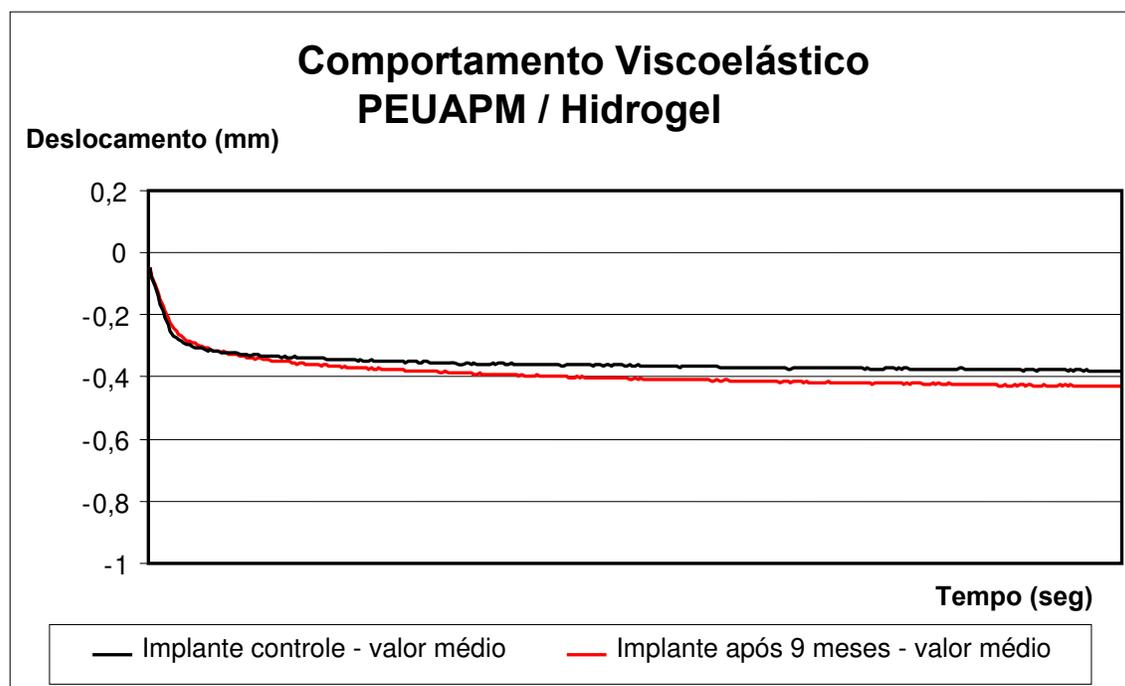
A análise da viscoelasticidade dos implantes utilizados foi realizada por meio do Teste de Indentação.

Nos gráficos 1 e 2 e tabela 7, são apresentados os valores médios de deformação sofrida pelos implantes osteocondrais sob a ação de uma carga, antes de sua implantação e após 9 meses de seguimento. Estas curvas de deformação *versus* tempo representam apenas a capacidade de deformação apresentada pelas matrizes dos implantes osteocondrais estudados, devido à força exercida pela penetração da ponta do indentador.

**Tabela 7-** Apresentação dos dados relativos aos valores médios de deformação em milímetros, sofrida pelos implantes osteocondrais, sob a ação da carga do indentador.

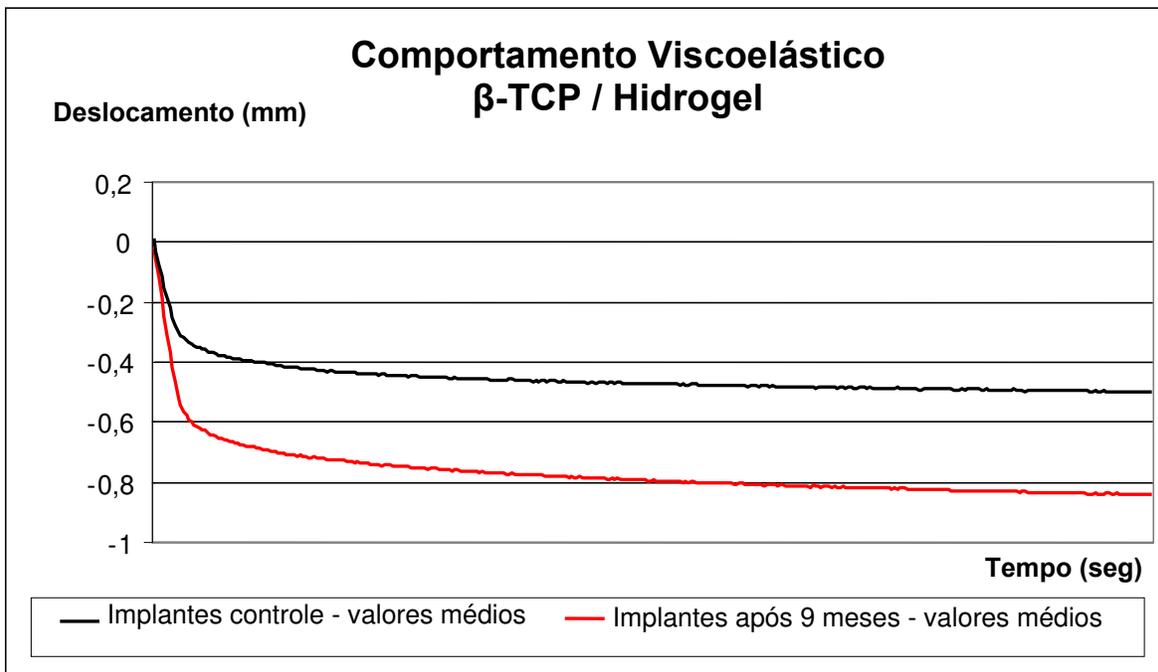
<b>Implante Osteocondral</b>	<b>Deslocamento (Controle)</b>	<b>Deslocamento (9 meses)</b>
PEUAPM/Hidrogel	0.36mm	0.40mm
$\beta$ -TCP/Hidrogel	0.46mm	0.78mm

Observa-se que o implante composto por matriz de PEUAPM, tanto antes como depois de 9 meses seguimento, apresentou comportamento viscoelástico semelhante (Gráfico 1).



**Gráfico 1-** Relação da deformação apresentada pelo implante composto por matriz polimérica, quando submetido a carga, em função do tempo.

Já a observação do comportamento das curvas no Gráfico 2 mostra que, após nove meses de seguimento, os implantes compostos por matriz de  $\beta$ -TCP apresentaram maior deformação, quando submetidos à aplicação da carga.



**Gráfico 2-** Relação da deformação apresentada pelo implante composto por matriz cerâmica, quando submetido a carga, em função do tempo. Evidente ausência de resistência mecânica apresentada por esta matriz.

#### 4.4- Avaliação microscópica

##### 4.4.1- Microscopia eletrônica de varredura (módulo retroespalhado)

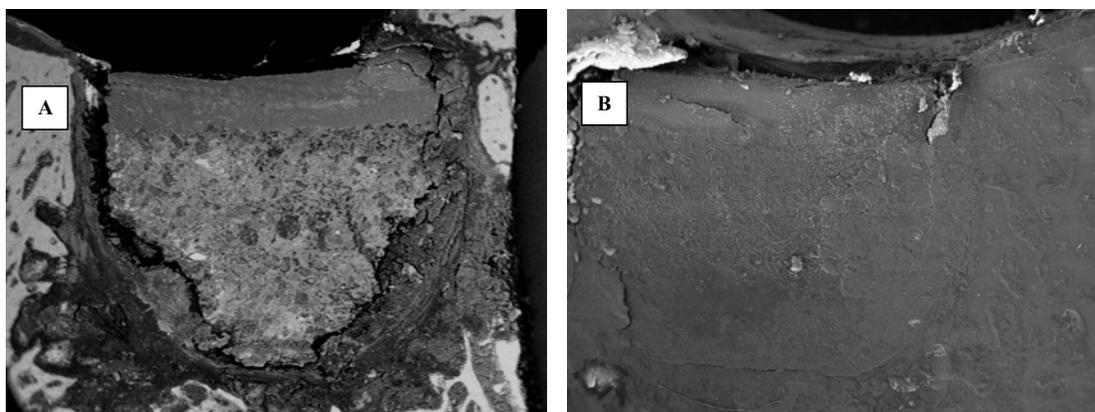
Para a análise da interface osso-implante utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (módulo retroespalhado), conforme descrito na Tabela 8.

**Tabela 8-** Apresentação dos dados relativos à presença de interface entre o implante e o osso, realizado por meio da microscopia eletrônica de varredura (módulo retro-espalhado), em função do tipo de implante.

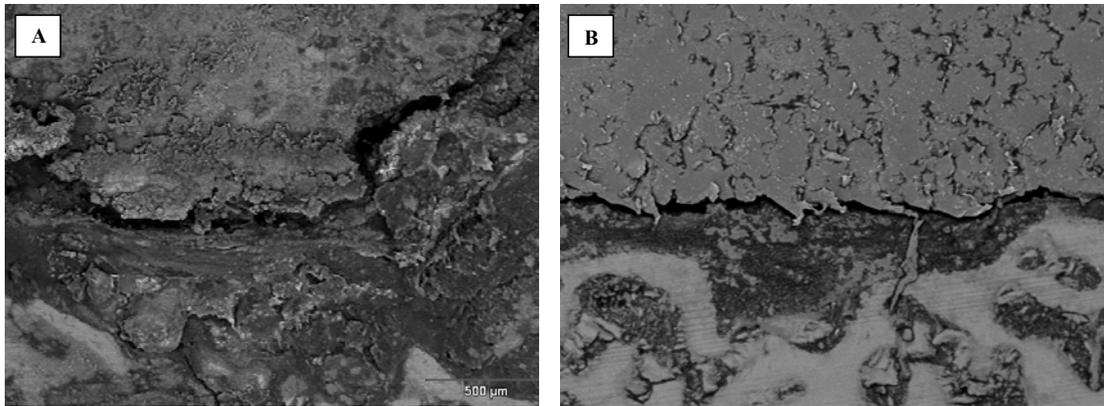
ANIMAL	Interface osso-implante (D) ( $\beta$ -TCP)	Interface osso-implante (E) (PEUAPM)
4	Sim	Não
5	Sim	Não
6	Sim	Não

**Legenda:**  $\beta$  TCP= beta tricálcio fosfato;/ PEUAPM= poli etileno de ultra alto peso molecular; acrílico), D= direita, E= esquerda.

Conforme se verifica nas Figuras 16 e 17, o implante de  $\beta$  TCP sofreu deformação, quando comparado com o implante de PEUAPM.



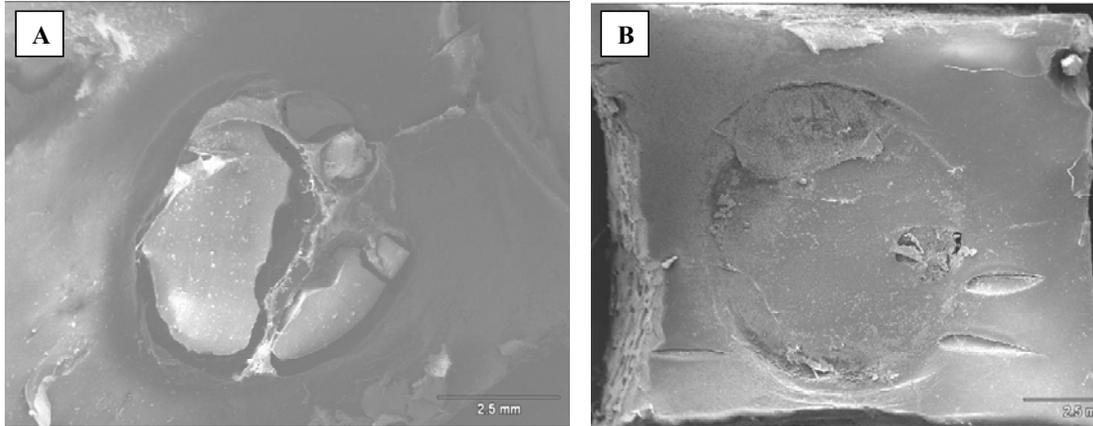
**Figura 16-** (A) Visualização da interface entre o implante composto por  $\beta$  TCP e o osso subcondral (MEV-modulo retroespalhado). Aumento de 15x; (B) Ausência de interface entre o implante composto por PEUAPM e o osso subcondral (MEV-modulo retroespalhado). Aumento de 15x.



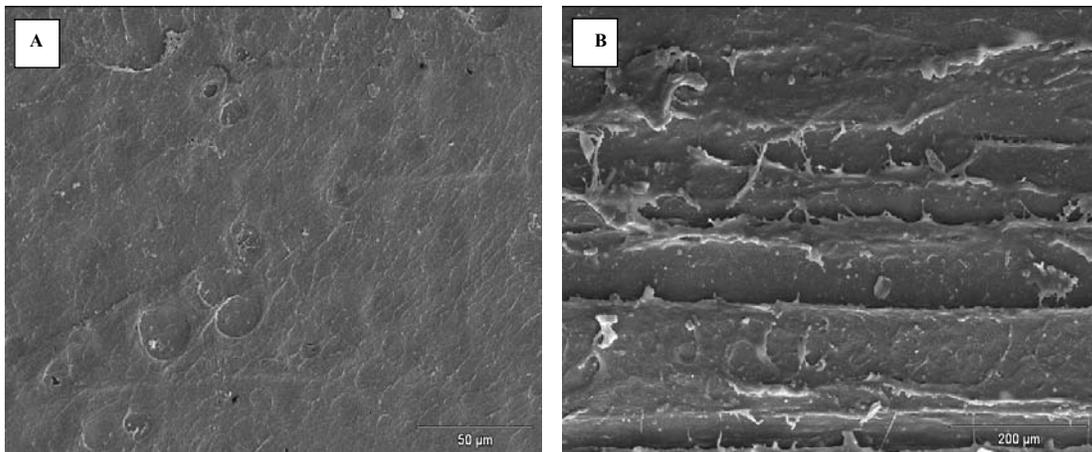
**Figura 17-** (A) Detalhe da Figura 16-A, evidenciando a perda do formato original do implante  $\beta$ -TCP, bem como a existência de interface entre o implante composto por  $\beta$  TCP e o osso subcondral (MEV-modulo retroespalhado) Aumento de 50x; (B) Detalhe da Figura 16-B, evidenciando a manutenção do formato original do implante composto por PEUAPM e a ausência de interface com o osso subcondral (MEV-modulo retroespalhado). Aumento de 50x.

#### 4.4.2- Microscopia eletrônica de varredura

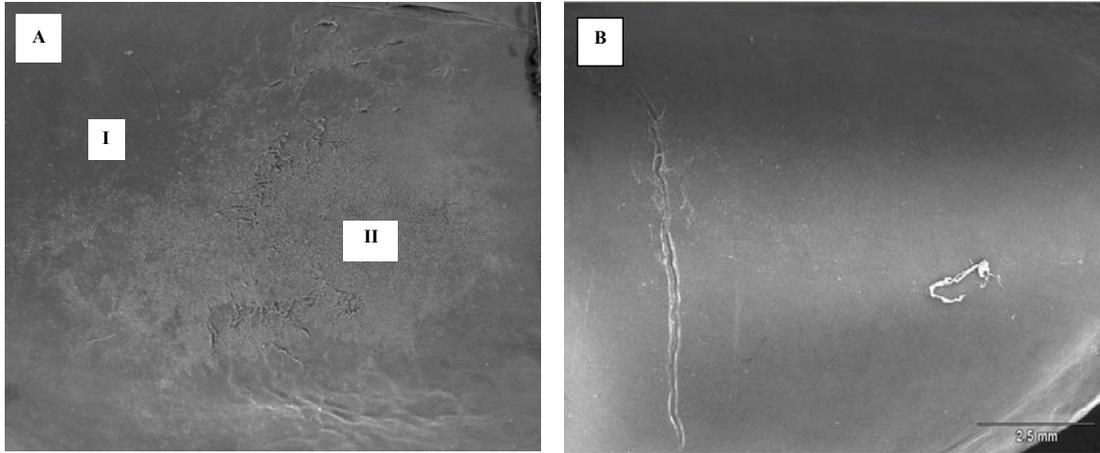
Na análise microscópica da superfície do implante e da patela, realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se o mesmo comportamento quanto ao desgaste independente da matriz (Figuras 18 a 23).



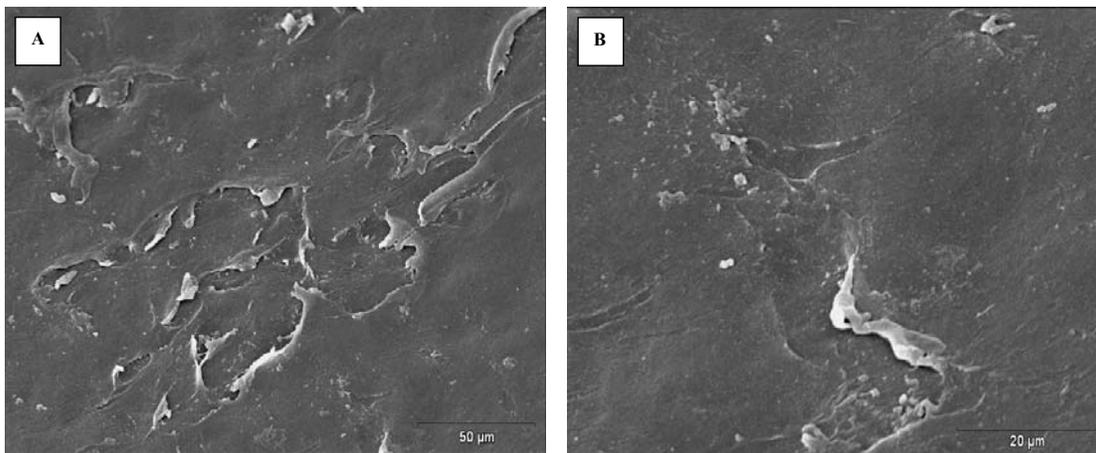
**Figura 18-** (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (côndilo) imagem geral - aumento de 10x -  $\beta$ -TCP - Verifica-se artefato gerado pela desidratação do hidrogel não contida pela matriz de  $\beta$ -TCP; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (côndilo) imagem geral - aumento de 10x. PEUAPM - Não se observa artefato devido a secagem do implante osteocondral.



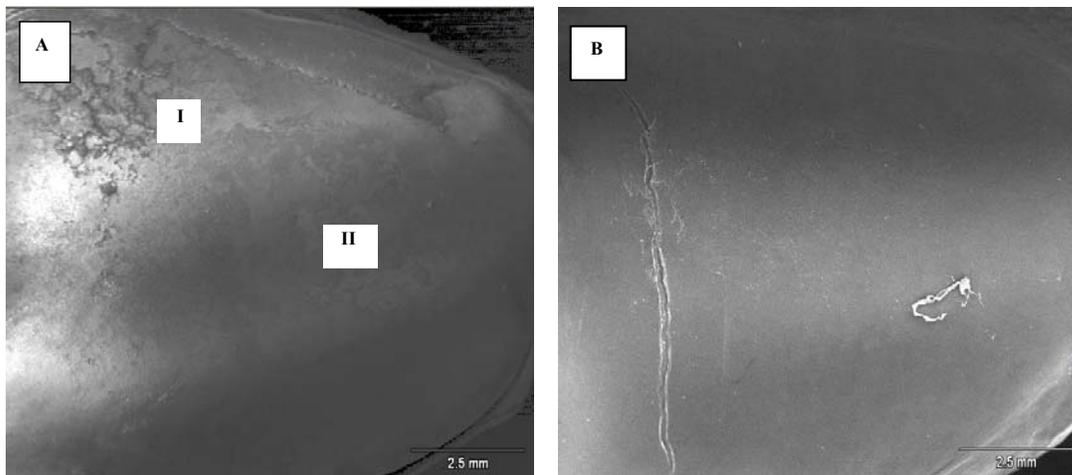
**Figura 19-** (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela) (controle positivo - sem mecanismo de desgaste) - aumento 500x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela) (controle negativo - com mecanismo de desgaste) - aumento 150x.



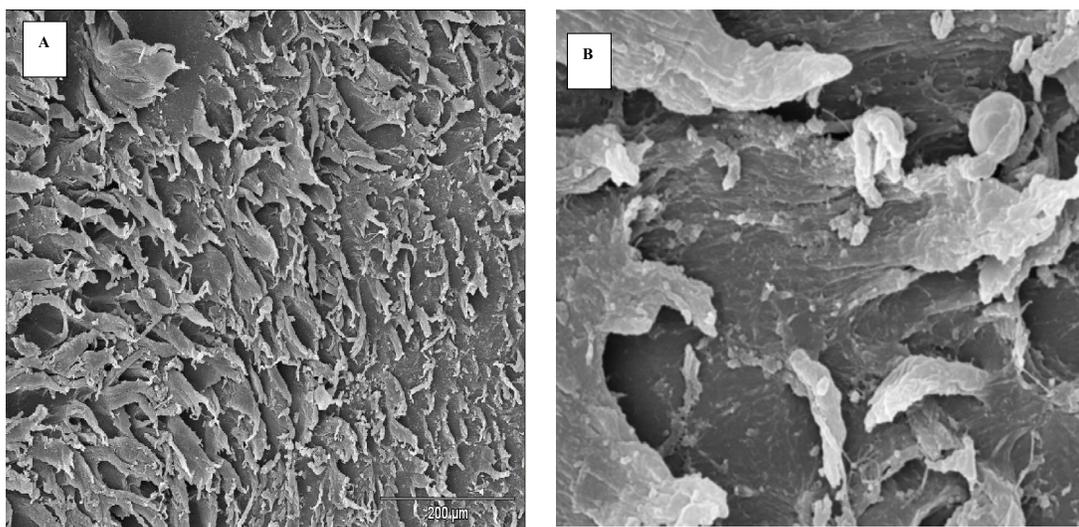
**Figura 20-** (A) Microscopia Eletrônica de Varredura patela submetida ao tempo de seguimento de 9 meses. Matriz PEUAPM. Verificam-se nitidamente duas regiões morfológicamente distintas (I e II) - aumento 10x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura - patela controle positivo (sem mecanismo de desgaste - aumento 10x).



**Figura 21-** (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela). Detalhes região I da micrografia da Figura 20-A. Aumento 500x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela). Detalhes região I da micrografia da Figura 20-A. Aumento 1500x.



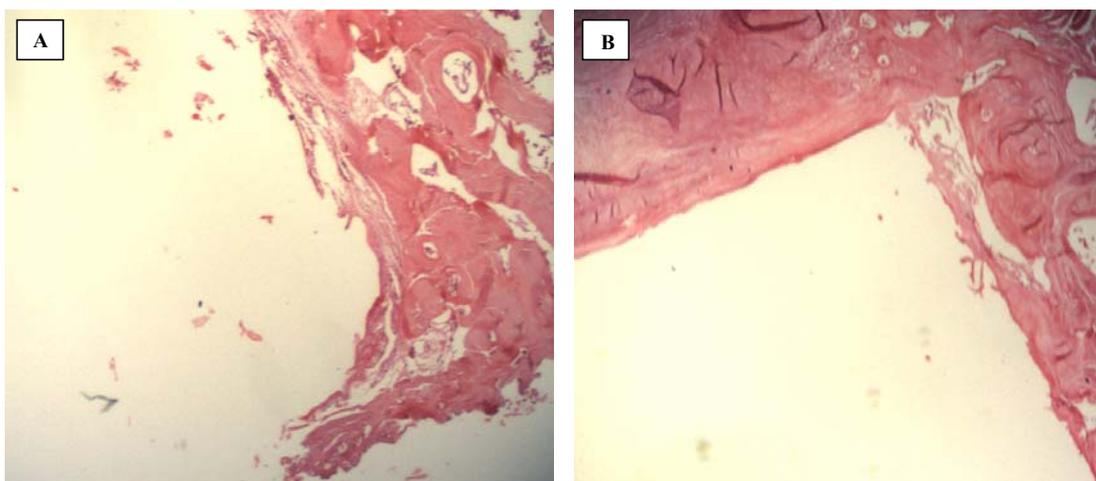
**Figura 22-** (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela) submetida ao tempo de seguimento de 9 meses matriz de  $\beta$ -TCP - Verificam-se nitidamente duas regiões morfológicamente distintas (I e II). Aumento 10x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura - patela controle positivo (sem mecanismo de desgaste. Aumento 10x).



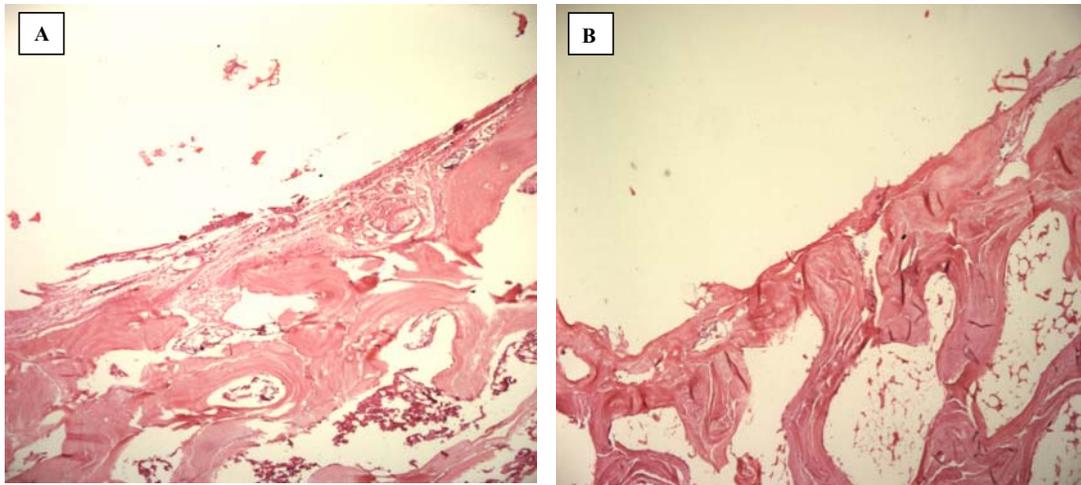
**Figura 23-** (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela) Detalhes região I da micrografia da figura 22-A, aumento 500x; (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (patela). Detalhes região I da micrografia da figura 22A. Aumento 1500x.

#### 4.4.3- Microscopia óptica

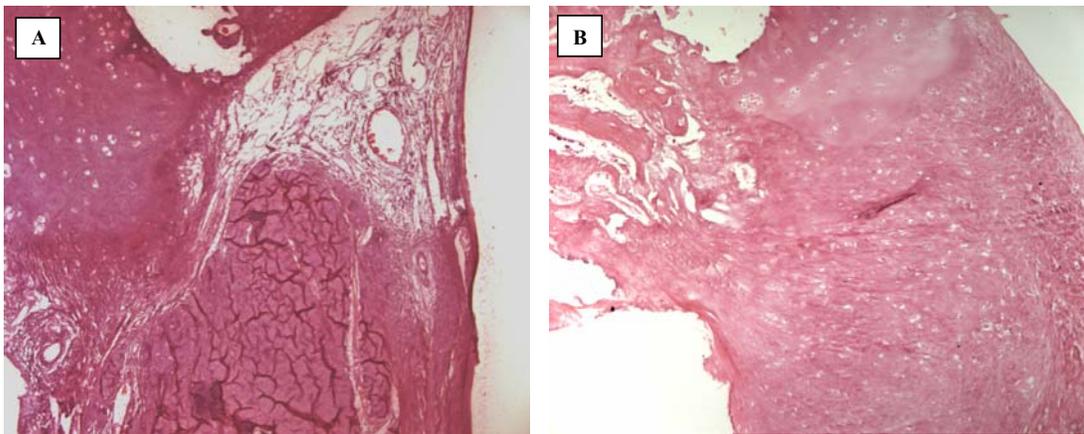
A análise histológica realizada pela microscopia óptica mostrou nítida presença de tecido fibroso ao redor de todos os implantes de  $\beta$ -TCP. Com relação aos implantes de PEUAPM, a camada de tecido fibroso era tênue, encontrando-se, por vezes, neoformação óssea em contato com o implante (Figuras 24 a 29).



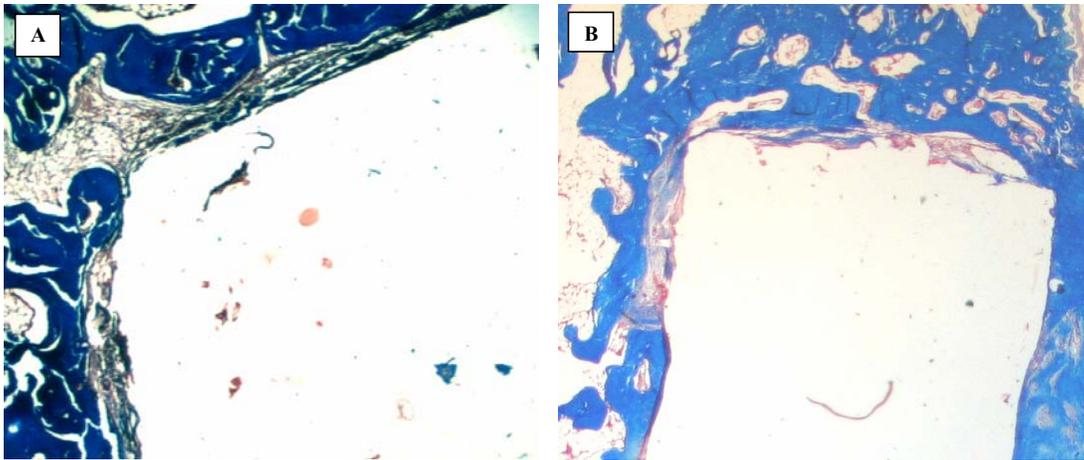
**Figura 24-** (A) Visão panorâmica do implante composto por  $\beta$ -TCP. Nota-se mesmo em menor aumento a presença significativa de tecido fibroso ao redor do implante (HE: Fotografado com objetiva de 2,5x); (B) Visão panorâmica do implante composto por PEUPM. Observa-se uma quantidade bastante discreta de material fibroso ao redor do implante (HE: Fotografado com objetiva de 2,5x).



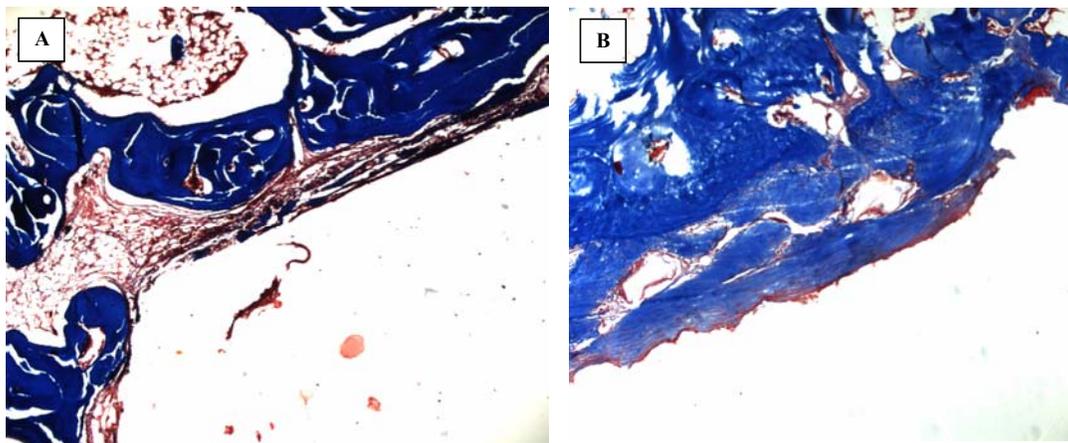
**Figura 25-** (A) Região de contato entre o implante de  $\beta$ -TCP e o osso subcondral. Observa-se material fibroso espesso (HE: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de contato entre o implante de PEUPM e o osso subcondral. Observa-se praticamente somente tecido ósseo (HE: Fotografado com objetiva de 5x).



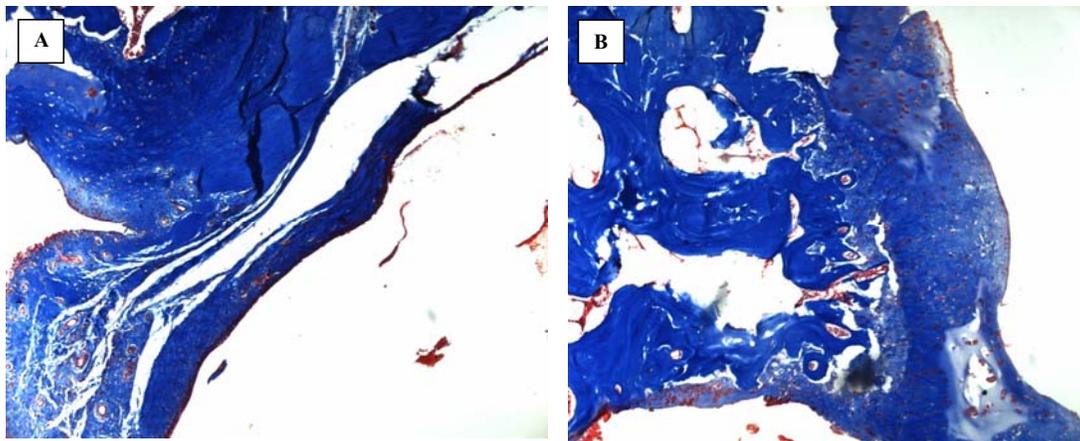
**Figura 26-** (A) Região de transição entre a cartilagem hialina, implante de  $\beta$ -TCP e o tecido fibroso neoformado (HE: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de transição entre a cartilagem hialina, implante de PEUPM e o tecido fibroso neoformado (HE: Fotografado com objetiva de 5x).



**Figura 27-** (A) Visão panorâmica do implante composto por  $\beta$ -TCP. Nota-se mesmo em menor aumento a presença significativa de tecido fibroso ao redor do implante (TM: Fotografado com objetiva de 2,5x); (B) Visão panorâmica do implante composto por PEUPM. Observa-se uma quantidade bastante discreta de material fibroso ao redor do implante (TM: Fotografado com objetiva de 2,5x).



**Figura 28-** (A) Região de contato entre o implante de  $\beta$ -TCP e o osso subcondral. Observa-se nesse aumento material fibroso espesso (TM: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de contato entre o implante de PEUPM e o osso subcondral. Observa-se praticamente somente tecido ósseo (TM: Fotografado com objetiva de 5x).



**Figura 29-** (A) Região de transição entre a cartilagem hialina, implante de  $\beta$ -TCP e o tecido fibroso neoforado (TM: Fotografado com objetiva de 5x); (B) Região de transição entre a cartilagem hialina, implante de PEUPM e o tecido fibroso neoforado (TM: Fotografado com objetiva de 5x).

## ***5- DISCUSSÃO***

Diversas espécies animais têm sido utilizadas em pesquisas para o estudo do processo de reparação da cartilagem articular. Na literatura encontram-se trabalhos que utilizam coelhos (O'DRISCOLL, 1988; MOW, 1991; MESSNER & GILLQUIST, 1993; SUOMINEN, 1996; SHAHGALDI, 1998; HASEGAWA, 1999; DIDUCH, 2000; COSTA, 2001; QIU, 2002; MIERISCH, 2002; RUDERT, 2005; WITTE, 2006), ratos (KONDO, 2005), cães (BREYNAN, 1997), porcos (GOTTERBARM, 2006), ovelhas (KANDEL, 2006) e bugios (MALININ, 2006). No entanto, segundo MURRAY (2002), o modelo canino se destaca por apresentar maior similaridade anatômica com o ser humano.

A articulação do joelho foi escolhida por ser uma articulação que sofre elevada solitação mecânica e por apresentar características anatômicas, que facilitam a sua abordagem cirúrgica e a avaliação do desempenho de implantes. Optou-se pelo sulco troclear, e não pela região dos côndilos femorais, pela facilidade de abordagem do primeiro, tornando deste modo o procedimento cirúrgico seguro e reprodutível. Além disso, a região troclear também está sujeita à solitações mecânicas repetidas durante a marcha do cão, do mesmo modo que a região dos côndilos.

Na literatura consultada, constatou-se que tanto a região dos côndilos femorais (MOW, 1991; MESSNER & GILLQUIST, 1993; COOK, 2003; KONDO, 2005; RENKEL, 2005; CHIANG, 2005; MALININ, 2006) como a região do sulco troclear (BREINAN, 1997; SHAHGALDI, 1998; HASEGAWA, 1999; COHEN, 2003; UEMATSU, 2005; RUDERT, 2005; WHITE, 2006; SUOMINEN, 2006; KANDEL, 2006), foram sede para a colocação de implantes.

A boa recuperação pós-operatória do Grupo Experimental foi um atestado de que os procedimentos cirúrgicos foram realizados de forma adequada, sem comprometimento significativo da função do membro, que se restabeleceu em torno de 12 horas após o procedimento. A exclusão do cão no. 2 foi considerada necessária, mesmo sem evidências de processo infeccioso agudo, pelo risco de ocorrer comprometimento do desempenho dos implantes, que seriam de difícil interpretação.

Embora o número de animais possa ser considerado pequeno, para se analisar o desempenho dos implantes todos os animais foram seguidos por nove meses e para se prescindir de um outro grupo, a alternativa encontrada foi analisar a integração do implante, por meio da artroscopia.

A opção pelo diâmetro de 5 mm do defeito osteocondral levou em consideração o fato de que já está definido na literatura que diâmetros inferiores a 3 mm tendem a ser reparados espontaneamente por tecido fibrocartilaginoso (RUDERT, 2005). Desse modo, procurou-se diminuir a interferência da capacidade de reparação intrínseca do próprio animal.

## **5.1- Análise dos resultados obtidos**

Para se mensurar o desempenho dos implantes de forma comparativa, foram estabelecidos critérios sobre alguns parâmetros. Dentre os parâmetros avaliados que foram definidos no objetivo do estudo, a manutenção do implante ao nível da cartilagem articular, pela sua integração ou fixação no osso subjacente, foi considerada o mais importante.

Outros parâmetros, como o desgaste da patela, o crescimento de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso sobre o implante, assim como a presença (ou não) de inflamação da membrana sinovial, foram considerados como eventos secundários ao primeiro. Se o implante apresentasse boa fixação no tecido ósseo subjacente, não haveria movimento e nem colapso do mesmo e, conseqüentemente, nem os outros eventos já citados.

Alguns métodos, descritos a seguir, foram utilizados para estudar esses parâmetros, seguindo critérios previamente estabelecidos para se comparar o desempenho dos implantes.

### **5.1.1- Superfície articular**

A artroscopia é uma técnica que propicia a observação direta das estruturas intra-articulares, por meio de um instrumento óptico, com mínima invasão e baixa morbidade (CRENSHAW, 1989). Essa técnica tem sido bastante utilizada na medicina humana para o diagnóstico e tratamento de patologias articulares, incluindo-se as lesões osteocondrais. Por meio dessa técnica é possível não só obter a dimensão exata da lesão,

como também efetuar alguns procedimentos cirúrgicos reparativos (CRENSHAW, 1989). Em medicina veterinária, no entanto, a técnica artroscópica é pouco utilizada, principalmente pela necessidade de equipe especializada e pelo elevado custo do material.

Não foi encontrado na literatura relato de estudos que tenham utilizado esse exame para analisar o desempenho de implantes osteocondrais. A utilização da artroscopia, neste estudo, foi extremamente útil, sinalizando de certo modo o que iria ocorrer com os dois tipos de implante aos 4 meses de seguimento. Esta ferramenta diagnóstica deve ser utilizada com mais frequência como uma forma alternativa de avaliação, reduzindo assim o número de animais no experimento e propiciando uma visão “in vivo” do implante, que pode ser realizada repetidamente ao longo do estudo, sem causar danos significativos para o animal.

Por meio desta avaliação, foi possível constatar que a maioria dos implantes cerâmicos ( $\beta$ -TCP) apresentavam-se abaixo da superfície articular adjacente, com intensa vascularização da membrana sinovial, refletindo provavelmente intenso processo inflamatório, decorrente do movimento do implante, ou da liberação de partículas de fosfato de cálcio ou ainda do próprio tecido que tentava se formar sobre o implante. Com relação ao PEUAPM, os achados foram completamente diferentes, pois não havia aumento de vascularização e os implantes estavam situados ao nível da cartilagem articular.

Pode-se, então, pressupor que a estabilidade mecânica induz menor inflamação da membrana sinovial.

#### 5.1.2- Análise da Interface entre o implante e o osso subcondral

Ao se utilizar implantes cerâmicos (polifosfato de cálcio e beta tricalcio fosfato) para o preenchimento de defeito osteocondral, espera-se que esse material seja lentamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo neoformado. Isso foi observado nos estudos realizados por KONDO et al. (2005), nos côndilos do fêmur de ratos; por GOTTERBARM et al. (2006), na região da tróclea do fêmur de porcos e por KANDEL (2006), na tróclea do fêmur de ovelhas.

Na elaboração deste estudo, optou-se pelo material cerâmico ( $\beta$ -TCP) visando a integração óssea do implante e a redução do movimento do implante no seu leito e, conseqüentemente, o colapso do mesmo com a sollicitação mecânica articular. No entanto, este não foi o resultado obtido, tanto na avaliação artroscópica já descrita, como na análise das radiografias. Com relação à avaliação radiográfica, pôde-se constatar evidente halo radioluscente ao redor dos implantes de  $\beta$ -TCP, quando comparado com o Grupo Controle e, inclusive, com o implante de PEUAPM. Além disso, a média da largura das paredes ósseas que continham os implantes de  $\beta$ -TCP, medida nas radiografias, foi significativamente maior do que a média da largura dos implantes de PEUAPM.

Possivelmente, uma explicação para o desempenho não esperado e inferior do implante de  $\beta$ -TCP no presente estudo (em relação à literatura) pode ser atribuída ao seu modo de fabricação. Os implantes em questão foram produzidos pela compactação de grânulos de  $\beta$ -TCP com o hidrogel na forma líquida, enquanto que os implantes utilizados pelos estudos citados eram blocos porosos de  $\beta$ -TCP utilizados comercialmente para preenchimento de defeitos ósseos. Provavelmente, a reabsorção do implante pela invasão celular e vascular reduziu rapidamente a sua resistência mecânica, impedindo a fixação do mesmo pelo tecido ósseo.

Corroborando de certo modo essa hipótese, a estabilidade mecânica dos implantes de PEUAPM foi um fator decisivo para o melhor desempenho desse implante, quando comparado com os de  $\beta$ -TCP. Mesmo sendo um implante sem condições intrínsecas de induzir o crescimento do tecido ósseo, o simples fato de se manter estável e inerte (sem induzir reação inflamatória secundária) foi suficiente para permitir que o tecido ósseo crescesse ao seu redor. Esse fato foi comprovado pela maior densidade óssea e manutenção da largura dos orifícios, evidenciado nas radiografias após nove meses de seguimento.

Pressupõe-se, então, que a matriz de PEUAPM suportou a carga recebida, não permitiu micromovimentação do implante e ofereceu um ambiente estável e adequado para a formação de tecido ósseo ao seu redor.

A microscopia eletrônica de varredura (módulo retroespalhado) também foi utilizada como uma forma alternativa para se avaliar a morfologia da interface osso-implante. Ficou evidente que no caso dos implantes de  $\beta$ -TCP a espessura da interface

era sempre maior e havia perda da sua arquitetura normal praticamente em todos os implantes, ao passo que com relação aos implantes de PEUAPM, a espessura da interface era muito menor e os implantes mantiveram a sua forma original. Esses achados simplesmente reforçam todas as considerações previamente apresentadas.

#### 5.1.3- Avaliação macroscópica do comportamento viscoelástico dos implantes de $\beta$ -TCP e de PEUAPM

A análise dos valores de deslocamento nos ensaios de fluência à indentação representa a deformação da rede polimérica do hidrogel, devido à força exercida pela penetração da ponta da esfera. Na Tabela 7 pode-se observar que houve alteração significativa do comportamento viscoelástico do hidrogel, em função da matriz do implante osteocondral. Comparando-se os valores de deformação da rede polimérica dos implantes com matriz de PEUAPM, seguidos por nove meses, verifica-se que houve manutenção do comportamento viscoelástico (Gráfico 1). No entanto, quando se analisam os valores de deformação e o comportamento das curvas de deformação com os implantes de  $\beta$ -TCP, também após nove meses de seguimento, é nítida a perda da resistência à carga. Essa resposta é resultado da falta de sustentação mecânica dos implantes de  $\beta$ -TCP com o passar do tempo, diminuindo a sua complacência e, conseqüentemente, resultando em maior deformação. Como fator causal dessa resposta, pode-se considerar a reabsorção do  $\beta$ -TCP, a sua fratura pelo movimento do implante gerado pela carga, ou os dois fatores em conjunto. Por ser mais resistente e não ser reabsorvido, o PEUAPM conferiu melhor desempenho por apresentar melhor sustentação mecânica para a superfície de hidrogel de pHEMA-(MMA-co-AA).

#### 5.1.4- Avaliação do mecanismo de desgaste dos implantes

A análise morfológica da superfície articular na região do implante (hidrogel) e da contra superfície (patela) permitiu qualificar os mecanismos de desgaste, e/ou a transferência de hidrogel para a contra superfície, a presença de “debris”, de lubrificação e manutenção, e/ou integridade da superfície articular.

Não foi observado arrancamento do hidrogel, seja por adesão ou por abrasão que tenha gerado mecanismo de desgaste intenso em nenhum dos implantes. Acredita-se que a manutenção da integridade superficial ocorreu devido à presença do líquido sinovial e pelo fato de não ter havido interações do tipo adesiva ou abrasiva significativas entre as superfícies da patela e do implante.

Apesar de não ter ocorrido desgarre do hidrogel das matrizes de  $\beta$ -TCP e de PEUAPM, houve desgaste da superfície da patela, com início de processo degenerativo evidente, apesar da presença do líquido sinovial. Provavelmente, o tecido neoformado sobre a superfície dos implantes foi responsável por essa agressão sobre a superfície articular da patela. Em geral, todo processo de desgaste se inicia pela adesão superficial que, com o passar do tempo, gera partículas no sistema, abrasão e um mecanismo de desgaste de três corpos, que é extremamente eficiente e catastrófico para a articulação (YAMAGUCHI, 1990). Esse achado é preocupante, já que há indícios de que esse processo de desgaste possa ocorrer com ambos os implantes, porém, somente uma avaliação com maior número de animais e com maior tempo de seguimento poderá confirmar essa hipótese.

#### 5.1.5- Histologia

A análise dos implantes osteocondrais avaliados por microscopia óptica, mostrou a presença de uma camada de tecido fibroso envolvendo ambos os implantes. Entretanto, nos implantes de B-TCP essa camada foi mais espessa. Todo implante, mesmo os chamados inertes, acabam sendo envolvidos por cápsula de tecido fibroso (ORÉFICE, 2006), quando implantados no meio interno. Segundo LANGER (1983), a espessura da cápsula de tecido fibroso formada ao redor do implante, está diretamente relacionada com o grau de toxicidade do material implantado.

Neste estudo as hipóteses possíveis para explicar porque a cápsula de tecido fibroso foi maior ao redor dos implantes de  $\beta$ -TCP devem recair sobre a pureza do material empregado e/ou sobre a liberação de partículas, estimuladas pelo micromovimento do implante.

Com relação à toxicidade do  $\beta$ -TCP, as análises realizadas em meio de cultura com fibroblastos mostraram que essas as partículas não foram consideradas tóxicas para esse tipo de célula, afastando, desse modo, essa hipótese.

Com relação à presença das partículas, sabe-se que, em geral, que quanto maior for o número e menor for o tamanho das partículas liberadas por um implante, maior será a reação inflamatória induzida, independente da constituição química das mesmas. Materiais considerados inertes, como por exemplo, os materiais carbônicos, podem induzir intensa reação inflamatória, dependendo do tamanho das partículas e da sua forma, como descrito por BELANGERO et al. (1993).

Assim sendo, resta como explicação possível, o efeito das partículas de  $\beta$ -TCP, que devem ter ocorrido pela invasão celular e vascular, logo após a sua implantação. Mesmo que não tenha havido efeito tóxico das mesmas, essas devem ter induzido reação inflamatória, com neoformação de tecido fibroso ao redor do implante, propiciando maior mobilidade do mesmo que, por sua vez, induzia ainda mais a reação inflamatória, criando-se, assim, um círculo vicioso que culminou com o colapso do implante. Todas as avaliações realizadas (artroscopia, radiografia, microscopia eletrônica de varredura) indicam e respaldam essa história natural.

## ***6- CONCLUSÕES***

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

- 1) O implante de PEUAPM / pHEMA/poli(MMA-co-AA) apresentou melhor desempenho biológico e mecânico do que o implante de  $\beta$ -TCP / pHEMA/poli(MMA-co-AA);
- 2) A interface gerada pelos implantes de PEUAPM / pHEMA/poli(MMA-co-AA) apresentou menor quantidade de tecido fibroso, tanto na avaliação radiográfica, pela MEV e microscopia óptica;
- 3) Os implantes de PEUAPM / pHEMA/poli(MMA-co-AA) apresentaram manutenção de seu comportamento viscoelástico no transcorrer do estudo;
- 4) Houve indícios de processo de desgaste abrasivo em patela.

## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

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

Bavaresco, V. P.; Zavaglia, C. A. C.; Reis, M. C.; Gomes, J. R. Tribological characteristics of synthetic hydrogels for biomedical applications. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MECHANICAL ENGINEERING, 17 (novembro), 2003, São Paulo. Proceedings..., 2003.

Belangero, W.D.; Köberle, G.; Hadler, W.A.: Inflammatory reaction of rat striated muscle to particles of carbon fiber reinforced carbon. *Brazilian J Med Biol Res*, 26: 819-826, 1993

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

Breinan, H.A., Minas, T., HSU, H., Nehrer, S., Sledge, C.B., Spector, M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.79, p.1439-1451,1997.

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

Buckwalter, J.A., Orthopaedic Basic Science – Biology and Biomechanics of the musculoskeletal system – American Academy of Orthopaedic Surgeons – 2<sup>nd</sup> Edition – 2000.

Chiang, H.,Kuo, T.F.,Tsai, C.C., Lin, M.C., She, B.R.,Huang, Y.Y., Lee, H.S., Shieh, C.S., Chen, M.H., Ramshaw, J.A.M., Weirkmeister, J.A., Tuan, R.S., Jiang, C.C. Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation.*Journal of Orthopaedic Research*, v.23,p.584-593,2005.

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

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

Cohen, S.B., Meirisch, C.M., Wilson, A., Diduch, D.R. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*, v.24, p.2653-2660,2003.

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

Crenshaw, A. H. – Cirurgia Ortopédica de Campbell – volume 4 – Editora Manole – 1989.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. Editora Guanabara 6. ed – Rio de Janeiro, 2000.

Diduch, D.R., Jordan, L.C.M., Mierisch, C.M., Balian, G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy: The Journal and Related Surgery*, v.16,p.571-577,2000.

Downes, S; Archer, R.S.; Kayser, M.V.; Patel, M.P. & Braden, M. - The Regeneration of Articular Cartilage Using a New Polymer System, *Journal of Materials Science - Materials In Medicine*, v.5: 88-95, 1994.

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

Fossum, T.W. , Cirurgia de Pequenos Animais – 1° Edição Roca – 2002;

Fukuda, A., Kato, K., Hasegawa, M., Hirata, H., Sudo, A., Okazaki, K., Tsuda, K., Shikinami, Y., Uchida, A., *Biomaterials* v.26, p. 4301, 2005.

Gonzalez, N., Vadillo, I., Blanco, M.D., Trigo, R.M., Teijon, J.M, Hidrogeles: Síntesis, propiedades y aplicaciones. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.1, p.79-92, 1992.

Gotterbarm, T., Richter, W., Jung, M., Vilei, S.B., Mainil-Varlet, P., Yamashita, T., Breusch, S.J. *Biomaterials*, v.27, p.3387-3395,2006.

Hasegawa, M., Sudo, A., Shikinami, Y., Uchida, A. Biological performance of a three-dimensional fabric as artificial cartilage in the repair of large osteochondral defects in rabbit. *Biomaterials*, v.20, p.1969-1975,1999.

Hattori, K. et al., Novel ultrasonic evaluation of tissue-engineered cartilage for large osteochondral defects – non invasive judgment of tissue-engineered cartilage. *Journal of Orthopedic Research*, v23, p. 1179-1183,2005.

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

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

Iso 10993-5 I (E) Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. 1992.

Jackson, B.W., Peggy, A.L., Aberman, H.A., Simon, T. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. *The Journal of the Bone and Joint Surgery*, v.83-A, p.53-64,2001.

Kandel, R.A., Grynblas, M, Pilliar, R., Lee, J., Wang, J., Waldman, S., Zalzal, P., Hurtig, M. – Repair of osteochondral defects with biphasic cartilage-calcium polyphosphate constructs in a sheep model. *Biomaterials*, v.27, p.4120-4131,2006.

Kempson, G.E.; Freeman, M.A.R.; Swanson, S.A.V. The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head. *Journal of Biomechanics*,v.4, p.239-250,1971.

Kirkpatrick, C.J. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. *Regulatory Affairs*, 4: 13-32, 1992.

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

Kondo, N.; Ogose, A.; Takunaga, K. – Bone formation and resorption of highly purified  $\beta$ -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle, *Biomaterials*, v.26, p. 5600-5608,2005.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças – Elsevier Editora LTDA. 7a edição, 2005.

Langer, G. Materials for bone and joint replacement. *Transplantation und künstliche Organe*. 16: 203-212, 1983.

Lison, L. Histochemie et Cytochemie Animales – Principes et Methodes. Gauthier Villars, Paris, 1960.

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

Lombello, C.B.; Malmonge, S.M. & Wada, M.L.F., Análise Morfológica de Condrócitos sobre Hidrogéis de poliHEMA, apresentado no 5º Congresso da Associação Brasileira de Polímeros, Águas de Lindóia, novembro de 1999b.

Lombello C.B., Malmonge, S.M. & Wada, M.L.F., Morphology of Fibroblastic Cells Cultured on Poly (HEMA-co-AA), *Cytobios*, v.101: 115-122, 2000a.

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

Malinin, T., Temple, H.T., Buck, B.E. Transplantation of osteochondral allografts after cold storage, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.88,p.762-770,2006.

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

Malmonge, S.M., Hidrogéis sintéticos para o reparo de defeitos de cartilagem articular, tese de doutorado, Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1997.

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

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

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

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

Mello, M. L. S. & VIDAL, B. C. *Práticas de Biologia Celular*, Edgard Blücher/FUNCAMP, SP, 1980.

Mello, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz. J. Genet.*, **20**, 257-264, 1997.

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

Mierisch, C., Cohen, S.B., Jordan, L.C., Robertson, P.G., Balian, G.B., Diduch, D.R. Transforming growth factor- $\beta$  in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, v.18, p.892-900, 2002.

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

Módis, L. Organization of the Extracellular Matrix: A polarization Microscopic Approach, CRC Press, Boca Raton, 1991.

Mow, V.C., Holmes, M.H., Lai, W.M., *Journal of Biomechanics*, v.17, p.377-394, 1984.

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

Murray, R. – Animal Models for orthopaedic disease – Who benefits? – The Veterinary Journal (163) 230-231, 2002.

Netti, P.A., Shelton, J.C., Revell, P.A., Pirie, C., Smith, S., Ambrosio, L., Nicolais, L., Bonfield, W. – Hydrogels as interface between bone and an implant, *Biomaterials*, v.14, p.1098-1104,1993.

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

Oréfice, R.L.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. Biomateriais – Fundamentos e Aplicações – Cultura Médica – 2006;

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

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

Piermattei, D.; Flo, G.L.; DeCamp, C.E. – *Handbook of Small Animal orthopedics and Fracture Repair*. Saunders – fourth Edition – 2006.

Qiu, Y.S.; Shahgaldi, W.J., Revell, W.J., Heatley, F.W. Evaluation of gateshead carbon fibre rod as an implant material for repair of osteochondral defects: a morphological and mechanical study in the rabbit knee, *Biomaterials*, v.23, p. 3943-3955, 2002.

Reissis, N.; Kayser, M.; Bentley, G. & Downes, S., A Hydrophylic Polymer System Enhanced Articular Cartilage Regeneration *in vivo*, *Journal of Materials Science - Materials In Medicine*, v.6:768-772, 1995.

Rudert, M., Wilms, U., Hoberg, M., Wirth, C.J., Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome – *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, v.125, p.598-608, 2005.

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

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

Slatter, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, Manole, 1998.

Suominen, E., Aho, A., Vedel, E., Kangasniemi, I., Uusipaikka, E., Yli-Urpo, A. Subchondral bone and cartilage repair with bioactive glasses, hydroxyapatite, and hydroxyapatite-glass composite. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.32, p.543-551, 1996.

Uematsu, K., Hattori, K., Ishimoto, Y., Yamauchi, J., Habata, T., Takakura, Y., Ohgushi, H., Fukuchi, T., Sato, M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*, v.26, p.4273-4279, 2005.

Yamaguchi, Y., Tribology of plastic materials – Their characteristics and applications to sliding components. *Tribology Series*, 16. 1990.

Wang, A., Essner, A., Polineni, V.K., Stark, C., Dumbleton, J.H., Lubrication and wear of ultra-high molecular weight polyethylene in total joint replacements. *Tribology International*, v.31, p.17-33, 1998.

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

Witte, F., Reifenrath, J., Müller, P.P., Bormann, D., Rudert, M. cartilage repair on magnesium scaffolds used as a subchondral bone replacement. *Mat-wiss. U. Werkstofftech*, v.37, p.504-508, 2006.