UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

HIDROGEL SINTÉTICO PARA REPARO DE DEFEITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR

Autor : **Sônia Maria Malmonge**
Orientador : **Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Sônia Maria Malmonge e aprovada pela Comissão Julgadora em 26/02/97
Orientador

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

HIDROGEL SINTÉTICO PARA REPARO DE DEFEITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR

Autor : **Sônia Maria Malmonge**
Orientador : **Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia**

Curso : Engenharia Elétrica
Área de Concentração : Automação

Tese de doutorado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica.

Campinas, 1997
S.P. - Brasil

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

IDADE BC
CHAMADA: T/UNICAMP
M297h
EX.
TOMBO BC/30552
PROC. 281/97
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 24/05/97
Nº CPD

CM-00098065-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

M297h

Malmonge, Sônia Maria
Hidrogel sintético para reparo de defeitos da cartilagem articular / Sônia Maria Malmonge.--Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Materiais biomédicos. 2. Biomecânica. 3. Implantes artificiais. 4. Polímeros na medicina. I. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

Tese de Doutorado

HIDROGEL SINTÉTICO PARA REPARO DE DEFEITOS DA CARTILAGEM ARTICULAR

Autor : **Sônia Maria Malmonge**

Orientador : **Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia**

Profª. Drª. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia - Presidente
Departamento de Engenharia de Materiais - FEM UNICAMP

Profª. Drª. Olga Zazuco Higa
Divisão de Radiobiologia - IPEN - CNEN - USP

Prof. Dr. Gilberto Góissis
Departamento de Química e Física Molecular - IFQSC - USP

Prof. Dr. Willian Dias Belangero
Departamento de Ortopedia e Traumatologia - FCM UNICAMP

Prof. Dr. Alberto Cliquet Júnior
Departamento de Engenharia Biomédica - FEEC - UNICAMP

Campinas, 26 de fevereiro de 1997

Aos meus pais, Paulo e Diva,

com admiração pela coragem com que enfrentam as dificuldades do dia a dia.

Ao Cláudio,

pelo carinho, incentivo e paciência.

"Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades."

Padre Sebastião

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia pela orientação, confiança e amizade.

À Eliana A. R. Duek pelo apoio, amizade e incentivo.

À professora Dra Maria Lúcia Furlan Wada do Departamento de Biologia Celular/IB/UNICAMP, pelo aprendizado e realização de ensaios de citotoxicidade.

Um agradecimento especial ao professor Dr. William Dias Belangero do Departamento de Ortopedia e Traumatologia/FCM/UNICAMP, pela colaboração prestada a este trabalho na realização dos ensaios de biocompatibilidade e discussão dos resultados, colaboração esta fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Engenharia Biomédica pela colaboração, em especial ao Dr. Alberto Cliquet Jr. pela oportunidade.

À todos os funcionários do Centro de Engenharia Biomédica pelo apoio, em especial ao técnico Rogério do Carmo Toledo pela dedicação na confecção das peças e dispositivos utilizados no decorrer do trabalho, à Nirlei A. Vitarelli, Eugênio C. Carrara, Gilson B. Maia, Márcio T. Watoniki e Valdinéia S. Petinari pela atenção e carinho.

À Eloísa da Silva Quitério e aos funcionários da CPG/FEEC/UNICAMP, pela atenção e presteza com que sempre me atenderam.

À todos os colegas do Departamento de Engenaria Biomédica/FEEC/UNICAMP pelo companheirismo durante a jornada, em especial a Maria Cláudia F. Castro, Joaquim M. Maia, Pedro Mikail, Josue B. de paula, Percy Nohama e François Sovi.

Aos colegas do grupo de biomateriais Rubens M. Luciano, Mayard Zolotar, Luis Bierwagen, Marcelo Carvalho Reis, Vanessa P. Bavaresco, Beatriz L. Fernandez, José Augusto dos Santos, Renato F. da Silva, Samuel Barbanti e Necésio G da Costa, pelo agradável convívio e proveitosas discussões.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Engenharia de Materiais/FEM/UNICAMP pela acolhida, em especial à Rita Helena B. Jacon, Cláudia Aoqui, Antonio Laerte Struziato, José Luis Lisboa, Fábio Gatamorta, Emilcio Cardoso, José Daniel P. Cedro e Maria do Carmo M. Ferreira pela inestimável ajuda.

Agradeço ainda à Isabel Cristina Izatto, Nilza Alzira Batista, Ana Cristina de Moraes e William Adalberto Silva pela imensa colaboração na realização dos ensaios de biocompatibilidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim agradeço a todos que de alguma maneira direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i

LISTA DE TABELAS viii

NOMENCLATURA

Glossário x

Terminologia xii

Siglas xii

RESUMO xiii

ABSTRACT xv

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO 01

Capítulo 2 - TEORIA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 03

2.1 - Biomateriais 03

2.2 - Reparo de cartilagem articular 05

2.3 - A cartilagem articular 9

2.3.1 - Colágeno 10

2.3.2 - Proteoglicanos 10

2.3.3 - Grupos carregados 11

2.3.4 - Água intersticial 11

2.3.5 - Biotribologia 14

2.3.6 - Comportamento mecânico 14

2.4 - Hidrogéis 18

2.4.1 - Aplicações biomédicas de hidrogéis 23

2.4.2 - Pesquisas utilizando hidrogéis para o reparo de defeitos da cartilagem articular 24

2.5 - Avaliação de biomateriais 27

2.5 - Citotoxicidade 27

2.5 - Biocompatibilidade 29

Capítulo 3 - OBJETIVO 31
Capítulo 4 - MATERIAIS E MÉTODOS 33
4.1 - Síntese do material 33
4.1.1 - poli(2-hidróxi etil metacrilato) 33
4.1.2 - blendas de redes semi interpenetrantes (sIPN) 34
4.1.2 - amostras porosas 36
4.2 - Caracterização dos hidrogéis 37
4.2.1 - Capacidade de absorção de água e de solução salina 38
4.2.2 - Densidade de carga negativa fixa 38
4.2.3 - Comportamento mecânico de hidrogéis 39
4.2.4 - Microscopia eletrônica de varredura 42
4.3 - Ensaios de citotoxicidade dos hidrogéis 42
4.3.1 - Células 43
4.3.2 - Inóculo 43
4.3.3 - Avaliação da citotoxicidade 44
4.4 - Ensaios *in vivo* 44
4.4.1 - Animais utilizados 44
4.4.2 - Determinação do modelo para estudo 45
4.4.3 - Acondicionamento e esterilização das amostras 45
4.4.4 - Procedimento cirúrgico - implante 45
- sacrifício 47
4.4.5 - Análise macroscópica das superfícies articulares 48
4.4.6 - Ensaios de indentação dos espécimes 48
4.4.7 - Análise histológica 50
Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
5.1 - Síntese e caracterização de hidrogéis 52
5.1.1 - Capacidade de absorção de água e de solução salina 52
5.1.2 - Comportamento mecânico dos hidrogéis 55
5.1.2.1 - Poli(2-hidróxi etil metacrilato) 56
5.1.2.2 - Blenda de rede semi interpenetrante poli(2-hidróxietil metacrilato)-acetato de celulose 58

5.1.2.3 - Blenda de rede semi interpenetrante poli(2-hidróxietil metacrilato)- poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) 59
5.1.3 - Densidade de carga negativa fixa..... 62
5.2 - Citotoxicidade 63
5.3 - Escolha do hidrogel a ser utilizado no ensaio *in vivo*..... 71
5.4 - Ensaio *in vivo* 77
5.4.1 - Análise macroscópica das superfícies articulares 77
5.4.2 - Análise histológica 91
5.4.3 - Comportamento mecânico das superfícies articulares ... 107
5.5 - Comentários sobre a metodologia utilizada..... 115
Capítulo 6 - CONCLUSÕES E PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS 117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 120
BIBLIOGRAFIA 132
TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS 133
APÊNDICES
A1 - TABELA DE DADOS EXPERIMENTAIS A1.1
A2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA A2.1

LISTA DE FIGURAS

figura	descrição	página
Figura 2.3.1 -	Aspectos estruturais típicos de uma junta diartrodial	12
Figura 2.3.2 -	Representação esquemática da matriz extracelular da cartilagem articular	13
Figura 2.3.3 -	Esquema ilustrando o ensaio de indentação em cartilagem articular	16
Figura 2.4.1 -	Representação esquemática de um hidrogel	19
Figura 2.4.2 -	Esquema ilustrando a estrutura de uma blenda polimérica do tipo rede interpenetrante (IPN)	21
Figura 2.4.3 -	Esquema ilustrando a estrutura de uma blenda polimérica do tipo rede semi interpenetrante (sIPN)	22
Figura 4.1.1 -	Molde utilizado para síntese de amostras de hidrogel denso	36
Figura 4.1.2 -	Molde utilizado para síntese de amostras de hidrogel poroso	37
Figura 4.2.1 -	Esquema ilustrando ensaio de indentação em hidrogéis	40
Figura 4.2.2 -	Ensaio de indentação em amostras de hidrogel	41
Figura 4.4.1 -	Superfície articular típica da região intercondiliana do fêmur distal de rato. (*) região onde foi realizada a perfuração.....	46

Figura 4.4.2 - Esquema ilustrando o implante de amostra de hidrogel na superfície articular de região intercondiliana de fêmur de rato 47

Figura 4.4.3 - Análises realizadas no ensaio *in vivo*..... 48

Figura 4.4.4 - Esquema ilustrando ensaio de indentação na superfície articular de fêmur distal de rato 49

Figura 4.4.5 - Ensaio de indentação na superfície articular de fêmur distal de rato 51

Figura 5.1.1 - Hidrogel de poli(2-hidróxi etil metacrilato) 53

Figura 5.1.2 - Hidrogel blenda de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato) - acetato de celulose 53

Figura 5.1.3 - Hidrogel blenda de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) 54

Figura 5.1.4 - Altura de indentação ao longo do tempo para hidrogel de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de agente de reticulação..... 56

Figura 5.1.5 - Módulo de fluência a indentação e capacidade de absorção de solução salina para amostras de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de agente de reticulação 57

Figura 5.1.6 - Altura de indentação ao longo do tempo para amostras de blenda rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de acetato de celulose 58

Figura 5.1.7 - Módulo de fluência a indentação e capacidade de absorção de solução salina para amostras de blenda rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de acetato de celulose 59

Figura 5.1.8 - Altura de indentação ao longo do tempo para blenda rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) 60

Figura 5.1.9 - Módulo de fluência a indentação e capacidade de absorção de solução salina para blenda rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)..... 61

Figura 5.2.1 - Morfologia das células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra do material controle positivo..... 65

Figura 5.2.2 - Morfologia das células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra do material controle negativo..... 66

Figura 5.2.3 - Morfologia das células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra de hidrogel de poli(2-hidróxi etil metacrilato)..... 67

Figura 5.2.4 - Morfologia das células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose 68

Figura 5.2.5 - Morfologia das células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico..... 69

Figura 5.3.1 - Módulo de fluência a indentação *versus* capacidade de absorção de solução salina para os hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato), blenda poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose e blenda poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) 73

Figura 5.3.2 - Fotomicrografias do hidrogel blenda de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico), composta por camada superior densa e camada inferior porosa 76

Figura 5.4.1 - Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 03 semanas de seguimento 80

Figura 5.4.2 - Superfícies articulares de fêmur distal de rato com implante após 03 semanas de seguimento 81

Figura 5.4.3 - Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 05 semanas de seguimento 83

Figura 5.4.4 - Superfícies articulares de fêmur distal de rato com implante após 05 semanas de seguimento 84

Figura 5.4.5 - Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 08 semanas de seguimento 86

Figura 5.4.6 - Superfície articular de fêmur distal de rato com implante após 08 semanas de seguimento 87

Figura 5.4.7 - Superfícies articulares de fêmur distal de rato com implante após 16 semanas de seguimento 89

Figura 5.4.8 - Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 16 semanas de seguimento 90

Figura 5.4.9 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 2 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 93

Figura 5.4.10 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 2 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 94

Figura 5.4.11 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 3 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 95

Figura 5.4.12 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 3 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 96

Figura 5.4.13 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 5 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 97

Figura 5.4.14 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 5 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 98

Figura 5.4.15 - Cortes histológicos histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 8 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 99

Figura 5.4.16 - Cortes histológicos histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 8 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 100

Figura 5.4.17 - Cortes histológicos histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 12 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 101

Figura 5.4.18 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 12 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 102

Figura 5.4.19 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 16 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 103

Figura 5.4.20 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 16 semanas de seguimento, (a) aumento - 60X, (b) aumento - 80X 104

Figura 5.4.21 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superficies articulares indentadas em áreas com (a) defeito controle e (b) implante, comparados a curva obtida para área de cartilagem normal, 03 semanas de seguimento 109

Figura 5.4.22 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superficies articulares indentadas em áreas com (a) defeito controle e (b) implante, comparados a curva obtida para área de cartilagem normal, 05 semanas de seguimento 109

Figura 5.4.23 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superfícies articulares indentadas em áreas com (a) defeito controle e (b) implante, comparados a curva obtida para área de cartilagem normal, 08 semanas de seguimento 111

Figura 5.4.24 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superfícies articulares indentadas em áreas com (a) defeito controle e (b) implante, comparados a curva obtida para área de cartilagem normal, 12 semanas de seguimento 112

Figura 5.4.25 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superfícies articulares indentadas em áreas com (a) defeito controle e (b) implante, comparados a curva obtida para área de cartilagem normal ,16 semanas de seguimento 113

Figura 5.4.26 - Valores de módulo elástico para superfícies articulares em áreas de implante, defeito controle e cartilagem articular normal 114

LISTA DE TABELAS

tabela	descrição	página
Tabela 4.1.1 -	Concentrações de monômero, iniciador e agente de reticulação utilizados na síntese de amostras de poli(2-hidróxi etil metacrilato) (%p/p).....	34
Tabela 4.1.2 -	Concentrações de monômero, iniciador e agente de reticulação utilizados na síntese de amostras de blenda poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose (%p/p).....	35
Tabela 4.1.3 -	Concentrações de monômero, iniciador e agente de reticulação utilizados na síntese de amostras de blenda poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (%p/p).....	35
Tabela 5.1.1 -	Valores de capacidade de absorção de água e de solução salina medidos experimentalmente para hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) , blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose e poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico), obtidos a partir da média entre tres determinações.....	55
Tabela 5.1.2 -	Valores de densidade de carga negativa fixa medidos para amostras de hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato), blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose e poli(2-hidróxi etil metacrilato) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).....	62

Tabela 5.2.1- Quantidade de células em suspensão presentes no meio de cultura utilizado no teste de citotoxicidade para os e hidrogéis testados (resultados representam a média dos 3 frascos para cada amostra)..... 63

Tabela 5.3.1 - Características da cartilagem hialina.. 72

Tabela 5.3.2 - Valores de módulo de fluência a indentação obtidos experimentalmente por diferentes pesquisadores 72

Tabela 5.3.3 - Características da amostra porosa do hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)..... 75

Tabela 5.4.1 - Número de animais utilizados e tempos de seguimento do ensaio *in vivo* 78

Tabela 5.4.2 - Ensaio *in vivo* - análise macroscópica das superfícies articulares dos côndilos com implante e côndiloc controle..... 78

NOMENCLATURA

GLOSSÁRIO

artrodese - procedimento cirúrgico que tem como objetivo provocar a junção articular.

biotribologia - estudo do atrito e desgaste de articulações animais.

blenda polimérica - mistura fisica de dois polímeros, sem qua haja ligação química covalente entre eles.

células Hela - linhagem de células estabelecida a partir de carcinoma humano, comumente utilizada em ensaios de citotoxicidade.

células L929 - linhagem de células estabelecida a partir de fibroblasto de rato, comumente utilizadas em ensaios de citotoxicidade.

células VERO - linhagem de células de fibroblastos, estabelecida a partir de rim de macaca, bastante difundida entre laboratórios de cultura de células.

condromalacia - termo utilizado para descrever alterações tróficas da cartilagem articular que nesta situação particular encontra-se amolecida.

copolímero - material polimérico constituído por cadeias poliméricas que possuem dois ou mais meros diferentes. As cadeias poliméricas que constituem um copolímero são formadas a partir de dois ou mais monômeros diferentes.

dureza - resistência a deformação local, define a facilidade com que um material pode ser indentado, perfurado ou sofrer abrasão.

fluência - deformação lenta e progressiva de um sólido quando submetido a uma carga constante. O termo "creep" costuma ser empregado sem tradução, principalmente quando se trata de ensaio em material polimérico.

fluência a indentação - ensaio de fluência em espécime submetido a indentação.

indentação - penetração de um espécime por uma ponta plana ou esférica, sob a aplicação de carga.

módulo elástico - a relação entre a tensão e a deformação correspondente, abaixo do limite de proporcionalidade. A menos que especificado, o termo pode ser aplicado a tração ou compressão. Normalmente denominado módulo de Young.

módulo de fluência - relação entre a tensão e a deformação, determinado a partir de um ensaio de fluência.

osteoartrite ou osteoartrose - caracterizam um processo degenerativo, inflamatório ou não de uma articulação, que leva a disfunção da cartilagem articular, hipertrofia do osso e rigidez articular após período de atividade física prolongada.

órgão híbrido - órgão constituído por uma matriz tridimensional de material sintético, sobre o qual crescem células do tecido que constitui o órgão que se deseja regenerar.

osteocondrite dissecante - consiste no destacamento de um fragmento articular, ocorrendo principalmente no joelho, quadril e ombro.

osteotomia - consiste na secção óssea através de instrumental cirúrgico.

relaxação de tensão - diminuição lenta e progressiva da carga necessária para manter uma deformação específica a um espécime sendo ensaiado.

solução salina - solução de água/NaCl 0,15 Mol L^{-1}.

TERMINOLOGIA

símbolo	**significado**	**unidade (SI)**
E	módulo elástico	[MPa]
E2s	módulo de fluência calculado a partir da resposta obtida após 2 segundos de aplicação da carga no caso do ensaio de fluência	[MPa]
e	espessura da amostra de hidrogel	[m]
h	altura de indentação	[m]
p	carga	[Kgf]
r	raio do indentador	[m]
m	massa	[Kg]
n	normalidade	[N]
V	volume	[l]
χ	capacidade de absorção de água ou de solução salina pelo hidrogel	[%]

SIGLAS

AA - ácido acrílico

AC - acetato de celulose

AR - agente de reticulação

ASTM - American Society for Testing Materials

DCF - densidade de carga fixa

GORETEX^{TM} - marca registrada de membrana de poli(tetraflúor etileno) expandido

IPN - rede interpenetrante

HEMA - 2-hidróxi etil metacrilato

ISO - International Standard Organization

KLM - modelo de comportamento mecânico da cartilagem articular desenvolvido por KWEY, LAI & MOW (MOW e cols., 1980)

MMA - metacrilato de metila

MTS - Material Test System

PMMA - poli(metacrilato de metila)

poliHEMA - poli(2-hidróxi etil metacrilato)

poli(MMA-co-AA) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)

PVA - poli(álcool vinílico)

SBF - soro fetal bovino

sIPN - rede semi interpenetrante

TMPTMMA - trimetilol propano trimetacrilato

UV - ultra violeta

RESUMO

MALMONGE, Sônia Maria, *Hidrogel Sintético para Reparo de Defeitos da Cartilagem Articular*, Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 1997, 182 p. Tese (doutorado).

Foi realizado um estudo com hidrogéis sintéticos, para a obtenção de biomaterial com características adequadas ao uso no reparo de defeitos da cartilagem articular. Amostras de hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) (poliHEMA), blendas do tipo redes semi interpenetrantes - sIPN de poliHEMA com acetato de celulose (poliHEMA-AC) e de poliHEMA com poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (poliHEMA-poli(MMA-co-AA) foram obtidas por polimerização térmica e caracterizadas quanto à capacidade de absorção de água e de solução salina; quanto ao comportamento mecânico, através de ensaios de fluência a indentação e quanto à citotoxicidade frente a cultura de células *in vitro*. Os resultados mostraram que é possível melhorar o comportamento mecânico de hidrogéis de poliHEMA, através da variação na quantidade de agente de reticulação ou da obtenção de blendas de poliHEMA com polímeros lineares, porém o aumento das propriedades mecânicas é sempre acompanhado de uma diminuição da capacidade de absorção de água. Nenhum dos hidrogéis estudados apresentou efeito citotóxico frente a cultura de células VERO. A blenda poliHEMA-poli(MMA-co-AA) possibilitou uma melhora das propriedades mecânicas do hidrogel de poliHEMA, sem diminuir muito a sua capacidade de absorção de água e permitiu a incorporação de grupos negativos fixos a estrutura macromolecular, mimetizando assim a matriz extracelular da cartilagem articular e apresentando características semelhantes as da cartilagem hialina. Por isso foi utilizada para a realização de um ensaio *in vivo*, onde verificou-se a potencialidade deste hidrogel para utilização na aplicação proposta. O implante

do hidrogel não apresentou reação inflamatória que inviabilizasse sua utilização, minimizou a ocorrência de reação sinovial e acelerou a reparação de defeitos provocados na cartilagem hialina, levando a formação de uma superfície articular com características biomecânicas melhores do que a superfície resultante nos casos de reparação biológica dos defeitos sem a presença do implante de hidrogel.

Palavras Chave

- Materiais Biomédicos, Biomecânica, Implantes Artificiais, Polímeros na Medicina.

ABSTRACT

MALMONGE, Sônia Maria, *Synthetic Hydrogel for the Repair of Articular Cartilage Defects*, Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade estadual de Campinas, 1997, 182 p. Thesis (doctorate).

This work shows a study carried out with synthetic hydrogels aiming the obtention of a biomaterial to be used in the repair of articular cartilage defects. Hydrogels samples of poly(2-hydroxy ethyl methacrylate) (polyHEMA) and blends of polyHEMA with cellulose acetate (CA) or poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid) (poly(MMA-co-AA)) was obtained by thermal polymerization and the following characterisation procedures was carried out: determination of the equilibrium water content and saline solution content, evaluation of the mechanical behaviour by creep indentation tests and cytotoxicity through *in vitro* tests. The results showed that it is possible to improve the mechanical behaviour of the polyHEMA hydrogels by changing the crosslinking agent amount or by blending polyHEMA with linear polymers. The mechanical properties improve was accompanied by a decrease in the equilibrium water content and let to the incorporation of negative fixed charges to the macromolecular network, mimicking the extracelular matrix of the hyaline cartilage. This hydrogel showed characteristics similar to that one of hyaline cartilage and was used in a *in vivo* test that showed its potential for using in the repair of articular cartilage defects. The hydrogel implant did not show significative inflammatory reaction, let to a decrease in the synovial inflammations and improved the repair of the articular cartilage defects performed in

the intercondilian region of rat femur, by forming an articular surface showing better biomechanical characteristics than the surface of biological repair in case of control defects.

Keywords

- Biomedical Materials, Biomechanics, Artificial Implants, Polymers in medicine.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

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

O crescente potencial dos biomateriais vem sendo cada vez mais reconhecido pelos observadores da indústria biomédica, o que tem levado a um crescente aumento das pesquisas na área e consequente aumento de procedimentos clínicos utilizando biomateriais, em diversas áreas da medicina e odontologia, embora muitos desafios ainda existam.

Dentro da ortopedia, nos últimos anos, muito esforço vem sendo dedicado a busca de procedimentos alternativos aos atualmente utilizados em casos de lesões de superfícies articulares.

Doenças envolvendo as articulações são comuns não só em humanos mas na espécie dos mamíferos em geral. As mais comuns são a osteoartrite ou osteoartrose, condromalacia, e

osteocondrite dissecante. Além das doenças, cujas causas e mecanismos que as desencadeiam não são bem conhecidos, são comuns as lesões das articulações por traumas mecânicos.

Atualmente, as terapias aplicadas nestes casos são: modificações no estilo de vida visando diminuir a atividade da articulação, aplicação de diferentes medicamentos, terapia física, que podem levar a diminuição dos sintomas sem alterar o curso da doença, e terapias que envolvem procedimentos cirúrgicos, tais como : artrodese, que alivia a dor em sacrifício da mobilidade articular; osteotomias, que aliviam os sintomas pela mudança do eixo de carga (podendo em alguns casos levar a formação de nova superfície articular, embora com resultados variáveis) e, finalmente, as substituições articulares por prótese total, o que leva ao alívio da dor e melhora na atividade articular. Tais procedimentos apresentam limitações, principalmente em casos de pacientes jovens e ativos, uma vez que não permitem a restauração de uma superfície articular com propriedades mecânicas e durabilidade semelhantes às da articulação natural.

Nos últimos anos tem se intensificado as pesquisas que buscam soluções alternativas para restaurar superfícies articulares lesadas. Muitas destas pesquisas envolvem a utilização de diferentes materiais, biológicos ou sintéticos nos casos em que a lesão apresenta-se com área bem definida.

Os implantes de polímero apresentam grande potencial de uso, desde que sejam fáceis de produzir, manusear e biocompatíveis. Dentre os materiais poliméricos estudados para essa aplicação podemos destacar os hidrogéis sintéticos, que são ainda pouco estudados e relatados na literatura médica. Os hidrogéis apresentam elevada capacidade de incorporação de água baixos coeficientes de atrito, características fundamentais para este tipo de aplicação.

Este trabalho apresenta o estudo realizado para o desenvolvimento e avaliação do potencial de uso de hidrogel a base de poli(2-hidróxi etil metacrilato) como material de reparo para defeitos da cartilagem articular.

CAPÍTULO 2 - TEORIA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os conceitos fundamentais ao desenvolvimento do trabalho realizado, bem como o atual estado da arte sobre biomateriais poliméricos para o reparo de defeitos da cartilagem articular. O capítulo é iniciado com uma breve explanação sobre as tendências atuais na área de biomateriais, especificamente aplicáveis à ortopedia. A seguir é discutido a situação atual sobre reparo de cartilagem articular, a descrição da estrutura, função e características da cartilagem articular. São apresentados os principais conceitos relativos aos hidrogéis em geral, aos hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato), bem como o estado da arte na utilização destes para correções de defeitos da cartilagem articular. Finalmente, são apresentados aspectos relacionados à avaliação da citotoxicidade e biocompatibilidade de materiais para a aplicação em questão.

2. 1 - BIOMATERIAIS

Nos últimos anos grande número de novos termos tem sido introduzidos ou inventados dentro da área dos biomateriais, gerando muita discussão e controvérsia. Isto levou a Sociedade Européia de Biomateriais a realizar uma conferência para discussão e definição dos termos mais importantes. Assim, os conceitos assumidos para os termos biomaterial e biocompatibilidade ao longo deste texto são os mesmos apresentados como consenso na "Consensus Conference of the European Society for Biomaterials" (WILLIANS, 1987). "*Biomaterial é todo material não vivo usado em um dispositivo médico (ou biomédico), objetivando a interação com o sistema biológico*". Este foi o conceito adotado como consenso na referida conferência, diferindo do conceito adotado em 1982 na NIH Consensus Development Conference "*biomaterial é qualquer substância que não drogas, ou combinação de substâncias de natureza sintética ou natural que pode ser usada por qualquer período de tempo, como um todo ou parte do sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo*". Paro o termo biocompatibilidade, partiu-se da

definição geral de que um "*material de ótima biocompatibilidade é aquele que não resulta em reações teciduais adversas*" e, após extensa discussão foi adotado o seguinte conceito : "*biocompatibilidade é a habilidade de um material para induzir no hospedeiro uma resposta adequada a uma aplicação específica*" visto que a primeira definição não era adequada porque requer a descrição de reações teciduais adversas e a determinação do nível de resolução e uma escala de tempo.

Hoje, além da adaptação de materiais já existentes para que possam ser utilizados como materiais de implantes, os pesquisadores buscam o desenvolvimento de biomateriais com características específicas de acordo com a aplicação desejada. Assim, surgiram linhas de pesquisa muito interessantes dentro da área de biomateriais tais como a busca de materiais biomiméticos, que sejam capazes de mimetizar aspectos estruturais ou funcionais de organismos biológicos (DE ROSSI, 1994), polímeros inteligentes, os quais usam analogia com materiais biológicos sendo capazes de adaptar sua estrutura, morfologia e outras propriedades quando física ou quimicamente estimulados (pH, Temperatura, pressão, etc.) (HOFFMAN, 1995) e a engenharia de tecido, que é a aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para o entendimento das relações entre estrutura e função de tecidos normais e patológicos , para o desenvolvimento de substitutos biológicos de forma a restaurar, manter ou melhorar funções teciduais (HEINEKEN & SKALAK, 1991), etc. Materiais com tais características podem ser utilizados não apenas como biomateriais na substituição de tecidos e/ou órgãos, mas também na confecção de nano e micro atuadores (ROGERS, 1994), ou motores que comportam se como músculos, sensores com aspectos de arquitetura e processamento similares aos dos nervos e memória, redes computacionais e de comunicação que representam o sistema de controle motor dos sistemas biológicos (DE ROSSI e cols., 1994 ; DE ROSSI e cols., 1988; REGEHRX e cols., 1988) e dispositivos para liberação controlada de drogas (PEPPAS & KORSMEYER, 1987), etc.

Dentro da ortopedia, tem surgido trabalhos para o desenvolvimento de materiais biomiméticos ou que utilizam materiais compósitos com piezoelétricos para substituição de tecidos ósseos (GOISSIS, 1994) ou mesmo a combinação de biopolímeros com polímeros condutores para a formação de órgãos híbridos (KHOR, LI & WEL, 1996; AOKI e cols., 1996). Desde a década de 70 tem se intensificado os estudos que buscam compreender os

mecanismos envolvidos na geração dos biopotenciais (piezoeletricidade e potencial de fluxo - "streaming potential") de tecidos ósseo e cartilaginoso, bem como a influência de tais fenômenos na atividade celular e consequente reparo tecidual (BASSET, 1971; SAH & GRODZINSKY, 1989). No caso da cartilagem articular, os estudos buscam conhecer os mecanismos envolvidos na geração dos biopotenciais, a relação entre estes e o comportamento mecânico apresentado pelo tecido sadio e/ou doente, e a relação destes com a capacidade de reparo tecidual (MAcGINITIE e cols., 1994; KIM e cols., 1995). O entendimento de tais fenômenos e mecanismos envolvidos permitem que se possa buscar materiais sintéticos que apresentem comportamento semelhante para serem utilizados na restauração de tecidos e/ou órgãos lesados por traumas ou doenças degenerativas.

2. 2 - REPARO DE CARTILAGEM ARTICULAR

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

Uma vez lesada, a cartilagem articular apresenta pouca ou nenhuma capacidade de regeneração e a lesão pode evoluir para alterações degenerativas da articulação. Ainda hoje não existe um completo entendimento dos mecanismos de formação da cartilagem articular. O que se tem conhecimento é que a cartilagem articular é um tecido incapaz de se regenerar e por isso não existe procedimento clínico alternativo à substituição da articulação por próteses, que possa ser utilizado para o reparo de pequenos defeitos surgidos em decorrência de traumas ou doenças degenerativas.

Diferentes materiais biológicos e sintéticos tem sido experimentados para tal finalidade (BENTLEY, 1992 ; SOLCHAGA e cols. 1996). Dentre os diferentes materiais biológicos testados, os resultados mais significativos tem sido obtidos com a utilização de periósteo (MORAN, KIM & SALTER, 1992 ; KREDDER e cols., 1994). Tecidos como periósteo, pericôndrio, enxertos de carcaça osteocondral além das matrizes semeadas com células condrogênicas tem sido testadas como material para enxertos osteocondrais. O uso de

materiais de enxerto gerados *in vitro*, isto é embebidos com uma população de células condrogênicas apresenta grande potencialidade, porém é necessário maior desenvolvimento do ponto de vista da engenharia, para determinar sua resistência mecânica e durabilidade como material de enxerto capaz de suportar cargas as quais as articulações são submetidas durante o processo de reparo. Além disso, a utilização de tais materiais depende de fatores relacionados à preservação do material e transmissão de doenças.

Implantes de polímero para o reparo de lesões cartilaginosas apresentam um grande potencial, desde que sejam fáceis de produzir, manusear e sejam biocompatíveis. Os polímeros que vem sendo estudados para tal aplicação dividem-se basicamente em duas categorias : a dos polímeros reabsorvíveis e a dos polímeros inertes.

Polímeros reabsorvíveis tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e copolímeros vêm sendo muito estudados para utilização como matriz temporária permitindo o crescimento de tecido cartilaginoso para preencher o defeito e restaurar a superfície articular. Alguns pesquisadores (VACANTI e cols., 1991; FREED e cols., 1993) vêm desenvolvendo matrizes para transplante de células usando polímeros reabsorvíveis, visto que o transplante de células tem sido proposto como uma estratégia para substituição de órgãos ou reparo de tecidos doentes/danificados. No transplante de células, o tecido doador é dissociado em células individuais ou pequenos grupos de células, as quais podem ser ligadas ou encapsuladas em uma matriz suporte e transplantada ao paciente para restaurar a função do tecido perdido. Em se tratando de cartilagem, desde a década de 60, quando condrócitos foram isolados com sucesso, muitos esforços para criar nova cartilagem hialina a partir de condrócitos isolados de cartilagem hialina tem sido relatados. O conceito mais significativo foi derivado do trabalho de GREEN (1977), que estudou o potencial de condrócitos articulares para o reparo de articulações, baseado em técnicas de cultura de tecidos e subsequente enxertia. GREEN não foi feliz na criação de nova cartilagem através do implante de condrócitos semeados em osso descalcificado, mas sugeriu que com o advento de novos materiais sintéticos biocompatíveis pode ser possível implantar condrócitos semeados em tais materiais e criar nova cartilagem.

Estes autores acreditam que esta proposição é factível para gerar vários tipos de cartilagem, contanto que a matriz sintética seja de material reabsorvível. Para tanto têm

desenvolvido extensos estudos utilizando poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e seus copolímeros. Várias questões devem ser resolvidas para que seja possível a aplicação clínica. Uma das questões diz respeito a matriz sintética, que deve possuir estrutura tridimensional, com porosidade e área superficial por unidade de volume adequadas e que além de mecanicamente estável deve ser moldável em várias formas.

O colágeno é outro material que vem sendo estudado para preenchimento de defeitos da cartilagem articular (SPEER e cols., 1979), ou servindo como suporte para cultura de células a serem implantadas (WAKITANI e cols., 1989; WAKITANI e cols., 1994). Segundo SPEER, esponjas de colágeno proporcionam resistência a compressão, permite a invasão e crescimento tecidual, sendo reabsorvido a medida que o tecido natural cresce, preenchendo o defeito. WAKITANI e colaboradores vêm estudando a utilização de células de tecido mesenquimal, cultivadas em gel de colágeno, para preenchimento de defeitos da cartilagem articular e de acordo com seus resultados é possível a obtenção de tecido de reparo com propriedades biomecânicas semelhantes às do tecido natural.

MAINARD e colaboradores (1992) estudaram um copolímero poroso - copoliéter imida uretano, conhecido como PORIMID, no reparo de lesões de cartilagem. Segundo os autores, o biomaterial foi bem tolerado por animais, tendo sido invadido por células e progressivamente reabsorvido, porém a literatura não relata maiores desenvolvimentos com este material.

Quanto aos estudos envolvendo polímeros inertes, podem ser citados alguns trabalhos tais como o de WACHTEL e colaboradores (1992) que avaliaram diferentes poliuretanos de grau médico como material para reparo de defeitos focais na cartilagem articular. O estudo envolveu a caracterização dos materiais quanto a aspectos tribológicos tais como coeficiente de atrito, danos e desgaste na superfície articular oposta. Nenhum dos poliuretanos estudados apresentou características semelhantes as da cartilagem articular natural .

GILLQUIST e seus colaboradores (GILQUIST & MESSNER, 1993; GILQUIST e cols., 1993) utilizaram teflon e dracon para correção de defeitos na cartilagem articular em joelhos de coelhos e concluíram que chumaços de fibras de poliester ou teflon podem ser

utilizados para preencher defeitos de cartilagem. Após 3 meses, a frequência de população celular no centro da matriz sintética bem como a formação de neocartilagem é baixa, porém, na ausência do osso subcondral, estes materiais fornecem sustentação mecânica para a reparação tecidual, apresentando melhores resultados do que os métodos biológicos. Segundo os referidos autores, os resultados mostraram evidências de que o reparo pode ser melhorado para tempos superiores a 3 meses.

Membranas de poli(tetra flúor etileno) expandido (GORETEX^{TM}) foram utilizadas por HANFF e cols. (1990) para investigar a possibilidade de restaurar defeitos osteocondrais em joelhos de coelho. Segundo os autores, apesar de seu estudo não envolver uma avaliação da resposta para tempos superiores a 12 semanas, o estudo permitiu verificar a propagação de células através da microestrutura porosa do material, indicando o potencial deste para a restauração de superfícies articulares lesadas.

Outro material já estudado e testado em coelhos para verificar sua biocompatibilidade e capacidade de promover o reparo de defeitos na cartilagem articular foi fibra de carbono. Segundo MINNS e colaboradores (1982) implantes de fibra de carbono usadas em defeitos osteocondrais em joelhos de coelhos osteoartríticos levam a reparos estruturalmente bem sucedidos.

Polímeros inertes como os acima descritos podem levar a restauração da superfície desde que haja boa integração entre o implante e os tecidos vizinhos e não haja desgaste do material implantado, com consequente liberação de partículas. Além disso, o implante não deve apresentar dureza maior do que a da cartilagem, para evitar danos a superfície oposta ou levar a desestabilização da articulação.

Polímeros piezoelétricos, polímeros condutores bem como suas blendas ou compósitos são materiais com potencial para utilização como material de preenchimento de defeitos de cartilagem articular, uma vez que podem mimetizar o comportamento elétrico da cartilagem articular.

Finalmente, os hidrogéis poliméricos (KUDELA, 1990) constituem uma classe de materiais bastante adequados para tal aplicação devido ao fato de apresentarem similaridades fisicas com os tecidos moles do organismo e em particular com a cartilagem. Além de serem complacentes, não impedem o fluxo de fluidos corpóreos contendo nutrientes e/ou metabólitos para as células, como é o caso do fluido sinovial, que proporciona a nutrição das células cartilaginosas. Assim, hidrogéis com propriedades mecânicas adequadas podem preencher defeitos da cartilagem articular, de forma a restaurar a função da superficie articular. Podem ainda ser revestidos por membranas biológicas com capacidade de formar matriz extracelular cartilaginosa, como é o caso do periósteo, propiciando a sustentação mecânica necessária para que o defeito seja devidamente restaurado através do crescimento de tecido cartilaginoso sobre o hidrogel, sem a formação de incongruências na superficie articular (MOW e cols., 1991). Outra vantagem dos hidrogéis é a possibilidade de incorporação e liberação controlada de fatores de crescimento, substâncias capazes de modular a atividade das células cartilaginosas, os condrócitos e ainda, a utilização de polímeros com grupamentos negativos permite a incorporação destes grupamentos negativos fixos à estrutura macromolecular, mimetizando a matriz extracelular da cartilagem articular.

2. 3 - A CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo especializado que recobre as superficies epifisárias dos ossos longos nas articulações diartrodiais. Todas as articulações diartrodiais possuem aspectos estruturais comuns. São envoltas por uma capsula formada por tecido conjuntivo denso, as superficies internas da cápsula são cobertas por um tecido metabólicamente ativo, o sinovium, que secreta o fluido sinovial proporcionando as substâncias necessárias para a nutrição e lubrificação da articular (figura 2.3.1).

Tais articulações tornam possível a locomoção e as atividades diárias dos vertebrados. Do ponto de vista da engenharia, estas articulações funcionam como verdadeiros mancais, uma vez que são submetidas a cargas elevadas . Quando sadias, são capazes de sustentar tais cargas sem sofrer atrito e desgaste.

A cartilagem articular é formada por duas fases distintas : uma fase fluida, composta de água e eletrólitos dissolvidos e uma fase sólida, a matriz extracelular (figura 2.3.2), composta de fibras de colágeno, proteoglicanos e outras glicoproteínas, na qual se alojam as células cartilaginosas , chamados condrócitos. O colágeno é o constituinte do componente orgânico presente em maior quantidade : 50 - 80 % peso seco (15-22% do peso molhado), sendo principalmente do tipo II. Os proteoglicanos constituem 4 - 7 % do peso molhado e a água, 60-85%. Além disso, encontram-se em pequenas quantidades, proteínas de ligação, colágenos dos tipos V, VI, IX, XI. Atualmente, a presença de colágeno tipo V na cartilagem articular vem sendo discutida.

2.3.1 - Colágeno

O colágeno predominante na cartilagem articular é o colágeno do tipo II, com traços de outros tipos, inclusive IX e XI .O colágeno tipo II contém 3 cadeias de polipeptídeos em forma de hélice $\alpha 1$(II). Já o colágeno tipo IX contém 3 cadeias distintas $\alpha 1$(IX), $\alpha 2$(IX) e $\alpha 3$(IX), formando a hélice. Este tipo de colágeno possui cadeias de glicosaminoglicanos ligados à cadeia $\alpha 2$, o que não é usualmente encontrado nas famílias de colágeno. Assim, este tipo de colágeno pode ajudar na formação de uma matriz sólida coesiva colágeno-proteoglicano.

O colágeno possui elevado grau de organização estrutural. Existem ligações covalentes intramoleculares e intermoleculares ligando as cadeias α e as moléculas de tropocolágeno, resultando em uma rede de colágeno que proporciona dureza e resistência mecânica ao tecido.

2.3.2 - Proteoglicanos

São compostos por cadeias de glicosaminoglicanos ligadas covalentemente a um "core" proteico. Na cartilagem, o proteoglicano maior e mais abundante é o agrecan, formado por um "core" proteico de peso molecular 210.000, ao qual estão ligadas covalentemente cadeias de condroitin sulfato e queratan sulfato. Estas moléculas são estruturas altamente ordenadas com comprimentos variando entre 10^{-8} e 10^{-6} m. Contribuem significativamente para as propriedades físico-químicas e mecânicas da cartilagem articular.

2.3.3 - Grupos carregados

As cadeias de glicosaminoglicanos proporcionam importantes propriedades físico-químicas à cartilagem articular. O condroitin sulfato é composto por unidades repetidas dissacarídeos de ácido glucurônico e N-acetil galactosamina com grupos sulfato SO_4.

Existem evidências de que estas cadeias sejam o principal determinante da resistência ao escoamento do fluido intersticial presente no interior da cartilagem articular para fora da mesma, quando esta é submetida a cargas. O sulfato de queratan consiste em unidades dissacarídeos repetidas de galactose e N-acetil glucosamina, com aproximadamente um grupo SO_4 por dissacarídeo.

Os grupos SO_4 e COOH na cartilagem encontram-se ionizados, exercendo fortes forças repulsivas entre sí. Esta força é uma das causas fundamentais para o inchamento da cartilagem no fluido sinovial. O número total destes grupos no tecido é medido em termos de densidade de carga negativafixa, que varia de acordo com a estrutura e quantidade de proteoglicanos no tecido. Um valor aceitável varia entre 0,05 a 0,3 mEq/ml de tecido (MAROUDAS e cols., 1990). Esta concentração de carga negativa presente na cartilagem articular, determina a concentração de contra íons (principalmente Na^+) que são retidos em seu interior para proporcionar o balanceamento elétrico. Tal concentração iônica governa a pressão osmótica da cartilagem articular, a qual tem sido relatada estar na faixa de 0,1 a 0,2 MPa (MAROUDAS e cols., 1990). Esta pressão osmótica contribui com até 50% da dureza compressiva da cartilagem articular.

2.3.4 - Água intersticial

Os espaços intermoleculares dentro do tecido são preenchidos água e eletrólitos dissolvidos (MOW e cols., 1992). O teor de água na cartilagem varia entre 60 - 85%. Uma pequena porcentagem desta água está contida nos compartimentos intracelulares, aproximadamente 30% encontra-se nos compartimentos interfibrilares das fibras de colágeno e o restante em solução, nos domínios das moléculas de proteoglicanos.

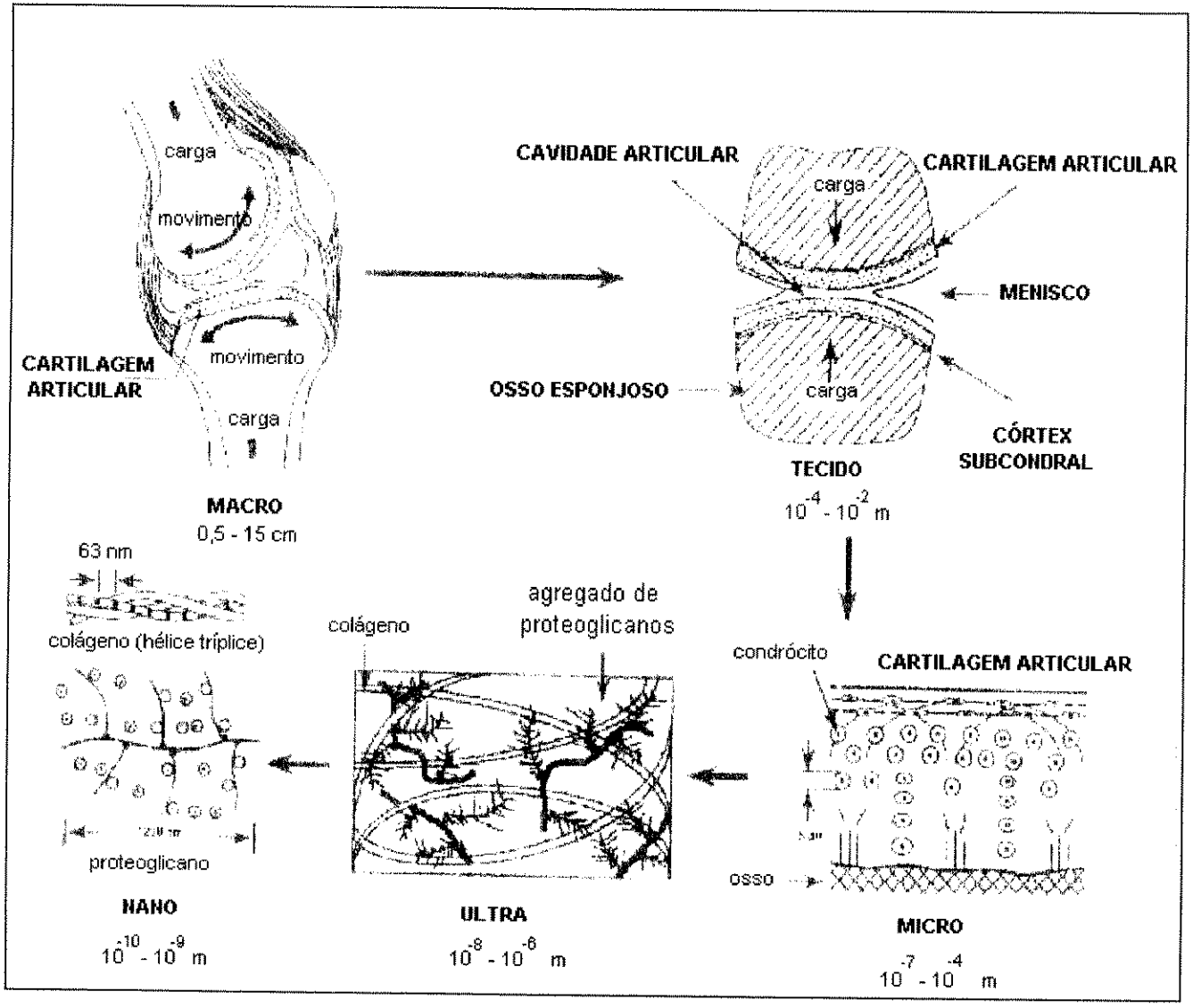


Figura 2.3.1 - Aspectos estruturais típicos de uma junta diartrodial. (adaptada de MOW e cols., 1992).

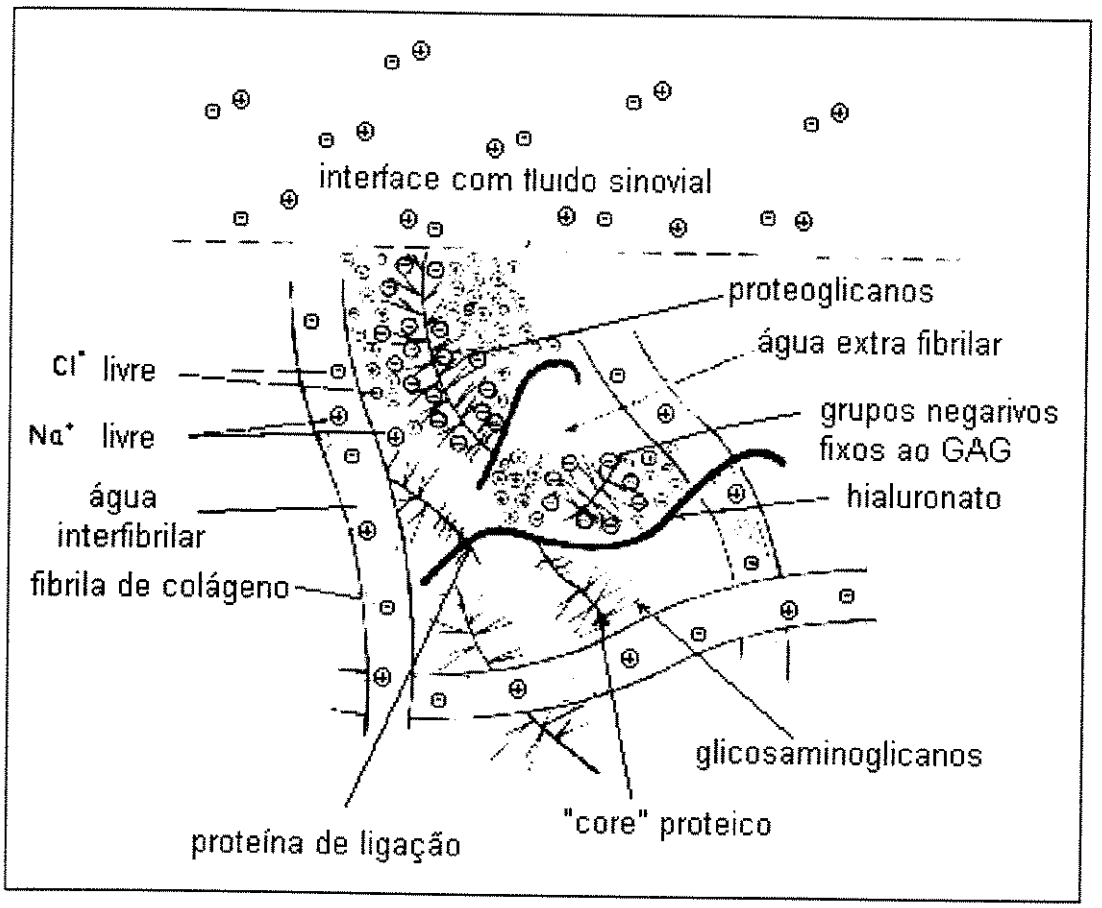


Figura 2. 3. 2 - Representação esquemática da matriz extracelular da cartilagem articular. (adaptado de MAROUDAS, 1990)

A quantidade de água presente nos interstícios da cartilagem articular depende fortemente :

- da densidade de carga negativa fixa e da concentração de íons dissolvidos no fluido intersticial;
- da organização da rede de colágeno e, consequente dureza e resistência mecânica;
- das propriedades da matriz sólida colágeno-proteoglicano.

2.3.5 - Biotribologia

As articulações do corpo humano são normalmente sujeitas a cargas durante os movimentos. Atividades comuns como caminhar ou subir escadas, implicam em cargas de até 10 vezes o peso do corpo nas articulações do joelho e quadril humanos .

A cartilagem articular proporciona a distribuição da carga aplicada de maneira uniforme para o osso subcondral, permitindo a articulação dos ossos sem sofrer ou provocar desgaste das superfícies.

2.3.6 - Comportamento mecânico

Sabe-se que o comportamento viscoelástico da cartilagem articular não depende apenas das propriedades mecânicas intrínsicas da matriz extracelular, que comporta-se como uma fase sólida porosa permeável, mas também da resistência ao escoamento de água intersticial através desta matriz quando o tecido é deformado. De fato, o comportamento viscoelástico compressivo observado experimentalmente através de ensaios de fluência ou ensaios de relaxação de tensão para o tecido pode ser atribuído totalmente à resistência oferecida pela matriz sólida ao escoamento do fluido, onde o equilíbrio tanto para fluência quanto para relaxação de tensão ocorre quando o escoamento intersticial cessa. (MOW e cols., 1980; 1984; HOCH e cols., 1983 ; HOLMES e cols., 1985). Assim, no equilíbrio, a carga imposta é completamente suportada pela matriz sólida. Portanto, para determinar as leis tensão-deformação que governam o comportamento da matriz sólida da cartilagem articular, é necessário medir respostas carga-deformação do tecido no equilíbrio (ARMSTRONG & MOW, 1982; HOCH e cols. , 1983). Seu comportamento pode ser caracterizado através de respostas dependentes da taxa de aplicação de carga, devido aos dois mecanismos acima descritos: a resposta viscoelástica intrínsica da rede de colágeno e proteoglicanos e devido ao escoamento da água intersticial. Além disso, a resposta a tensões pode ser dependente do meio (Temperatura, pH, concentração iônica, etc.), uma vez que tais parâmetros alteram as propriedades intrínsicas da matriz sólida. Assim, para a realização de um experimento que visa caracterizar o comportamento de cartilagem, é importante utilizar valores de tais parâmetros normalmente apresentados pelo tecido normal.

A cartilagem articular é um tecido difícil de se trabalhar, pois sua espessura raramente ultrapassa 2 mm e, pelo fato de recobrir superfícies curvas, a coleta de amostras do tecido é difícil. Apesar disto, inúmeros estudos vem sendo realizados, empregando vários testes diferentes para caracterizar as propriedades mecânicas da cartilagem articular (WOO, MOW & LAI, 1987). O método mais frequentemente empregado para a caracterização mecânica de tecido cartilaginoso tem sido a indentação *in situ*. A popularidade deste método é devido a facilidade relativa de executar um experimento de indentação e a disponibilidade de soluções matemáticas empregando as teorias clássicas de contato entre corpos (HERTZ, 1882).

Este experimento é usado por permitir condições de carregamento semelhantes àquelas em que o tecido é submetido em condições fisiológicas e vem sendo utilizado para testar cartilagem humana desde a década de 20 (BAR, 1926 ; GOCKE, 1927). HIRSCH, (1944) usou o teste de indentação para estudar as propriedades compressivas da cartilagem articular de patella humana, na tentativa de correlacionar tais propriedades com aspectos histológicos e histoquímicos do tecido. Em 1963, ELMORE e colaboradores utilizando a técnica de indentação testaram espécimes imersos em solução, ressaltando assim a importância da água no comportamento mecânico da cartilagem.

Uma grande vantagem da técnica de indentação é o fato de permitir o mapeamento do comportamento da cartilagem ao longo da superfície articular e, com isso, permitir a correlação de parâmetros mecânicos e bioquímicos do tecido (KEMPSON e cols., 1971).

Embora a cartilagem seja um meio bifásico exibindo comportamento viscoelástico sob cargas compressivas, devido ao escoamento de fluido contido no interior do tecido através da superfície do tecido, as teorias usadas pelos autores de trabalhos com indentação em geral consideram a cartilagem como um tecido constituído por uma única fase, que apresenta comportamento elástico (KEMPSON e cols., 1971 ; HAYES e cols., 1972) ou viscoelástico (COLETTI e cols., 1972) . Mais recentemente, MAK, LAI & MOW (1987), chegaram a uma solução matemática para o comportamento da cartilagem articular sob fluência a indentação e relaxação de tensão, onde o tecido é modelado como uma camada de espessura determinada de material bifásico linear , depositada sobre um substrato rígido. Trata-se do modelo KLM (MOW & LAI, 1980), que considera a cartilagem uma mistura binária homogênea de um

sólido linearmente elástico, isotrópico e incompressível com um fluido inviscido (viscosidade muito baixa) e incompressível. Para a formulação, os autores consideram material com permeabilidade constante e usam teorias de deformação infinitesimal.

O teste de indentação tem sido largamente empregado para o estudo de tecidos biológicos, mostrando ser uma técnica eficiente quando se deseja uma análise comparativa ao invés da determinação das propriedades intrínsicas do tecido.

No ensaio de indentação, uma carga constante é pressionada normalmente à cartilagem com uma ponta plana ou esférica. A figura 2.3.3 ilustra o sistema utilizado para este tipo de teste, o qual apresenta uma grande vantagem sobre os demais por permitir a avaliação do comportamento mecânico da cartilagem articular natural sem a retirada da mesma do osso, evitando assim erros devido a variação da espessura.

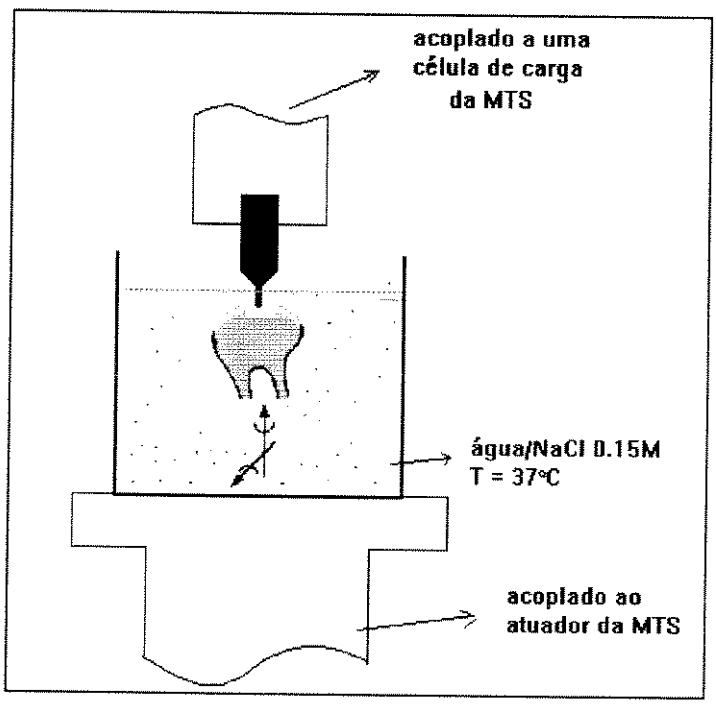


Fig. 2.3.3 - Esquema ilustrando o ensaio de indentação em cartilagem articular.

KEMPSON e colaboradores (1971) propõem o cálculo do módulo de fluência à indentação da cartilagem articular a partir de ensaios de indentação, usando a equação formulada inicialmente por WATERS (1965) para chapas finas de borracha natural

vulcanizada. Neste caso, embora a cartilagem articular apresente um comportamento viscoelástico, para pequenas deformações seu comportamento pode ser aproximado a um modelo elástico uma vez que apresenta respostas rápidas as cargas aplicadas.

$$E = \frac{9 \cdot 10^4 p}{16\sqrt{r}} \left[\frac{1 - \exp(-0.42 \cdot e / a)}{h} \right]^{3/2} \qquad (1)$$

E = módulo de fluência [Kgf/m^2]

p = carga [Kgf]

r = raio do indentador [m]

e = espessura da amostra [m]

h = altura de indentação [m]

$a = \sqrt{(2rh - h^2)}$ [m]

SWANN & SEEDHOM (1989) apresentam uma técnica para medida da indentação da cartilagem articular usando um indentador com ponta esférica de raio 1,6 mm onde o cálculo do módulo de fluência é feito com a mesma fórmula utilizada por KEMPSON.

Como pode ser visto, o comportamento mecânico da cartilagem articular é fundamental para o bom desempenho funcional da articulação. Assim sendo um biomaterial para ser utilizado no reparo de defeitos da cartilagem articular deve apresentar comportamento mecânico semelhante.

Neste trabalho optou-se pela utilização de hidrogéis para tal aplicação, pois estes além de apresentarem características físicas semelhantes à cartilagem articular, em geral são fáceis de produzir e manusear, a maioria dos hidrogéis sintéticos são de fácil esterilização e armazenamento, e têm sido largamente estudados para diferentes aplicações nas áreas médico e odontológica, conforme será descrito mais adiante. Em geral apresentam baixos valores de propriedades mecânicas, mas podem ser modificados para a obtenção de comportamento mecânico semelhante ao da cartilagem articular.

2.4 - HIDROGÉIS

Hidrogéis são polímeros capazes de absorver elevada quantidade de água. Estruturalmente são constituídos por uma rede polimérica tridimensional, formada por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes, as chamadas reticulações. Caracterizam-se por apresentarem hidrofilicidade e insolubilidade. A hidrofilicidade é devido a presença de grupos hidrofílicos tais como : -OH, -COOH, $-CONH_2$, $-SO_3H$, etc e a insolubilidade e estabilidade de forma são devidas a presença da rede tridimensional. Muitas estruturas químicas diferentes podem ser classificadas como hidrogéis, apresentando em comum, a existência de fortes interações com água. Quando existem ligações covalentes entre as cadeias, formam um reticulado que não pode ser dissolvido (KUDELA, 1990).

Quando o hidrogel desidratado é imerso em água, incha absorvendo água até atingir um equilíbrio entre as forças favoráveis à entrada de água para dentro da estrutura polimérica (potencial osmótico, ligações de hidrogênio entre água e polímero, flexibilidade da cadeia, etc.) e as forças de coesão da rede (reticulações) (RATNER, 1981).

A pressão osmótica favorece a entrada de água para ocupar os espaços livres dentro da rede polimérica. As fortes interações positivas entre as estruturas químicas no polímero e a água também contribuem para o aumento do inchamento. A medida que a água entra, ocupando os espaços entre as cadeias poliméricas, estas se estendem buscando uma nova configuração visto que a presença da água no sistema requer a sua expansão e uma reordenação das cadeias.

A medida que as cadeias são alongadas para uma configuração entropicamente menos favorável, existe uma força resistiva, a qual aumenta com a densidade de ligações cruzadas. O equilíbrio é atingido quando as forças acima citadas se igualam.

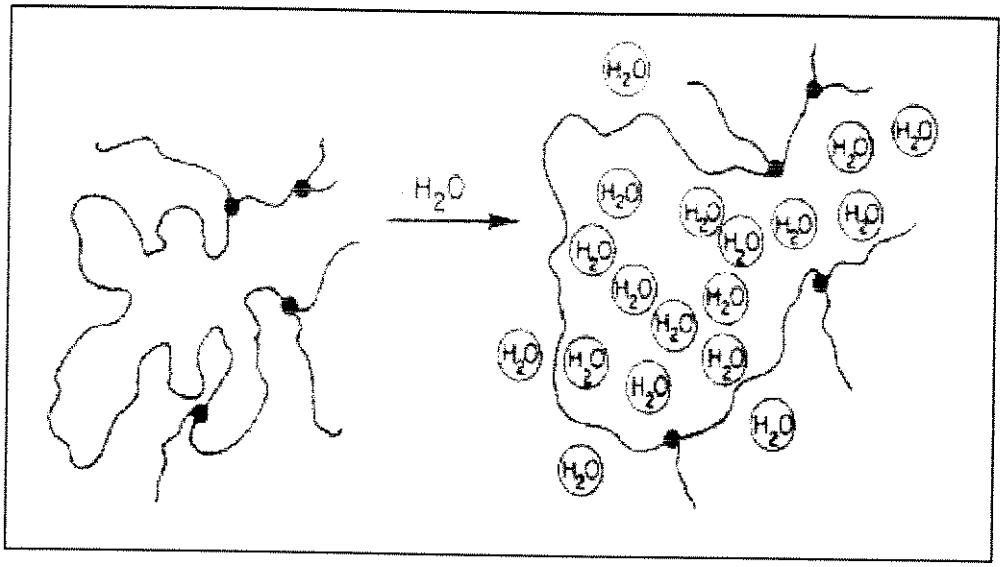


Figura 2.4.1 - Representação esquemática de um hidrogel.

No equilíbrio, a quantidade de água presente no hidrogel representa sua capacidade de absorção de água que neste trabalho é definido como :

$$\chi = (m_{\text{gel inchado}} - m_{\text{gel seco}}) \times 100 / m_{\text{gel inchado}}$$

χ = capacidade de absorção de água pelo hidrogel (% peso)

$m_{\text{gel inchado}}$ = massa do gel inchado

$m_{\text{gel seco}}$ = massa do gel seco

A presença de água entre as cadeias poliméricas levam a diminuição das forças de interação intermoleculares, exercendo assim um efeito plastificante que altera o comportamento mecânico do polímero. Quando totalmente secos, os hidrogéis em geral apresentam-se rígidos e frágeis, mas a medida que aumenta a quantidade de água no interior da estrutura, o polímero tende a um comportamento elastomérico.

Hidrogéis sintéticos podem ser obtidos em diferentes formas, a partir de diferentes técnicas. A técnica específica a ser empregada na obtenção de um hidrogel depende principalmente da natureza do polímero, porém qualquer que seja a técnica empregada, o objetivo é sempre o mesmo: preparar um polímero hidrofílico capaz de manter sua integridade estrutural quando imerso em água, que apresente uma configuração geométrica desejável a

aplicação e que apresente resistência mecânica e dureza requerida pela aplicação. Dentre as principais técnicas de síntese de hidrogéis podem ser citadas:

Evaporação de solvente: Consiste no espalhamento de uma solução contendo polímero e solvente, seguido da evaporação do solvente, o que resulta em um filme do polímero. A seguir, procede-se a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas.

Enxertia : Uma camada de hidrogel pode ser obtida como enxerto na superfície de um outro substrato polimérico. Para tanto, o polímero substrato é submetido a um inchamento em solução do monômero precursor do hidrogel, agente de reticulação e iniciador e, a seguir, submetido à uma condição de polimerização. Forma-se um hidrogel fortemente aderido a superfície do substrato polimérico inicial, resultando em dispositivo com boa resistência mecânica e superfície hidrofílica.

Polimerização em solução : Uma solução constituída de monômero, agente de reticulação, iniciador de polimerização e solvente é colocada num molde e submetida ao processo de polimerização, o qual pode se dar por energia térmica, UV ou por radiação ionizante. Quando se trata de um bom solvente para o monômero e para o polímero formado, o resultado será um gel opticamente claro, que costuma ser chamado de homogêneo ou microporoso. A porosidade aqui está relacionada aos espaços vazios entre as cadeias poliméricas, espaço inicialmente ocupado pelo solvente, que evaporou durante a polimerização.

Quando o solvente utilizado é um bom solvente para o monômero mas não o é para o polímero formado, a medida que este vai sendo formado ocorre uma precipitação, resultando em um gel macroporoso com coloração branca ou translúcida. Neste caso, obtém-se um hidrogel heterogêneo, contendo verdadeiros poros (espaços vazios) em sua estrutura, que a depender do tamanho pode permitir invasão e crescimento celular.

Polimerização em massa : Neste caso, a solução a ser polimerizada é constituída de monômero, agente de reticulação e iniciador, dispensando apenas o solvente. O resultado será um polímero reticulado, na forma do molde utilizado. Alguns autores denominam o polímero obtido nestas condições como xerogel ao invés de hidrogel.

Neste caso, para a obtenção de poros na estrutura do material, pode se utilizar técnicas como a adição de cristais solúveis em água, à solução a ser polimerizada. Podem ser utilizados cristais de NaCl, glicose ou sacarose, de tamanhos que correspondem ao diâmetro desejável para os poros. Após a polimerização, o gel é submetido a um processo de lavagem em água, que dissolve e arrasta os cristais para fora de sua estrutura. O espaço ocupado pelo cristal formará o poro.

Os hidrogéis em geral apresentam baixos valores de propriedades mecânicas, quando comparados aos demais materiais poliméricos, porém é possível a obtenção de hidrogéis com boas propriedades mecânicas através da obtenção de blendas do tipo redes interpenetrantes ou semi interpenetrantes.

Uma blenda polimérica do tipo rede interpenetrante (IPN) é formada pela combinação de dois polímeros diferentes, ambos na forma reticulada, sendo que pelo menos um deles é sintetizado ou reticulado na presença do outro (KLEMPNER, 1987).

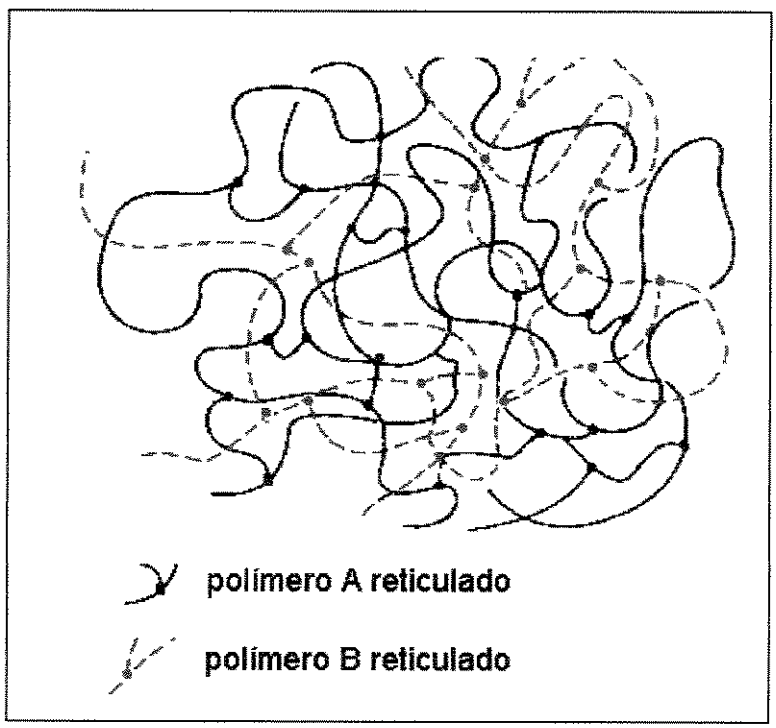


Figura 2.4.2 - Esquema ilustrando a estrutura de uma blenda polimérica do tipo rede interpenetrante (IPN).

Não existem ligações covalentes unindo o polímero A ao polímero B, isto é, moléculas do polímero A reagem apenas com moléculas do polímero A e moléculas do polímero B reagem apenas com moléculas do polímero B.

Ao invés da combinação de dois polímeros na forma reticulada, pode ser feito a combinação de um polímero na forma reticulada e outro na forma linear. Neste caso tem-se a chamada blenda polimérica do tipo rede semi interpenetrante (sIPN).

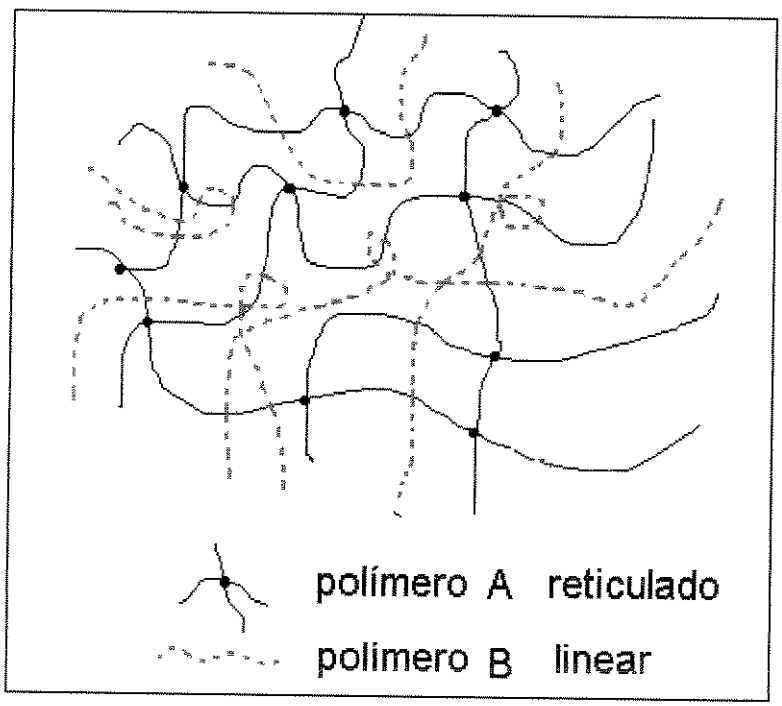


Figura 2.4.3 - Esquema ilustrando a estrutura de uma blenda polimérica do tipo rede semi interpenetrante (sIPN).

As cadeias do polímero B linear permanecem entrelaçadas na rede do polímero A, restringindo assim alterações da estrutura da rede.

2.4.1 -Aplicações biomédicas de hidrogéis

Conforme já foi citado anteriormente, os hidrogéis apresentam características que os tornam interessantes para utilização em aplicações nas áreas médica e odontológica. Dentre estas vantagens destacam-se:

- A capacidade de inchar em água, permite que o mesmo possa ser lavado para a retirada de resíduos e substâncias indesejáveis;
- A sua consistência elastomérica minimiza o atrito entre o implante e os tecidos vizinhos;
- A permeabilidade permite o fluxo de fluidos corpóreos entre o implante e os tecidos vizinhos;
- Apresentam baixos valores de tensão interfacial e assim minimizam a adesão de proteínas;
- São de fácil obtenção em diferentes formas;
- Permitem a incorporação e liberação controlada de drogas;
- etc.

Entre os hidrogéis sintéticos, aqueles obtidos a partir da polimerização ou copolimerização do 2-hidroxietil metacrilato, para o qual o termo genérico poliHEMA é largamente empregado, tem recebido muita atenção, principalmente em aplicações biomédicas (RATNER & HOFFMAN, 1976). O reconhecimento do poliHEMA como um biomaterial em potencial resultou do trabalho de um grupo de pesquisadores da antiga Checkoslováquia, liderados por OTTO WICHTERLE (1960). A partir de seu estudo, teve início a utilização do poliHEMA na confecção de lentes de contato hidrofílicas, apresentando excelentes resultados.

Os hidrogéis de poliHEMA são divididos em duas categorias, de acordo com o tamanho de poros em sua estrutura. As diferentes porosidades resultam da utilização de diferentes técnicas de polimerização. A polimerização em massa do HEMA leva a formação de um polímero rígido transparente que quando é imerso em água, incha tornando-se flexível. Esse tipo de material é normalmente considerado não poroso, embora apresente permeabilidade a solutos de baixo peso molecular, o que sugere a existência de poros com dimensões na faixa das dimensões moleculares (nanometros). Já quando é obtido por polimerização em solução, resulta em material poroso, e o tamanho dos poros aumenta com o aumento da quantidade de diluente na solução, sendo possível a obtenção de material

microporoso (10 a 100 nm) e macroporoso (100 nm - 1 μm). Estes hidrogéis apresentam-se transparentes como os não porosos, e ainda são conhecidos como homogêneos. Quando se emprega um diluente que é um não solvente para o poliHEMA em quantidade que excede a capacidade máxima de inchamento do polímero final, ocorre um processo de separação de fases que vai resultar na formação de hidrogéis opacos, com poros que variam entre 40 e 80 μm e, neste caso, são normalmente denominados esponjas (CHIRILA e cols., 1993).

Os hidrogéis de poliHEMA tem se mostrado bastante versáteis dentro das diferentes áreas da medicina, sendo utilizados na confecção de lentes de contato, nas cirurgias de córnea, como prótese mamária (RATNER & HOFFMAN, 1976; CHIRILLA e cols., 1993 ; PEDLEY & SKELLEY, 1980) e vem sendo estudado para diferentes aplicações tais como : dispositivos intra uterinos, cirurgias plásticas e buco maxilo facial, cirurgias periodontais, sistemas para liberação controlada de drogas, revestimento de material hemocompatível e outros (PEDLEY & SKELLEY, 1980 ; STASTNY e cols., 1993 ; ZAVREL & STOL, 1993 ; AMBRÓSIO e cols., 1996).

2.4.2 - Pesquisas utilizando hidrogéis para reparo de defeitos da cartilagem articular

Hidrogéis sintéticos já vem sendo pesquisados para aplicações na correção de defeitos da cartilagem articular desde a década de 70. Em meados de 1973, BRAY & MERRYL, envolvidos em um programa para desenvolvimento de material sintético a ser utilizado em cirurgias de reconstrução de articulações, sugeriram que hidrogéis poliméricos de álcool polivinílico (PVA), obtido por reticulação com radiação apresentavam algumas propriedades interessantes para a referida aplicação. Mais tarde, dando continuidade a este trabalho, PEPPAS & MERRYL (1977), utilizaram técnicas de tratamento térmico para melhorar as propriedades mecânicas deste material. Os trabalhos com PVA continuaram com SASADA e seu grupo (1985; 1988), inclusive com medidas do comportamento frente atrito.

Outro material que tem despertado interesse para tal aplicação é o poli(2-hidróxi etil metacrilato). CHIRILA e seus colaboradores (1993) apresentam uma lista com várias referências bibliográficas e um breve resumo sobre as pesquisas efetuadas com testes em animais para avaliação da reação tecidual frente ao poliHEMA, iniciada em 1967 por

pesquisadores checoslováquios. Os resultados mostraram uma boa tolerância do organismo ao polímero. Em alguns casos é relatado a ocorrência de invasão celular e vascularização para dentro de esponjas macroporosas de poliHEMA. Os mesmos autores em seu estudo para avaliação *in vivo* e *in vitro* da invasão celular em implantes de esponjas de poliHEMA com diferentes tamanhos de poros, concluíram que invasão e proliferação celular só acontece na presença de poros interconectados e com diâmetros maiores que 10 μ m, provavelmente devido às facilidades para nutrição. Concluíram ainda que a invasão celular é criticamente dependente da natureza da superfície do implante. Uma superfície moldada parece ser menos efetiva que a superfície cortada.

KON & DE VISSER (1981) avaliaram o potencial de esponjas de poliHEMA com diferentes porosidades como material para restauração de defeitos em cartilagens articulares. Para isto, esponjas com diferentes tamanhos de poros foram caracterizadas mecanicamente, implantadas em articulações de joelho de coelhos jovens e adultos. Posteriormente foram avaliadas macroscópica e histológicamente 4, 8 e 12 semanas após o implante. Os autores concluíram que esponjas com tamanhos de poros superiores a 50 μm apresentavam baixa resistência mecânica e eram esmagadas após implante. Já, esponjas com poros menores que 50 μm apresentaram-se resistentes e após 12 semanas estavam cobertas com tecido fibroso e fibrocartilaginoso.

SMETANA e seus colaboradores (1992) apresentam um estudo comparando as propriedades biológicas de um composto poliHEMA-colágeno com as propriedades apresentadas pelo poliHEMA puro, onde concluem que o efeito do colágeno na destruição biológica do material é muito significativo. O colágeno além de acelerar a degradação do implante, exerce ação estimuladora na formação de osso.

CORKHILL e colaboradores (1990) vem trabalhando para o desenvolvimento de material sintético para utilização como cartilagem articular artificial, baseando-se na estrutura composta da mesma. O grupo vem trabalhando em colaboração com pesquisadores do hospital de Stanmore para estudos de biocompatibilidade dos materiais desenvolvidos e com pesquisadores da universidade de Leeds para estudos de atrito e desgaste (SMEATHERS & WRIGHT, 1990 ; CARAVIA e cols., 1993). O trabalho inicial destes autores foi a otimização

das propriedades fisicas de hidrogéis sintéticos homogêneos. Tais polímeros otimizados foram então utilizados como matrizes e submetidos a técnicas de reforçamento por fibra. Como não se obteve bons resultados, partiu-se para o estudo das redes interpenetrantes. Vários hidrogéis foram sintetizados e caracterizados mecanicamente na busca de propriedades semelhantes às da cartilagem articular natural. Na etapa seguinte, estudos sobre adesão de células mostraram a necessidade de sintetizar material macroporoso para melhorar a adesão de células. Investigou-se então o efeito que a introdução de macroporosidade causou nas propriedades mecânicas e verificou-se que poros com diâmetros menores que 40 μm podem ser introduzidos sem afetar muito as propriedades mecânicas.

MOW e colaboradores (1991) propõem um procedimento para enxertia de defeitos articulares usando periósteo autólogo-osso ou periósteo autólogo-osso sintético (PMMA-poliHEMA). Seus resultados mostraram a formação de tecido muito similar à cartilagem articular normal, embora estudos histológicos tenham indicado ligação incompleta entre o tecido reparado e a cartilagem adjacente, além da ausência de uma zona superficial apropriada na superficie articular, sendo portanto necessário a continuidade dos estudos.

PATEL e colaboradores, (1994) e DOWNES e colaboradores, (1994) vem estudando um sistema polimérico baseado no polietil metacrilato e tetrahidro furfuril metacrilato, que apresenta elevada capacidade de absorção de água e, segundo os autores tem mostrado grande potencial como material para reparo de cartilagem. Segundo os autores, a absorção de fluidos vizinhos ao tecido permite que o material incorpore proteínas de matriz tais como fatores de crescimento, o que pode contribuir para o processo de reparo tecidual. Quando testado frente a cultura de condrócitos (SAWTELL e cols., 1995), o material mostrou-se biocompatível para manutenção de condrócitos bovinos, os quais mantiveram-se diferenciados com síntese de glicosaminoglicanos. Em testes *in vivo* (REISSIS e cols., 1995), verificaram que o material após seis semanas de implante, foi recoberto com tecido similar a cartilagem hialina, perfeitamente integrada à cartilagem vizinha.

Estes exemplos da utilização de hidrogéis poliméricos são indicativos do potencial destes materiais para o reparo de lesões da cartilagem articular. Apesar dos vários estudos sendo realizados, ainda não se chegou a um procedimento para reparo de defeitos da

cartilagem articular usando hidrogel polimérico. Os estudos devem prosseguir na busca de biomaterial que permita a obtenção de uma superfície articular biomecanicamente funcional.

2.5 - AVALIAÇÃO DE BIOMATERIAIS

Hoje em dia, com o crescente uso de biomateriais na prática médica e odontológica, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento e/ou implementação de testes para a avaliação da biocompatibilidade dos materiais.

2.5.1 - Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade representam a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas (BLACK , 1992). Podem ser utilizados em uma pré-seleção como método para detectar se o material em questão provoca morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares. Diferentes métodos de avaliação de citotoxicidade de materiais tem sido desenvolvidos e padronizados (KIRKPATRICK, 1992), porém dependendo da especificidade do material, algumas adaptações devem ser feitas para que se possa tirar bons resultados da aplicação do teste.

O teste de citotoxicidade faz uso de técnicas *in vitro* para identificar efeitos adversos que biomateriais ou dispositivos médicos em potencial possam acarretar à células, de maneira a torná-los impróprios para uso como tal. Para ser aprovado num teste de citotoxicidade *in vitro*, um material não deve causar a morte das células nem afetar suas funções celulares.

Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células (FRESHNEY, 1989), os testes podem detectar se ocorre a lise das células, a inibição do crescimento celular e outros efeitos que possam ser causados nas células pelo material e/ou extrato oriundo do material.

Existem dois tipos de testes *in vitro* : métodos de contato direto e métodos de contato indireto. No primeiro, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente semeadas na forma de uma suspensão celular sobre o material. Já os métodos de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é

separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e o segundo tipo no qual substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente e colocada em contato com as células.

Normalmente faz se uso de células de linhagens estabelecidas (NORTHUP, 1986). A linhagem L929, estabelecida a partir de fibroblastos de rato e a linhagem Hela, estabelecida a partir de carcinoma cervical humano, são as mais comumente utilizadas, embora outras linhagens possam ser utilizadas.

A avaliação da citotoxicidade pode ser feita através da análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação celular, de atividade biossintética, etc (FRESHNEY , 1989).

Existem diferentes protocolos padrões já estabelecidos para os testes de citotoxicidade, dentre os quais podem ser citados :

- ASTM F-813-83 - Método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células
- ASTM F-895-84 - Método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade.
- ISO 10993-5 - Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5 : Testes para citotoxicidade : métodos *in vitro* .

Além de aspectos referentes ao procedimento, os padrões normalmente especificam a linhagem celular, o meio de cultura e as técnicas para avaliação da citotoxicidade. Além disso, todos os protocolos padrões prevêem a utilização e especificam materiais a serem utilizados como controles positivo e negativo. Controle positivo é uma substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível e controle negativo é o material ou substância que não produza efeito citotóxico.

2.5.2 - Biocompatibilidade

Conforme apresentado no início deste capítulo, a definição de biocompatibilidade de um material é a de que o material deve ser capaz de induzir resposta adequada , de acordo com a aplicação. Assim sendo, no caso do reparo de defeitos da cartilagem articular, para ser biocompatível o biomaterial empregado deve proporcionar a restauração de uma superfície articular funcional, isto é, que permita a articulação executar sua função adequadamente. Para tanto, duas situações diferentes devem ser analisadas. Caso a função do material seja dar suporte mecânico para o crescimento de tecido cartilaginoso, o material deve então permitir o crescimento de tecido de reparo que possua características biomecânicas semelhantes as da cartilagem articular e, caso o material seja utilizado como material de preenchimento, não permitindo o crescimento de tecido, deve então integrar-se devidamente ao tecido da superfície vizinha, não sofrendo desgaste e ainda apresentar comportamento mecânico semelhante a cartilagem articular. Em ambas as situações o material não deve induzir reações inflamatórias.

Desta forma, ensaios de biocompatibilidade neste caso devem avaliar a resposta do hospedeiro ao material implantado junto a cartilagem articular.

Conforme apresentado nos ítens 2.2 e 2.5 , muitos estudos vem sendo realizados para avaliação de diferentes materiais frente a restauração de superfície articular, mas não existe ainda um protocolo padrão estabelecido para de avaliação de material com esta finalidade específica. Em geral, os estudos fazem uma avaliação da resposta apresentada pelo hospedeiro ao implante do material ao longo do tempo, comparado com resposta apresentada por defeito que permanece vazio.

Os modelos utilizados geralmente empregam coelhos ou cães. O teste é feito em regiões de articulações que são submetidas a cargas, tais como côndilos femurais distais (HANFF e cols., 1990 ; MINNS e cols., 1982 ; SMETANA e cols., 1992) ou em regiões onde a carga não é tão elevada, tais como região intercondiliana de fêmur distal (HEATLEY & REVELL, 1985 ; SPERR e cols. , 1978). O implante é feito normalmente preenchendo um defeito circular de diâmetro variando entre 1,0 e 4,0 mm e profundidade variando entre 2,0 e 4,0 mm, de forma a atingir região vascularizada do osso subcrondral. Para controle individual,

no mesmo animal é provocado um defeito de iguais dimensões que permanece vazio. Utilizam-se grande número de animais, subdivididos em grupos de 5 ou mais que são sacrificados em períodos de tempo diferentes. A maioria dos estudos relatam acompanhamento por períodos de até 12 a 16 semanas.

CAPÍTULO 3 - OBJETIVO

Tendo em vista o exposto nos capítulos anteriores, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um hidrogel que apresentasse características semelhantes as da cartilagem hialina, bem como a avaliação *in vivo* de sua potencialidade para utilização no reparo de defeitos da cartilagem articular.

Para tanto foram estudados os hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) quanto as suas propriedades físico químicas e mecânicas, a sua citotoxicidade e o seu desempenho na reparação *in vivo* de defeitos produzidos em região intercondiliana de fêmur distal de ratos.

O trabalho compreendeu as seguintes etapas :

- Estudo da síntese e caracterização de hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) (poliHEMA) e blendas do tipo redes semi interpenetrantes (sIPN) de poliHEMA com diferentes polímeros lineares, buscando obter hidrogéis com propriedades mecânicas que permitam sua utilização no reparo de defeitos da cartilagem articular.

Nesta etapa foi estudado inicialmente a síntese de poliHEMA utilizando diferentes concentrações de agente de reticulação para verificar a influência nas características do hidrogel. A seguir para a síntese das blendas sIPN inicialmente com base em resultados da literatura foi escolhido como polímero linear o acetato de celulose e, como os resultados não foram satisfatórios para a aplicação desejada, foi então escolhido um copolímero de metacrilato de metila (MMA) e ácido acrílico (AA), para que fosse possível a incorporação de grupamentos negativos fixos a rede macromolecular e com isso mimetizar o comportamento da matriz extracelular de cartilagem hialina.

- Estudo do comportamento mecânico dos hidrogéis sintetizados, correlacionando parâmetros de síntese com propriedades mecânicas.

Para o estudo do comportamento mecânico dos hidrogéis foi escolhida uma metodologia que é normalmente utilizada para estudo de cartilagem, para permitir uma posterior avaliação do comportamento da superfície articular com implante do hidrogel. Foi escolhido o ensaio de indentação.

- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos hidrogéis estudados.

Amostras representativas dos hidrogéis de poliHEMA e das blendas de poliHEMA-AC e poliHEMA-poli(MMA-co-AA) foram submetidas a ensaios de citotoxicidade *in vitro*, frente a cultura de células do tipo VERO.

- Ensaios *in vivo*

Com base nos resultados das primeiras etapas, foi escolhido o hidrogel que apresentou características mais adequadas para aplicação proposta, e este foi submetido a uma avaliação preliminar de sua biocompatibilidade frente a reparação de pequenos defeitos provocados na superfície articular da região intercondiliana de fêmur distal de rato. Esta avaliação foi feita com base na análise macroscópica, análise histológica e análise do comportamento mecânico das superfícies articulares após o reparo utilizando o hidrogel e reparo biológico.

Com isto, este trabalho representa uma inovação quanto a avaliação *in vivo* de um hidrogel que apresenta cargas negativas fixas a sua rede macromolecular, mimetizando a estrutura da matriz extracelular, no reparo de defeitos da cartilagem articular; quanto a avaliação da citotoxicidade *in vitro* de hidrogéis e quanto a avaliação biomecânica da superfície articular após o reparo utilizando hidrogel.

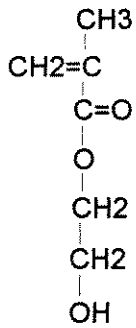
CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada a metodologia usada ao longo do desenvolvimento deste trabalho, que compreende as etapas de síntese de amostras de hidrogéis, caracterização dos mesmos quanto a capacidade de absorção de água, comportamento mecânico, densidade de carga negativa fixa, ensaios de citotoxicidade e finalmente o ensaio *in vivo* do hidrogel.

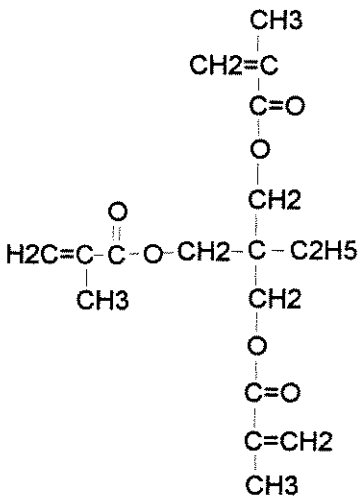
4.1 - SÍNTESE DO MATERIAL

4.1.1 - Poli(2-hidróxi etil metacrilato) - poliHEMA

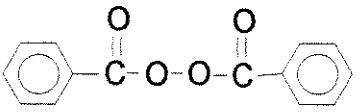
Amostras de hidrogéis foram obtidas através da polimerização térmica utilizando-se peróxido de benzoíla como iniciador. O monômero base utilizado foi o 2-hidróxi etil metacrilato - HEMA (Aldrich) e o agente de reticulação (AR) foi o trimetilolpropano trimetacrilato - TMPTMMA (Rhom Haas).



HEMA



TMPTMMA



peróxido de benzoíla

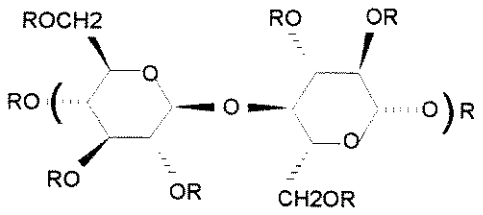
Quantidades pré determinadas de cada um dos componentes (tabela 4.1.1) eram pesadas, misturadas e a solução submetida a agitação em agitador magnético até completa homogeneização. A seguir a solução era vertida no molde e submetida a polimerização. Para a obtenção de amostras na forma de placas, a solução a ser polimerizada era vertida num molde constituído de duas placas de vidro separadas por uma gaxeta de teflon com 2 mm de espessura e presas externamente por garras e parafusos e a seguir levada a temperatura de 80 °C durante 4.0 horas (figura 4.1.1). Após o resfriamento as amostras eram deixadas em água destilada e deionizada para a remoção de monômero e iniciador residuais.

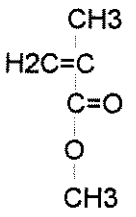
Tabela 4.1.1 - Concentrações de monômero, iniciador e agente de reticulação utilizados para síntese de amostras de poliHEMA (%p/p).

monômero HEMA	agente de reticulação TMPTMMA	iniciador PERÓXIDO DE BENZOÍLA
99,5	0	0,5
98,5	1,0	0,5
94,5	5,0	0,5
89,5	10,0	0,5

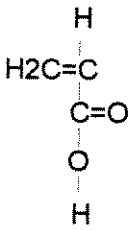
4.1.2 - Blendas de redes semi interpenetrantes (sIPN)

Foram sintetizadas também blendas de rede semi interpenetrantes - sIPNs de poliHEMA e diferentes polímeros lineares : acetato de celulose - AC (Rhodia) com grau de substituição 2.5 (grau de acetilação) (tabela 4.1.2) e poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (tabela 4.1.3), um copolímero de metacrilato de metila - MMA e ácido acrílico - AA, sintetizado por polimerização térmica a partir da mistura de monômeros de MMA (Metacril) e AA (Rhom Haas), na proporção MMA:AA de 75:25. Para a obtenção das amostras de blenda, o polímero reforço era inicialmente dissolvido em solvente adequado (acetona ou álcool etílico) e adicionado a solução de monômero, iniciador e agente de reticulação nas concentrações desejadas, formando a solução a ser polimerizada conforme já descrito.

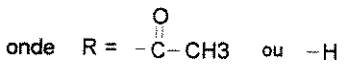




MMA



AA



AC

Tabela 4.1.2 - Concentrações de monômero, polímero, iniciador e agente de reticulação utilizados para síntese de amostras da blenda sIPN de poliHEMA-AC (% p/p).

monômero HEMA	polímero AC	agente de reticulação TMPTMMA	iniciador PERÓXIDO DE BENZOÍLA
98,5	0	1,0	0,5
97,5	1,0	1,0	0,5
93,5	5,0	1,0	0,5
88,5	10,0	1,0	0,5

Tabela 4.1.3 - Concentrações de monômero, polímero, iniciador e agente de reticulação utilizados para síntese de amostras da blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA).

monômero HEMA	polímero poli(MMA-co-AA)	agente de reticulação TMPTMMA	iniciador PERÓXIDO DE BENZOÍLA
98,5	0	1,0	0,5
96,0	2,5	1,0	0,5
93,5	5,0	1,0	0,5
88,5	10,0	1,0	0,5

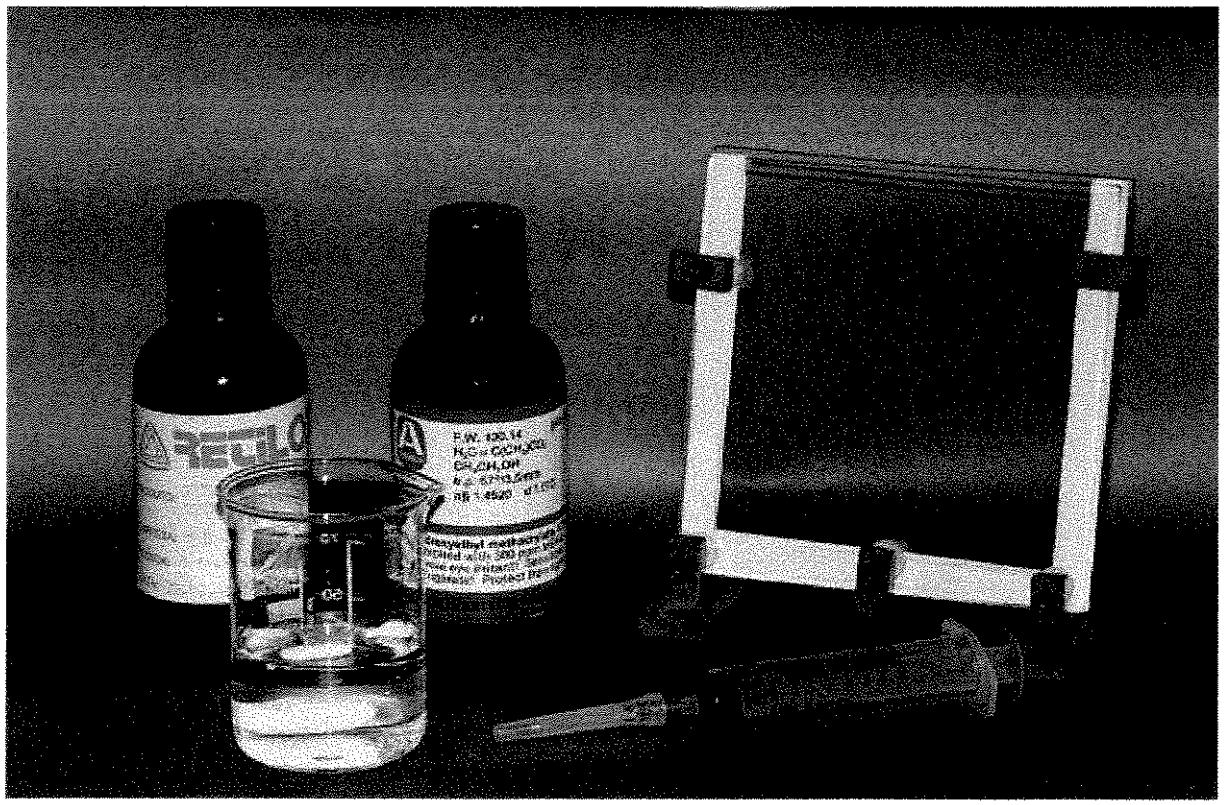


Figura 4.1.1 - Molde utilizado para síntese de amostras de hidrogel denso.

4.1.2 - Amostras porosas

Foram obtidas amostras porosas de blenda sIPN de poliHEMA com poli(MMA-co-AA), com tamanho de poros < 45 μm. Após o preparo da solução de monômero, iniciador e polímero reforço, conforme já descrito, era adicionado a solução cristais de glicose (MERCK) previamente peneirado em peneira com malha de abertura 0,045 mm (tamanho de cristais <0,045 mm). Esta solução era vertida para o molde de vidro e submetido a polimerização (figura 4.1.2). Após a polimerização e resfriamento do molde contendo o filme polimerizado, este era lavado em água destilada e deionizada para remoção do iniciador e monômero residuais, solubilização dos cristais e retirada da glicose do interior do filme.

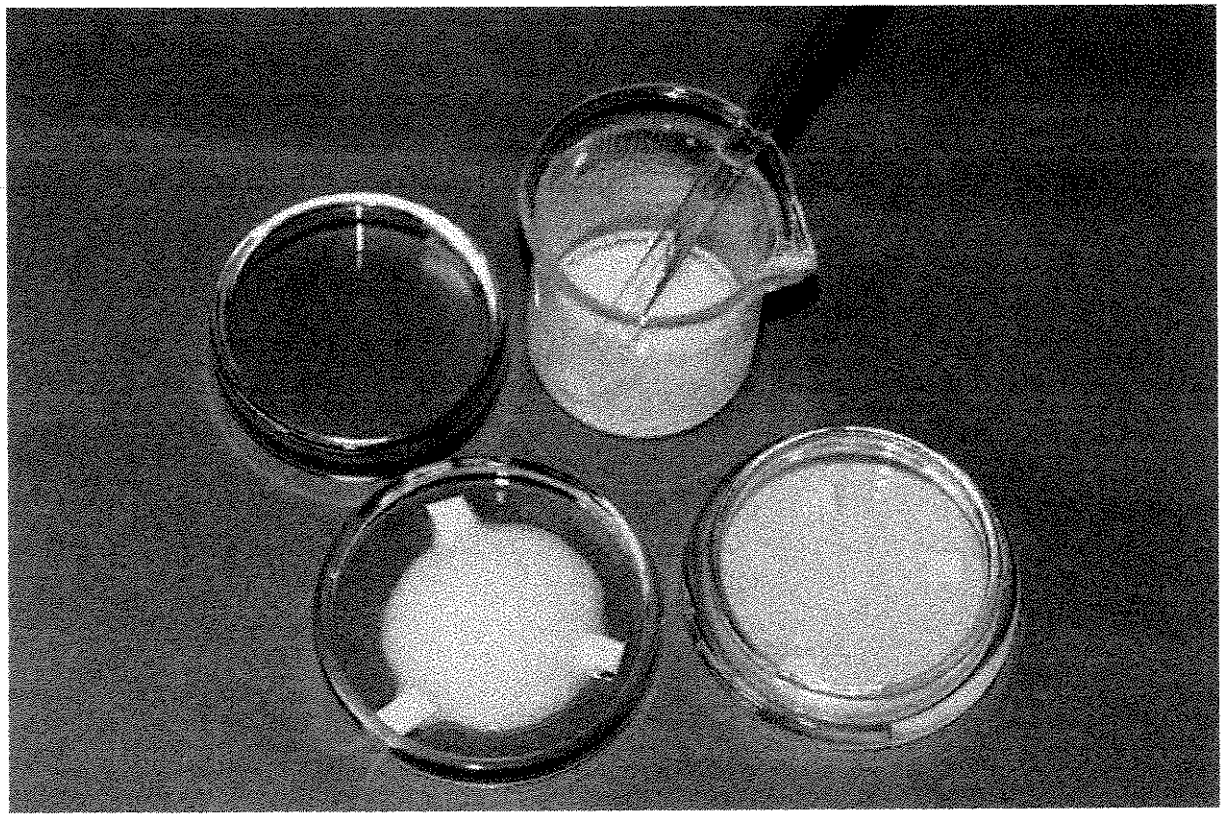


Figura 4.1.2 - Molde utilizado para síntese de amostras de hidrogel poroso.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Todas as amostras sintetizadas dos hidrogéis de poliHEMA e das blendas sIPN de poliHEMA com AC ou poli(MMA-co-AA) foram caracterizadas quanto a capacidade de absorção de água e de solução salina, densidade de carga negativa fixa, comportamento mecânico frente a ensaios de fluência a indentação, ensaios de citotoxicidade, conforme metodologias descritas a seguir. A partir dos resultados de tais caracterizações e tendo em vista os parâmetros objetivos para a aplicação proposta para o material, foi escolhida uma amostra de hidrogel a ser utilizado no ensaio *in vivo*, conforme metodologia descrita no ítem 4.2.5.

4.2.1 - Capacidade de absorção de água e de solução salina

Amostras obtidas a partir de diferentes concentrações dos constituintes foram caracterizadas quanto à capacidade de absorção de água ($\chi_{água}$) e de uma solução salina (água/NaCl 0,15 M) - ($\chi_{água/NaCl}$) . Escolheu-se 0,15 Mol L^{-1} para simular o fluido sinovial.

Para a determinação de $\chi_{água}$ e $\chi_{água/NaCl}$ pequenas amostras do hidrogel eram devidamente secas sob vácuo, pesadas e a seguir imersas em água destilada e deionizada ou solução salina até atingirem o equilíbrio (peso constante). χ_i era então determinado como uma média entre 5 determinações para cada amostra.

$$\chi_i = (m_{i\ no\ gel} / m_{gel}) \times 100 \quad , \qquad \text{onde}$$

$m_{i\ no\ gel}$ = (massa amostra inchada em i - massa amostra seca)

m_{gel} = massa amostra inchada

4.2.2 - Densidade de carga negativa fixa

A determinação da densidade de carga fixa das amostras (grupos COOH ionizados) foi feita por titrimetria. Pequena porção (fragmentos) da amostra era coletada logo após a síntese, devidamente lavada em água destilada e deionizada, liofilizada , pesada e colocada em solução salina (NaCl 0.15 Mol L^{-1}), com indicador de fenolftaleína e deixada sob agitação por aproximadamente 24 horas. Após esse tempo, a titulação era feita com solução aquosa de NaOH 0.01 N, até o ponto de viragem. O volume de NaOH gasto era anotado e a amostra na solução permanecia sob agitação por mais 24 horas e, caso fosse verificado nova acidificação, era adicionado mais NaOH até atingir novamente o ponto de viragem. Este procedimento era repetido quantas vezes fosse necessário para que não mais houvesse acidificação do meio. Para cada amostra eram feitas tres determinações.

A densidade de carga negativa fixa era então calculada a partir do número de equivalentes grama de íons OH^-, necessários para neutralização dos íons H^+ liberados pelo hidrogel para a solução.

$$DCF = (n_{NaOH} \cdot V_{NaOH}) / m_{gel}$$

DCF	: densidade de carga negativa fixa	[mEq/g]
n_{NaOH}	: normalidade da solução de NaOH utilizada	[N]
V_{NaOH}	: volume de solução de NaOH utilizado	[l]
m_{gel}	: massa da amostra de gel inchado em água	[Kg]

4.2.3 - Comportamento mecânico de hidrogéis

O estudo do comportamento mecânico das diferentes amostras de hidrogéis foi feito através de ensaios de fluência a indentação, utilizando uma ponta esférica de raio 1,6 mm em um sistema conforme o ilustrado nas figuras 4.2.1 e 4.2.2, o qual foi acoplado a uma máquina universal de ensaios mecânicos (MTS - modelo 810) . Durante o ensaio a amostra era mantida imersa em solução salina, sob temperatura controlada de 37°C . Para todas as amostras a carga aplicada foi de 0,5 Kgf durante 120 segundos, após o que era imediatamente retirada. Em cada ensaio era registrada a altura de indentação (h) ao longo do tempo (t). Para cada amostra foram realizados tres ensaios e tomados os valores médios para h. A partir de tais dados e da equação (1) foi possível o cálculo do módulo de fluência a indentação para as diferentes amostras, utilizando o modelo de KEMPSON et al (1971), tomando-se o valor de h medido 2,0 segundos após a aplicação da carga, pois acredita-se que para pequenas deformações as amostras apresentam comportamento mais próximo ao de um material elástico. O módulo de fluência a indentação assim calculado foi chamado E2s.

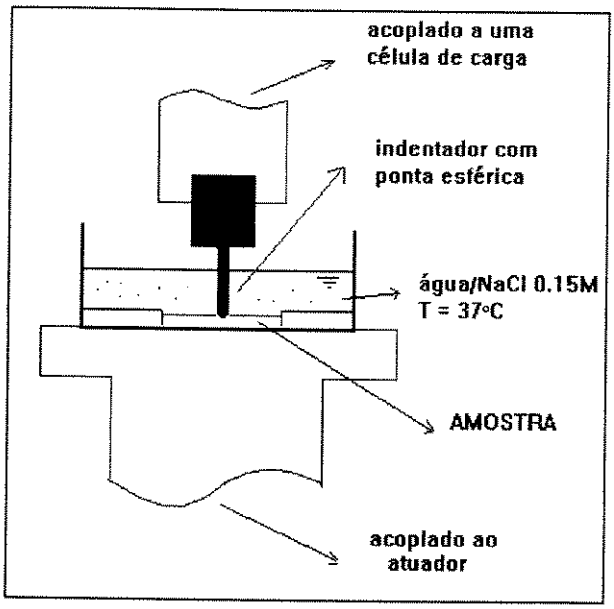


Figura 4.2.1 - Esquema ilustrando ensaio de indentação em hidrogéis.

$$E_{2s} = \frac{9 \cdot 10^4 p}{16\sqrt{r}} \left[\frac{1 - \exp(-0.42 \cdot e / a)}{h} \right]^{3/2} \quad (1)$$

E_{2s} = módulo de fluência [Kgf/m^2]

p = carga [Kgf]

r = raio do indentador [m]

e = espessura da amostra [m]

h = altura de indentação [m]

$a = \sqrt{(2rh - h^2)}$ [m]

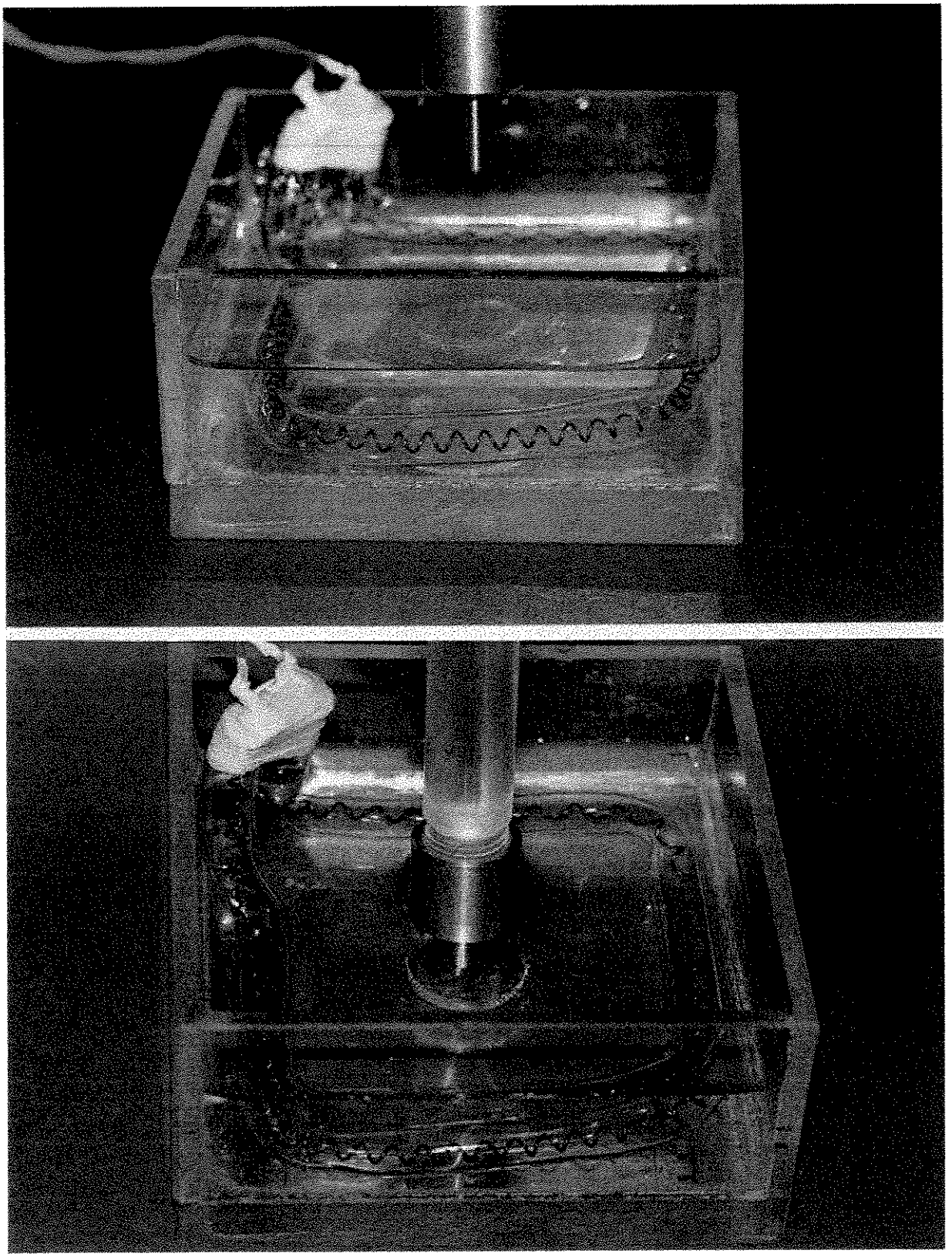


Figura 4.2.2 - Ensaio de indentação em amostras de hidrogéis

4.2.4 - Microscopia eletrônica de varredura

A amostra utilizada no ensaio in vivo, isto é, amostra de blenda siPN de poliHEMA-poliMMA-co-AA) composta por camada densa e porosa foi observada ao microscópio eletrônico de varredura. A amostra foi seca (liofilização), fraturada em N_2 líquido. Seus fragmentos foram colados sobre um suporte metálico, recobertos com ouro, usando um metalizador de amostras Sputer Coater BAL-TEC SCD 050, e a seguir observados ao MEV JEOL JXA 860A.

4.3 - ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE DOS HIDROGÉIS

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP, que cedeu suas dependências e infra estrutura para a realização dos ensaios.

Para a avaliação da citotoxicidade dos hidrogéis estudados, foram escolhidas amostras representativas de cada grupo para serem submetidas a testes segundo procedimentos descritos pelas normas ASTM F895-84, F813-83 e ISO 10993-5 (1992) com pequenas adaptações.

Como controle negativo (não citotóxico) foi utilizado polipropileno (fragmentos de material descartável utilizados rotineiramente em cultura de células) e, como controle positivo (citotóxico) foi utilizado um filme obtido a partir de adesivo de silicone (Rhodiastic). Tanto as amostras quanto os controles foram preparados na forma de discos com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, e a seguir lavados várias vezes com solução salina 0.9% e esterilizadas em autoclave a 120° C por 30 min. Cada amostra do material foi colocada sobre uma lamínula de vidro no interior de tubos de Leigthon (figura 4.3.1) e mantidos com meio Ham F 10, com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 12 horas a 37° C, antes de receberem o inóculo celular.

4.3.1 - Células

Células da linhagem VERO provenientes do Instituto Adolfo Lutz - SP, foram mantidas rotineiramente em meio Ham F 10 com 10% de soro fetal bovino (SFB) com repiques efetuados sempre que a cultura atingiu a confluência.

4.3.2 - Inóculo

Os discos de cada amostra a ser testada bem como dos controles foram colocados sobre lamínulas de vidro no interior de tubos de Leighton (1 disco / frasco). Desta forma em um mesmo frasco teremos o efeito do contato da célula com o substrato e a indicação se o material libera ou não substâncias tóxicas para o meio. Um volume de 1,0 mL de uma suspensão celular em meio de cultivo contendo 10^5 células/ml foi inoculada em cada tubo de Leighton (figura 4.3.1) após a retirada do meio de lavagem. Os frascos foram mantidos a 37° C por 48 horas. O experimento foi efetuado em triplicata, isto é 3 frascos de cultura por amostra, inclusive para os controles positivo e negativo.

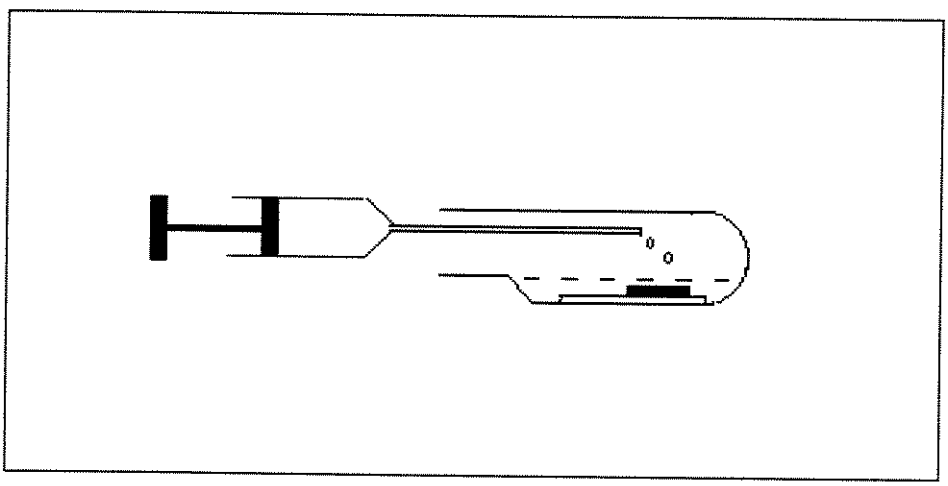


Figura 4.3.1 - Esquema ilustrando o inóculo de células sobre a lamínula de vidro e amostra, contidos em frasco de Leighton.

4.3.3 - Avaliação da citotoxicidade

- Viabilidade celular

Após 48 horas de incubação a 37°C em meio HAM F-10 com 10% SFB foi efetuada a análise da viabilidade celular, nas células presentes no meio de cultivo, através do método de exclusão com Azul Tripan. Amostras dos meios de cultura dos frascos foram coletadas, diluídas 1:1 em solução de Azul tripan 0,1 % em salina 0.9 % e as células viáveis e não viáveis em suspensão no meio de cultura foram contadas em câmara de Neubauer.

- Morfologia das células

Os discos e as lamínulas foram retirados dos tubos de Leighton, fixados em metanol:ácido acético (3:1), lavados rapidamente em metanol e secos ao ar. A seguir foram corados com cresil violeta 0,25% por 15 min, lavados em água, secos ao ar, diafanizados em xilol e montados sobre lâminas de vidro com entelan (MERCK) para observação ao microscópio ótico.

4.4 - ENSAIOS *IN VIVO*.

Os ensaios de biocompatibilidade foram realizados nos Laboratórios de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que cedeu suas dependências e infra estrutura para a realização dos ensaios.

4.4.1 - Animais utilizados

Foram utilizados ratos brancos machos (Rattus Novergicus) da variedade wistar, com 2 meses de idade e peso aproximadamente 200g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

4.4.2 - Determinação do modelo para estudo

Inicialmente foi realizado um teste piloto para verificar a viabilidade prática do procedimento experimental planejado com base na literatura descrita no capítulo 2 (ítem 2.6) e definição de alguns parâmetros tais como diâmetro e profundidade do defeito a ser provocado no local de implante. A partir dos resultados obtidos com este teste piloto foi possível definir os procedimentos a serem utilizados para implante do material, retirada do mesmo e procedimentos de análise dos resultados, conforme descrito a seguir.

4.4.3 - Acondicionamento e esterilização das amostras

As amostras do material em teste (blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) com porosidade < 45 μm), após sintetizadas, eram devidamente lavadas em água destilada e deionizada para remoção de monômero e iniciador residuais conforme descrito no ítem síntese de amostras. Após a lavagem, as amostras eram acondicionadas em solução salina (NaCl 0,15 Mol L^{-1}). Antes do implante, era adicionado solução aquosa de NaOH 0,01N ao frasco contendo a amostra em solução aquosa de NaCl, em quantidade suficiente para manter pH=7,0.

As amostras imersas em solução a pH = 7,0 eram então esterilizadas em autoclave (110°C, 30 min) antes do implante.

4.4.4 - Procedimento cirúrgico

- Implante

O animal era anestesiado através da inalação de éter etílico e logo após realizava-se a tricotomia e a assepsia das patas posteriores com solução alcoólica de iodo.

Era feito uma incisão para-patelar lateral com exposição da articulação do joelho e em seguida era luxada lateralmente a rótula para expor completamente a região intercondiliana do

fêmur. No centro da região intercondiliana realizava-se a perfuração com furadeira de baixa rotação (130 rpm) e broca de 2,5 mm de diâmetro. A broca possuia um anel fixado a 2,1 mm de sua ponta, para limitar a penetração desta no tecido ósseo. Cortava-se um cilindro do hidrogel, cam as mesmas dimensões do defeito, que era introduzido cuidadosamente. A seguir a cápsula era suturada com fio de náylon 4,0 e a pele também. O implante foi feito no lado direito do animal enquanto que na articulação contralateral era feito um defeito de iguais dimensões que permanecia vazio para servir como controle.

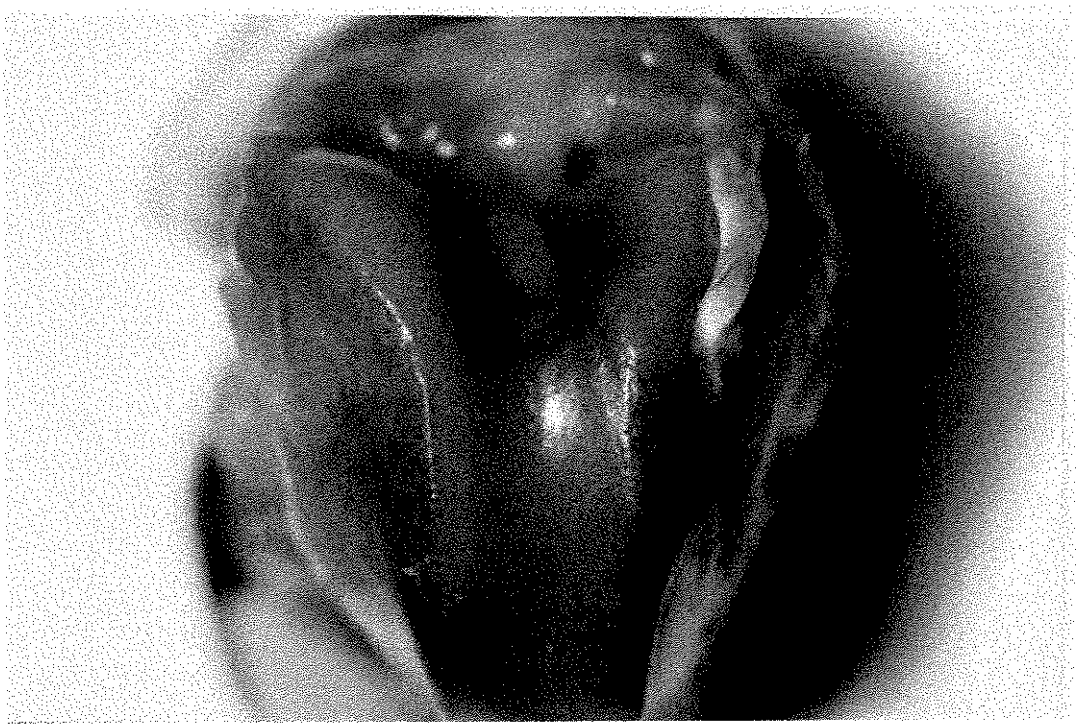


Figura 4.4.1 - Superficie articular típica da região intercondiliana do fêmur distal do rato, (*) região onde foi realizado a perfuração.

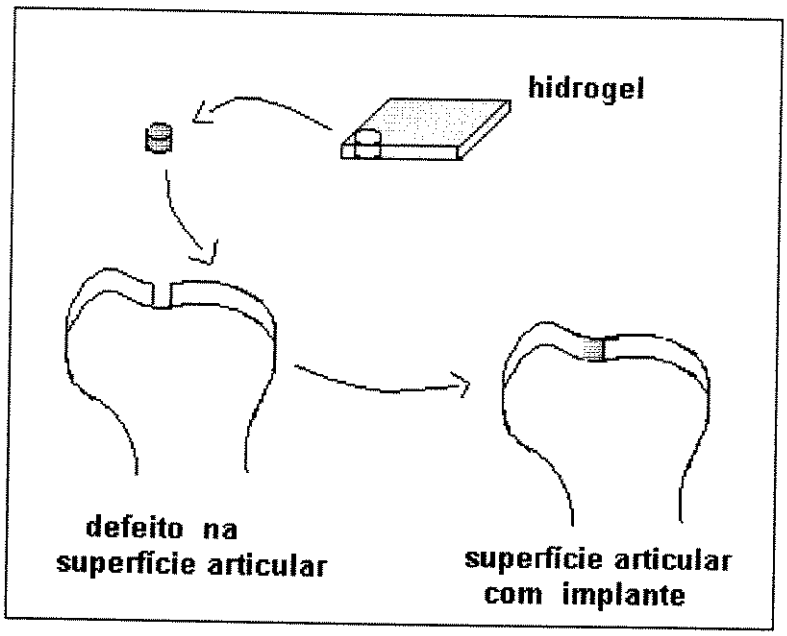


Figura 4.4.2 - Esquema ilustrando o implante de amostra de hidrogel na superfície articular de região intercondileana de fêmur de rato.

Após operados os animais eram mantidos livres em gaiola apropriada, com ração e água "ad libitum".

- Sacrifício

Após decorrido o tempo de seguimento especificado, os animais eram sacrificados com inalação de éter etílico, os joelhos eram desarticulados e fazia-se a osteotomia do terço médio do fêmur.

Os seguimentos de fêmur retirados (espécimes) eram etiquetados e armazenados a temperatura de aproximadamente 10°C enquanto aguardavam análise macroscópica da superfície articular e ensaio mecânico. A seguir eram colocados em solução de formaldeído 10,0 % para fixação e análise posterior.

Figura 4.4.3 - Análises realizadas no ensaio *in vivo*.

4.4.5 - Análise macroscópica da superfícies articulares

Análise macroscópica das superfícies articulares dos femures com implante e controle foi feita utilizando os dispositivos para visualização e fotografia com luz incidente e sistema de baixo aumento (10 a 50 vezes) de um banco metalográfico marca ZEISS, modelo NEOPHOT 32 .

4.4.6 - Ensaios de indentação dos espécimes

Após análise macroscópica da superfície articular, os espécimens eram submetidos a ensaios de indentação conforme ilustrado na figura 4.4.4.

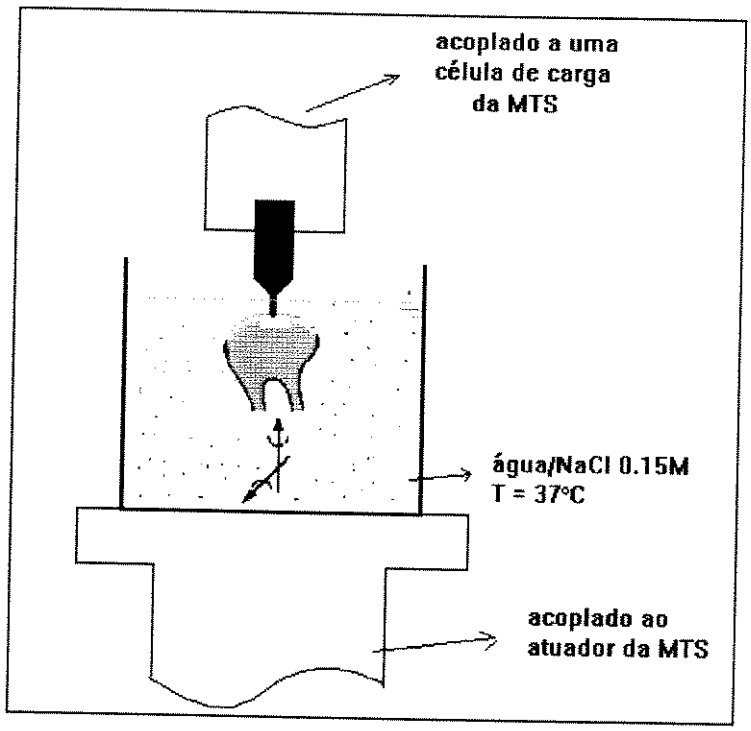


Figura 4.4.4. Esquema ilustrando o ensaio de indentação na superfície articular de fêmur distal de rato.

O espécime era devidamente fixado utilizando-se um dispositivo que permitia movimentos para o ajuste adequado da superfície a ser indentada, imerso em solução aquosa de NaCl 0,15 Mol L^{-1} a temperatura de 37 °C.

Foram realizados ensaios de relaxação de tensão da superfícies articulares em estudo submetida a indentação utilizando uma ponta esférica de raio 0,5 mm em aço inox 310 L . Inicialmente era feito ajuste do posicionamento do espécime para que a ponta ficasse perpendicular à área a ser identada, e tocasse levemente a superfície.

A partir desse ponto, era imposta uma deformação ao espécime, a uma taxa controlada de 0,5 mm/ min e a carga necessária para tal deformação era medida e registrada ao longo do tempo. Após atingir 0,3 mm de deformação, a deformação era mantida constante, enquanto a carga era medida e registrada ao longo do tempo por 120 segundos.

Em cada espécime foram feitos ensaios na área do defeito/implante e nas vizinhanças do mesmo. Cada grupo de seguimento era constituído por 5 animais e portanto, foram obtidas

5 curvas do tipo *carga x tempo* (01 curva/animal x 05 animais/grupo). Tais resultados foram submetidos a uma análise estatística para validação dos dados, cálculo de médias, desvios e variâncias. A partir de tais dados e da equação 1 foi possível calcular o módulo de Young para as superfícies articulares indentadas, tomando-se os valores de carga medidos para deformação de 0,16 mm.

4.4.7 - Análise histológica

Os espécimes foram fixados em formol a 10,0 % por 24 horas e a seguir descalcificados usando solução de ácido nítrico 5,0% , processados para inclusão em parafina. A inclusão foi feita de maneira que os cortes histológicos fossem longitudinais ao implante/defeito. Para cada amostra foram feitos cortes com 7,0 μm a preparadas lâminas coradas com hematoxilina-eosina e lâminas coradas com tricômio de Masson.

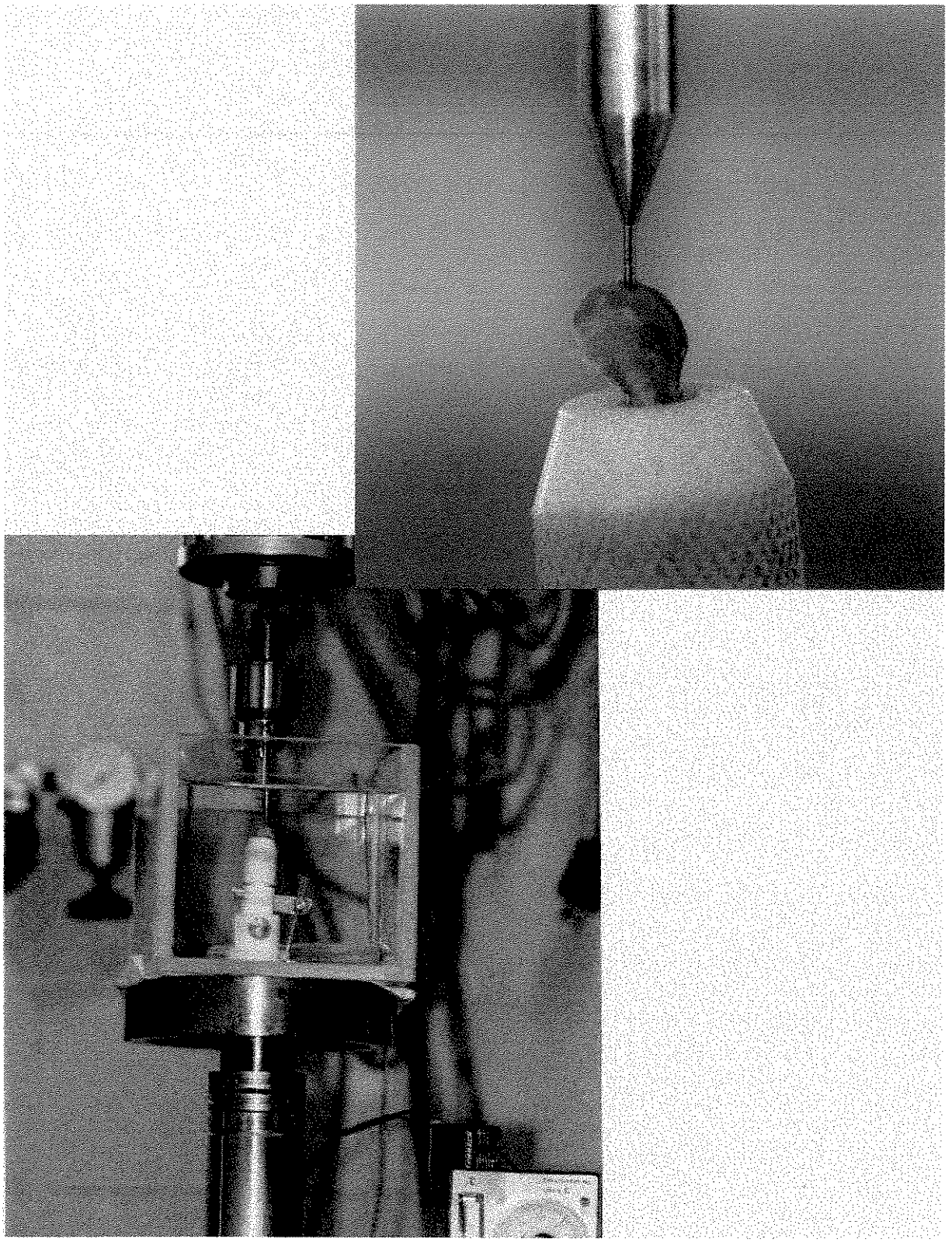


Figura 4.4.5 - Ensaio de indentação na superfície articular de fêmur distal de rato.

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo os resultados obtidos são apresentados e discutidos. Inicialmente são apresentados os resultados que se referem a etapa de síntese e caracterização de hidrogéis, buscando material com comportamento semelhante ao da cartilagem articular. A seguir, são apresentados os resultados referentes aos ensaios de citotoxicidade, a escolha da amostra para utilização no ensaio *in vivo* e finalmente, os resultados e discussão deste ensaio.

5.1 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS

As amostras de hidrogéis obtidas (figuras 5.1.1 a 5.1.3) apresentaram-se como materiais rígidos de comportamento frágil quando totalmente secas, tornando-se flexíveis quando inchadas em água ou em solução salina.

5.1.1 - Capacidade de absorção de água e de solução salina

Todas as amostras apresentaram para capacidade de absorção de água ($\chi_{água}$) valores levemente superiores aos de capacidade de absorção de solução salina ($\chi_{água/NaCl}$), conforme mostram os resultados apresentados na tabela 5.1.1.

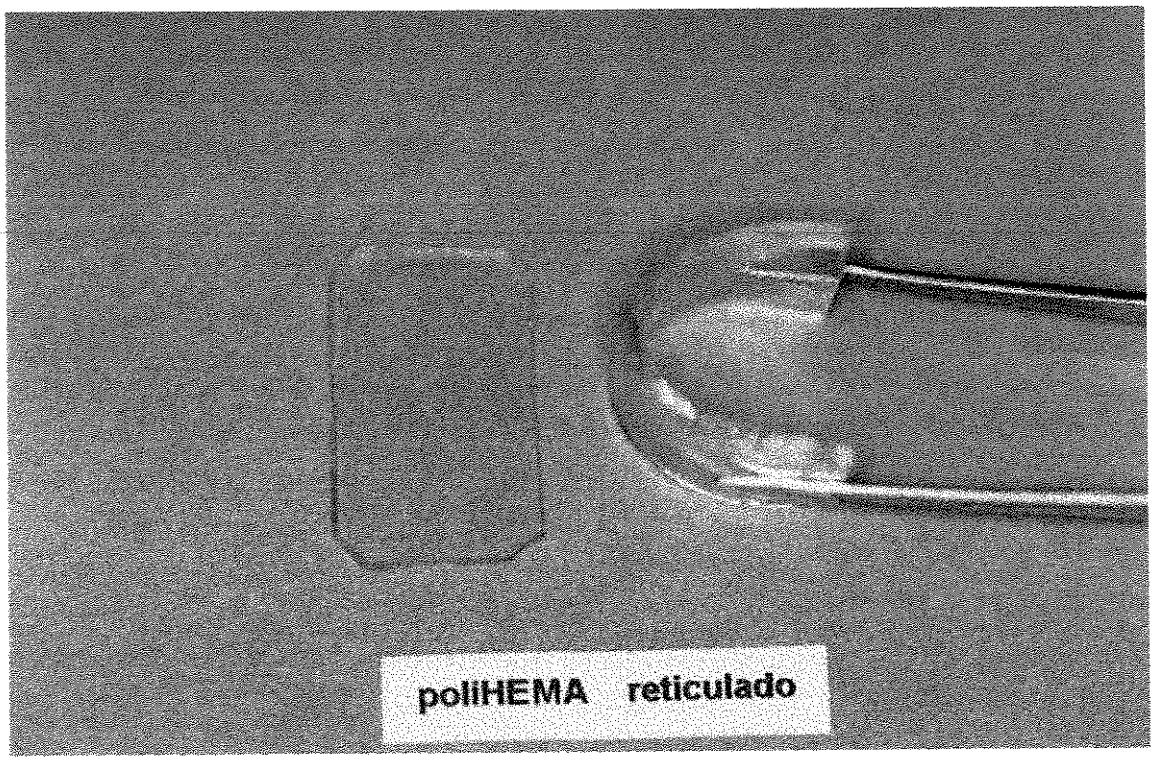


Figura 5.1.1 - Hidrogel de poli(2-hidróxietil metacrilato).

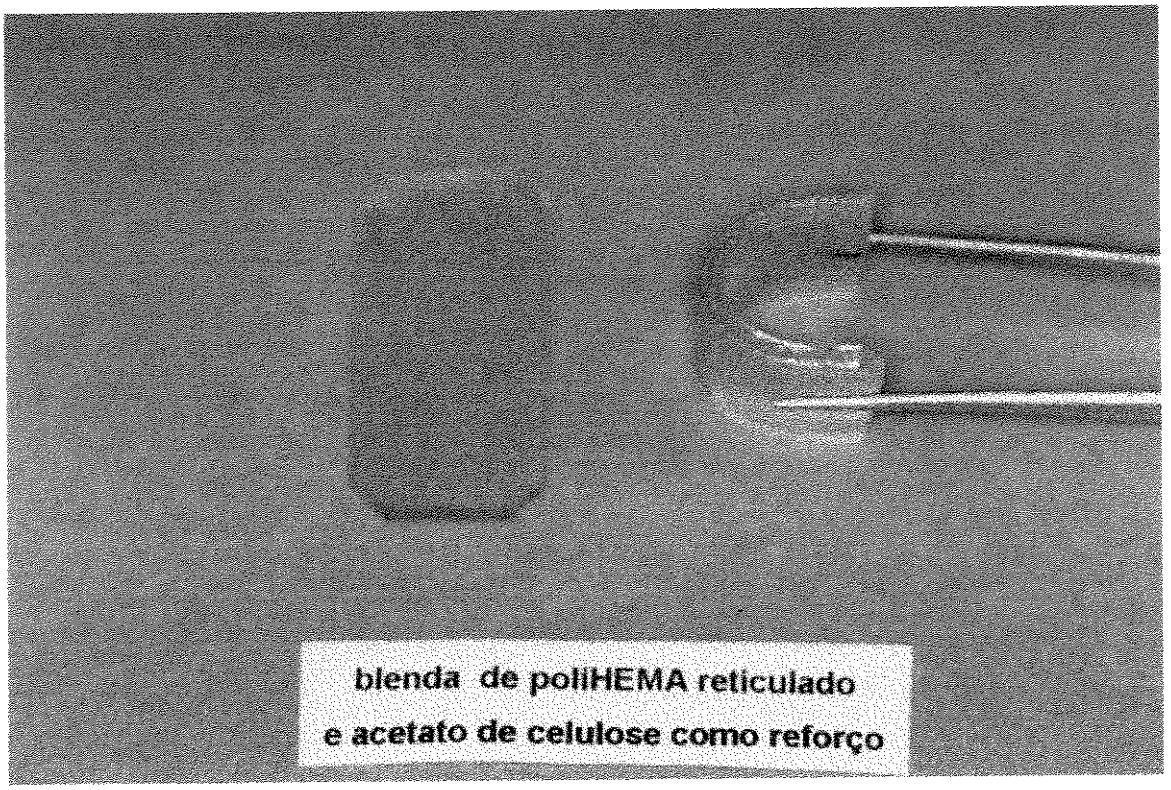


Figura 5.1.2 - Hidrogel blenda de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose.

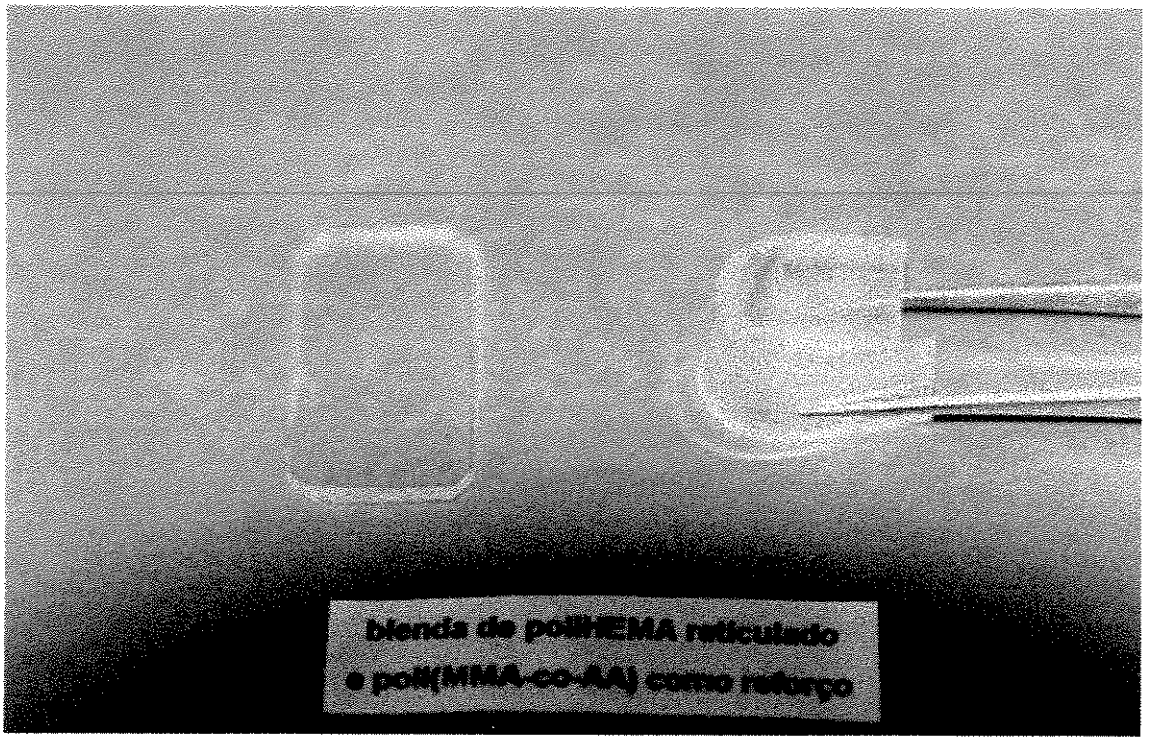


Figura 5.1.3 - Hidrogel blenda de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).

A pressão osmótica da solução aquosa de NaCl contribui para o abaixamento do potencial osmótico do sistema e, consequentemente da força motriz para a entrada de água no hidrogel. Conforme discutido no capítulo 2, quando um hidrogel é colocado em água, existe um potencial osmótico que favorece a entrada da água para o interior do hidrogel. No caso do hidrogel em água, o potencial osmótico a ser considerado para o sistema é igual a pressão osmótica da "solução de macromoléculas". Quando a água é substituída por solução aquosa de NaCl, a qual apresenta uma pressão osmótica característica, o potencial osmótico do sistema passa a ser a diferença entre as pressões osmóticas da "solução de macromoléculas" e da solução aquosa de NaCl.

Tabela 5. 1.1 - Valores de capacidade de absorção de água e de solução salina, medidos experimentalmente para hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato), blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose e poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico), obtidos a partir da média entre tres determinações.

hidrogel	[TMPTMMA] (% p/p)	[AC] (% p/p)	[poli(MMA-co-AA)] (% p/p)	$\chi_{água}$ (% p/p)	$\chi_{água/NaCl}$ (% p/p)
poliHEMA	0	-	-	34,0 ± 0,3	32,4 ± 0,7
"	1,0	-	-	31,8 ± 0,2	31,2 ± 0,5
"	5,0	-	-	26,5 ± 0,4	25,0 ± 0,3
"	10,0	-	-	18,7 ± 0,1	16,2 ± 0,6
sIPN poliHEMA - AC	1,0	0	-	31,8 ± 0,2	31,2 ± 0,5
"	1,0	1,0	-	32,6 ± 0,4	30,9 ± 0,5
"	1,0	5,0	-	21,5 ± 0,3	30,1 ± 0,7
"	1,0	10,0	-	30,4 ± 1,4	20,7 ± 0,9
sIPN poliHEMA - poli(MMA-co-AA)	1,0	-	-	31,8 ± 0,2	31,2 ± 0,5
"	1,0	-	2,5	30,3 ± 0,2	29,7 ± 0,4
"	1,0	-	5,0	32,4 ± 0,8	30,8 ± 0,4
"	1,0	-	10,0	28,3 ± 0,3	24,0 ± 0,7

5.1.2 - Comportamento mecânico dos hidrogéis

A capacidade de absorção de água e de solução salina e consequentemente a dureza das amostras variaram em função da quantidade de agente de reticulação (AR) utilizado para a síntese do poliHEMA e em função do tipo e concentração de polímero linear utilizado utilizado nas blendas sIPN, conforme mostram os resultados apresentados nas figuras 5.1.5, 5.1.7 e 5.1.9.

Para o estudo do comportamento mecânico dos hidrogéis, foi utilizada metodologia semelhante a utilizada por KEMPSON e colaboradores (1971) , descrita no capítulo 4, que permitiu a obtenção de parâmetros para comparação entre os resultados apresentados pelas diferentes amostras.

5.1.2.1 - Poli(2-hidróxi etil metacrilato)

A figura 5.1.4 mostra os resultados do ensaio de fluência a indentação, isto é, a altura da indentação (h) ao longo do tempo para a aplicação de uma carga de 0,5 Kgf durante 120 segundos, após o que a carga era retirada rapidamente. Observa-se que o aumento da concentração de agente de reticulação de 0 a 10 % reduz drasticamente a altura de indentação. O aumento na concentração de agente de reticulação leva ao aumento na dureza do hidrogel.

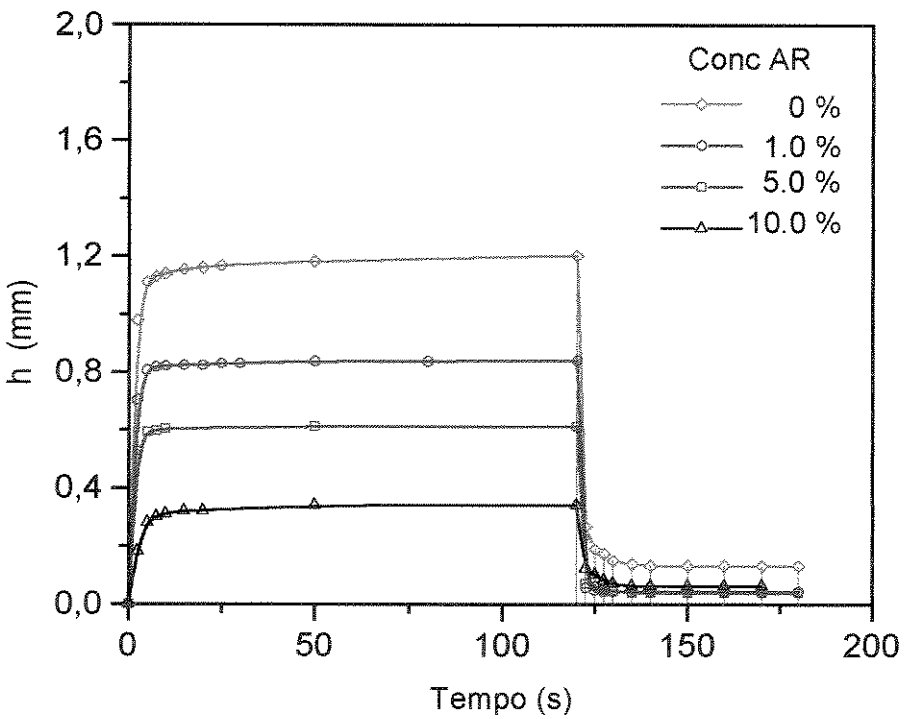


Figura 5. 1.4 - Altura de indentação medida ao longo do tempo para amostras de hidrogel de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de agente de reticulação.

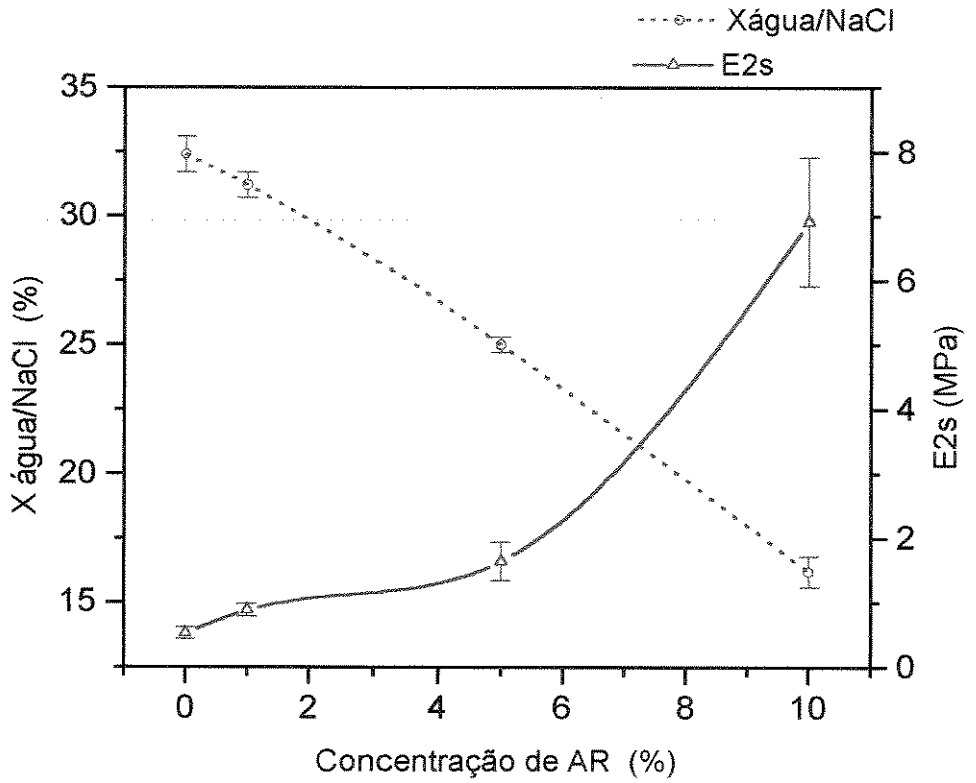


Figura 5. 1.5 - Módulo de fluência à indentação e capacidade de absorção de solução salina medidos para amostras de hidrogel de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de agente de reticulação.

Na figura 5.1.5 é possível observar que o módulo de fluência à indentação (E_{2s}), obtido a partir do valor da altura de indentação tomado 2.0 seg após a aplicação da carga aumenta enquanto que a capacidade de absorção de solução salina ($\chi_{água/NaCl}$) diminui em função do aumento da concentração de AR. O aumento da densidade de reticulação aumenta a coesão da rede, dificultando a entrada da água para o interior do hidrogel e diminuindo sua capacidade de absorção de água ou solução salina. Quanto menor a capacidade de absorção de água, maior a dureza do hidrogel, isto é, maior a flexibilidade e capacidade de deformação do mesmo.

A deformação de um hidrogel submetido a carga de compressão é resultante da deformação sofrida pela rede polimérica e do escoamento de água para fora do hidrogel. Assim sendo, o aumento da concentração de AR leva ao aumento da rigidez da rede polimérica e dificulta o escoamento de água para fora do hidrogel, contribuindo para o aumento da sua dureza.

5.1.2.2 - Blendas de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose

As figuras 5.1.6 e 5.1.7 mostram o comportamento das amostras de blendas sIPN formadas de poliHEMA-AC obtidas utilizando [AR] = 1,0% e diferentes quantidades de AC.

Tais resultados comprovam a formação de estrutura a nível molecular, semelhante a estrutura de um material compósito, onde o polímero não reticulado, no caso o AC funciona como um material de reforço para o polímero reticulado, o poliHEMA.

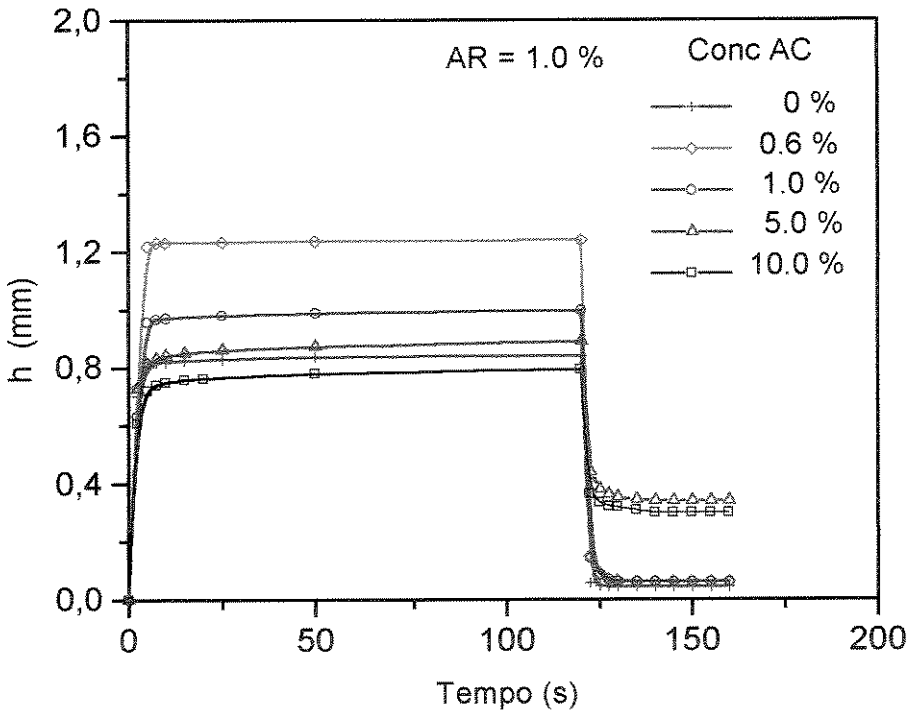


Figura 5. 1.6. - Altura de indentação medida ao longo do tempo para amostras de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de acetato de celulose.

Neste caso, as cadeias do poliHEMA encontram-se entrelaçadas pelas cadeias de AC e assim, o aumento da concentração de AC aumenta a coesão da rede, diminuindo a capacidade de absorção de água e solução salina. O módulo de fluência (E_{2s}) aumenta com a quantidade de AC, porém não ultrapassa 1,2 MPa, mesmo para concentrações de até 10,0 % de AC. Não foi possivel obter amostras com concentração de AC superiores a 10,0 %, devido a baixa solubilidade deste no HEMA.

Comportamento semelhante foi verificado por NAGAOKA, (1989) que estudou o comportamento mecânico de hidrogéis obtidos a partir de blendas sIPN de poli(N vinil pirrolidona) e AC. Seus resultados mostram que o aumento da concentração de AC leva a um aumento da resistência mecânica e diminuição na capacidade de alongamento do hidrogel.

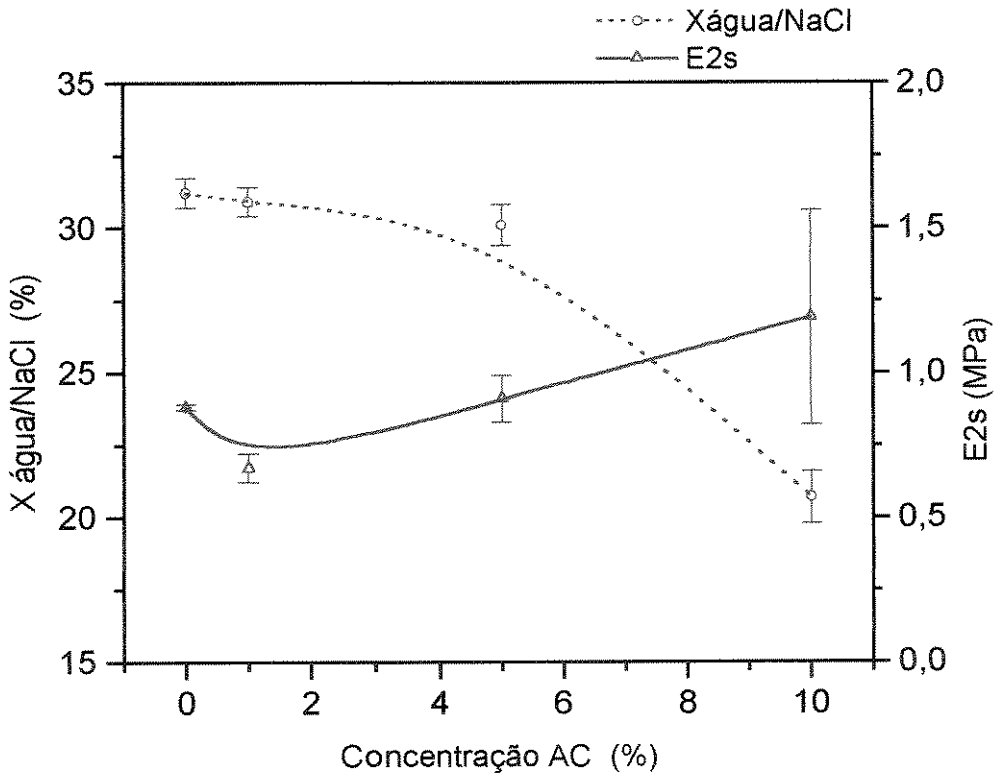


Figura 5. 1.7 - Módulo de fluência à indentação e capacidade de absorção de solução salina medidos para amostras de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de acetato de celulose.

5.1.2.3 - Blendas de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).

Tendo em vista que o aumento de E_{2s} foi pequeno para as blendas sIPN de poliHEMA-AC e que o aumento da quantidade de agente de reticulação apresentou como inconveniente uma grande queda na capacidade de absorção de água pelo poliHEMA, estudou-se então o comportamento de blendas sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA). Foi escolhido o copolímero de MMA e AA obtido a partir de uma proporção 75:25, para garantir a

insolubilidade do mesmo em água. Caso isso acontecesse, o polímero linear seria dissolvido e arrastado para fora da rede quando imerso em água.

As figuras 5. 1.8 e 5. 1.9 mostram que neste caso foi possível aumentar o módulo de fluência sem grande prejuízo da capacidade de absorção de água.

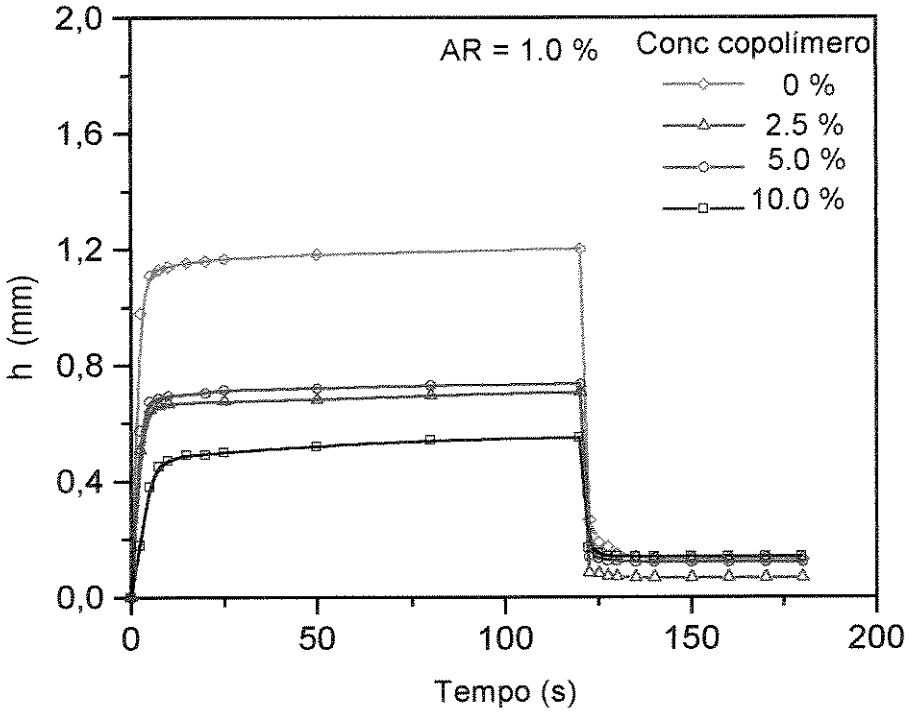


Figura 5. 1. 8 - Altura de indentação medida ao longo do tempo para amostras de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).

Durante o ensaio de indentação do hidrogel, a penetração da ponta é devido à deformação da rede polimérica e à deformação consequente do escoamento de água para fora do hidrogel. Assim sendo, no caso da blenda reforçada com poli(MMA-co-AA), o hidrogel é menos flexível do que no caso da blenda com AC. A presença do copolímero confere maior rigidez a rede polimérica e ainda, devido à presença dos grupamento COO^- , íons Na^+ permanecem no interior do hidrogel para o balanceamento eletrico, o que provavelmente dificulta a saída da água que tende a permanacer no hidrogel solvatando os íons. Esse comportamento é semelhante ao descrito para a cartilagem articular por MOW e colaboradores (1992).

A predição e controle das propriedades mecânicas dos hidrogéis é de grande importância para a aplicabilidade destes materiais. Os resultados aqui obtidos mostram que o comportamento mecânico destes materiais é fortemente dependente da estrutura do polímero que constitui a rede macromolecular, da densidade de reticulação e/ou da quantidade e tipo de polímero linear, emaranhado na rede macromolecular de uma blenda sIPN.

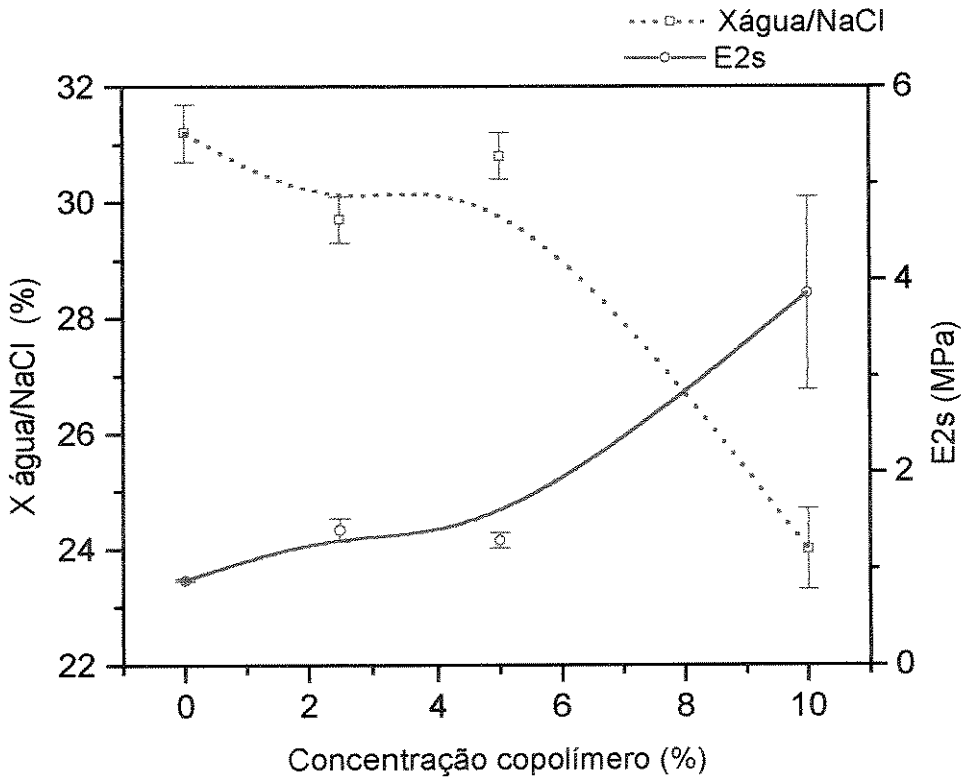


Figura 5. 1. 9 - Módulo de fluência à indentação e capacidade de absorção de solução salina medidos para amostras de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato) com diferentes quantidades de poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).

Os resultados verificados neste estudo estão de acordo com a discussão e conclusões apresentadas por ANSETH e colaboradores (1996), que apresentam uma revisão sobre as propriedades mecânicas de hidrogéis.

A formação de blendas sIPN a partir da utilização de polímeros com estruturas moleculares adequadas permite a obtenção de hidrogéis capazes de mimetizar o comportamento de hidrogéis biológicos como a cartilagem articular.

5.1.3 - Densidade de carga negativa fixa

A tabela 5.1.2 mostra os valores de densidade de carga negativa fixa, medidos para amostras dos 3 hidrogéis estudados.

A amostra de blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) apresentou valores de carga negativa fixa aproximadamente dez vezes maior do que o apresentado pelas amostras de poliHEMA e da blenda sIPN de poliHEMA-AC. Isto ocorre devido a presença dos grupamentos ácidos (COO^-H^+) provenientes dos meros de ácido acrílico, constituintes do copolímero na blenda, o qual encontra-se entrelaçado no reticulado de poliHEMA.

Já, os valores de densidade de carga fixa obtidos para os hidrogéis de poliHEMA e para a blenda sIPN de poliHEMA-AC podem ser explicados pela ionização de alguns grupamentos presentes na estrututra de tais hidrogéis.

Tabela 5.1.2 - Valores de densidade de carga negativa fixa medidos para amostras de hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato), blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose e blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) .

amostra	**composição**	**densidade de carga negativa (mEq/g)**
poliHEMA	HEMA 99,0 % TMPTMMA 1,0 %	0,017
sIPN poliHEMA-AC	HEMA 94,0 % TMPTMMA 1,0 % AC 5,0 %	0,020
sIPN poliHEMA-poli(MMA-co-AA)	HEMA 94,0 % TMPTMMA 1,0 % poli(MMA-co-AA) 5,0 %	0,110

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

5.2 - CITOTOXICIDADE

Para a avaliação da citotoxiciadade dos hidrogéis em estudo, foi utilizada a metodologia descrita no capítulo 4, a qual foi estabelecida com base nos protocolos padrões ASTM F 895-84, ASTM F 813-83 e ISO 10993-5.

O material utilizado como controle positivo, adesivo de silicone apresentou efeito citotóxico extremamente forte frente a células VERO. Após 48 h de cultura, praticamente não restaram células sobre as amostras do filme do adesivo de silicone e nem mesmo sobre as lamínulas onde os mesmos estavam depositados. Na figura 5.2.1 podem ser observados aspectos degenerados das poucas células que permaneceram sobre o adesivo de silicone ou sobre a respectiva lamínula. Para todos os frascos de cultura contendo o material controle positivo, foram detectadas células não viáveis em suspensão no meio de cultivo (tabela 5.2.1).

Tabela 5.2.1 : Quantidade de células em suspensão presentes no meio de cultura utilizado no teste de citotoxicidade para os controles e hidrogéis testados (resultados representam a média dos 3 frascos para cada amostra).

AMOSTRA	número de células viáveis ($x\ 10^4$)	número de células não viáveis ($x\ 10^4$)
controle negativo	0.2	zero
controle positivo	0.2	4
poliHEMA	0.2	zero
blenda poliHEMA- AC	0.2	zero
blenda poliHEMA-poli(MMA-co-AA)	zero	zero

Células VERO são dependentes de ancoragem, necessitando portanto de um substrato para crescerem formando uma monocamada. A presença de um pequeno número de células viáveis suspensas no meio de cultura é normal, uma vez que durante o processo de divisão estas tornam-se arredondadas e soltam-se do substrato (WADA & VIDAL, 1991). Já a presença de células não viáveis no meio indica que são células que soltaram-se do substrato

por estarem mortas. Como pode ser visto na tabela acima, foi verificado a presença de células não viáveis apenas no caso do material controle positivo.

Já no caso do material usado como controle negativo, polipropileno, as células cresceram normalmente, tanto sobre as amostras quanto sobre as respectivas lamínulas (figura 5. 2.2). A análise do meio de cultivo destes frascos mostrou ausência de células não viáveis em suspensão. O polipropileno é o material normalmente utilizado na confecção de frascos e placas de cultura descartáveis. Sobre este material, células dependentes de ancoragem crescem normalmente , apresentando-se espalhadas da mesma forma que sobre vidro. Nas figuras 5.2.2 (a) e (b) nota-se muita semelhança entre as células crescendo sobre polipropileno e vidro.

Conforme pode ser observado nas figuras 5.2.3 a 5.2.5, a morfologia das células crescendo sobre as lamínulas que foram incubadas junto com as amostras dos hidrogéis e as células que cresceram sobre estas não mostram alteração morfológica acentuadas quando comparadas com o controle negativo figura 5.2.2. Isto demonstra que os hidrogéis não liberam substâncias tóxicas para o meio e que os mesmos também não são tóxicos.

A não citotoxicidade das amostras testadas pode ser concluída tendo em vista que apesar de menor número de células presentes sobre o substrato (hidrogel), é possível detectar células em processo de divisão para multiplicação. Além disso, as células que cresceram sobre as lamínulas em todos os casos apresentaram comportamento típico de células VERO.

A presença de células com morfologia um pouco mais alongada crescendo sobre os hidrogéis é apenas resposta biológica das células VERO as quais apresentam a característica de mudar de forma e/ou função *in vitro* de acordo com o substrato na qual estão aderidas (WADA & VIDAL, 1991). Quanto ao fato de observarmos células viáveis em suspensão no meio de cultura de algumas das amostras de hidrogel pode ser considerado normal, pois as células que crescem em monocamada tornam-se redondas quando entram em divisão. Desta forma elas ficam menos aderidas ao substrato e podem ser facilmente descoladas pelo manuseio do frasco de cultura.

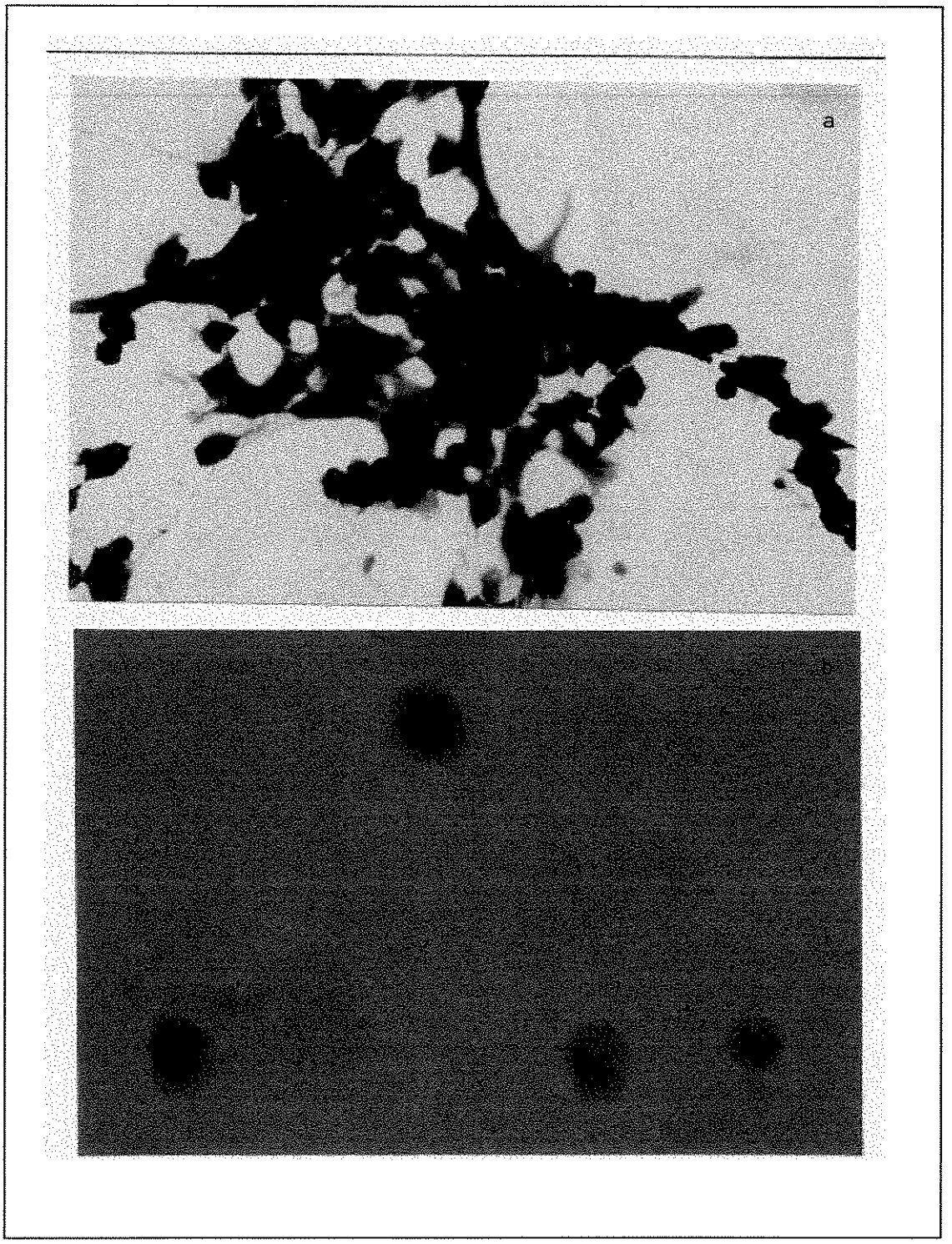


Figura 5.2.1 - Morfologia de células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra de material controle positivo.

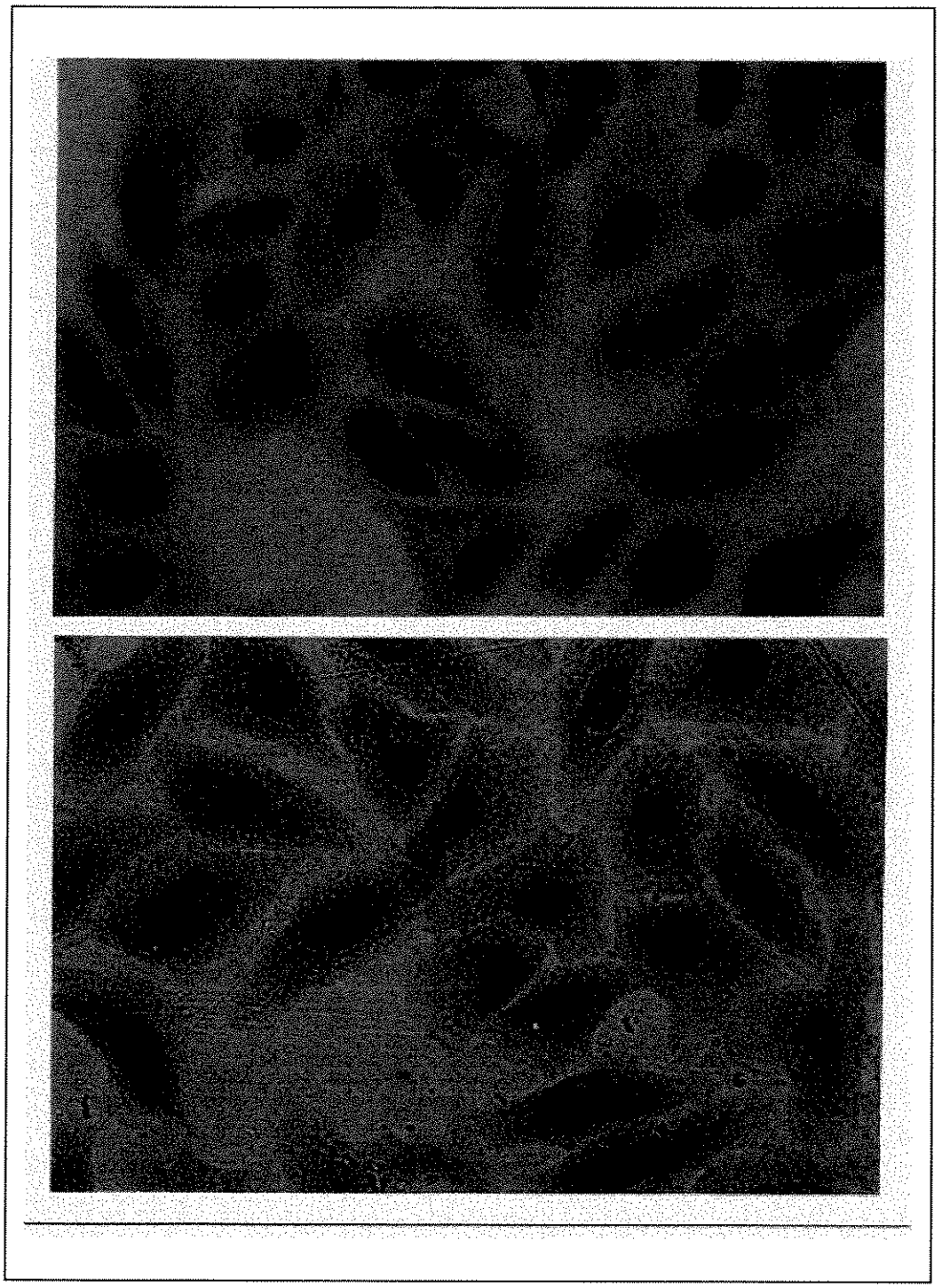


Figura 5.2.2 - Morfologia de células VERO crescendo sobre (a) lamínulade vidro e (b) amostra de material controle negativo.

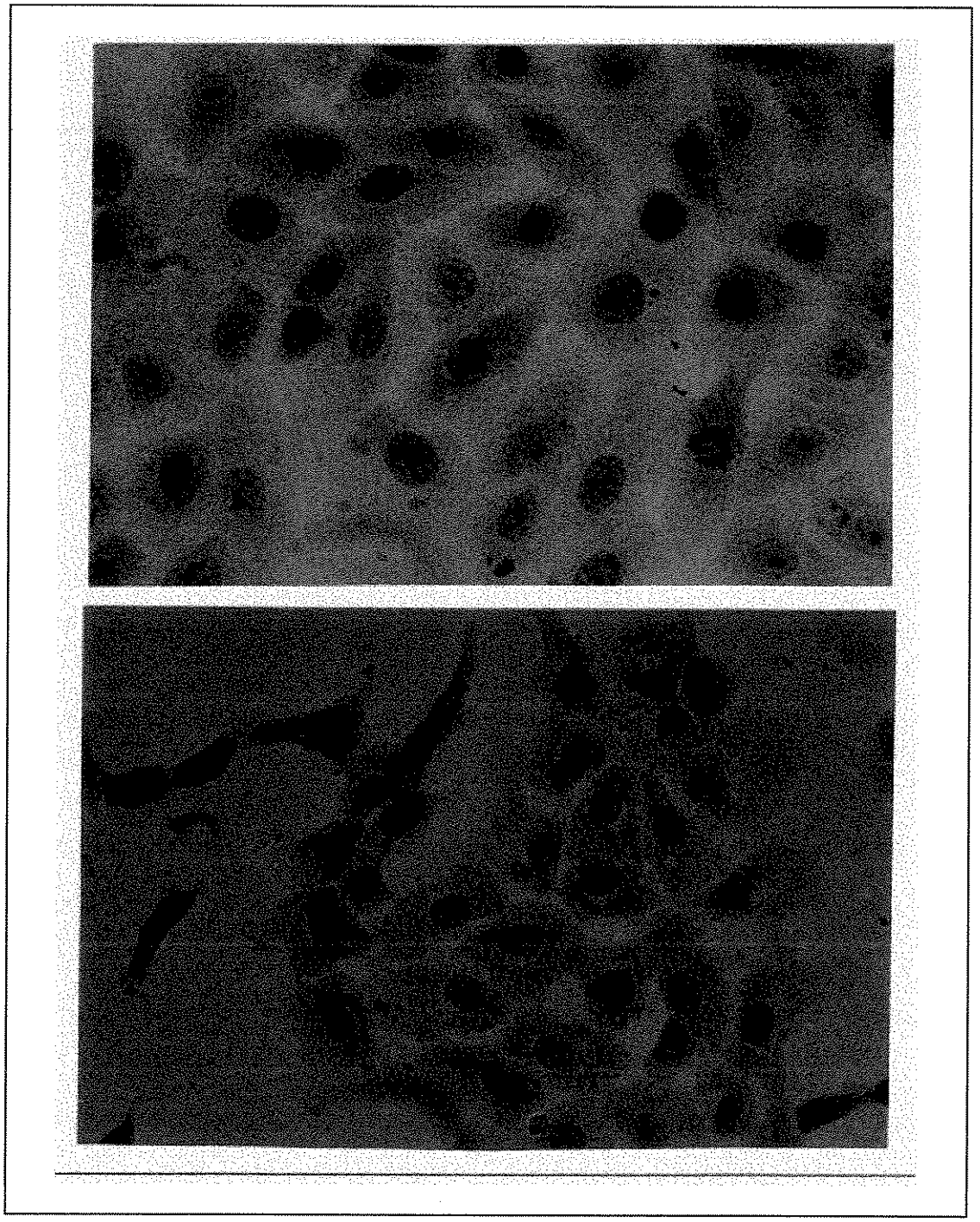


Figura 5.2.3 - Morfologia de células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra de poli(2-hidróxi etil metacrilato).

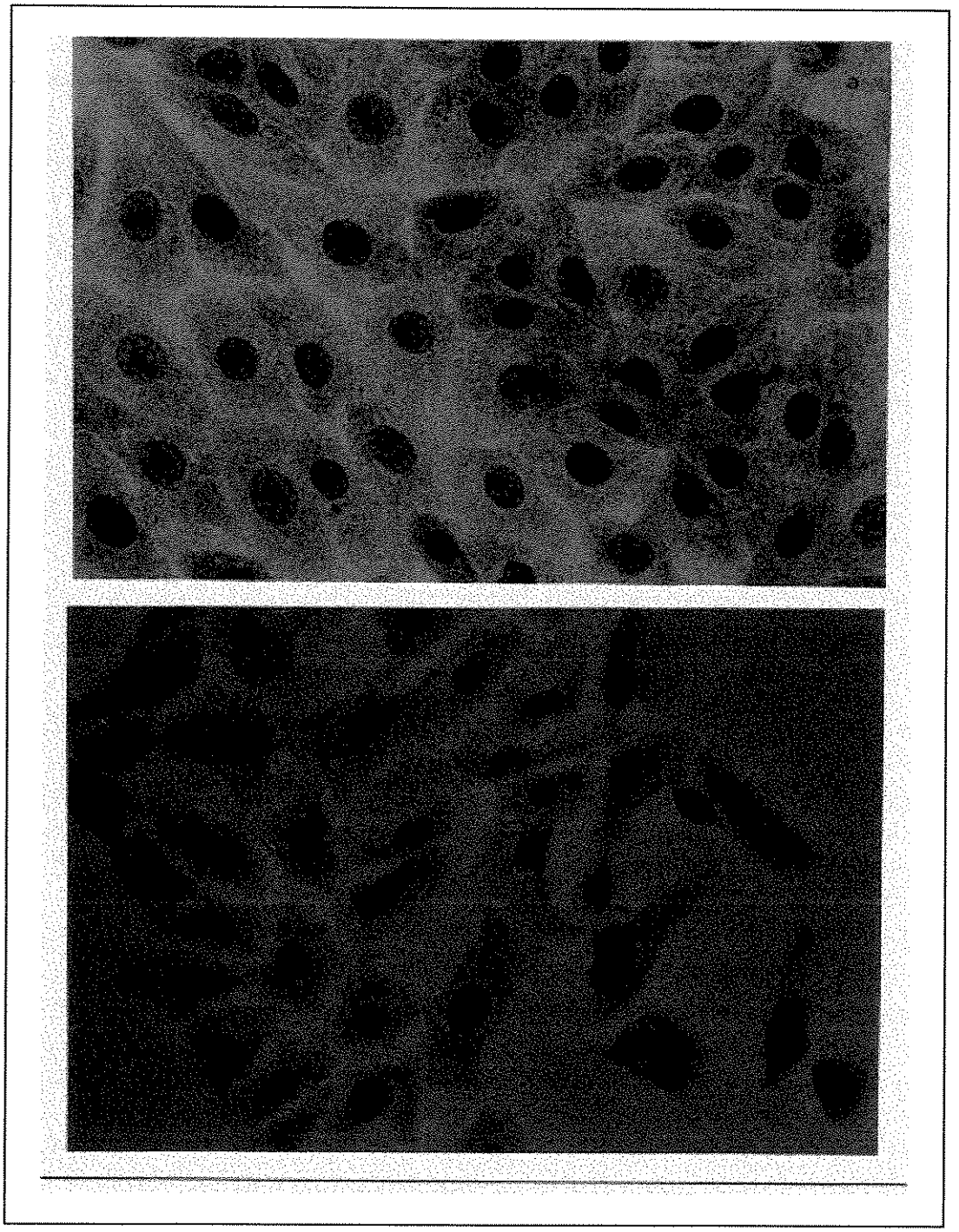


Figura 5.2.4 - Morfologia de células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-AC.

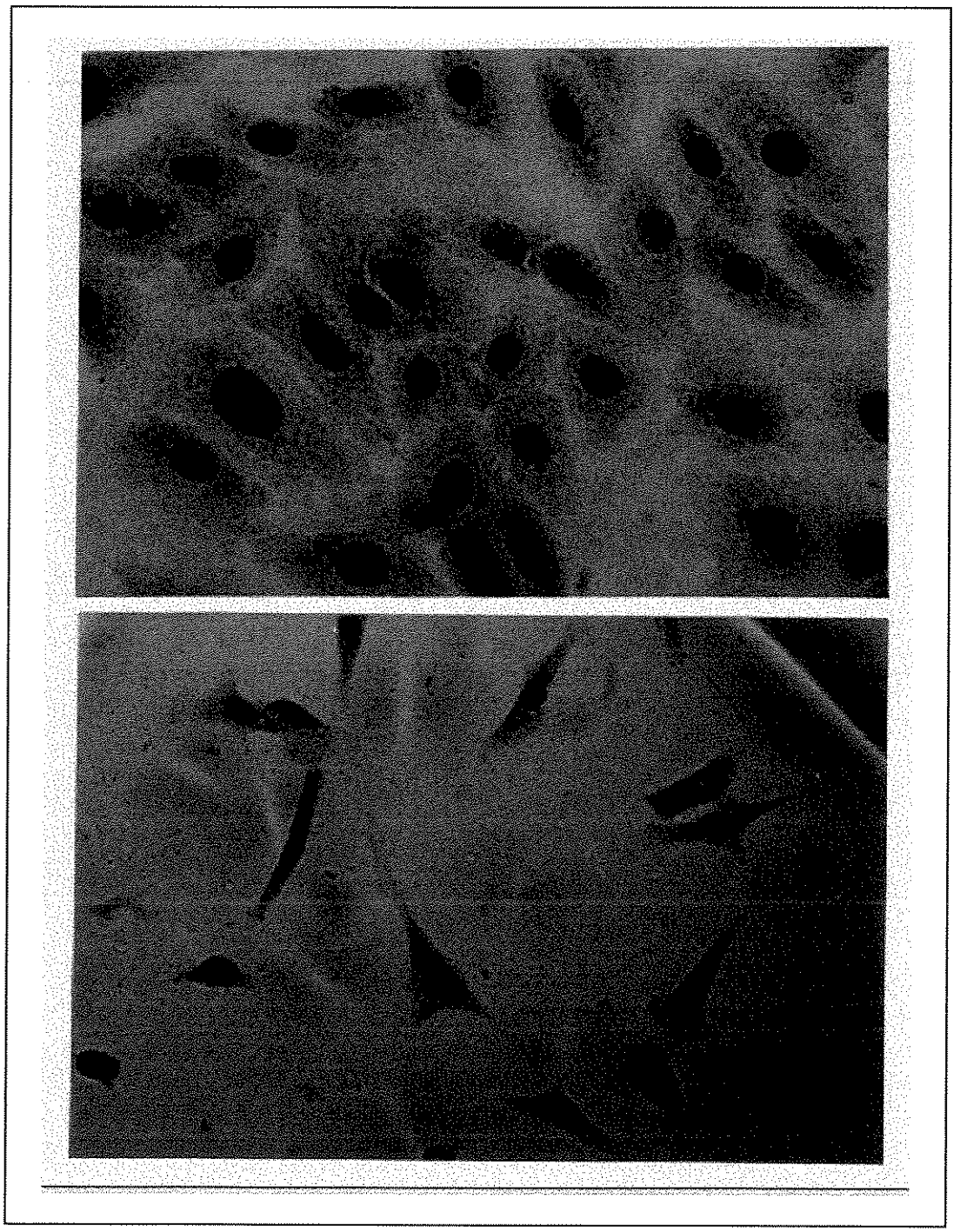


Figura 5.2.5 - Morfologia de células VERO crescendo sobre (a) lamínula de vidro e (b) amostra de hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).

Pode-se verificar que a adesão celular foi menor para as amostras de hidrogéis do que para as lamínulas de vidro. Além disso, a blenda de poliHEMA- poli(MMA-co-AA) apresentou a menor adesão celular entre os três hidrogéis testados.

Segundo FOLKMAN & MOSCONA, (1978), apesar de não apresentar efeito citotóxico, poliHEMA inibe a adesão celular. Segundo estes autores, o recobrimento de substratos com camadas de poliHEMA com diferentes espessuras podem modular tanto a extensão do espalhamento quanto o metabolismo celular.

Sabe-se que adesão e proliferação celular de diferentes tipos de células sobre substratos poliméricos dependem das características de superfície de tais materiais tais como : molhabilidade, presença de grupamentos químicos específicos, carga, rugosidade e rigidez. Um grande número de pesquisadores vem estudando a interação entre diferentes tipos de células *in vitro* e polímeros com diferentes características superficiais (LYDON, MINETT & TIGHE, 1985 ; HORBETT, e cols., 1987 ; SMETANA, 1993 ; LEE e cols. , 1994).

Segundo LEE e colaboradores, (1994), para superfícies com molhabilidade, rugosidade e rigidez semelhantes, aqueles que são positivamente carregados são mais propícios para a adesão, espalhamento e crescimento celular *in vitro* do que aqueles que são negativamente carregados ou mesmo neutros. Ainda segundo o autor, algumas proteínas presentes no meio de cultura como fibronectina e vitronectina, as quais exercem grande influência na adesão celular são mais facilmente adsorvidas nas superfícies positivamente carregadas, melhorando assim a adesão celular. Ainda segundo estes autores, a presença de grupamentos ácido carboxílico exerce efeito negativo na adesão, espalhamento e crescimento celular.

SMETANA, (1993) e LIO e colaboradores, (1994) mostram que materiais positivamente carregados induzem a adesão celular, ao contrário dos materiais negativamente carregados. A hipótese levantada por SMETANA é de que interações eletrostáticas entre a membrana celular e o substrato representam um dos mecanismos de adesão celular ao substrato, uma vez que as glicoproteínas presentes na membrana celular são negativamente carregadas.

Recentemente, vários pesquisadores tem verificado a importância das glicoproteínas, em particular a fibronectina, na adesão e espalhamento celular (CULPI, 1978 ; GRINNELL & FELD, 1981).

Assim, para a blenda de poliHEMA com poli(MMA-co-AA), a presença de grupamentos (COO^-H^+), provenientes do ácido acrílico os quais no meio de cultura encontram-se ionizados, constituem cargas negativas fixas a matriz, o que provavelmente leva a diminuição da adesão celular por mimetizar os estímulos normalmente fornecidos pelas glicoproteínas presentes na matriz extracelular dos tecidos.

O fato de um substrato apresentar menor adesão celular *in vitro* não significa que sua biocompatibilidade seja menor. Ao contrário, alguns autores acreditam que a presença de grupos (COO^-H^+) em hidrogéis não reabsorvíveis diminuem a interação do material com macrófagos, sendo portanto mais interessantes para algumas aplicações clínicas (SMETANA, 1993 ; SMETANA e cols., 1990).

Segundo SMETANA (1993), as propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas de polímeros e a ocorrência de grupos funcionais carregados pode influenciar a interação das células com o substrato e consequentemente a função celular. Os autores relatam ainda que a presença de grupos ácido carboxílico (COO^-H^+) no hidrogel, semelhante ao que ocorre na matriz extracelular natural permite ao hidrogel participar no controle da função celular, mimetizando os estímulos normalmente realizados pela matriz extracelular natural.

5.3 - ESCOLHA DO HIDROGEL A SER UTILIZADO NO ENSAIO *IN VIVO*

Optou-se pela escolha de apenas um dos hidrogéis para uma avaliação preliminar e determinação de metodologia para estudo da biocompatibilidade. Para tanto, tomou-se como referência as características da cartilagem articular, apresentadas a seguir e o hidrogel escolhido foi aquele que apresentou as características mais próximas a estas.

Na tabela 5.3.1 encontram-se valores para a quantidade de absorção de água e densidade de carga negativa fixa, da cartilagem hialina.

Tabela 5.3.1 - Características da cartilagem hialina.

quantidade de água (%)	**densidade de carga negativa fixa (mEq/g)**
60 - 85 [1]	0,1 - 0,2 [2]

Os parâmetros relativos ao comportamento mecânico da cartilagem hialina foram obtidos da literatura, a partir de trabalhos realizados por pesquisadores em estudos com cartilagem humana. Conforme descrito no capítulo 2, KEMPSON e cols. (1971) e SWANN & SEEDHOM (1989), determinaram experimentalmente valores de módulo de fluência a indentação em cartilagem humana (tabela 5.3.2).

Tabela 5.3.2 - Valores de módulo de fluência a indentação de cartilagem hialina obtidos experimentalmente por diferentes pesquisadores.

tipo de cartilagem	**condições do experimento**	**módulo de fluência (MPa)**
femural proximal (humana)	indentação com ponta esférica ϕ = 0,125 in	0 - 10 [3]
femural distal (humano)	indentação com ponta esférica ϕ =1,587 mm	4 - 15 Mpa [4]
região intercondiliana femural distal (humano)	"	< 4 Mpa [4]

[1] MOW e cols., 1992

[2] MAROUDAS & GRUNSHKO, 1990

[3] KEMPSON e cols., 1971

[4] SWANN & SEEDHOM, 1989

Para que possa ser utilizado no reparo de defeitos da cartilagem articular, além de valor elevado de E, é desejável que o material apresente elevada capacidade de absorção de água, como é o caso da cartilagem natural.

Assim, estes foram os parâmetros analisados para a escolha do hidrogel a ser utilizado no ensaio *in vivo*. A figura 5.3.1 apresenta o comportamento de E_{2s} em função de $\chi_{água/NaCl}$ para os hidrogéis estudados.

Para o poliHEMA e para a blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA), foi possível aumentar o valor do módulo de fluência (E_{2s}) para valores de até 7,0 e 4,0 MPa respectivamente, enquanto que no caso da blenda sIPN poliHEMA-AC o valor do módulo permaneceu aproximadamente constante, abaixo de 1,2 MPa. Verifica-se ainda na figura 5.3.1 que para um mesmo valor de módulo de fluência, a blenda poliHEMA-poli(MMA-co-AA) apresenta $\chi_{água/NaCl}$ maior do que os demais hidrogéis.

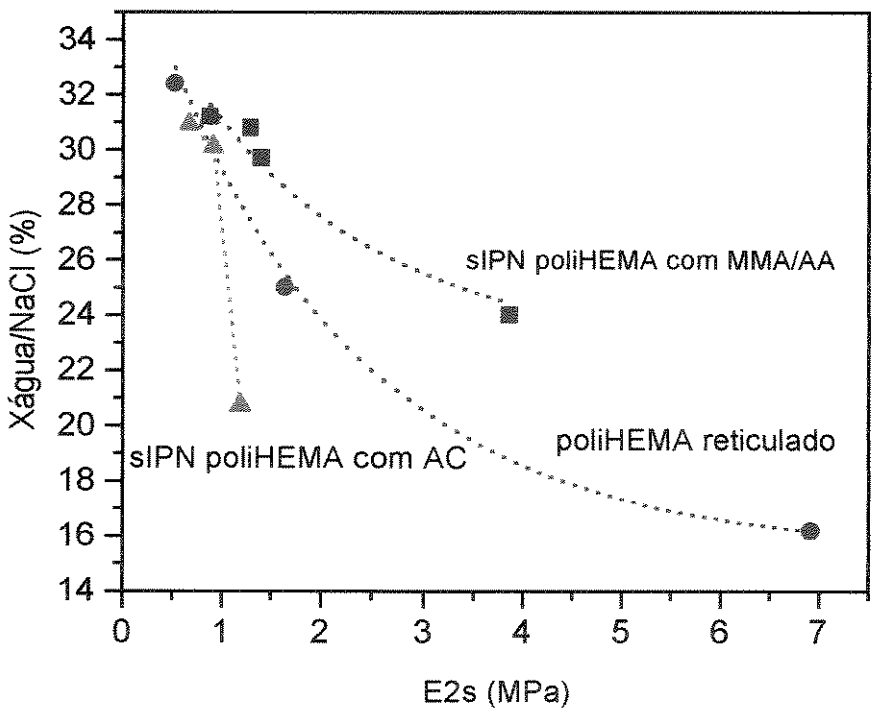


Figura - 5. 3.1 - Módulo de fluência a indentação *versus* capacidade de absorção de solução salina para os hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato), blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-acetato de celulose e blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).

Nenhum dos hidrogéis estudados apresentaram características iguais às da cartilagem articular, porém o hidrogel blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) apresentou resultados mais próximos aos valores objetivos. Além disso, este hidrogel fora sintetizado utilizando ácido acrílico no copolímero, para a incorporação de grupamentos de ácido carboxílico em sua estrutura, na tentativa de mimetização de comportamento da matriz extracelular de tecido cartilaginoso.

Conforme discutido no ítem 5.2 , a presença de grupamentos (COO^-H^+) na estrutura de polímeros sintéticos pode torná-los capazes de influenciar a função celular. Exemplo disto são os resultados obtidos por SMETANA e colaboradores, (1996) no estudo da influência de polímeros contendo íons carboxilatos na calcificação.

É desejável que o material de preenchimento do defeito articular seja poroso, ao menos na superfície inferior, para facilitar sua fixação ao local do implante devido ao crescimento de tecido para dentro dos poros e consequente embricamento mecânico.

Portanto, para o estudo *in vivo*, foi sintetizado amostra de hidrogel blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA), com estrutura composta por uma camada inferior porosa e uma camada superior densa conforme figura 5.3.2. A camada inferior, com poros de tamanho inferior a 45 μm, teve como objetivo permitir a invasão celular e crescimento tecidual de forma a conferir boa fixação do material ao sítio do implante, enquanto que a camada densa superior fornece uma superfície lisa para permitir o deslizamento entre as superfícies articulares sem sofrer ou provocar desgaste.

A escolha do tamanho de poros do hidrogel foi feita com base no trabalho de KON & DE VISSER, (1981), os quais verificaram que hidrogéis de poliHEMA com poros na faixa de 50 a 100 μm são esmagados quando implantados junto a cartilagem articular em fêmur de coelhos, enquanto que aqueles contendo poros com diâmetros inferiores a 50 μm são capazes de dar sustentação mecânica ao crescimento tecidual sem sofrer esmagamento.

A amostra foi caracterizada quanto a capacidade de absorção de água e de solução salina, quanto a densidade de carga negativa fixa e quanto ao comportamento mecânico.

Tabela 5.3.3. - Características da amostra porosa do hidrogel blenda de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico).

composição da amostra	tamanho de poros (μm)	$\chi_{água}$ (%)	$\chi_{água/NaCl}$ (%)	DCF (mEq/g)	E_{2s} (MPa)
HEMA 92,0 % AR 3,0 % poli(MMA-co-AA) 5,0 %	50 - 100	47,1 ± 0,7	43,7 ± 0,7	0,100	2,32 ± 0,46

Pelos valores apresentados na tabela 5.3.3, é possível verificar que a densidade de carga negativa fixa da amostra obtida permaneceu em 0,100 mEq/g, porém os valores de $\chi_{água}$ e $\chi_{água/NaCl}$ neste caso aumentaram em relação aos apresentados pelas amostras iniciais. Isto era esperado pois trata-se de amostra porosa e quando em meio aquoso os poros são preenchidos pelo fluido. De acordo com a metodologia utilizada na determinação do teor de água na amostra, a água que ocupa os poros da amostra é considerada parte da massa do gel inchado.

Quanto ao módulo de fluência, o valor apresentado pela amostra porosa foi inferior ao apresentado pela amostra densa. Essa diminuição foi devido a incorporação de poros a estrutura do hidrogel.

Assim, o trabalho teve prosseguimento utilizando a amostra de hidrogel com estrutura composta por parte densa e parte porosa, com as características acima descritas para uma avaliação preliminar de sua biocompatibilidade através de ensaio *in vivo*.

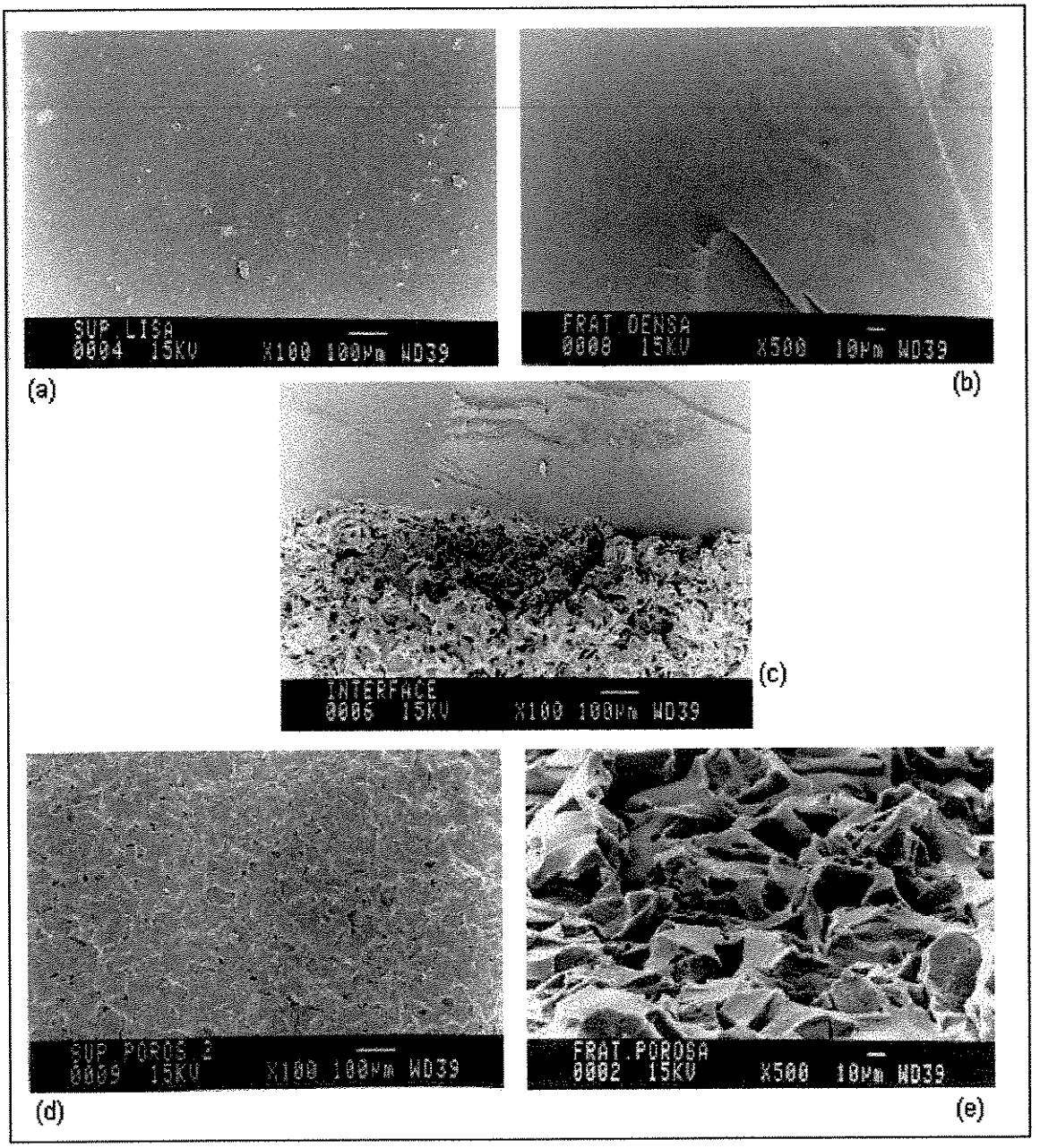


Figura 5.3.2 - Fotomicrografias do hidrogel blenda de rede semi interpenetrante de poli(2-hidróxi etil metacrilato)-poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico), composta por camada superior densa e camada inferior porosa. (a) fratura,
(b) superfície superior densa, (c) fratura da camada densa, (d) superfície inferior porosa,
(e) fratura da camada porosa.

5.4 - ENSAIO *IN VIVO*

Cabe ressaltar que os resultados aqui apresentados e discutidos constituem uma avaliação preliminar da biocompatibilidade de hidrogel blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA). Esta avaliação preliminar foi necessária para verificar a viabilidade da continuidade do estudo com este tipo de material para a aplicação proposta neste trabalho, bem como para estabelecer uma metodologia adequada para o estudo da biocompatibilidade de materiais que visam esta aplicação.

A metodologia utilizada apresentou problemas tais como a dificuldade na reprodutibilidade do posicionamento do defeito e a variação do tamanho do fêmur, em função da idade dos animais. Deste modo, o orifício de 2,5 mm de diâmetro foi grande, atingindo parcialmente os côndilos do fêmur, o que pode ter acarretado maior comprometimento da articulação.

Embora tenha sido difícil controlar rigorosamente tais parâmetros, pudemos verificar a potencialidade do material em questão, conforme mostram os resultados e discussões apresentadas a seguir.

5.4.1 - Análise macroscópica das superfícies articulares

A análise macroscópica das superfícies articulares foi feita logo após o sacrifício do animal e retirada do fêmur. Nas tabelas 5.4.1 e 5.4.2 é apresentada uma avaliação quntitativa da análise macroscópica para os côndilos com e sem implante, para os diferentes tempos de seguimento.

Nos joelhos onde foi colocado o implante, foi possível observar que em 100% dos casos o material permaneceu no local, permitindo inclusive a deposição de tecido cartilaginoso ou fibrocartilaginoso sobre o implante (56%).

Tabela 5.4.1 - Número de animais utilizados e tempos de seguimento do ensaio *in vivo*.

Grupos / tempo de seguimento (semanas)	nº de animais por grupo
G5 - 03 semanas	05
G4 - 05 semanas	05
G3 - 08 semanas	05
G2 - 12 semanas	05
G1 - 16 semanas	05

Tabela 5.4.2 - Ensaio *in vivo* - análise macroscópica das superfícies articulares dos côndilos com implante e côndilos controle.

	côndilos com implante (25)			côndilos controle (25)	
grupos	permanência no local	recobrimento com tecido	fratura do implante	houve reparação	depressão superficial
G5	05	04	0	05	05
G4	05	04	0	05	05
G3	05	02	03	05	04
G2	05	03	0	05	04
G1	05	01	0	05	03
total	25	14	03	25	19
percentual	100 %	56 %	12 %	100 %	76 %

Tempo de seguimento : 03 semanas

As figuras 5.4.1-a, 5.4.1-b, 5.4.1-c e 5.4.1-d mostram as superfícies articulares com defeito controle após 3 semanas de seguimento. É nítida a presença de grande quantidade de vasos devido a neovascularização com formação intensa de tecido conjuntivo de granulação para o preenchimento do defeito.

As figuras 5.4.2-a, 5.4.2-b, 5.4.2-c e 5.4.2-d mostram as superfícies articulares com implante após 3 semanas. Em todos os casos observa-se a presença de neoformação vascular nas margens do implante, porém com menor intensidade do que nos controles. É possível também observar que variações na altura do implante em relação a superfície vizinha acabam aparentemente induzindo a formação ou não de tecido conjuntivo. Os implantes posicionados abaixo da superfície vizinha, parece facilitar o seu recobrimento por tecido cartilaginoso ou fibrocartilaginoso (figuras 5.4.2- b, 5.4.2-c e 5.4.2-d).

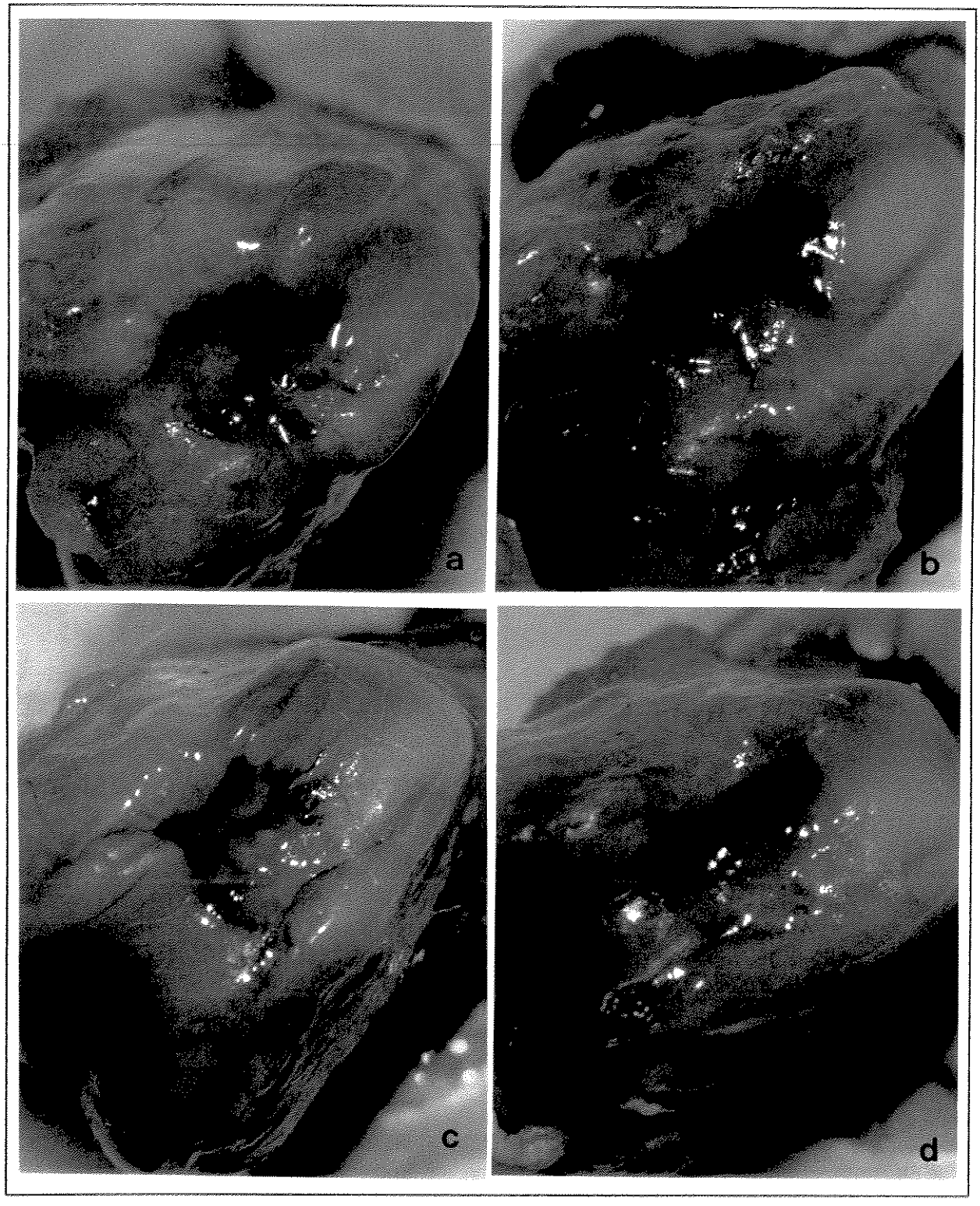


Figura 5.4.1- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 3 semanas de seguimento.

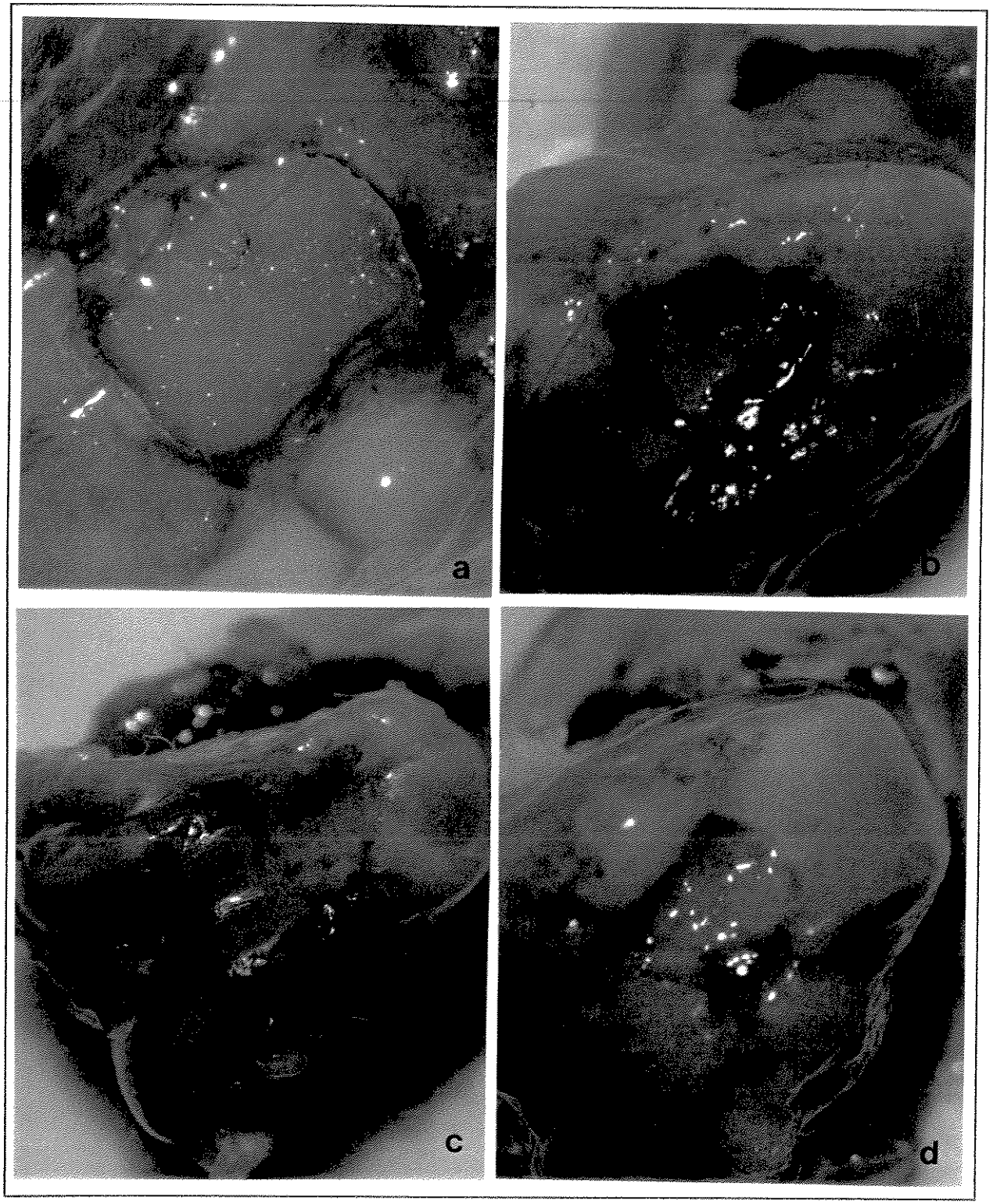


Figura 5.4.2- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com implante após 3 semanas de seguimento.

tempo de seguimento : 5 semanas

Nas figuras 5.4.3-a, 5.4.3-b, 5.4.3-c e 5.4.3-d, podem ser observadas as superfícies articulares controle 5 semanas após a cirurgia. Nota-se a presença da neoformação vascular e início de reação sinovial ao trauma. É possível verificar o crescimento de tecido para o interior do defeito, embora este ainda não tenha sido completamente preenchido e quando o defeito não atinge os côndilos, a recuperação da superfície é melhor.

Nas figuras 5.4.4-a, 5.4.4-b, 5.4.4-c e 5.4.4-d observam-se as superfícies articulares com implantes 5 semanas após a cirurgia. Nestas figuras é nítida a diminuição da neoformação vascular, embora nas margens implante/superfície ainda sejam visíveis os vasos sanguíneos. Observa-se um caso de implante no mesmo nível da superfície articular, sem recobrimento do material (5.4.4-b), enquanto que nas demais fotos onde o material ficou posicionado em nível inferior à superfície vizinha, verifica-se o crescimento de tecido sobre o implante.

Convém ressaltar que neste grupo, no caso mostrado pela figura 5.4.3-b, o diâmetro do defeito parece não ter atingido os côndilos e o implante foi posicionado no mesmo nível da superfície vizinha. Não houve alteração morfológica da junta e, macroscópicamente a superfície articular apresenta-se com bom aspecto e o implante bem integrado ao tecido vizinho.

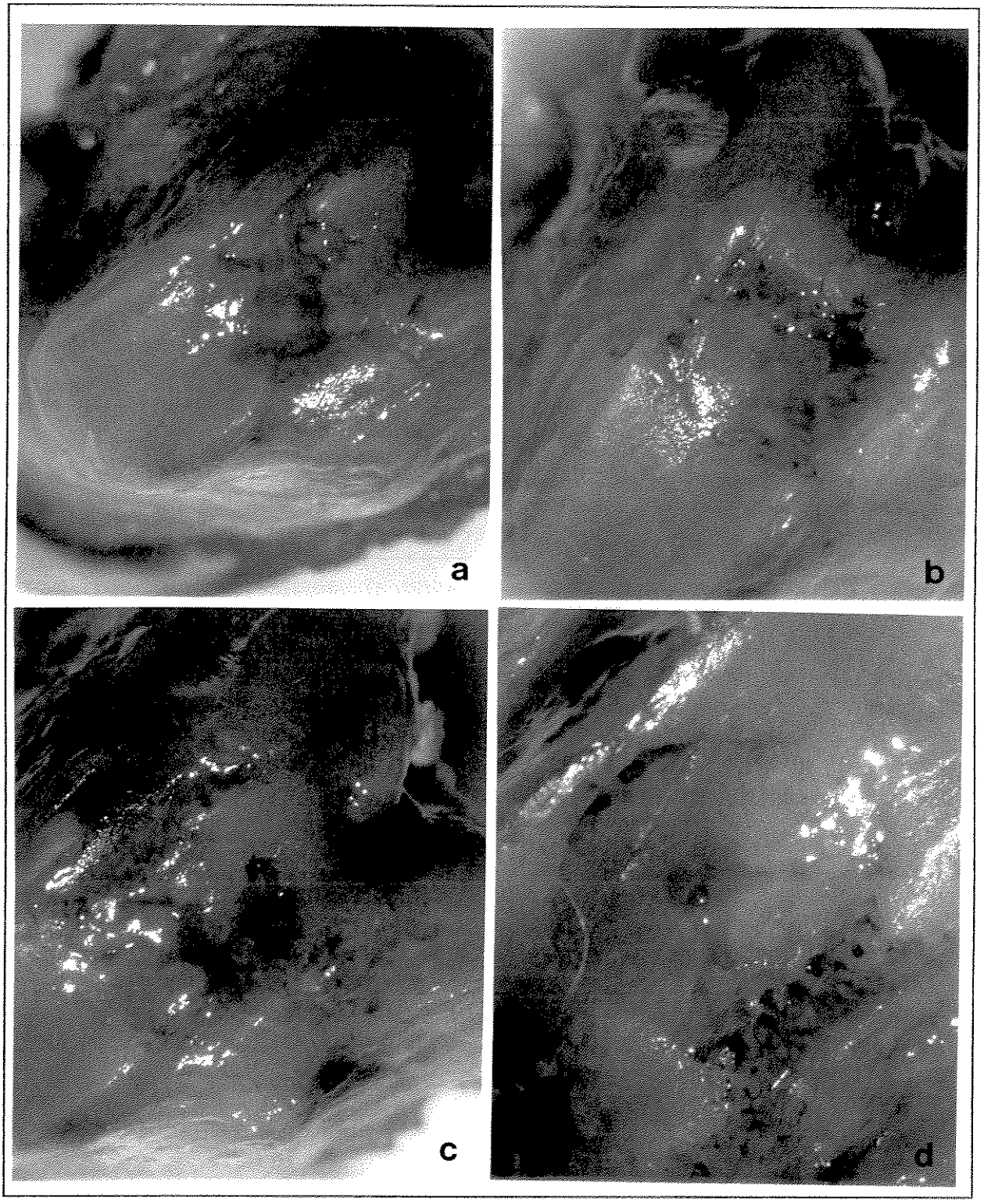


Figura 5.4.3- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 5 semanas de seguimento.

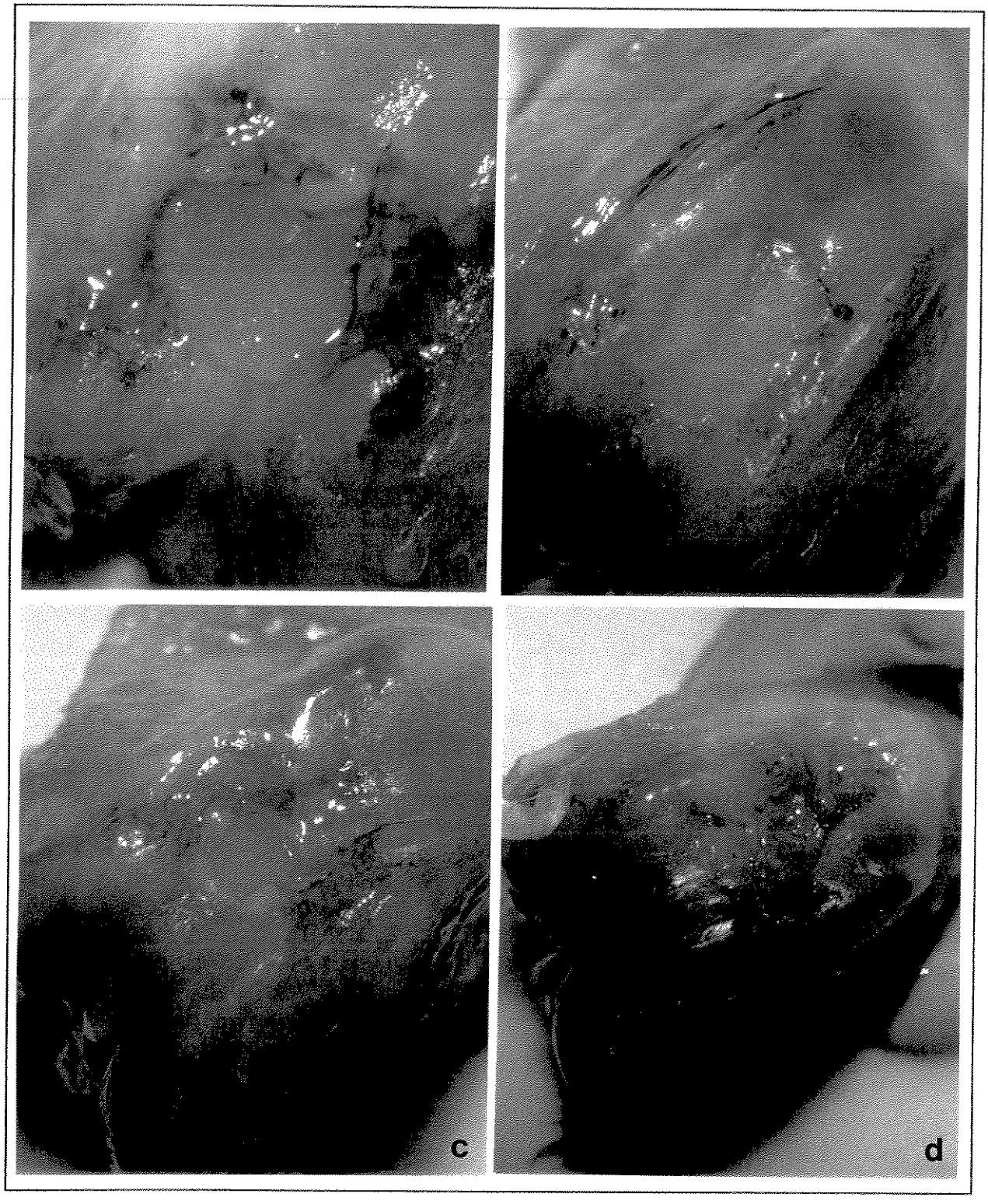


Figura 5.4.4- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com implante após 5 semanas de seguimento.

Tempo de seguimento: 8 semanas

Nas figuras 5.4.5-a, 5.4.5-b e 5.4.5-c, observa-se que ocorre reparação tecidual nos defeitos vazios, porém com neovascularização significativa e reação sinovial discreta O preenchimento tecidual não é completo mesmo 8 semanas após a cirurgia. É nítida a ocorrência de depressão central no defeito, provavelmente devido a maturação e retração do tecido fibrocartilaginoso neoformado. Nos casos em que houve danos aos côndilos, o reparo apresenta aspecto inferior.

Após 8 semanas de seguimento (figuras 5.4.6-a, 5.4.5-6, 5.4.6-c, e 5.4.6-d) para as superfícies com implante, parece não há mais a presença da neoformação vascular. O material parece estar bem integrado ao tecido vizinho, pois as margens implante/superfície vizinha são quase imperceptíveis. Em dois caso observa-se que houve perda de parte do material. No caso da figura 5.4.6-a, parece ter havido desprendimento da parete superficial densa do material, enquanto que a parte porosa permaneceu no interior do defeito. Mesmo assim, a porção do material que permaneceu no local apresenta-se devidamente integrada ao tecido vizinho.

No caso da figura 5.4.6-c, parece ter havido dano aos côndilos, porém estes mostram-se reparados e neste caso o tecido neoformado estende-se sobre o implante. Já no caso da figura 5.4.6-d , houve perda do material implantado e, talvez devido ao mal posicionamento do defeito não tenha sido possível a reconstrução da parede óssea perdida.

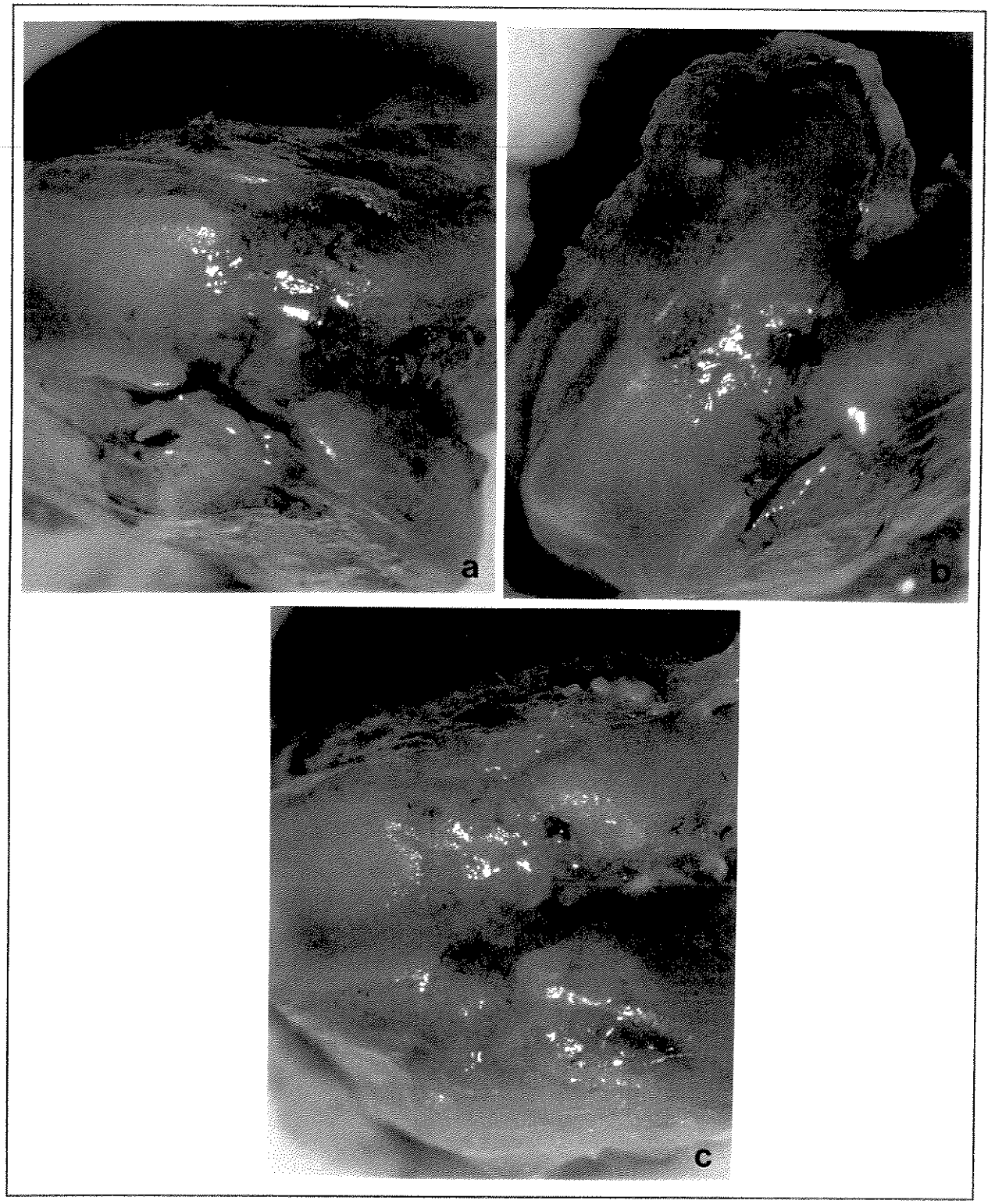


Figura 5.4.5- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 8 semanas de seguimento.

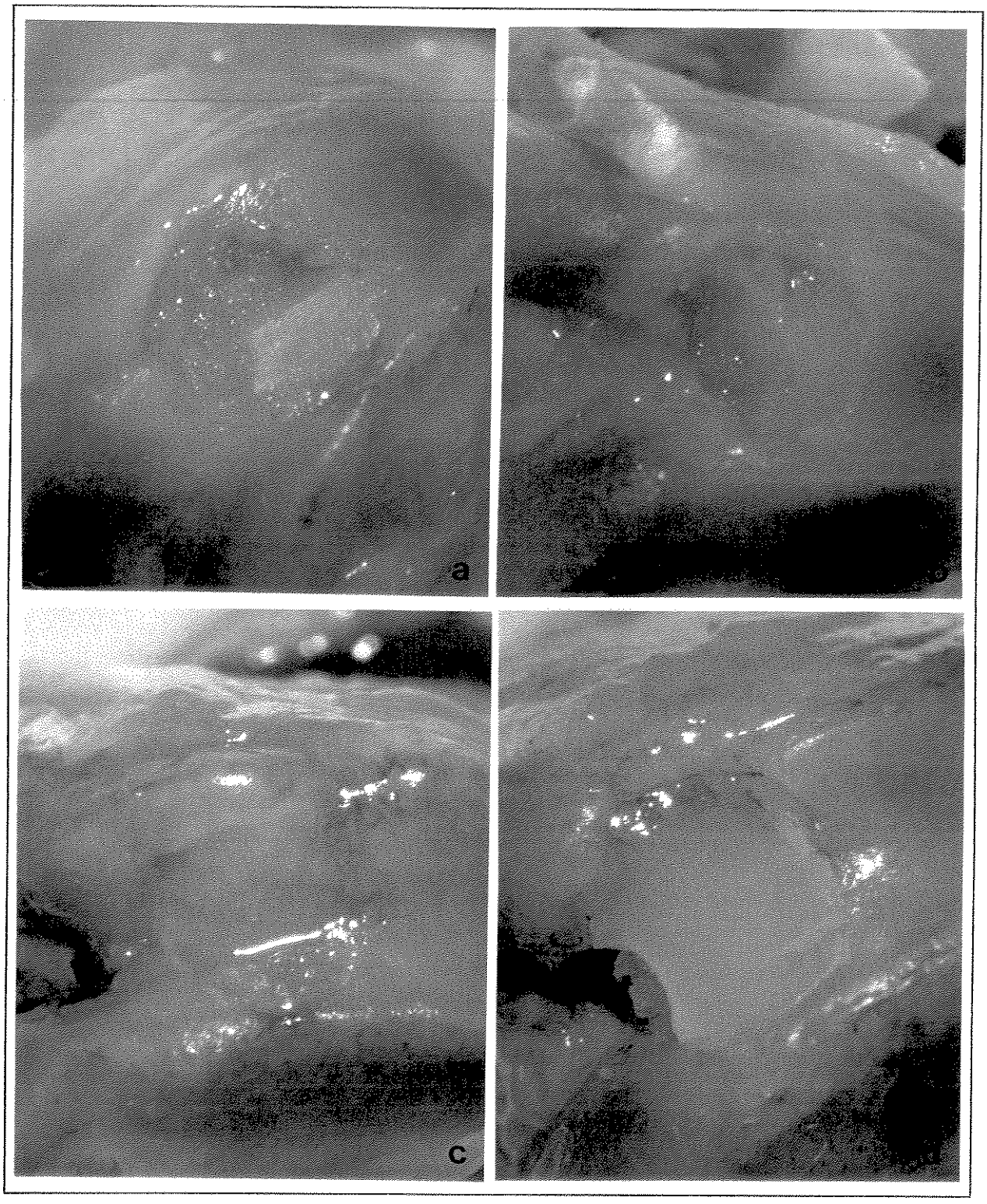


Figura 5.4.6- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com implante após 8 semanas de seguimento.

Tempo de seguimento : 16 semanas

As figuras 5.4.7-a, 5.4.7-b, 5.4.7-c e 5.4.7-d mostram as superficies com defeito controle para o grupo de 16 semanas de seguimento, nos quais o defeito apresenta-se totalmente preenchido, porém com as margens ainda rebaixadas. Nos casos em que houve dano aos côndilos, é bem visível a neovascularização local e novamente, a reparação destes parece ser inferior quando comparada com casos onde houve implante.

Finalmente, as figuras 5.4.8-a, 5.4.7-b, 5.4.8-c e 5.4.8-d mostram as superficies com implante após 16 semanas de seguimento. Os implantes apresentam-se bem integrados ao tecido vizinho e, nos casos 5.4.8-a e 5.4.8-d é possível verificar a reconstrução dos côndilos e o implante funcionando como uma superficie articular artificial. No caso 5.4.8-b, embora o côndilo não tenha sido ainda completamente reparado, na região intercondiliana o implante está perfeitamente integrado. No caso 5.4.8-c, novamente o defeito onde o material foi implantado apresenta falta de parede óssea e, mesmo assim o material permaneceu fixo ao local.

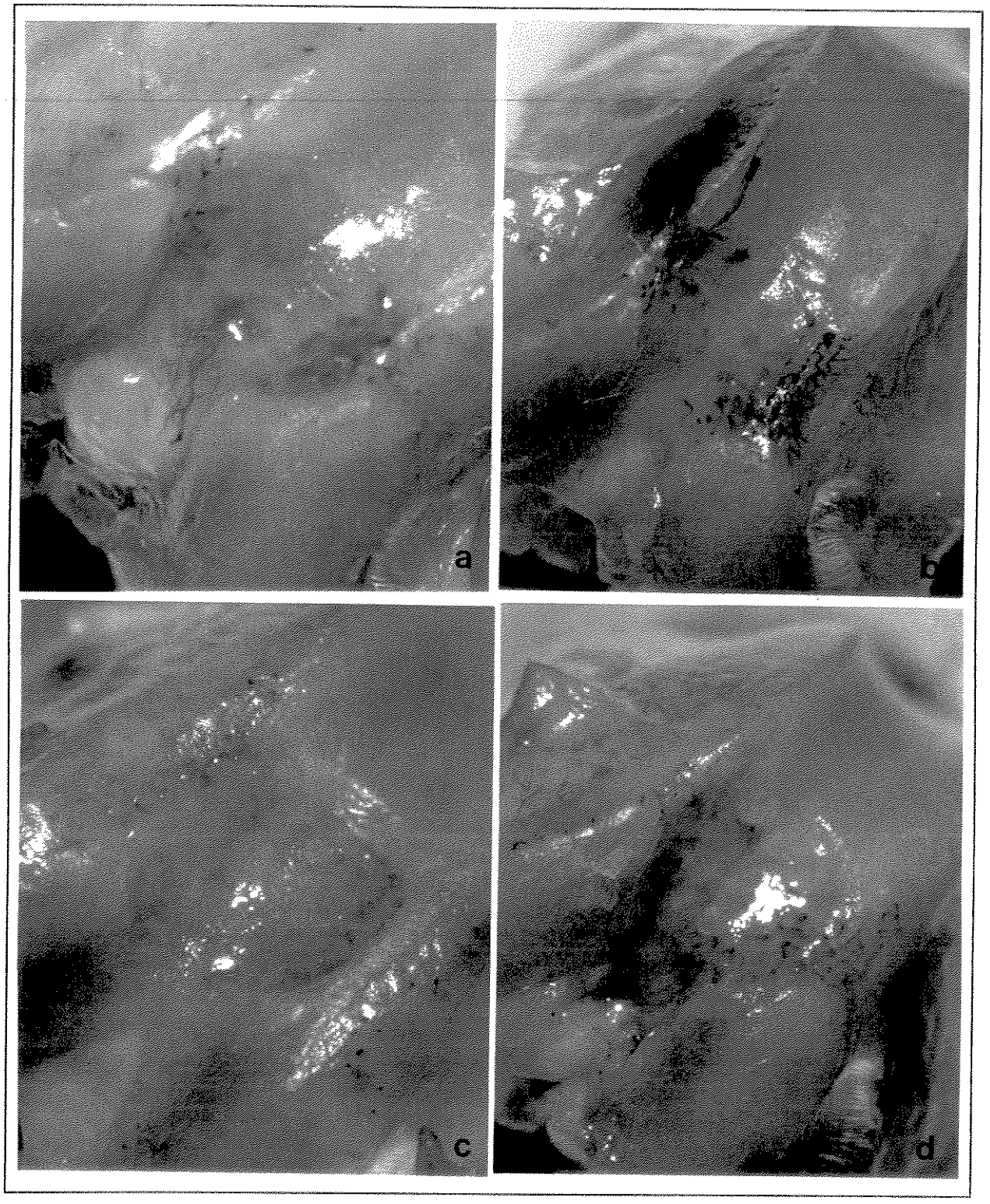


Figura 5.4.7- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com defeito controle após 16 semanas de seguimento.

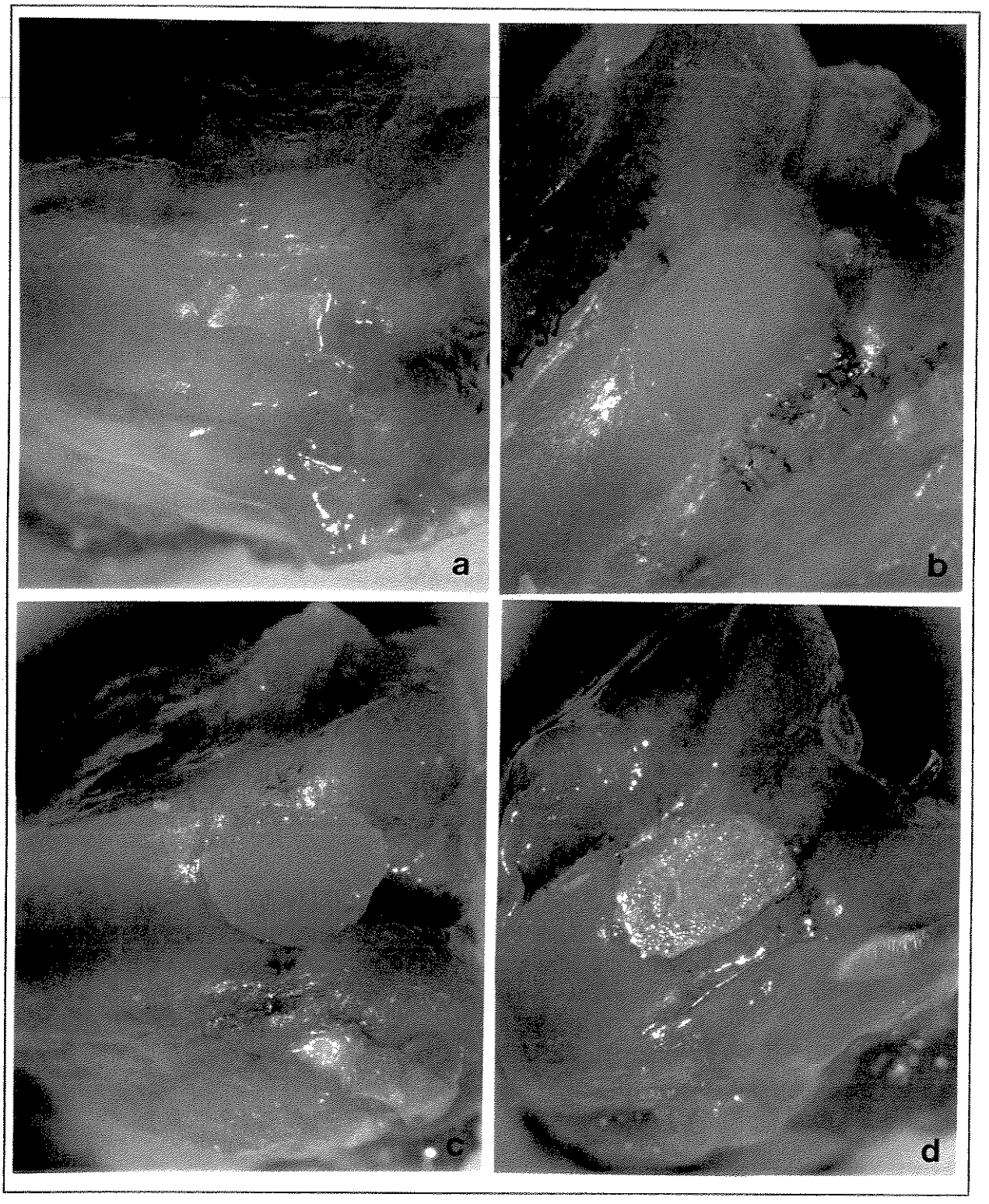


Figura 5.4.8- Superfícies articulares de fêmur distal de rato com implante após 16 semanas de seguimento.

5.4.2 - Análise histológica

As figuras a seguir mostram os cortes histológicos longitudinais aos côndilos controle e com implante. Não foi observada reação inflamatória do tipo exudativa nas fases agudas ao redor do implante. Embora o hidrogel tenha sofrido retração durante preparo das lâminas, foi possível observar que o hidrogel é permeável aos fluidos presentes no local, permitindo assim a sua invasão por células e crescimento de tecido no interior da parte porosa do material, enquanto que a parte densa permanece intacta.

Os cortes histológicos mostram que nos casos dos defeitos controle houve reparo através da formação inicial de um tecido de granulação que foi paulatinamente substituído por tecido ósseo imaturo e maduro. Para as primeiras semanas de seguimento, a reparação da superfície articular foi feita sempre pela deposição de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso.

Nos femures com implante foi observado o mesmo processo de reparação tecidual, porém com menor intensidade, ou seja, houve ao redor do implante a formação de tecido de granulação, tecido ósseo imaturo e maduro. Quando o implante ficou posicionado no mesmo nível da superfície articular, não ocorreu crescimento de tecido sobre o mesmo e quando este foi posicionado abaixo da superfície articular, parece ter havido crescimento de cartilagem hialina.

Nas figuras 5.4.9 a e b, com 2 semanas de seguimento, foi possível observar a presença de tecido de granulação mais frouxo no interior do defeito e com aspecto fibroso na superfície. Na figura 5.4.10 onde há a presença do hidrogel, nota-se que o tecido de reparo sobre o implante é semelhante a cartilagem hialina e se observa ainda a neoformação de tecido de granulação ao redor do implante como ocorre no controle.

Com 3 semanas de seguimento, ocorreu a diferenciação do tecido de granulação para tecido cartilaginoso preenchendo de forma mais adequada a cavidade. Nas figuras 5.4.11 a-b, observa-se o defeito do grupo controle sendo preenchido, porém na superfície nota-se o degrau entre a superfície cartilaginosa normal e a da região neoformada com fibrose. Nas

figuras 5.4.12 a-b, verifica-se que o material colapsou, mas está sendo invadido pelo tecido ósseo neoformado com formação de tecido fibrocartilaginoso sobre a sua superfície.

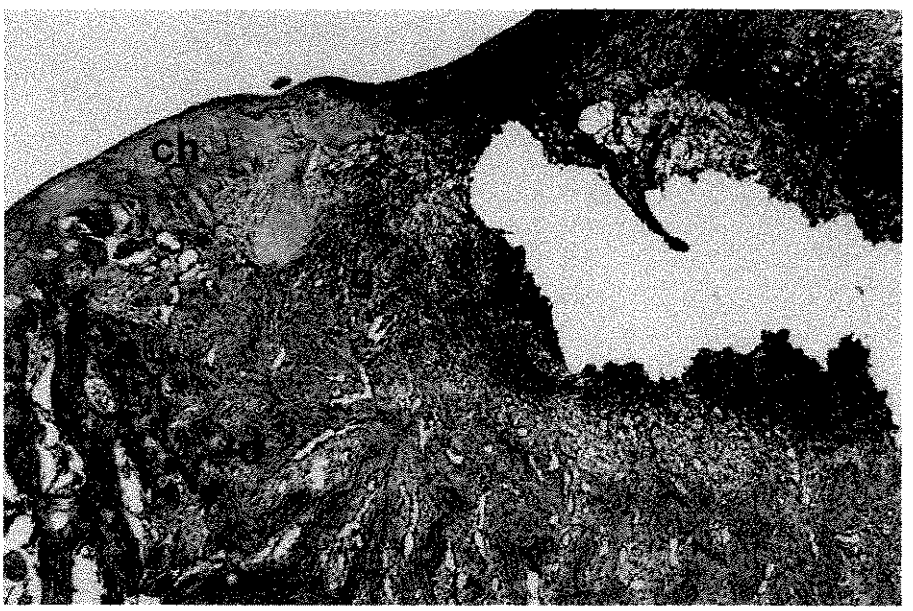
Com 5 semanas de seguimento (figuras 5.4.13 a-b e 5.4.14 a-b), observou-se que o controle já estava preenchido por tecido ósseo imaturo, com formação de tecido fibrocartilaginoso superficial. Nos cortes com implante, foi possível notar interação entre o tecido ósseo e o hidrogel, inclusive com ilhas de cartilagem no interior do implante.

Após 8 semanas de seguimento, a superfície articular permaneceu irregular no caso dos defeitos controle (figuras 5.4.15 a-b) e o tecido ósseo começou a formar trabéculas. No grupo com o implante verificou-se que este apresenta-se bem integrado ao tecido formado e nas figuras 5.4.16 a-b pode-se perceber a neoformação de fibrocartilagem. Neste caso, novamente o hidrogel ficou posicionado abaixo da superfície articular vizinha.

Nas figuras 5.4.17 a-b, para 12 semanas de seguimento, parece ficar claro que o tecido fibrocartilaginoso na superfície do defeito controle foi formado a partir do tecido de preenchimento e não da cartilagem hialina vizinha ao defeito. No caso do implante, novamente a presença deste parece ter fornecido sustentação mecânica para o reparo da superfície (figura 5.4.18 a-b).

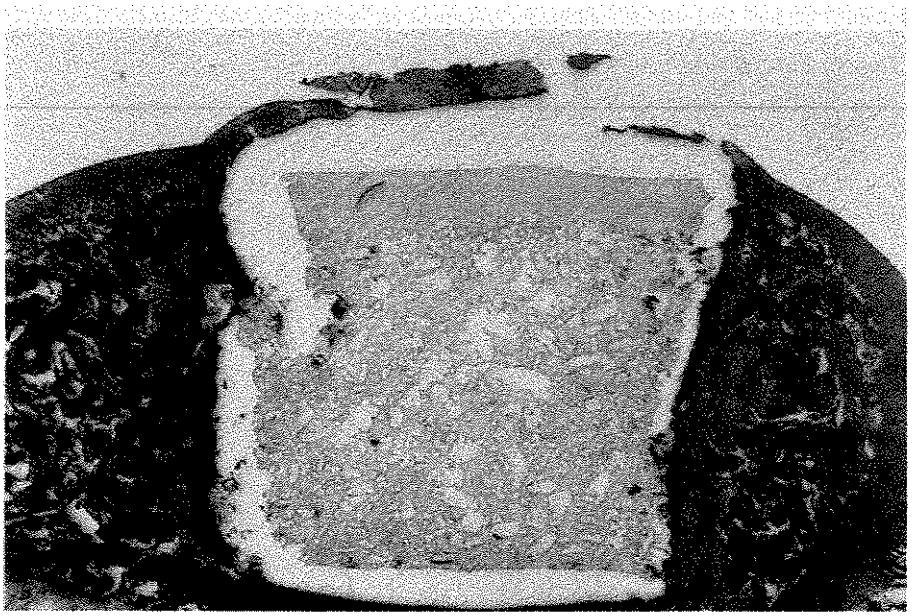
Finalmente, para 16 semanas de seguimento (figuras 5.4.19 a-b e 5.4.20 a-b), observa-se que a superfície reparada permaneceu irregular e sem a presença de tecido cartilaginoso no caso dos defeitos controle enquanto que o hidrogel implantado preencheu o defeito e encontra-se bem integrado ao tecido vizinho.

(a)

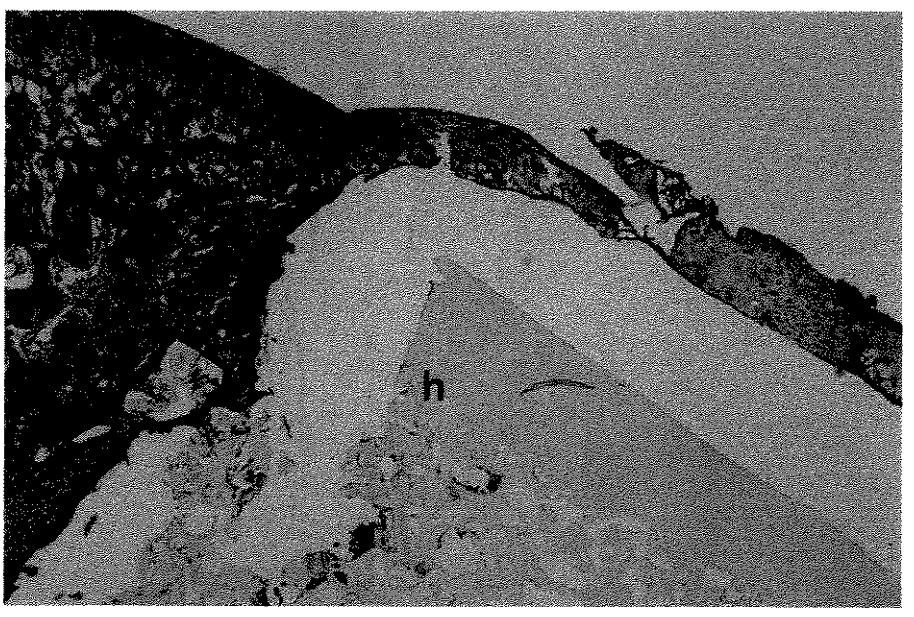


(b)

Figura 5.4.9 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 2 semanas de seguimento. (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X. (ch) cartilagem hialina, (o) tecido ósseo, (g) tecido de granulação, (f) tecido fibroso.



(a)



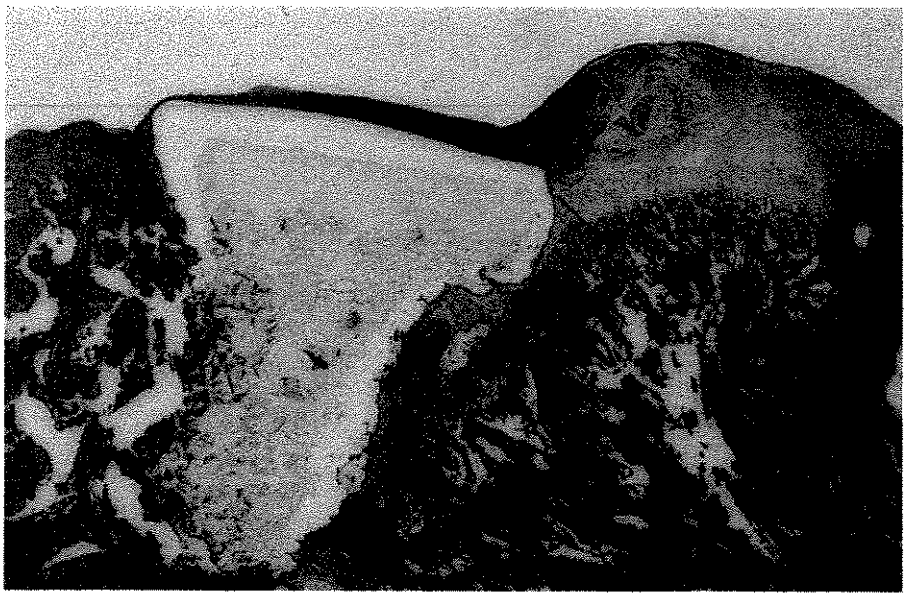
(b)

Figura 5.4.10 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 2 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**h**) hidrogel, (**ch**) cartilagem hialina, (**o**) tecido ósseo, (**c**) tecido neoformado semelhante a cartilagem hialina, (**g**) tecido de granulação.

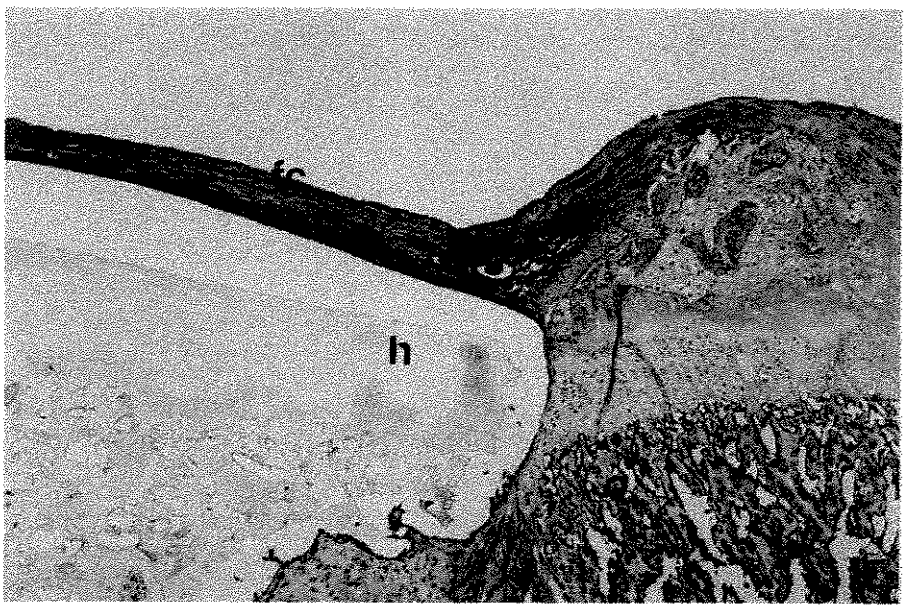
(a)

(b)

Figura 5.4.11 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 3 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**ch**) cartilagem hialina, (**o**) tecido ósseo, (**c**) tecido cartilaginoso neoformado, (**f**) tecido fibroso.



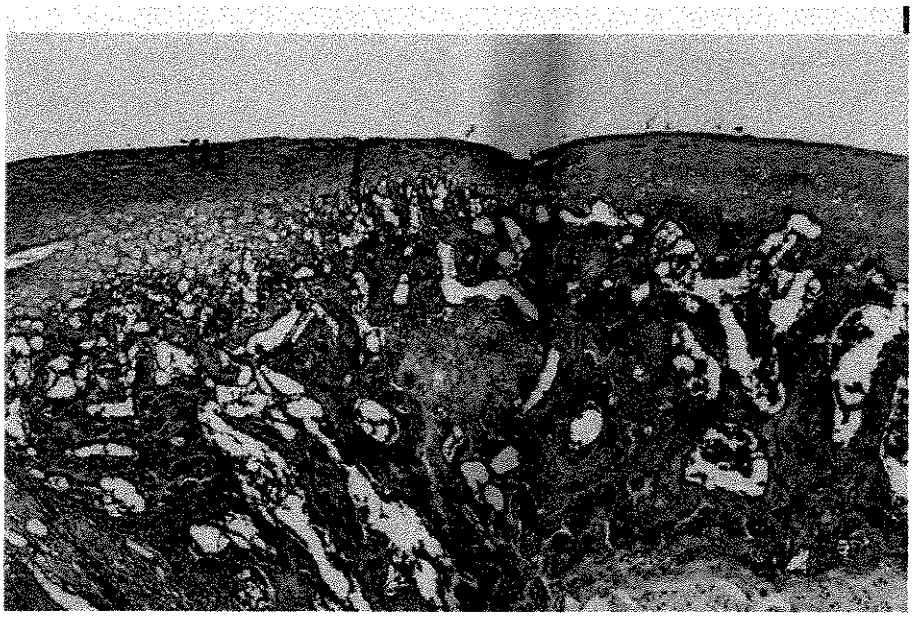
(a)



(b)

Figura 5.4.12 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 3 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**h**) hidrogel, (**fc**) tecido fibrocartilaginoso neoformado, (**o**) tecido ósseo neoformado.

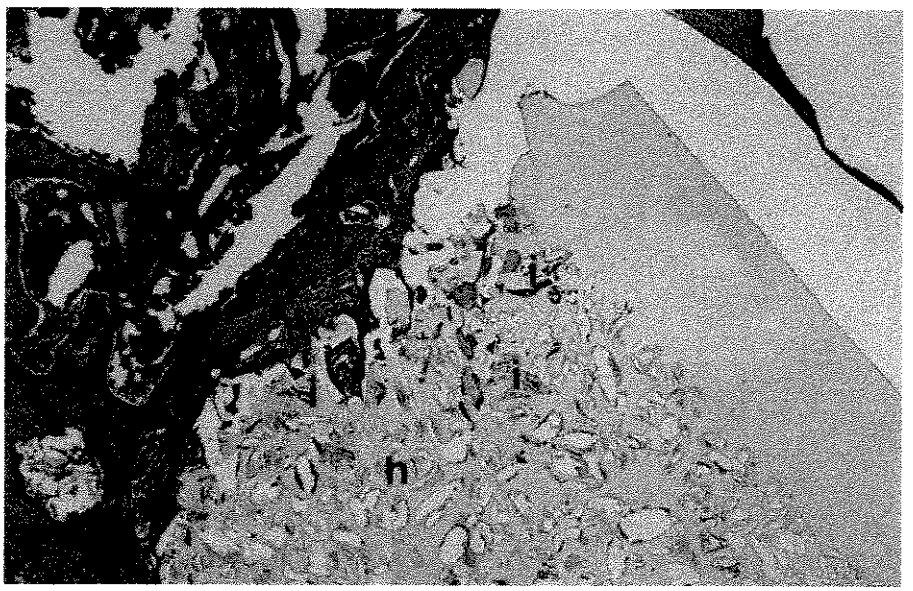
(a)



(b)

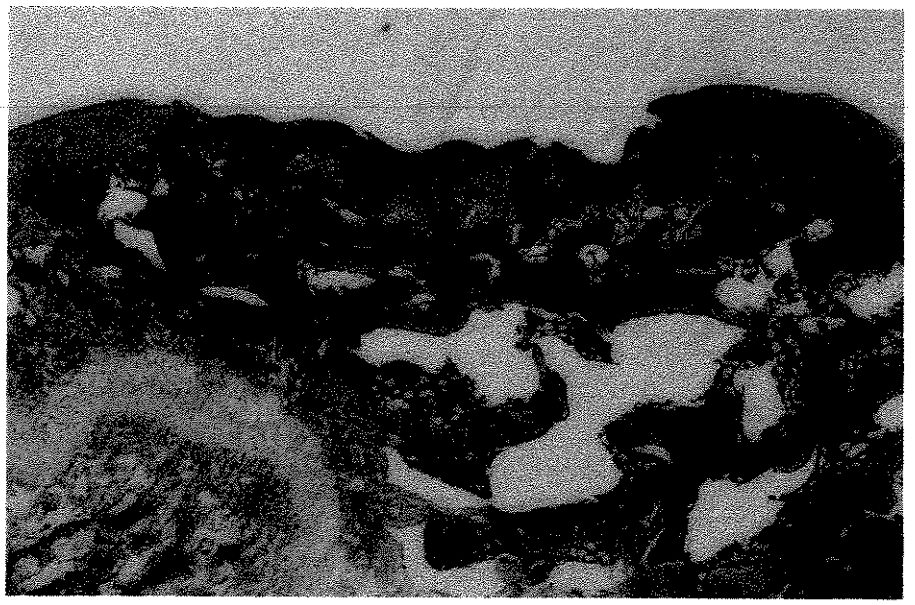
Figura 5.4.13 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 5 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**fb**) tecido fibrocartilaginoso neoformado, (**o**) tecido ósseo imaturo.

(a)

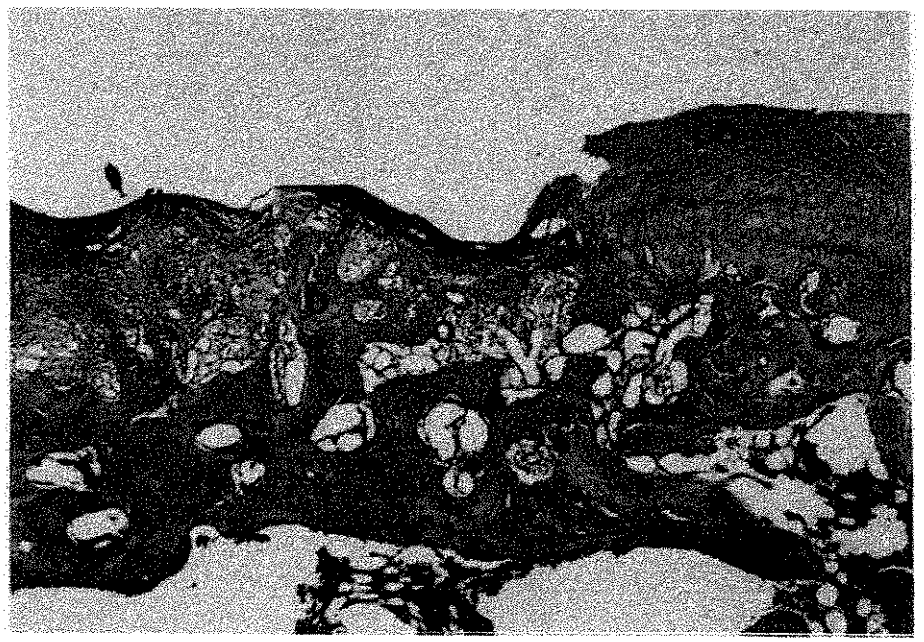


(b)

Figura 5.4.14 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 5 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, **(h)** hidrogel, **(i)** invasão tecidual (tecido cartilaginoso).



(a)



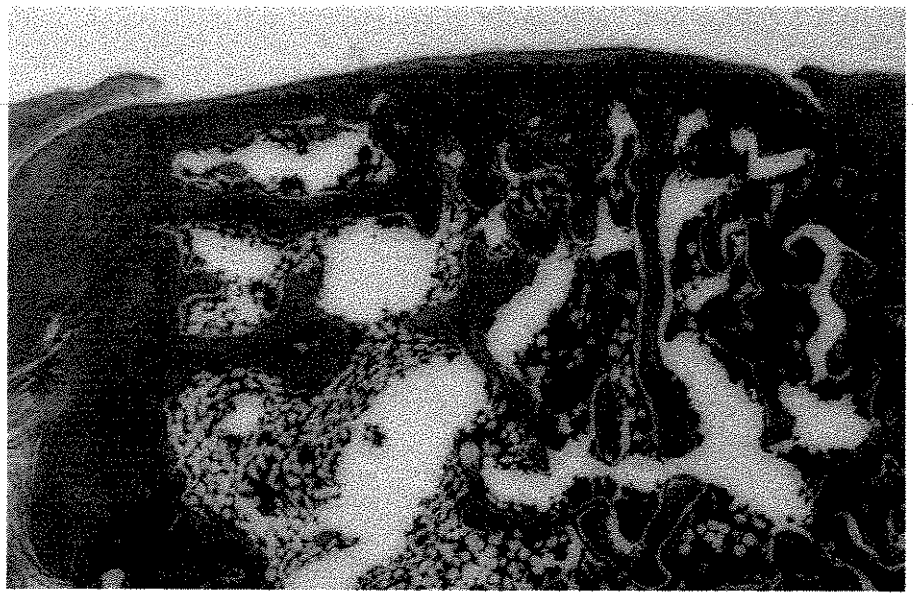
(b)

Figura 5.4.15 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 8 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**ch**) cartilagem hialina, (**o**) tecido ósseo (trabéculas), (**fb**) fibrocartilagem neoformada.

(a)

(b)

Figura 5.4.16 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 8 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**h**) hidrogel com invasão de tecido neoformado.



(a)

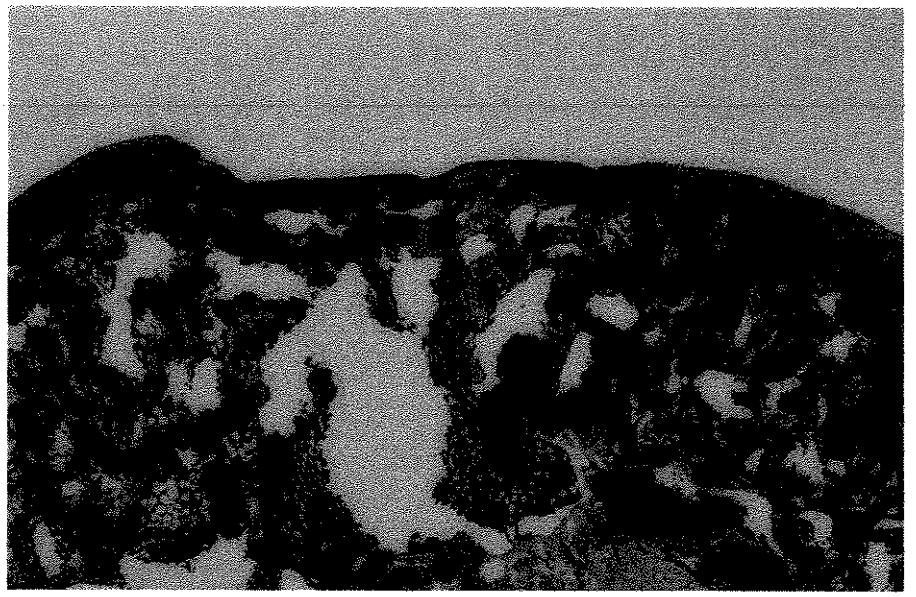
(b)

Figura 5.4.17 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 12 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**ch**) cartilagem hialina, (**o**) tecido ósseo (trabéculas), (fb) fibrocartilagem neoformada.

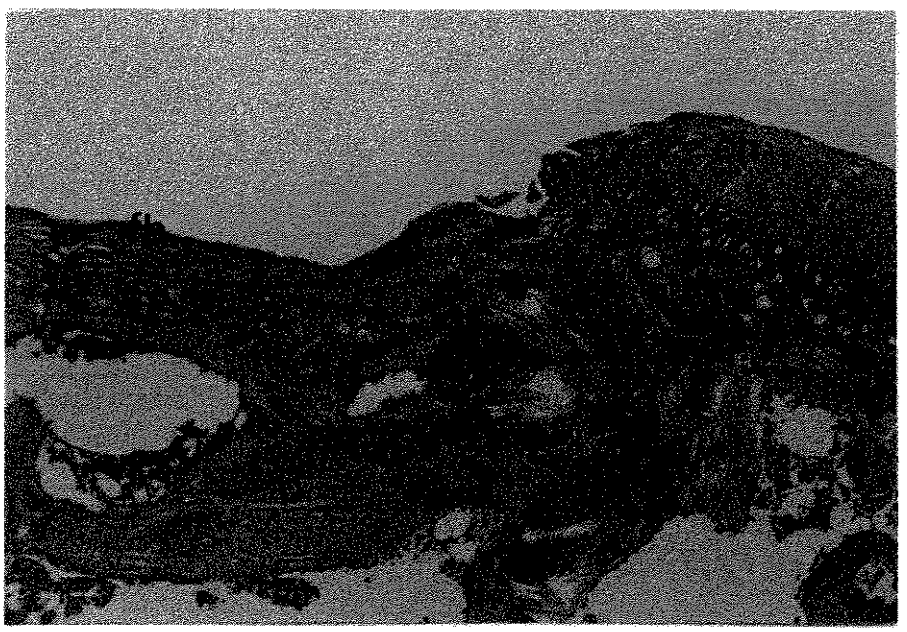
(a)

(b)

Figura 5.4.18 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 12 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**h**) hidrogel, (**i**) invasão de tecido neoformado).



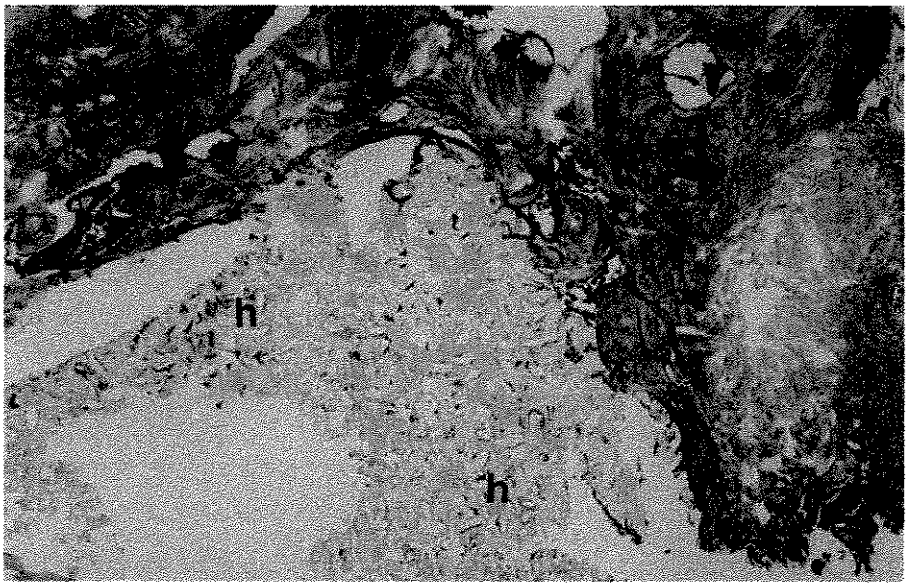
(a)



(b)

Figura 5.4.19 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com defeito controle para 16 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**ch**) cartilagem hialina, (**o**) tecido ósseo, (fb) fibrocartilagem.

(a)



(b)

Figura 5.4.20 - Cortes histológicos longitudinais a região intercondiliana de fêmur distal de rato com implante para 16 semanas de seguimento: (a) aumento - 60X e (b) aumento - 80X, (**h**) hidrogel com invasão de tecido neoformado.

Conforme relatado no capítulo 2, alguns estudos vem sendo conduzidos com implante de diferentes materiais na tentativa de reparo de defeitos de cartilagem articular, porém a literatura não relata nenhum estudo visando a obtenção de uma superfície articular artificial. Todos empregam materiais sintéticos para o preenchimento do defeito, de maneira a servir como sustentação mecânica para o crescimento tecidual. O objetivo em todos os casos tem sido a obtenção de tecido de reparo da superfície com características biomecânicas semelhantes as da cartilagem hialina. Embora muitos trabalhos da literatura apresentem resultados promissores, não se chegou ainda a procedimento satisfatório.

Os resultados deste trabalho mostraram que defeitos da cartilagem articular podem ser reparados pelo crescimento de tecido a partir de células provenientes de regiões ósseas vascularizadas, formando osso no interior do defeito e diferenciando-se na superfície articular para um tecido fibrocartilaginoso com superfície irregular que, embora possa parecer capaz de exercer as mesmas funções da cartilagem normal, segundo alguns autores sofre degeneração rápida com o tempo.

SHAPIRO e colaboradores (1993), estudando a origem e diferenciação celular para o reparo de defeitos da cartilagem articular, mostraram que os condrócitos da cartilagem residual adjacente não participam da repopulação do defeito. Segundo estes autores, o reparo ocorre pela proliferação e diferenciação de células provenientes da medula óssea, as quais se diferenciam para fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e condrócitos. Ainda segundo estes autores, a matriz do tecido neoformado não é capaz de proporcionar uma boa integração à cartilagem vizinha remanescente e a ausência desta integração entre os tecidos causa micromovimentos que podem contribuir para a soltura e degeneração da cartilagem neoformada.

Assim, alguns pesquisadores vem obtendo resultados interessantes com a utilização de materiais biológicos que consistem numa fonte de células capazes de diferenciação para condrócitos tais como periósteo. WAKITANI e colaboradores, (1994) que vem estudando a utilização de células provenientes de medula óssea ou de periósteo, cultivadas em gel de colágeno e SALTER e colaboradores (SALTER e cols., 1980; MORAN, KIN & SALTER, 1992 ; KREDDER e cols., 1994) com a utilização de material biológico e a manutenção de

estímulo mecânico através de movimentação passiva contínua da articulação após a cirurgia, acreditam que partindo destes materiais biológicos é possível a formação de tecido com arranjo e distribuição de colágeno do tipo II e com ultraestrutura da matriz extracelular semelhante a cartilagem hialina.

Para o caso dos implantes, os resultados observados neste trabalho estão de acordo com resultados obtidos por DOWNES e colaboradores (1994) que vêm estudando a possibilidade de reparo de defeitos da cartilagem articular pelo implante de um biomaterial polimérico a base de polietil metacrilato e tetra furfuril metacrilato. Segundo estes autores existem três tecidos biológicos contornando a área do implante/defeito : osso, sinovium e cartilagem articular e são vários os mecanismos pelos quais podem ocorrer a formação de tecido de reparo. Os autores sugerem que o defeito provocado no osso subcondral permite a migração de células da medula óssea, que consistem numa fonte para a diferenciação dos condrócitos. Além disso, a ruptura de vasos sanguíneos deve promover a formação óssea. O fluido sinovial pode proporcionar células condrogênicas, fibroblastos e fatores de crescimento. E ainda existem indicativos de proliferação celular e formação de clones de condrócitos nos cantos da cartilagem original, levando a expansão da cartilagem original sobre o implante de polímero. Para estes autores o posicionamento do implante em relação a superfície vizinha é um fator que influencia marcadamente o reparo superficial. O implante deve ser posicionado ao nível do osso subcondral ou um pouco abaixo, deixando as margens da cartilagem vizinha livres para proliferação tecidual.

Tais resultados permitiram verificar a potencialidade do hidrogel estudado, para o reparo de defeitos da cartilagem articular, e mostrou alguns caminhos alternativos a serem estudados, tais como a busca de um biomaterial que seja capaz de atuar como superfície articular artificial ou a utilização do hidrogel recoberto com periósteo ou embebido em fatores de crescimento.

5.4.3 - Comportamento mecânico das superfícies articulares

Conforme descrito no capítulo 3, para análise do comportamento mecânico do local de implante/defeito nas superfícies articulares dos espécimes, foram realizados ensaios de relaxação de tensão sob indentação com ponta esférica de raio 0,5 mm. Foi feita uma análise dos resultados comparando-se as respostas apresentadas pelas superfícies das áreas dos implantes e dos defeitos controles, com a resposta apresentada pelo tecido normal de áreas vizinhas ao local de implante/defeito.

Tendo em vista a variabilidade dos resultados obtidos, foi realizada uma análise estatística para validação dos resultados, cálculo de médias, desvios, variâncias e análise de variância das diversas curvas obtidas nos ensaios de relaxação de tensão. Detalhes sobre os procedimentos estatísticos utilizados bem como os dados referentes a tais procedimentos encontram-se no apêndice A2. A discussão apresentada a seguir foi feita com base nos resultados da análise estatística.

As figuras 5.4.21 a 5.4.25 mostram as respostas de variação da carga *versus* tempo apresentada pelas superfícies das áreas dos defeitos controle/implantes, bem como da cartilagem normal vizinha, para os grupos com diferentes tempos de seguimento. Foi possível verificar diferenças entre as respostas apresentadas pelo implante, defeito controle e pelo tecido normal para cada grupo e entre os diferentes grupos, isto é, para as diferentes superfícies e ao longo do tempo de seguimento do experimento.

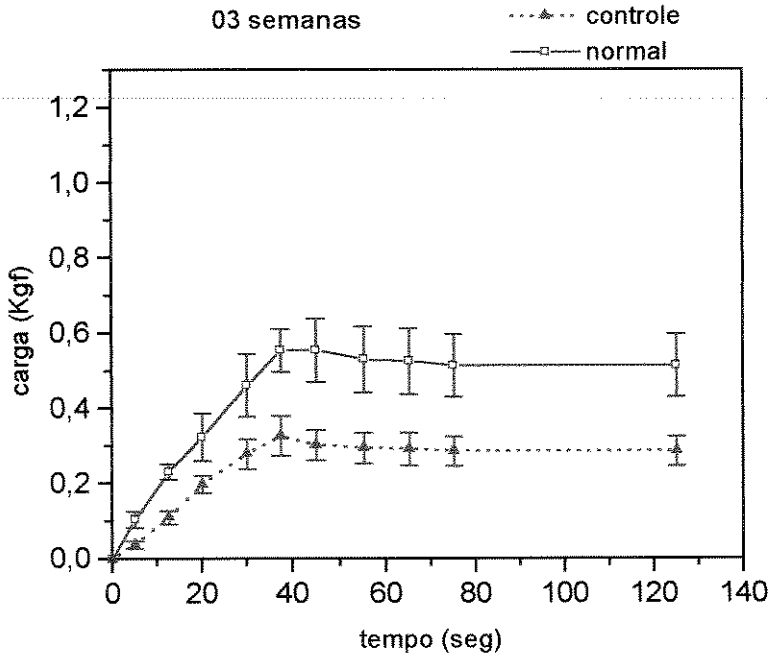
Foi possível verificar que para todos os tempos de seguimento, a superfície da área do implante apresentou menor dureza do que a cartilagem normal, isto é, a carga necessária para a deformação imposta foi menor do que no caso do defeito controle e cartilagem normal. Porém, analisando a figura 5.4.26, fica claro que o módulo elástico (E) da superfície do implante aumenta ao longo do tempo, partindo do valor inicialmente apresentado pelo hidrogel antes do implante (2,32 Mpa), tendendo a um comportamento mais próximo ao da cartilagem normal, provavelmente devido ao crescimento de tecido de reparo sobre a superfície do hidrogel e a invasão tecidual para o interior do implante nas superfícies em contato com as paredes ósseas

do defeito, o que confere maior estabilidade ao implante e dificulte a deformação do mesmo. Para os defeitos controles, inicialmente a superfície do tecido de preenchimento apresentou maior dureza do que a cartilagem normal, porém ao longo do tempo seu módulo elástico aumenta, tornando-se superior ao da cartilagem normal, indicando a presença de um tecido mais duro do que a cartilagem, preenchendo os defeitos.

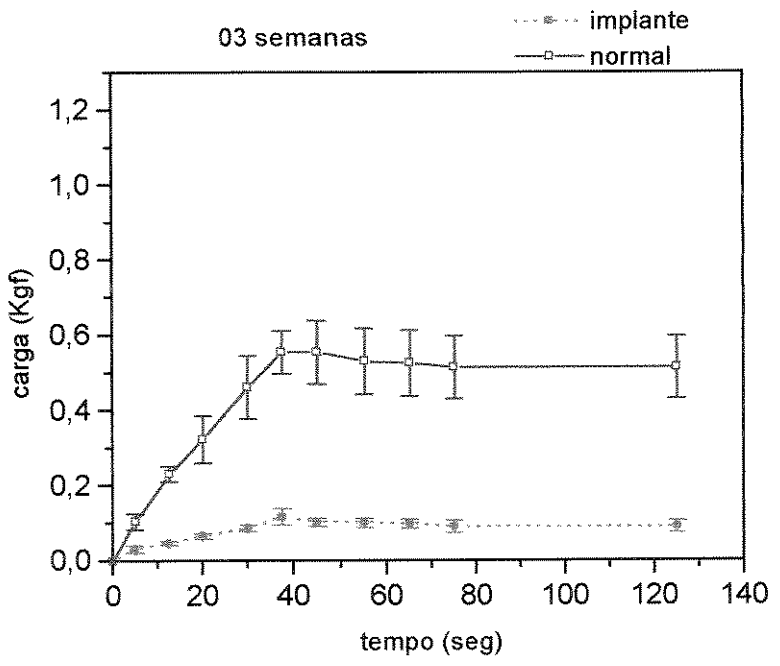
Conforme discutido na análise histológica, no caso dos defeitos controles, ocorre o crescimento de tecido ósseo no interior do defeito e em alguns casos com a presença de fina camada de tecido fibrocartilaginoso na superfície articular. Assim sendo, para a faixa de deformação imposta durante o ensaio, a resposta observada no caso dos defeitos controles refletiu o comportamento de tecido ósseo mais do que nas áreas vizinhas onde existe a presença da cartilagem normal que além de ser mais espessa do que a camada de fibrocartilagem neoformada, apresenta menor dureza do que esta.

Na figura 5.4.26 observa-se que o valor do módulo elástico da superfície do implante aumenta ao longo do tempo de seguimento, tendendo para o valor do módulo apresentado pela superfície articular de cartilagem normal, enquanto que no caso da superfície do defeito controle, inicialmente para as primeiras semanas de seguimento o módulo é inferior ao da cartilagem normal, aumenta ao longo do tempo e depois de 12 semanas de seguimento volta a diminuir. No caso da cartilagem normal observa-se grande variabilidade no valor de E, porém sem uma tendência estabelecida.

Tempo de seguimento : 03 semanas



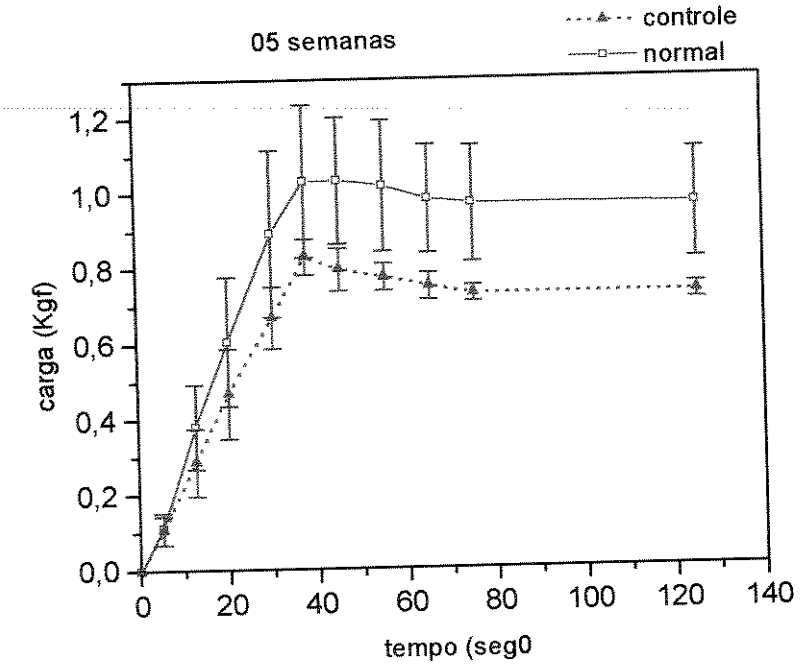
(a)



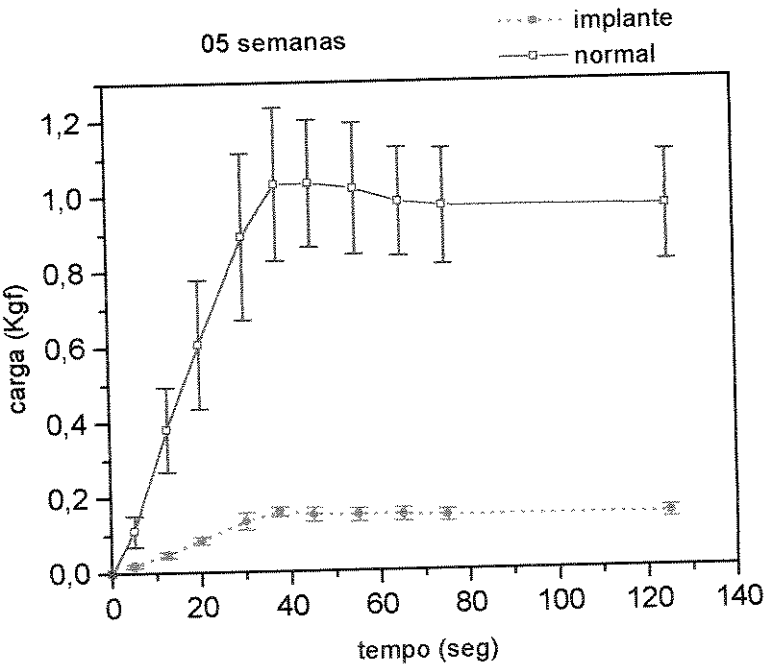
(b)

Figura 5.4.21 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superfícies articulares indentadas em áreas com (a) controle e (b) implante, comparadas a curva obtida para área de cartilagem normal, 03 semanas após a cirurgia.

Tempo de seguimento : 5 semanas



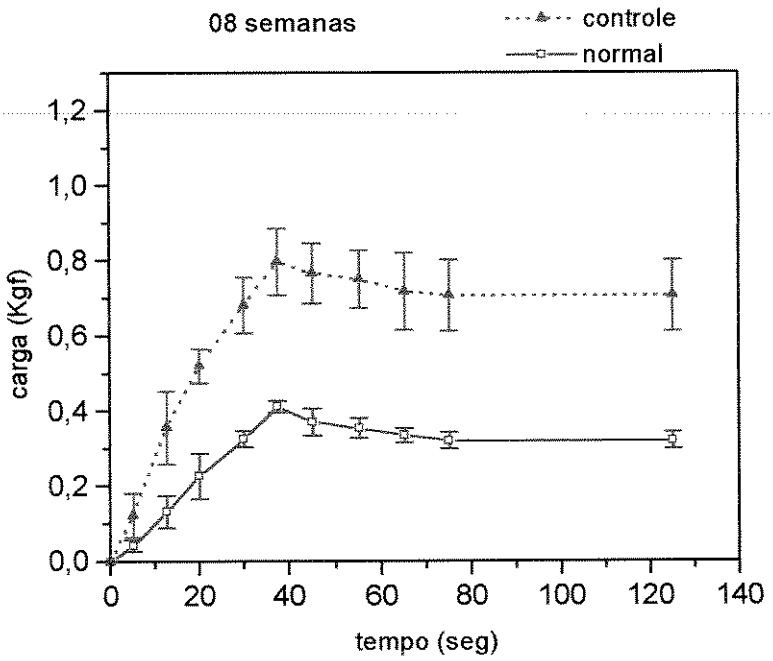
(a)



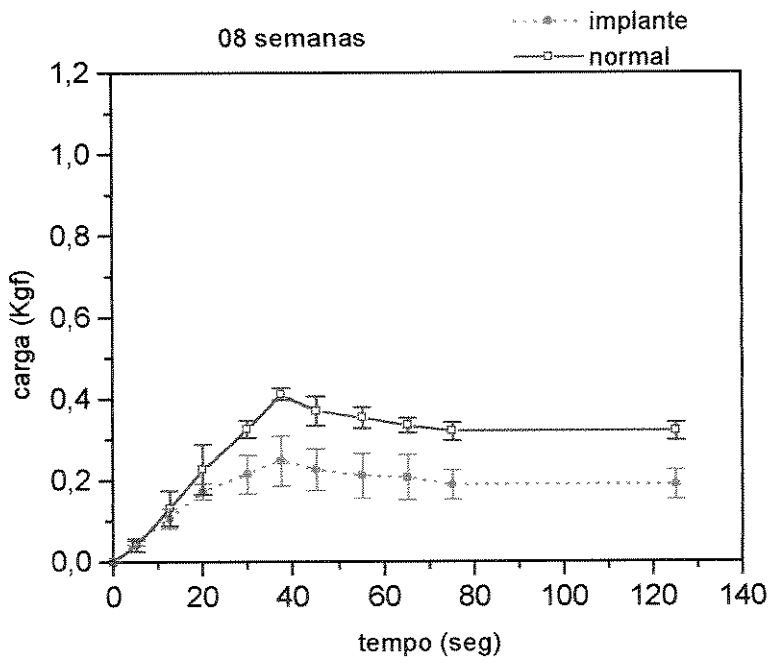
(b)

Figura 5.4.22 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superficies articulares indentadas em áreas com (a) controle e (b) implante, comparadas a curva obtida para área de cartilagem normal, 05 semanas após a cirurgia.

Tempo de seguimento : 8 semanas



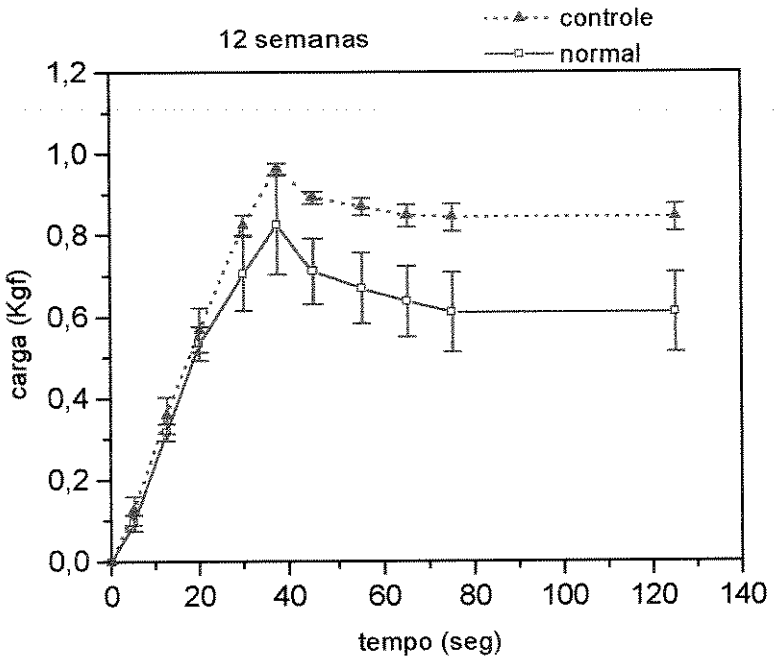
(a)



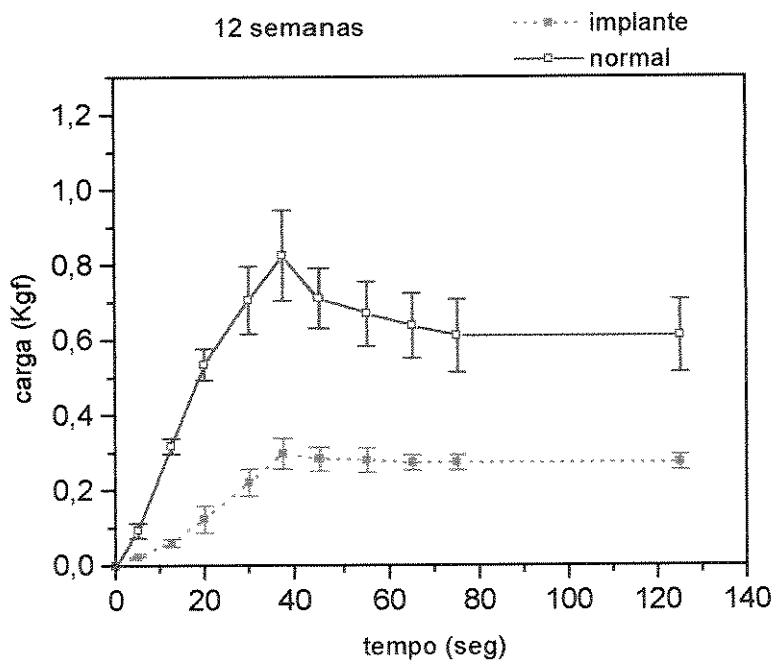
(b)

Figura 5.4.23 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superfícies articulares indentadas em áreas com (a) controle e (b) implante, comparadas a curva obtida para área de cartilagem normal, 08 semanas após a cirurgia.

Tempo de seguimento : 12 semanas



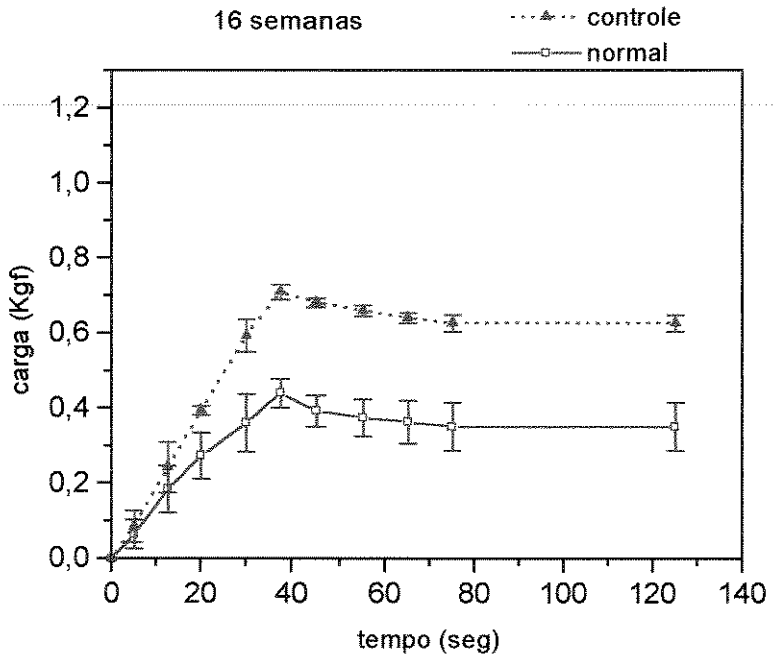
(a)



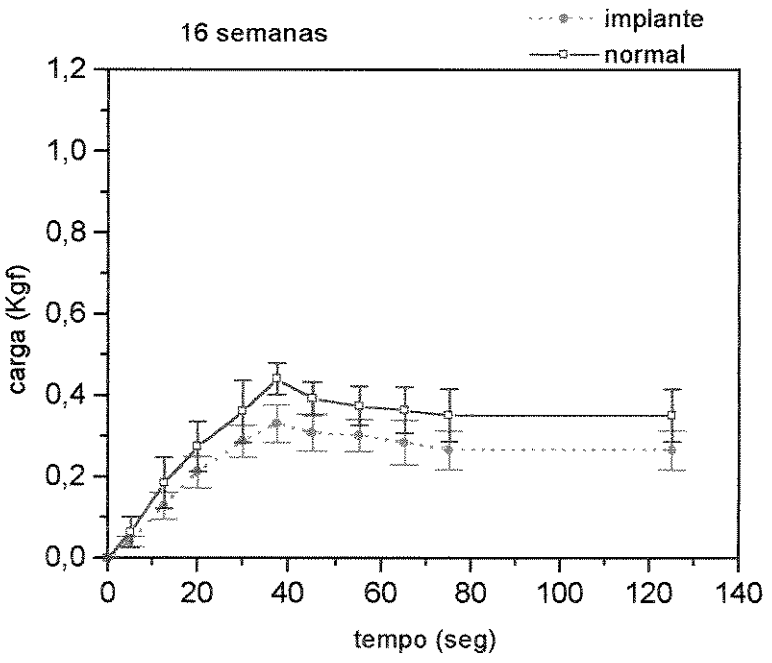
(b)

Figura 5.4.24 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superfícies articulares indentadas em áreas com (a) controle e (b) implante, comparadas a curva obtida para área de cartilagem normal, 12 semanas após a cirurgia.

Tempo de seguimento : 16 semanas



(a)



(b)

Figura 5.4.25 - Curvas de tensão *versus* deformação e relaxação de tensão obtidas para superfícies articulares indentadas em áreas com (a) controle e (b) implante, comparadas a curva obtida para área de cartilagem normal, 16 semanas após a cirurgia.

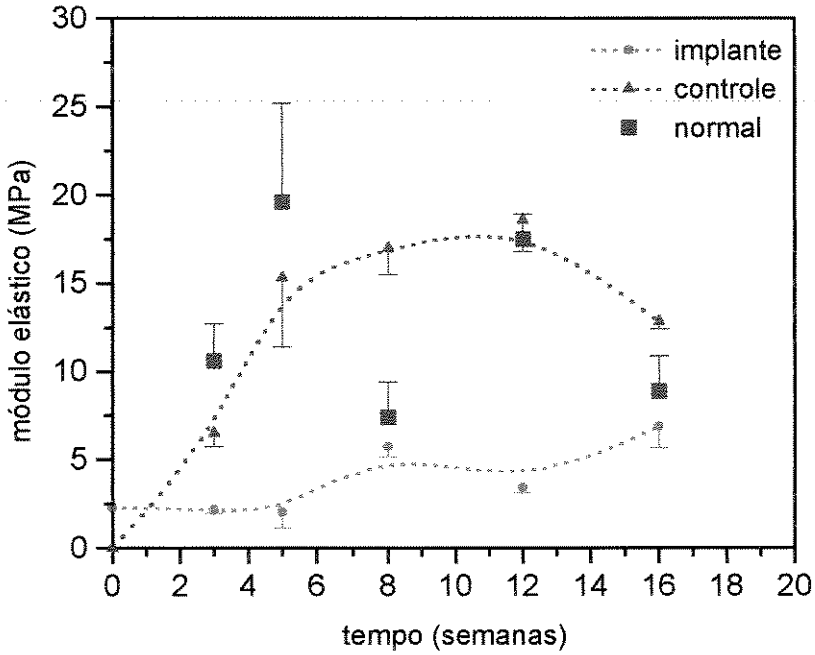


Figura 5.4.26 - Valores de módulo elástico para superfícies articulares em áreas de implante, defeito controle e cartilagem normal.

Com estes resultados não foi possível conclusão definitiva sobre o comportamento mecânico das superfícies do defeito controle para tempos superiores a 12 semanas. Embora o resultado obtido para 16 semanas mostre uma tendência a diminuição do módulo elástico, é necessário a confirmação deste resultado ou a coleta de dados com tempos de seguimento superiores a 16 semanas para uma conclusão a esse respeito. Mesmo assim, tendo em vista a discussão apresentada anteriormente sobre a degeneração do tecido fibrocartilaginoso com o tempo, pode-se sugerir que esta diminuição no valor do módulo elástico pode estar refletindo um início de degeneração do tecido de reparo.

Tais resultados reforçam a conclusão sobre a potencialidade do hidrogel de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) para utilização no reparo de defeitos da superfície articular.

5. 5 - COMENTÁRIOS SOBRE A METODOLOGIA UTILIZADA

No modelo utilizado, o diâmetro do defeito parece ter influenciado bastante os resultados, dificultando a análise da resposta induzida pelo tecido. Um modelo adequado deve utilizar um defeito que atinja apenas a região do sulco intercondileano da articulação. WAKITANI e colaboradores, (1994) propõe a realização de um defeito longitudinal ao sulco ao invés de um defeito circular, o que permite a obtenção de uma área crítica de defeito, mesmo para pequenas articulações como é o caso de animais de pequeno porte.

A utilização de animal de maior porte, coelho ou cão facilita do ponto de vista prático a obtenção de reprodutibilidade nas dimensões do defeito.

Convém ressaltar que a área do defeito deve ser crítica o suficiente para permitir a avaliação da resposta induzida pelo material em comparação ao defeito controle. Para o caso de defeitos muito pequenos como controle, estes são completamente preenchidos, e assim o preenchimento do defeito não pode ser utilizado como parâmetro crítico para permitir a comparação de resultados.

Outro aspecto importante parece ser o nível do implante em relação a superfície articular vizinha. O modelo deve estabelecer um valor para a profundidade do defeito, bem como um mecanismo que permita a reprodutibilidade desse valor. Os resultados desse trabalho não permitem concluir qual é o melhor posicionamento do implante em relação à superfície articular vizinha, isto é, se o mesmo deve ser posicionado no mesmo nível ou em nível inferior ao da superfície vizinha. Segundo DOWNES e colaboradores, (1994), o implante deve ser posicionado no mesmo nível ou um pouco acima do osso subcondral e não da cartilagem vizinha. Segundo estes autores, se o implante ficar posicionado ao mesmo nível da superfície vizinha, não ocorre recobrimento perfeito do material por tecido de reparo.

Talvez, quando se deseja que haja crescimento tecidual sobre o implante seja interessante utilizar material totalmente poroso, isto é, sem camada superior densa, implantado em nível inferior ao da cartilagem vizinha .

Por outro lado, pode se utilizar material com propriedades mecânicas adequadas, apresentando superfície superior densa e lisa, implantado de maneira a obter mesmo nível da superfície vizinha. Neste caso, não ocorrendo crescimento tecidual sobre o implante, a presença da superfície densa e lisa do material garante a formação da superfície articular funcional a articulação. Neste caso, deve se garantir que não haja uma mudança brusca da porosidade ao longo da estrutura do material, pois isso pode facilitar a ruptura do mesmo na interface entre as camadas densa e porosa. O ideal para esse caso é um material com assimetria em relação a porosidade, ao longo de sua altura, isto é, com superfície densa de espessura definida e um aumento gradativo no diâmetro e quantidade de poros até a superfície inferior, que fica em contato com o osso subcondral. A obtenção de uma superfície articular sintética pode ser mais interessante do que a restauração da superfície pelo crescimento de tecido de reparo, pois conforme verificado por alguns autores, o tecido de reparo degenera após algum tempo.

Ao ser colocado no local do implante, o material deve comprimido para que, como uma esponja possa absorver fluidos do meio. O material pode ser implantado não totalmente inchado, para que possa ser inchado no local do implante, absorvendo os fluidos do meio, aumentando sua dimensão de maneira a melhorar sua fixação ao local do implante.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos e mediante as discussões apresentadas no capítulo anterior, foi possível chegar as seguintes conclusões :

1 - Quanto as características materiais dos hidrogéis estudados:

- Para hidrogéis de poliHEMA, o aumento da concentração do agente de reticulação de 0 a 10,0% levou a diminuição da capacidade de absorção de solução de 32,4 para 16,2% e aumento no módulo de fluência a indentação de 1,0 para 7,0 MPa.

  Para blenda sIPN de poliHEMA-AC, o aumento da concentração de AC de 0 a 10,0 %, levou a diminuição da capacidade de absorção de solução salina de 31,8 para 30,4 % e aumento no módulo de fluência a indentação de 0,7 para 1,5 MPa.

- Para blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA), o aumento da concentração de poli(MMA-co-AA) de 0 a 10,0 %, levou a diminuição da capacidade de absorção solução salina de 31,2 para 24,0% e aumento no módulo de fluência a indentação de 0,5 para 4,0 MPa.

- Dentre os hidrogéis estudados, aqueles obtidos a partir da blenda sIPN de poliHEMA com poli(MMA-co-AA) apresentou propriedades mais semelhantes as da cartilagem hialina.

2 - Quanto a citotoxicidade dos hidrogéis estudados :

- Nenhum dos três hidrogéis estudados apresentou efeito citotóxico frente a células VERO.

3 - Quanto a biocompatibilidade do hidrogel blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA), frente ao reparo de defeitos de cartilagem articular de região intercondiliana de fêmur de rato:

- O hidrogel implantado permaneceu no local do implante em todos os animais, sem reação inflamatória na interface implante/ tecido, bem integrado aos tecidos vizinhos e com indicativos de invasão tecidual para o interior do mesmo, indicando que o reparo da superfície articular foi favorecido pela presença do hidrogel, que minimizou a ocorrência de reação sinovial e da irregularidade superficial que aconteceu nos casos da reparação biológica dos defeitos controle;

- O crescimento de tecido de reparo sobre o implante foi dependente do posicionamento do mesmo em relação a superfície vizinha, isto é, o posicionamento em nível inferior favoreceu o crescimento de tecido de reparo e quando posicionado ao mesmo nível da cartilagem vizinha inibiu o crescimento de tecido de reparo;

- Defeitos da superfície articular sem a presença do implante foram reparados pelo preenchimento do defeito com tecido ósseo em seu interior, recobertos com tecido fibrocartilaginoso com características biomecânicas diferentes da cartilagem hialina e, na maioria dos casos resultou em incongruência da superfície articular na região do defeito.

Finalmente, o hidrogel obtido a partir da blenda sIPN de poliHEMA com poli(MMA-co-AA) apresenta grande potencialidade como biomaterial para correção de defeitos da cartilagem articular e portanto deve ser avaliado em ensaios *in vivo* para tempos de seguimento superiores a 16 semanas, seja atuando como sustentação mecânica para o crescimento de tecido com

características semelhantes as da cartilagem hialina, seja atuando como superfície articular artificial.

Tendo em vista as conclusões acima descritas e as questões não respondidas que foram levantadas no decorrer do trabalho, foram elaboradas as propostas de trabalhos futuros abaixo descritas.

- Realizar um estudo que permita a verificação da resposta ao implante posicionado em diferentes níveis em relação a cartilagem articular;

- Avaliar a importância da porosidade do hidrogel para sua biocompatibilidade frente ao reparo de defeitos da cartilagem articular, utilizando para isso amostra com estrutura assimétrica quanto a porosidade, amostra totalmente porosa, isto é, sem a presença da camada superior densa, etc ;

- Estudar a influência da densidade de carga do hidrogel no comportamento de células cartilaginosas *in vitro* e no reparo tecidual *in vivo*, utilizando para isso amostras de um mesmo hidrogel com diferentes densidades de carga negativa fixa.

- Estudar a influencia de parâmetros tais como movimento passivo, estimulação elétrica no reparo de defeitos articulares com ou sem implante, avaliando sempre o comportamento biomecânico do tecido de reparo.

- Estudar a influência do comportamento mecano elétrico apresentado pelos hidrogéis no comportamento de células cartilaginosas *in vitro* e no reparo tecidual *in vivo*.

- Estudar a utilização de hidrogel com características mecânicas e tribológicas adequadas para uso como superfície articular sintética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBRÓSIO, L.; NETTI, P.A.; JANNALL, S. HUANG, S.J. and NICOLAIS, L. , *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, v7, 251-254, (1996).

ANSETH, K. S..; BOWMAN, C.N. and PEPPAS, L.B., Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination, *Biomaterials*, v.17, p.1647-1657, 1996.

AOKI, T. ; TANINO, M. ; SANUI, K. ; OGATA, N. and KAMAKURA, K. , Secretory function of adrenal chromaffin cells cultured on polypyrrole films, *Biomaterials*, v.17, n.20, p.1971-1974, 1996.

ARMSTRONG, C.G. & MOW, V.C., Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content, *Journal of Bone and Joint Surgery*, v.64-A, p.88-94, 1982.

ASTM F 895-84, Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity.

ASTM F 813-83, Standard practice for Direct Contact Cell culture Evaluation of Materials for Medical Devices.

BAR, E. , Elasticitatsprufungen der gelenkknorpel, *Arch. Entwicklungsmech. Organ.*, v.108, p. 739-760, 1926. (citado em WOO, S.L.Y. et al , 1987)

BASSET, C.A.L. , Biophysical principles affecting bone structures. In : Biochemistry and physiology of bone, ed. by G.H. BOURNE , 2ª ed, 1-76 , NY Academic Press, 1971.

BENTLEY, G. , Articular tissue grafts, *Annals of the Rheumatic Diseases*, n.51, p.292-296, 1992.

BLACK , J. Biological performance of materials - Fundamentals of biocompatibility, NY.: Marcel Dekker, 1992.

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

CARAVIA, L. ; DOWSON, D. ; FISHER, J. ; CORKHILL, P.H. and TIGHE, B.J. , A comparison of friction in hydrogel and polyurethane materials for cushion-form joints, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.4, p.515-520, 1993.

CHIRILA,T. V.; CONSTABLE, I.J.; CRAWFORD, G.J.; VIJAYASEKARAN, S.; THOMPSON, D.E. CHEN, Y.C.; FLETCHER, W.A. and GRIFFIN, B.J. , Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) sponges as implant materials : *in vivo* and *in vitro* evaluation of cellular invasion - *Biomaterials*, v.14 n.1 , p.26-38, 1993.

COLETTI, J.M. ; AKESON, W. H. & WOO, S.L.Y., A comparison of the physical behavior of normal articular cartilage and the arthoplasty surface, *Journal of Bone and Joint Surgery*, v.54-A, p. 147-160, 1972.

CORKHILL,P. H.; TREVETT,A. S. and TIGHE,B. J. , The potential of hydrogels as synthetic articular cartilage - *Proc. Inst. Mech. Engrs. part H: Journal of Engineering in Medicine*, v. 204, p.147-155, 1990.

CULP, R.C. , Biochemical determinants of cell adhesion , *Curr. Top. Membr. Transp.* , v.2 , p.327-396, 1978.

DE ROSSI , D. , Biomimetic materials, systems and structures, Abstracts of the WORLD CONGRESS ON PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, RJ, Brazil, 21-26 august p.75, 1994.

DE ROSSI, D. ; AHLUWALIA, A. and MULÈ, M. , Molecular and supramolecular systems for sensing and actuation, *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, p.103-111, fev/mar 1994.

DE ROSSI, D. ; NANNINI, A and DOMENICI, C. , Artificial sensing skin mimicking mechanoelectrical conversion properties of human dermis, *IEEE Transactions on Biomedical Eng.*, v. 35 n.2, p.83-92, fev 1988.

DOWNES, S; ARCHER,R.S.; KAYSER, M.V.; PATEL, M.P. and BRADEN, M. - The regeneration of articular cartilage using a new polymer system, *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, v. 5, p.88-95, 1994.

ELMORE, S.M.; SOKOLOFF, L. ; NORRIS, G. and CARMECI, P., Nature of "imperfect" elasticity of articular cartilage, *Journal of Appl. Physiology*, v.18, p.393-396, 1963.

FOLKMAN, J. & MOSCONA, A. , Role of cell shape in growth control, *Nature*, v. 273, p. 345 - 349, june 1978.

FREED, L.E. ; MARQUIS, J.C. ; NOHRIE, A. ; EMMANUEAL, J. ; MIKOS, A.G. and LANGER, R. , Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on biodegradable polymers - *J. Biomedical Material Research*, v.27, p.11-23, 1993

FRESHNEY, R. I., Animal cell culture - A practical approach, IRL Press, 1989.

GILLQUIST,J. and MESSNER, K. , 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 n.5, p.513-521, 1993.

GILLQUIST, J. MESSNER, K. and LOHMANDER, L. S. - Neocartilage after artificial cartilage repair in the rabbit: histological and proteoglycan fragments in joint Fluid - *Journal of Biomedical Material Research*, v.27, p. 949-954, 1993.

GOCK, E. , Elastizitasstudien an jungen und alten gelenkknorpel, *Verh. Dtsch. Orthop. Ges.* , v.22, p.130-147, 1927). (citado em WOO, S.L.Y. et al , 1987).

GOISSIS, G. , Charged collagen matrices mineralized with calcium phosphate salts: a potential mimetic bone material ? , ABSTRACTS OF THE WORLD CONGRESS ON PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, RJ, Brazil, 21-26 august p.78, 1994.

GREEN, W. T. Jr. - Articular cartilage repair: Behaviour of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting - *Clinical Orthopaedics Reated. Research* v.124, 237-250, 1977.

GRINNEL, F. and FELD, M. K. , Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.15, p. 363-381, 1981.

HANFF, G. ; SOLLERMAN, C. ABRAHAMSSON, S.O. and LUNDBORG, G. , Repeir of osteochondral defects in the rabbit knee with GORETEX™ (expanded polytetrafluoretileno. An experimental study, *Scandinavian Plastic Reconstructive Surgery*, v. 24, p.217-223, 1990.

HAYES, W.C. ; KEER, L. M. ; HERRMANN, G. and MOCKROS, L.F. , A mathematical analysis for indentation tests for articular cartilage, *Journal of Biomechanics*, v.5, p.541-551, 1972.

HEATLEY, F. W. & REVELL, W. J. , The use of a meniscal fibrocartilage as a surface arthroplasty to effect the repair of osteochondral defects: An experimental study, *Biomaterials*, v.6, p.161-168, 1985.

HEINEKEN, F.G. and SKALAK, R. , Tissue engineering: a brief overview, *J. of Biomechanical Engineering*, v.113, p.111, 1991.

HERTZ, H.R. , On the contacts of elastic solids, *J. Reine Angew. Math*, v.92, p.156-171, 1881, cit. in KEMPSON e cols., 1971.

HIRSCH, C. , A contribution to the pathogenesis of chondromalacia of the patella, *Acta Chir. Scand.*, v.90, suppl. 83, p.9-106, 1994.

HOCK, D.H. ; GRODZINSY, A.J. ; KOOB, T.J. ; ALBERT, M. L. and EYRE, D.R., Early changes in material properties of rabbit articular cartilage after meniscectomy, *Journal of Orthopaedics Research*, v.1, p.4-12, 1983.

HOFFMAN, A.S. , Intelligent polymers in medicine and biotechnology, *Artificial Organs*, v.19, n.5, p. 458-467, 1995.

HOLMES, M.H. ; LAI, W..M. and MOW, V.C., Singular perturbation analysis of the nonlinear flow independent compressive stress relaxation behavior of articular cartilage, *Journal of Biomechanical Engineering*, v. 207, p.206-218, 1985.

HORBETT, T. A. ; WALDBURGER, J. J. ; RATNER, B. D. and HOFFMAN, A.S. , Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrofhobic copolymers studied with a spinning disc apparatus, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.22, p.383-404, 1988.

ISO 10993-5, Biological Evaluation of medical Devices - Part 5 : Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods.

KEMPSON, G. E. ; FREEMAN, M.A.R. and SWANSON, S.A.V. , The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head, *J. Biomechanics*, vol. 4, , 239-250 , 1971.

KHOR, E. ; LI, H. C. and WEE, A. , Animal tissue-polypyrrole hybrid biomaterials:shrinkage temperature evaluation, *Biomaterials*, v.17, n.19, p.1977-1980, 1996.

KIM, Y.J; BONASSAR, L.J. & GRODZINSKY, A.J. The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression, *J. Biomechanics*, v.28 n.9, p. 1055-1066, 1995.

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

KLEMPNER, D. & BERKOWSKI, L. , Interpenetrating polymer networks, Encyclopedy of Polymer Science and Engineering , Kroschwitz, J. I. (editor) , second edition, Jhon Wiley & Sons EUA, v. 8 , 1987.

KON, M. and DE VISSER,A. C. - A Poly(HEMA) sponge for restoration of articular cartilage defects - *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.67, n.5, p. 289-293., 1981.

KREDER, H. J. ; MORAN, M. ; KEELEY, F. W. and SALTER, R. B. , Biologic resurfacing of a major joint defect with cryopreserved allogeneic periosteum under the influence of continuous passive motion in a rabbit model, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 300, p. 288 - 296, 1994.

KUDELA, V. , Hydrogels, in Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, JACQUELINE I. K. (EDITOR), Wiley Interscience , p. 783-807, 2^{O} edition, 1990.

LEE, J. H. ; JUNG, H. W. KANG, I. K. and LEE, H. B. , Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups, *Biomaterials*, v. 15, n. 9, p. 705 - 711, 1994.

LIO,K. ; MINOURA, N. ; AIBA, S. ; NAGURA, M. and KODAMA, M. , Cell growth on poly(vinyl alcohol) hydrogel membranes containing biguanido groups, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.28, p.459-462, 1994.

LYDON, M. J. ; MINETT, T. W. and TIGHE, B. J. , Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture, *Biomaterials*, v.6, p. 396-402, 1985.

MAcGINITIE, L.A. ; GLUZBAND, Y.A. and GRODZINSKY, A.J. , Electric field stimulation can increase synthesis in articular cartilage explants, *J. Orthopaedic Research*, vol. 12, n.2 p.111-160, 1994.

MAINARD,D.; DELAGOUTTE, J.P.; BENICHOUX, R.; LOCHON, P. and CUNY, J., Repair of an articular cartilage Lesion by a porous biomaterial (PORIMID) - Experimental and first clinical results - 4º WORLD BIOMATERIALS CONGRESS, 1922.

MAK, A. F. ; LAI, W. M. and MOW, V.C. , Biphasic indentation of articular cartilage - I.Theoretical solution, *Journal of Biomechanics*, v.20, p.703-714, 1987.

MAROUDAS, A.; SCHNEIDERMAN, R.; WEINBERG, C. and GRUSHKO, G. , Choice of specimen in comparative studies involving human femoral heads, in Methods in Cartilage Research (Eds A. Maroudas and K. Kuettner), Academic, New York, USA, 1990, pp. 9-17.

MINNS, R,J.; MUCKLE, D.S. and DONKIM, J.E. , The repair of osteochondral defects in osteoarthritic rabbit knees by the use of carbon fibre - *Biomaterials*, v.3, p.81-86, 1982.

MORAN, M. E. ; KIM, H. K. W. and SALTER, R. B. , Biological resurfacing of full-thickness defects in patellar articular cartilage of the rabbit, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 74-B, p. 659 - 667, 1992.

MOW, V.C. ; HOLMES, M.H. and LAI, W.M., Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review, *Journal of Biomechanics*, v.17, p.377-394, 1984.

MOW, V. C. ; KUEI, S. C. ; LAI, W. M. and ARMSTRONG, C. G. , Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: Theory and experiments, *Transactions of ASME, Journal of Biomechanical Engineering*, v. 102, p. 73 - 84, feb. 1980.

MOW, V.C. and LAI, W.M. , Recent developments in synovial joint biomechanics, *SIAM Rev.*, v.22, p.275-317, 1980.

MOW, V. C. ; RACTLIFFE, A. ; ROSENWASSER, M. P. and 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.

MOW, V. C. ; RACTLIFFE, A. and POOLE, A.R. , Cartilage and diarthrodial joint as paradigms for hierarchical materials and structures, *Biomaterials*, v.13, n.2, p.67-97, 1992.

NAGAOKA, S., Mechanical properties of composite hydrogels, *Polymer Journal*, v.21, n.10, p.847-850, 1989.

NORTHUP, S.J., Mammalian cell culture models in Handbook of Biomaterials Evaluation: Scientific, technical and clinical testing of implant material, p.209-225, A.F. von Recun ed. , 1986, cit. in KIRKPATRICK, 1992.

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

PEDLEY, D.G.;SKELLEY, P.J. and TIGHE, B.J. , Hydrogels in biomedical applications, *The British Polymer Journal*, vol. 12, 99-110 (1980).

PEPPAS, N.A. ; KORSMEYER, R.W. , eds. Hydrogels in Medicine and Pharmacology, Boca Raton, Flórida , CRC Press, 1987.

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

RATNER, B.D. , Biomedical Applications of Hydrogels: Review and Critical Appraisal, in Biocompatibility of Clinical Implant Materials, vol. II, cap 7, 145-175, CRC, ed D.F. Williams, CRC, Flórida, 1981.

RATNER, B. D. and HOFFMAN, A. , Synthetic hydrogels for biomedical applications, *ACS Symposium Series*, 31, 1-36, (1976).

REGEHRX, W. G. ; PINE, J. and RUTLEDGE, D.B. , *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, V.35, p. 1023, 1988.

REISSIS, N.; KAYSER, M.; BENTLEY, G. and DOWNES, S., A hydrophylic polymer system enhanced articular cartilage regeneration *in vivo*, *Journal of Materials Science - Materials in Medicine*, v.6, p.768-772, 1995.

ROGERS, C. A. , A new philosophy of design : Intelligent material system and structures, ABSTRACTS OF THE WORLD CONGRESS ON PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, RJ, Brazil, 21-26 august p.77 1994.

SAH, R.L. ; GRODZINSKY, A.J. : Biosynthetic response to mechanical and electrical forces. In: The biology of tooth movement, pp 335-347, ed. by L.A. NORTON and C.J. BURSTONE, Boca Raton, CRC Press, 1989.

SALTER, R.B. ; SIMMONDS, D.F. ; MALCOLM, B.W. ; RUMBLE, E.J.; MACMICHAEL, D. and CLEMENTS, N.D. , The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness in articular cartilage, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.62-A, n.8, p.1232-1251, 1980.

SASADA, T. , Frictional behaviour of a total hip prosthesis containing artificial articular cartilage, *J. Japan. Soc. Biomat.*, 3, p.151-157, 1985.

SASADA,T., Biomechanics and biomaterials - Friction behaviour of an artificial articular cartilage, ABSTRACTS OF THIRD WORLD BIOMATERIALS CONGRESS, p.21-25 april, 6, 1988.

SAWTELL,R.M.; DOWNES, S. and KAYSER, M.V., An in vitro investigation of the PEMA/THFMA system using chondrocyte culture, *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, v.6, p.676-679, 1995.

SHAPIRO, F. ; KOIDE, S. and GLIMCHER, M., Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.75-A,n.4, p.532-553, 1993.

SMEATHERS, J.E. & WRIGHT, V. , New engineering concepts and alternative materials for prostheses, *Proc. Instn. Mech. Engrs*, v.204, p. 259-261, 1990.

SMETANA, K. , The influence of hydrogel functional groups on cell behaviour, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 463 - 470, 1990.

SMETANA, K. , Cell biology of hydrogels, *Biomaterials*, v. 14, n. 14, p. 1046 - 1050, 1993.

SMETANA, K. ; STOL, M. ; KORBELAR, P. ; NOVAK, M and ADAM, M. , Implantation of p(HEMA)-collagen composite into bone , *Biomaterials*, v.13, n.9, p. 639-643, 1992.

SMETANA, K. ; STOL, M. ; NOVAK, M and DANES, J. Influence of polymers containing carboxylate ions on calcification : in vitro study, *Biomaterials*, v.17, n.16, p. 1563-1566, 1996.

SOLCHAGA, L. ; FORRIOL, F. and CANADELL, J. , Réparation du cartilage articulaire par materiaux biologiques. Etude expérimentale sur le mouton, *Revue de Chirurgie Orthopédique*, v.82, n.2, p.101-107, 1996.

SPEER, D.P. ; CHVAPIL, M. ; VOLTZ, R.G. and HOLMES, M.D. , Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants, *Clinical Orthopaedics and related Research*, v.144, p.326-335, 1979.

STASTNY, K.; HORA,K. and STOL, M., Preliminary reports on use of p(HEMA)-collagen composite in maxillofacial surgery, *Biomaterials*, v.14, n.14, p.1105-1108, 1993.

SWANN, A.C. & SEEDHOM, B.B., Improved techniques for measuring the indentation and thickness of articular cartilage, *Proc. Inst. Mechanical Enginnering - part H: Journal of Engineering in Medicine*, v.203, p.143-150, 1989.

VACANTI, C.; LANGER, R.; SHLOO, B. and VACANTI, J.P., Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation *in vivo*, *Plast. Reconstr. Surg.*, v.88, p.753-759, 1991.

WACHTEL,E. F. , Articular cartilage replacement materials - 4° WORLD BIOMATERIALS CONGRESS , 1992.

WADA, M.L.F. & VIDAL, B.C. Growth and differentiation of Vero cells cultived in three-dimensional type I collagen, *Cylobios*, 67 : 101-109, 1991.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDO, S.J. ; YOUNG, R.G. ; MANSOUR, J.M. ; CAPLAN, A.I. and GOLDBERG, V.M., Mesenchymal cell-based repair of large full thickness defects of articular cartilage, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.76-A, n.4, p. 579-592, 1994.

WAKITANI, S.; KIMURA, T.; HIROOKA, A.; OCHI, T.; YONEDA, M. ; YASUI, N. ; OWAKI, H. and ONO, K. , Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.71-B, p.74-80, 1989.

WATERS, N.E., The indentation of thin rubber sheets by spherical indenters, *British Journal of Applied Physics*, v.16, p.557-563, 1965.

WILLIANS, D.F. (ed) , Definitions in Biomaterials, Proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials, Chester, England, march 3-5, 1986, Elsevier, 1987.

WITCHERLE, O. , Hydrophilic gels for biological uses - *Nature*, 185, p. 117-118, 1960.

WOO, S.L.Y. ; MOW, V.C and LAI, W.M. , Biomechanical properties of articular cartilage , in Handbook of Bioengineering, SKALAK, R. and CHIEN, S. co ed., McGraw Hill, cap 4, 1987.

ZAVREL, V. and STOL, M. , PHEMA composite as allografting material during therapy of periodontal disease: three case reports, *Biomaterials*, v.14, n.14, p.1109-1112, (1993).

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R.L.P. Cell Culture for Biochemists, Amsterdam, Elsevier, 1990.

BEIGUELMAN, B. , Curso Prático de Bioestatística, SOCIEDADE BRASILERIA DE GENÉTICA, 1988.

DORLAND'S ILLUSTRATED MEDICAL DICTIONARY, W. B. SAUNDERS Comp. , Philadelphia USA second edition, 1988.

MONTGOMERY, D. C. , Design and Analysis of Experiments, JHON WILEY & SONS, Singapore CHINA third edition, 1991.

TUREK, S. L. , Orthopaedics - Principles & applications, ed J.B. Lippencott Company , Philadelphia, 4ª edition, 1984.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Malmonge, S.M. e Zavaglia, C.A.C. , Hidrogel de PoliHEMA para Reparo de Defeitos da Cartilagem Articular. 1- Síntese e Caracterização Mecânica,
submetido para publicação na revista Polímeros Ciência e Tecnologia.

Malmonge, S.M. e Zavaglia, C.A.C. , Hidrogel Sintético capaz de Mimetizar o Comportamento Mecano - elétrico da Cartilagem Articular.
Publicado nos Anais do Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde - Campos do Jordão, outubro de 1996 vol 1, p: 39.

Malmonge, S.M.; Zavaglia, C.A.C. ; Santos, A.R. & Wada, M.L.F. , Citotoxicidade de Hidrogéis de PoliHEMA - Estudo "in vitro".
apresentado no III Encontro Nacional de Biomateriais a ser publicado nos anais.

Malmonge, S.M. e Zavaglia, C.A.C. - Hidrogéis Sintéticos para Reparo de Defeitos da Cartilagem Articular. Comportamento Mecânico a partir de Ensaios de Indentação.
Anais do 3^{0} Congresso da Associação Brasileira de Polímeros ABPol, 1995, Vol. 1 pag 455.
**** trabalho premiado com o primeiro lugar na categoria doutorado.***

Sakamoto, M.Y.; Malmonge, S.M.; Duek, E.A.R.; Zavaglia, C.A.C e Cliquet, A. - Aplicação de Polímeros em Próteses de Mão como Meio de Acionamento,
Anais do VI Congresso Brasileiro de Biomecânica, 1995, pag 324 .

Malmonge, S.M. e Zavaglia, C.A.C - Hidrogéis Sintéticos para Reparo de Defeitos da Cartilagem Articular ,
Anais do 11º CBCIMAT , 1994, vol 2, pag 1129 .

Malmonge, S.M.; Queirós, A.A. e Zavaglia, C.A.C. - Hydrogels for Artificial Articular Cartilage Obtained from Ionizing Radiation,
Anais do 2º Simpósio Ibero Americano de Polímeros /4º Simpósio Latino Americano de Polímeros - Gramado-RS , 1994, vol I , pag 534.

APÊNDICE 01 - TABELAS DE DADOS EXPERIMENTAIS

Tabela A01 - Valores experimentais de $\chi_{água}$ para poliHEMA (% p/p).

concentração de AR (%)	$\chi_{água}$ 1 (%)	$\chi_{água}$ 2 (%)	$\chi_{água}$ 3 (%)	média	desvio padrão
0	35,1	34,7	-	34,9	0,3
1,0	31,8	31,6	31,9	31,8	0,2
5,0	26,1	26,4	26,9	26,5	0,4
10,0	18,8	18,6	18,8	18,7	0,1

Tabela A02 - Valores experimentais de $\chi_{água/NaCl}$ para poliHEMA (%p/p).

concentração de AR (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 1 (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 2 (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 3 (%)	média	desvio padrão
0	31,7	33,1	32,4	32,4	0,7
1,0	31,2	30,6	31,7	31,2	0,5
5,0	24,9	25,4	24,8	25,0	0,3
10,0	16,5	15,5	16,5	16,2	0,6

Tabela A03 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de poliHEMA (AR = zero).

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	1,040	0,80	1,10	0,98	0,159
5,0	1,090	1,120	1,120	1,110	0,017
7,5	1,110	1,150	1,130	1,130	0,020
10,0	1,120	1,160	1,140	1,140	0,020
15,0	1,130	1,180	1,150	1,153	0,025
20,0	1,150	1,180	1,150	1,160	0,017
25,0	1,150	1,190	1,160	1,167	0,021
50,0	1,170	1,210	1,170	1,183	0,023
120,0	1,200	1,220	1,190	1,203	0,015
122,5	0,240	0,260	0,300	0,267	0,031
125,0	0,190	0,180	0,200	0,190	0,010
127,5	0,180	0,160	0,180	0,173	0,012
130,0	0,140	0,140	0,170	0,150	0,017
135,0	0,140	0,120	0,160	0,140	0,020
140,0	0,120	0,120	0,160	0,133	0,023

Tabela A04 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de poliHEMA (AR = 1,0).

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,770	0,600	0,740	0,703	0,091
5,0	0,800	0,790	0,830	0,807	0,021
7,5	0,810	0,800	0,840	0,817	0,021
10,0	0,810	0,800	0,850	0,820	0,026
15,0	0,820	0,810	0,850	0,823	0,025
20,0	0,820	0,810	0,850	0,823	0,025
25,0	0,820	0,810	0,860	0,830	0,026
50,0	0,830	0,820	0,860	0,837	0,021
120,0	0,830	0,820	0,870	0,840	0,026
122,5	0,040	0,060	0,070	0,057	0,015
125,0	0,030	0,050	0,060	0,047	0,015
127,5	0,030	0,040	0,060	0,043	0,015
130,0	0,030	0,040	0,060	0,043	0,015
135,0	0,030	0,040	0,060	0,043	0,015
140,0	0,030	0,040	0,060	0,040	0,015

Tabela A05 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de poliHEMA (AR = 5,0).

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,440	0,560	0,580	0,526	0,076
5,0	0,580	0,590	0,610	0,593	0,015
7,5	0,585	0,590	0,620	0,598	0,019
10,0	0,590	0,600	0,620	0,603	0,015
15,0					
20,0					
25,0					
50,0	0,600	0,601	0,630	0,613	0,015
120,0	0,600	0,601	0,630	0,613	0,015
122,5	0,070	0,070		0,070	0,015
125,0	0,060	0,060		0,060	0,015
127,5	0,050	0,050		0,050	0,015
130,0	0,050	0,040		0,045	0,015
135,0	0,040	0,040		0,040	0,007
140,0	0,040	0,040		0,040	0,007

Tabela A06 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de poliHEMA (AR = 10,0).

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	h_i	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,180			0,180	
5,0	0,280			0,280	
7,5	0,300			0,300	
10,0	0,310			0,310	
15,0	0,320			0,320	
20,0	0,320			0,320	
25,0	0,320			0,320	
50,0	0,340			0,340	
120,0	0,340			0,340	
122,5	0,120			0,120	
125,0	0,100			0,100	
127,5	0,080			0,080	
130,0	0,070			0,070	
135,0	0,060			0,060	
140,0	0,060			0,060	

Tabela A07 - Valores de Módulo de fluência a indentação calculados para amostras de poliHEMA a partir da altura de indentação medida após 2,0 segundos de aplicação da carga.

concentração de AR (%)	$E2s_1$ (MPa)	$E2s_2$ (MPa)	$E2s_3$ (MPa)	média	desvio padrão
0	0,43	0,51	0,60	0,52	0,08
1,0	0,85	0,93	-	0,88	0,10
5,0	1,35	1,66	1,92	1,64	0,30
10,0	7,66	6,18	-	6,92	1,00

Tabela A08 - Valores experimentais de $\chi_{água}$ para blenda sIPN de poliHEMA - AC (%p/p).

concentração de AC (%)	$\chi_{água}$ 1 (%)	$\chi_{água}$ 2 (%)	$\chi_{água}$ 3 (%)	média	desvio padrão
0	31,8	31,6	31,9	31,8	0,2
1,0	32,3	32,9	-	32,6	0,4
5,0	32,2	29,7	30,3	30,8	1,4
10,0	21,2	21,7	21,6	21,5	0,3

Tabela A09 - Valores experimentais de $\chi_{água/NaCl}$ para blenda sIPN de poliHEMA - AC (%p/p).

concentração de AC (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 1 (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 2 (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 3 (%)	média	desvio padrão
0	31,2	30,6	31,7	31,2	0,5
1,0	31,1	31,2	30,6	30,9	0,3
5,0	29,4	30,8	-	30,1	0,7
10,0	20,7	21,5	20,1	20,7	0,9

Tabela A10 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de blenda sIPN de poliHEMA-AC, (AR =1,0 - AC = 1,0).

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,600	0,700	0,600	0,689	0,058
5,0	0,920	0,950	1,000	0,957	0,040
7,5	0,930	0,960	1,010	0,967	0,040
10,0	0,940	0,960	1,015	0,970	0,036
15,0					
20,0		0,970	1,020		
25,0	0,950	0,970	1,020	0,980	0,036
50,0	0,960	0,980	1,020	0,987	0,031
120,0	0,970	0,990	1,030	0,997	0,056
122,5	0,200	0,090	0,140	0,143	0,055
125,0	0,100	0,080	0,070	0,083	0,015
127,5	0,090	0,070	0,040	0,067	0,025
130,0	0,080	0,060	0,040	0,060	0,020
135,0	0,08	0,060	0,040	0,060	0,020
140,0	0,080	0,060	0,040	0,060	0,020

Tabela A11 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de blenda sIPN de poliHEMA-AC, (AR =1,0 - AC = 5,0).

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,740	0,740	0,700	0,727	0,023
5,0	0,780	0,860	0,800	0,813	0,042
7,5	0,790	0,870	0,830	0,830	0,040
10,0	0,800	0,880	0,840	0,840	0,040
15,0	0,810	0,890	0,850	0,850	0,040
20,0					
25,0	0,820	0,900	0,860	0,860	0,040
50,0	0,830	0,910	0,880	0,873	0,040
120,0	0,850	0,900	0,900	0,890	0,036
122,5	0,360	0,530	0,430	0,440	0,085
125,0	0,300	0,450	0,390	0,380	0,075
127,5	0,290	0,430	0,370	0,363	0,070
130,0	0,280	0,420	0,360	0,353	0,070
135,0	0,270	0,400	0,360	0,343	0,067
140,0	0,260	0,400	0,360	0,340	0,072

Tabela A12 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de blenda sIPN de poliHEMA-AC, (AR =1,0 - AC = 10,0).

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,500	0,600	0,720	0,607	0,110
5,0	0,600	0,740	0,820	0,720	0,111
7,5	0,610	0,770	0,840	0,740	0,118
10,0	0,620	0,780	0,850	0,750	0,118
15,0		0,790	0,860	0,757	0,123
20,0	0,630	0,800	0,870	0,763	0,119
25,0				0,780	
50,0	0,650	0,810	0,880	0,793	0,118
120,0	0,660	0,820	0,900	0,363	0,122
122,5	0,200	0,400	0,490	0,333	0,148
125,0	0,190	0,350	0,460	0,320	0,136
127,5	0,180	0,340	0,440	0,317	0,131
130,0	0,180	0,330	0,440	0,317	0,131
135,0	0,170	0,320	0,430	0,307	0,131
140,0	0,150	0,320	0,420	0,297	0,137

Tabela A13 - Valores de Módulo de fluência a indentação calculados para amostras de blenda sIPN de poliHEMA-AC, a partir da altura de indentação medida após 2,0 segundos de aplicação da carga.

concentração de AC (%)	$E2s_1$ (MPa)	$E2s_2$ (MPa)	$E2s_3$ (MPa)	média	desvio padrão
0	0,89	-	0,87	0,88	0,01
1,0	0,72	0,68	0,62	0,67	0,05
5,0	0,98	0,82	0,93	0,91	0,08
10,0	1,61	1,08	0,89	1,19	0,37

Tabela A14 - Valores experimentais de $\chi_{água}$ para blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) (%p/p).

concentração de poli(MMA-co-AA) (%)	$\chi_{água}$ 1 (%)	$\chi_{água}$ 2 (%)	$\chi_{água}$ 3 (%)	média	desvio padrão
0	31,8	31,6	31,9	31,8	0,2
2,5	30,1	30,4	30,9	30,3	0,02
5,0	32,3	33,3	31,7	32,4	0,8
10,0	28,6	27,9	28,3	28,3	0,3

Tabela A15 - Valores experimentais de $\chi_{água/NaCl}$ para blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) (%p/p).

concentração de poli(MMA-co-AA) (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 1 (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 2 (%)	$\chi_{água/NaCl}$ 3 (%)	média	desvio padrão
0	31,2	30,6	31,7	31,2	0,5
2,5	29,6	30,2	29,9	29,7	0,4
5,0	30,8	31,1	30,7	30,8	0,2
10,0	23,4	24,8	23,9	24,0	0,7

Tabela A16 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) - [AR =1,0 - poli(MMA-co-AA) = 2,5].

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,560	0,500	0,460	0,507	0,050
5,0	0,680	0,640	0,620	0,647	0,031
7,5	0,690	0,660	0,630	0,660	0,030
10,0	0,690	0,670	0,640	0,667	0,025
15,0		0,680			
20,0					
25,0	0,700	0,680	0,650	0,667	0,025
50,0	0,701	0,700	0,660	0,680	
120,0	0,720	0,680	0,680	0,707	0,023
122,5	0,060	0,080	0,080	0,083	0,025
125,0	0,060	0,080	0,080	0,080	0,020
127,5	0,060	0,070	0,070	0,073	0,015
130,0	0,050	0,070	0,070	0,070	0,020
135,0	0,050	0,060	0,060	0,067	0,021
140,0	0,050	0,060	0,060	0,067	0,021

Tabela A17 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) - [AR =1,0 - poli(MMA-co-AA) =5,0].

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0
2,5	0,550	0,600		0,575	0,035
5,0	0,660	0,690		0,675	0,021
7,5	0,670	0,700		0,685	0,021
10,0	0,680	0,710		0,695	0,021
15,0	0,680				
20,0	0,690	0,720		0,705	0,021
25,0	0,700	0,730			
50,0	0,710	0,730		0,720	0,014
120,0	0,720	0,750		0,735	0,021
122,5	0,120	0,160		0,140	0,028
125,0	0,120	0,150		0,135	0,021
127,5	0,110	0,140		0,125	0,021
130,0	0,110	0,140		0,125	0,021
135,0	0,100	0,140		0,120	0,028
140,0	0,100	0,140		0,120	0,028

Tabela A18 - Valores experimentais de altura de indentação obtidos a partir de ensaios de fluência a indentação em amostra de blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) - [AR =1,0 - poli(MMA-co-AA) = 10,0].

tempo (seg)	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_3 (mm)	h_i (mm)	desvio padrão
0	0			0	
2,5	0,180			0,180	
5,0	0,380			0,380	
7,5	0,450			0,450	
10,0	0,470			0,470	
15,0	0,490			0,490	
20,0	0,490			0,490	
25,0	0,500			0,500	
50,0	0,520			0,520	
120,0	0,550			0,550	
122,5	0,180			0,180	
125,0	0,170			0,170	
127,5	0,150			0,150	
130,0	0,140			0,140	
135,0	0,140			0,140	
140,0	0,140			0,140	

Tabela A19 - Valores de Módulo de fluência a indentação calculados para amostras de blenda sIPN de poliHEMA-poli(MMA-co-AA), a partir da altura de indentação medida após 2,0 segundos de aplicação da carga.

concentração de MMA/AA (%)	$E2s_1$ (MPa)	$E2s_2$ (MPa)	$E2s_3$ (MPa)	média	desvio padrão
0	0,89	0,87	-	0,88	0,01
2,5	1,27	1,42	1,51	1,40	0,12
5,0	1,34	1,23	-	1,29	0,08
10,0	4,46	3,25	-	3,86	0,90

Tabela A20 - Número de animais utilizados e tempos de seguimento do ensaio *in vivo*.

Grupos / tempo de seguimento (semanas)	nº de animais por grupo
G5 - 03 semanas	05
G4 - 05 semanas	05
G3 - 08 semanas	05
G2 - 12 semanas	05
G1 - 16 semanas	05

Tabela A21 - Ensaio *in vivo* - análise macroscópica das superfícies articulares dos côndilos com implante e côndilos controle.

	côndilos com implante (25)			côndilos controle (25)	
grupos	permanência no local	recobrimento com tecido	fratura do implante	houve reparação	depressão superficial
G5	05	04	0	05	05
G4	05	04	0	05	05
G3	05	02	03	05	04
G2	05	03	0	05	04
G1	05	01	0	05	03
total	25	14	03	25	19
percentual	100 %	56 %	12 %	100 %	76 %

Tabela A22 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão espécimes (fêmur) com implante, após 03 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,038	0,005	0,025	0,020	0,040	0,026	0,006
12,5	0,104	0,050	0,013	0,05	0,040	0,050	0,041	0,007
20,0	0,166	0,075	0,030	0,062	0,060	0,070	0,059	0,008
30,0	0,249	0,088	0,060	0,100	0,080	0,080	0,082	0,006
37,5	0,300	0,110	0,080	0,150	0,110	0,100	0,110	0,011
45,0	0,300	0,100	0,070	0,120	0,097	0,095	0,096	0,008
55,0	0,300	0,100	0,070	0,120	0,097	0,090	0,095	0,008
65,0	0,300	0,100	0,065	0,115	0,090	0,090	0,092	0,008
75,0	0,300	0,080	0,065	0,115	0,090	0,080	0,086	0,008
125,0	0,300	0,080	0,065	0,115	0,090	0,0800	0,086	0,008

Tabela A23- Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - controle, após 03 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,050	0,025		0,037	0,038	0,037	0,010
12,5	0,104	0,125	0,125	0,035	0,090	0,100	0,095	0,037
20,0	0,166	0,200	0,225	0,075	0,170	0,200	0,174	0,058
30,0	0,249	0,325	0,300	0,110	0,240	0,250	0,245	0,083
37,5	0,300	0,400	0,325	0,160	0,280	0,300	0,293	0,087
45,0	0,300	0,360	0,300	0,150	0,270	0,280	0,272	0,077
55,0	0,300	0,350	0,300	0,138	0,260	0,270	0,263	0,078
65,0	0,300	0,350	0,300	0,138	0,260	0,260	0,261	0,078
75,0	0,300	0,335	0,300	0,135	0,250	0,260	0,256	0,076
125,0	0,300	0,335	0,300	0,135	0,250	0,260	0,256	0,076

Tabela A24 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão espécimes (fêmur) - cartilagem normal, após 03 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,125	0,125	0,075	0,100	0,100	0,105	0,021
12,5	0,104	0,250	0,225	0,200	0,250	0,230	0,231	0,021
20,0	0,166	0,325	0,300	0,250	0,425	0,320	0,324	0,064
30,0	0,249	0,450	0,425	0,375	0,600	0,460	0,462	0,084
37,5	0,300	0,550	0,525	0,500	0,650	0,550	0,555	0,057
45,0	0,300	0,525	0,500	0,500	0,700	0,550	0,555	0,084
55,0	0,300	0,525	0,450	0,475	0,675	0,530	0,531	0,087
65,0	0,300	0,500	0,450	0,475	0,675	0,530	0,526	0,088
75,0	0,300	0,500	0,425	0,475	0,650	0,520	0,514	0,0854
125,0	0,300	0,500	0,425	0,475	0,650	0,520	0,514	0,084

Tabela A25 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) com implante, após 05 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,025	0,025	0,012	0,021	0,020	0,021	0,005
12,5	0,104	0,060	0,050	0,038	0,040	0,050	0,048	0,009
20,0	0,166	0,100	0,083	0,075	0,080	0,090	0,086	0,010
30,0	0,249	0,150	0,150	0,100	0,130	0,150	0,136	0,022
37,5	0,300	0,180	0,150	0,150	0,160	0,160	0,160	0,012
45,0	0,300	0,175	0,125	0,145	0,150	0,160	0,151	0,019
55,0	0,300	0,175	0,125	0,145	0,150	0,155	0,150	0,018
65,0	0,300	0,175	0,125	0,140	0,150	0,155	0,149	0,019
75,0	0,300	0,170	0,125	0,140	0,142	0,150	0,145	0,016
125,0	0,300	0,170	0,125	0,140	0,142	0,150	0,145	0,016

Tabela A26 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - controle, após 05 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,150	0,100	0,050	0,125	0,110	0,107	0,037
12,5	0,104	0,350	0,200	0,200	0,400	0,290	0,288	0,089
20,0	0,166	0,500	0,375	0,350	0,650	0,470	0,469	0,119
30,0	0,249	0,675	0,600	0,600	0,800	0,670	0,669	0,082
37,5	0,300	0,775	0,800	0,825	0,900	0,850	0,807	0,021
45,0	0,300	0,738	0,750	0,812	0,880	0,800	0,770	0,029
55,0	0,300	0,725	0,750	0,800	0,800	0,800	0,757	0,027
65,0	0,300	0,700	0,750	0,800	0,750	0,750	0,750	0,035
75,0	0,300	0,700	0,725	0,750	0,725	0,750	0,726	0,018
125,0	0,300	0,700	0,725	0,750	0,725	0,750	0,724	0,018

Tabela A27 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - cartilagem normal, após 05 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,150	0,150	0,100	0,050	0,110	0,112	0,041
12,5	0,104	0,475	0,475	0,375	0,200	0,380	0,381	0,112
20,0	0,166	0,775	0,750	0,550	0,350	0,610	0,607	0,172
30,0	0,249	1,075	1,100	0,850	0,550	0,890	0,893	0,221
37,5	0,300	1,175	1,250	0,975	0,725	1,030	1,031	0,203
45,0	0,300	1,175	1,212	0,950	0,800	1,030	1,033	0,168
55,0	0,300	1,175	1,200	0,950	0,775	0,990	1,018	0,175
65,0	0,300	1,030	1,175	0,950	0,775	0,980	0,982	0,144
75,0	0,300	1,025	1,175	0,925	0,750	0,970	0,969	0,154
125,0	0,300	1,025	1,150	0,925	0,750	0,970	0,964	0,146

Tabela A28 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) com implante, após 08 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,050	0,055	0,045	0,050	0,040	0,062	0,011
12,5	0,104	0,100	0,150	0,160	0,090	0,100	0,155	0,059
20,0	0,166	0,150	0,180	0,200	0,160	0,180	0,222	0,068
30,0	0,249	0,170	0,280	0,250	0,180	0,200	0,245	0,069
37,5	0,300	0,175	0,300	0,300	0,190	0,280	0,274	0,094
45,0	0,300	0,165	0,280	0,260	0,180	0,250	0,261	0,089
55,0	0,300	0,150	0,280	0,250	0,165	0,220	0,247	0,089
65,0	0,300	0,150	0,280	0,250	0,160	0,200	0,237	0,079
75,0	0,300	0,150	0,200	0,240	0,160	0,200	0,235	0,079
125,0	0,300	0,150	0,200	0,240	0,160	0,200	0,235	0,079

Tabela A29 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - controle, após 08 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,075	0,200	0,150	0,140	0,080	0,129	0,052
12,5	0,104	0,250	0,425	0,500	0,450	0,300	0,385	0,105
20,0	0,166	0,475	0,530	0,750	0,580	0,500	0,567	0,109
30,0	0,249	0,675	0,675	1,000	0,780	0,600	0,746	0,156
37,5	0,300	0,800	0,750	1,200	0,920	0,720	0,878	0,195
45,0	0,300	0,762	0,725	1,150	0,880	0,700	0,843	0,185
55,0	0,300	0,740	0,725	1,125	0,860	0,680	0,826	0,180
65,0	0,300	0,725	0,700	1,100	0,850	0,600	0,795	0,192
75,0	0,300	0,700	0,700	1,075	0,830	0,600	0,781	0,183
125,0	0,300	0,700	0,700	1,075	0,830	0,600	0,781	0,183

Tabela A30 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - cartilagem normal, após 08 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0		0	0
5,0	0,041	0,050	0,025	0,037	0,060		0,043	0,015
12,5	0,104	0,150	0,080	0,120	0,180		0,132	0,043
20,0	0,166	0,250	0,160	0,200	0,300		0,228	0,061
30,0	0,249	0,335	0,300	0,320	0,350		0,326	0,021
37,5	0,300	0,420	0,400	0,400	0,430		0,412	0,015
45,0	0,300	0,400	0,325	0,360	0,400		0,371	0,036
55,0	0,300	0,375	0,320	0,350	0,375		0,355	0,026
65,0	0,300	0,350	0,312	0,330	0,350		0,335	0,018
75,0	0,300	0,325	0,300	0,310	0,350		0,321	0,022
125,0	0,300	0,325	0,300	0,310	0,350		0,321	0,022

Tabela A31 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) com implante, após 12 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,025	0,025	0,250	0,025	0,025	0,025	
12,5	0,104	0,050	0,050	0,075	0,062	0,060	0,059	0,010
20,0	0,166	0,100	0,100	0,175	0,100	0,120	0,119	0,032
30,0	0,249	0,200	0,180	0,275	0,200	0,210	0,213	0,036
37,5	0,300	0,250	0,250	0,350	0,300	0,290	0,288	0,041
45,0	0,300	0,250	0,250	0,325	0,280	0,280	0,277	0,031
55,0	0,300	0,250	0,250	0,325	0,279	0,270	0,275	0,031
65,0	0,300	0,250	0,250	0,300	0,275	0,270	0,269	0,021
75,0	0,300	0,250	0,250	0,300	0,275	0,270	0,269	0,021
125,0	0,300	0,250	0,250	0,300	0,275	0,270	0,269	0,021

Tabela A32 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - controle, após 12 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,175	0,075	0,125	0,125	0,125	0,125	0,035
12,5	0,104	0,425	0,300	0,363	0,350	0,360	0,359	0,044
20,0	0,166	0,650	0,500	0,575	0,550	0,570	0,569	0,054
30,0	0,249	0,850	0,800	0,825	0,800		0,819	0,021
37,5	0,300	0,950	0,975	0,963	0,950	0,980	0,962	0,011
45,0	0,300	0,875	0,912	0,893	0,880	0,900	0,890	0,014
55,0	0,300	0,850	0,900	0,875	0,850	0,880	0,871	0,019
65,0	0,300	0,825	0,888	0,856	0,820	0,850	0,853	0,023
75,0	0,300	0,825	0,888	0,856	0,800	0,850	0,850	0,025
125,0	0,300	0,825	0,888	0,856	0,800	0,850	0,850	0,025

Tabela A33 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - cartilagem normal, após 12 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,075	0,125	0,100	0,080	0,095	0,095	0,020
12,5	0,104	0,300	0,350	0,320	0,300	0,320	0,318	0,020
20,0	0,166	0,500	0,600	0,550	0,500	0,530	0,536	0,041
30,0	0,249	0,675	0,850	0,700	0,600	0,710	0,707	0,091
37,5	0,300	0,775	1,025	0,800	0,700	0,830	0,826	0,121
45,0	0,300	0,625	0,825	0,750	0,650	0,710	0,712	0,080
55,0	0,300	0,586	0,800	0,700	0,600	0,670	0,671	0,086
65,0	0,300	0,550	0,775	0,650	0,580	0,640	0,639	0,086
75,0	0,300	0,525	0,775	0,600	0,550	0,610	0,612	0,098
125,0	0,300	0,525	0,775	0,600	0,550	0,610	0,612	0,098

Tabela A34 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) com implante, após 16 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,050	0,025	0,050	0,050	0,030	0,041	0,012
12,5	0,104	0,150	0,100	0,100	0,175	0,120	0,129	0,033
20,0	0,166	0,250	0,200	0,160	0,250	0,200	0,212	0,038
30,0	0,249	0,350	0,280	0,250	0,300	0,260	0,288	0,039
37,5	0,300	0,400	0,350	0,280	0,325	0,300	0,331	0,047
45,0	0,300	0,375	0,330	0,260	0,300	0,280	0,309	0,045
55,0	0,300	0,350	0,330	0,250	0,300	0,280	0,302	0,039
65,0	0,300	0,350	0,325	0,212	0,280	0,260	0,285	0,054
75,0	0,300	0,325	0,300	0,200	0,250	0,260	0,267	0,048
125,0	0,300	0,325	0,300	0,200	0,250	0,260	0,267	0,048

Tabela A35 - Valores experimentais de deformação e carga ao longo do tempo medidos em ensaios de tensão x deformação e relaxação de tensão para espécimes (fêmur) - controle, após 16 semanas de seguimento.

tempo (seg)	deformação (mm)	R1 carga (Kgf)	R2 carga (Kgf)	R3 carga (Kgf)	R4 carga (Kgf)	R5 carga (Kgf)	média	desvio padrão
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5,0	0,041	0,050	0,150	0,120	0,050	0,125	0,99	0,046
12,5	0,104	0,175	0,350	0,320	0,200	0,275	0,264	0,075
20,0	0,166	0,375	0,500	0,400	0,400	0,400	0,415	0,049
30,0	0,249	0,550	0,675	0,650	0,600	0,575	0,610	0,052
37,5	0,300	0,700	0,780	0,740	0,700	0,700	0,724	0,036
45,0	0,300	0,675	0,750	0,700	0,680	0,675	0,696	0,032
55,0	0,300	0,650	0,725	0,680	0,660	0,650	0,673	0,032
65,0	0,300	0,625	0,700	0,660	0,640	0,640	0,653	0,029
75,0	0,300	0,600	0,700	0,650	0,620	0,640	0,642	0,038
125,0	0,300	0,600	0,700	0,650	0,620	0,640	0,642	0,038

APÊNDICE A2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

VALIDAÇÃO DOS DADOS - Análise de Chauvenet para verificação da necessidade de rejeição de valores.

Para tanto foi escolhido os pontos das curvas de relaxação de tensão que representam os valores de carga medido no tempo de 20 segundos (tabelas A22 - A36). Este ponto foi escolhido porque foi utilizado no cálculo do módulo elástico do material.

Para cada grupo de espécimes foi calculado :

$$DR = | y_i - y_{med} | / S$$

tomando-se y_i para t=20s , y_{med} e S calculados para cada grupo.

Se $DR > DR_0$ => y_i foi rejeitado

Se $DR < DR_0$ => y_i foi mantido

sendo que para $n = 5$ => $DR_0 = 1,65$

- implante

seguimento	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5
3	0,89	***1,68***	0,14	0,03	0,60
5	1,48	0,26	1,09	0,58	0,45
8	1,23	0,31	1,33	0,72	0,31
12	0,59	0,59	***1,72***	0,59	0,03
16	0,99	0,31	1,36	0,99	0,31

- controle

seguimento	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5
3	0,44	0,87	**1,68**	0,07	0,44
5	0,26	0,79	0,99	1,52	0,01
8	0,84	0,34	**1,67**	0,12	0.62
12	1,50	1,27	0,11	0,35	0,02
16	0,82	**1,74**	0,31	0,31	0,31

- cartilagem

seguimento	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5
3	0,02	0,38	1,16	1,58	0,06
5	0,98	0,83	0,33	1,50	0,02
8	0,37	1,11	0,45	1,19	-
12	0,86	1,53	0,34	0,87	0,14
16	1,23	0,82	0,41	0,41	1,22

Assim, novas tabelas de dados foram montadas, e estes passaram a ser utilizados na construção das curvas médias de cada grupo e na análise do comportamento do defeito controle, implante e cartilagem normal ao longo do tempo de seguimento.

- implante

seguimento (semanas)	y_{R1}	y_{R2}	y_{R3}	y_{R4}	y_{R5}	$y_{médio}$	s	s^2
03	0,075	-	0,062	0,060	0,070	0,067	0,007	0,004
05	0,100	0,083	0,075	0,080	0,090	0,086	0,010	0,004
08	0,150	0,180	0,200	0,160	0,180	0,174	0,019	0,009
12	0,100	0,100	-	0,100	0,120	0,105	0,010	0,005
16	0,250	0,200	0,160	0,250	0,200	0,212	0,038	0,017

- controle

seguimento (semanas)	y_{R1}	y_{R2}	y_{R3}	y_{R4}	y_{R5}	$y_{médio}$	s	s^2
03	0,200	0,225	-	0,170	0,200	0,199	0,023	0,011
05	0,500	0,375	0,350	0,650	0,470	0,469	0,119	0,053
08	0,475	0,530	-	0,580	0,500	0,521	0,045	0,022
12	0,650	0,500	0,575	0,550	0,570	0,569	0,054	0,242
16	0,375	-	0,400	0,400	0,400	0,394	0,013	0,006

- cartilagem normal

seguimento (semanas)	y_{R1}	y_{R2}	y_{R3}	y_{R4}	y_{R5}	$y_{médio}$	s	s^2
03	0,325	0,300	0,250	0,425	0,320	0,324	0,064	0,028
05	0,775	0,750	0,550	0,350	0,610	0,607	0,172	0,077
08	0,250	0,160	0,200	0,300	-	0,227	0,061	0,030
12	0,500	0,600	0,550	0,500	0,530	0,563	0,042	0,019
16	0,350	0,225	0,300	0,300	0,200	0,275	0,061	0,027

Teste de igualdade das variâncias

S^2_1 menor valor de variância para a amostra

S^2_2 maior valor de variância para a amostra

$$F = S^2_1 / S^2_2$$

Teste : Se $F < F_{crítico}$ => S^2 não diferem significativamente

amostra	S^2_1	S^2_2	$F = S^2_1 / S^2_2$
implante	0,004	0,017	0,235
controle	0,022	0,053	0,415
cartilagem	0,019	0,077	0,244

$F_{crítico}$ = 15,44 (tabela de valores críticos de F ao nível de 2,5 % de probabilidade - BEIGUELMAN , 1988)

CONCLUSÃO : Assim, conclui-se que ao nível de 5,0 % as variâncias podem ser consideradas semelhantes.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA - Verificação da desigualdade entre as médias das cinco populações (5 tempos de seguimento) para o implante, controle e cartilagem normal.

1 - ANOVA (ORIGIN v.4.0)

critérios :

- independencia das observações (curvas levantadas a partir de espécimes diferentes)
- igualdade de s^2
- normalidade (neste caso assumindo que os dados seguem uma distribuição normal)

- IMPLANTE PARA DIFERENTES TEMPOS DE SEGUIMENTO

One-Way ANOVA on col(tres) -> col(dezesseis):

Data	Mean	Variance	N
tres	0,06675	4,89167E-5	4
cinco	0,0856	9,43E-5	5
oito	0,174	3,8E-4	5
doze	0,105	1E-4	4
dezesseis	0,212	0,00147	5

F = 39,1386
p = 1,19612E-8

At the 0,05 level, the means are significantly different.

- DEFEITO CONTROLE PARA DIFERENTES TEMPOS DE SEGUIMENTO

One-Way ANOVA on col(tres) -> col(dezesseis):

Data	Mean	Variance	N
tres	0,19875	5,0625E-4	4
cinco	0,469	0,01418	5
oito	0,52125	0,00204	4
doze	0,569	0,00293	5
dezesseis	0,39375	1,5625E-4	4

F = 19,71714
p = 3,29051E-6

At the 0,05 level, the means are significantly different.

- CARTILAGEM ARTICULAR PARA DIFERENTES TEMPOS DE SEGUIMENTO

One-Way ANOVA on col(tres) -> col(dezesseis):

Data	Mean	Variance	N
tres	0,324	0,00407	5
cinco	0,607	0,0295	5
oito	0,2275	0,00369	4
doze	0,536	0,00173	5
dezesseis	0,275	0,00375	5

F = 15,13054
p = 1,02078E-5

At the 0,05 level, the means are significantly different.

Assim sendo, pode-se afirmar que ao nível de 5,0%, as médias para os diferentes tempos de seguimento são diferentes no caso do defeito controle, implante e cartilagem normal.

2 - KRUSKAL - WALLIS - análise não paramétrica

Este teste é uma alternativa não paramétrica à análise de variância que pode ser aplicado quando a consideração de normalidade não pode ser justificada. É um teste que utiliza a hipótese nula de que os tratamentos são idênticos contra a hipótese alternativa de que os tratamentos geram observações diferentes. O procedimento e exemplos de aplicação deste teste pode ser encontrado na bibliografia citada, MONTGOMERY, D. C. , 1991.

No caso deste experimento foi utilizado um pequeno número de amostras (n=5), o que dificulta a afirmação de distribuição normal dos dados.

O teste estatístico é :

$$H = \frac{1}{s^2}\left[\sum_{i=1}^{a}\frac{Ri.^2}{ni} - \frac{N(N+1)^2}{4}\right]$$

onde ni = número de observações do i-ésimo tratamento;

N = número total de observações (0< i <a)

Ri. = somatório de Rij;

Rij = transformada "Rank"da observação y_{ij} (0<j<ni) ;

$$S^2 = \frac{1}{N-1}\left[\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{ni} Rij^2 - \frac{N(N+1)^2}{4}\right]$$

Se $H > \chi^2_{\alpha, a-1}$, a hipótese nula é rejeitada, isto é, as médias são diferentes.

obs. valores de $\chi^2_{\alpha, a-1}$ são encontrados nas tabelas de distribuição de χ^2.

Aplicando este teste para analisar as médias obtidas para diferentes tempos de seguimento nos casos de defeito controle, implante e cartilagem normal, pode se afirmar que a nível de 1,0% as médias são diferentes para os tres casos.

- implante

03 semanas		05 semanas		08 semanas		12 semanas		16 semanas	
y_{1j}	$\mathbf{R_{1j}}$	y_{2j}	$\mathbf{R_{2j}}$	y_{3j}	$\mathbf{R_{3j}}$	y_{4j}	$\mathbf{R_{4j}}$	y_{5j}	$\mathbf{R_{5j}}$
0,075	**4,5**	0,100	**10,5**	0,150	**14**	0,100	**10,5**	0,250	**22,5**
-	-	0,080	**6,5**	0,180	**17,5**	0,100	**10,5**	0,200	**20,0**
0,060	**1,5**	0,075	**4,5**	0,200	**20,0**	-	-	0,160	**15,5**
0,060	**1,5**	0,080	**6,5**	0,160	**15,5**	0,100	**10,5**	0,250	**22,5**
0,070	**22,5**	0,090	**20,0**	0,180	**15,5**	0,120	**22,5**	0,200	**20,0**
$\mathbf{R_{i.}}$	**30,0**		**48,0**		**82,5**		**54,0**		**100.5**

$S^2 = 95,7$; $H = 15,5 > \chi_{0,01;\,4} = 13,3$

- controle

03 semanas		05 semanas		08 semanas		12 semanas		16 semanas	
y_{1j}	$\mathbf{R_{1j}}$	y_{2j}	$\mathbf{R_{2j}}$	y_{3j}	$\mathbf{R_{3j}}$	y_{4j}	$\mathbf{R_{4j}}$	y_{5j}	$\mathbf{R_{5j}}$
0,200	**2,5**	0,500	**14,0**	0,475	**12,0**	0,650	**21,5**	0,375	**6,5**
0,225	**4,0**	0,375	**6,5**	0,530	**16,0**	0,500	**14,0**	-	-
-	-	0,350	**5,0**	-	-	0,575	**19,0**	0,400	**9,0**
0,170	**1,0**	0,650	**21,5**	0,580	**20,0**	0,550	**17,0**	0,400	**9,0**
0,200	**2,5**	0,470	**11,0**	0,500	**14,0**	0,570	**18,0**	0,400	**9,0**
$\mathbf{R_{i.}}$	**10,0**		**58,0**		**62,0**		**89,5**		**36,0**

$S^2 = 38,6$; $H = 16,4 > \chi_{0,01;\,4} = 13,3$

- cartilagem normal

03 semanas		05 semanas		08 semanas		12 semanas		16 semanas	
y_{1j}	$\mathbf{R_{1j}}$	y_{2j}	$\mathbf{R_{2j}}$	y_{3j}	$\mathbf{R_{3j}}$	y_{4j}	$\mathbf{R_{4j}}$	y_{5j}	$\mathbf{R_{5j}}$
0,325	**12,0**	0,775	**24,0**	0,250	**5,5**	0,500	**16,5**	0,350	**13,5**
0,300	**8,5**	0,750	**23,0**	0,160	**1,0**	0,600	**21,0**	0,225	**4,0**
0,250	**5,5**	0,550	**19,5**	0,200	**2,5**	0,550	**19,5**	0,300	**8,5**
0,425	**15,0**	0,350	**13,5**	0,300	**8,5**	0,500	**16,5**	0,300	**8,5**
0,320	**11,0**	0,610	**22,0**	-	-	0,530	**18,0**	0,200	**2,5**
$\mathbf{R_{i.}}$	**52,0**		**102,0**		**17,5**		**91,5**		**37,0**

$S^2 = 49,7$; $H = 18,0 > \chi_{0,01;\,4} = 13,3$

REGRESSÃO LINEAR

Finalmente, uma vez tendo sido verificado que as médias diferem para os tempos de seguimento utilizados, foi aplicada a regressão linear para avaliar a influência do tempo de seguimento.

- implante : $Yi = 0,049 + 0,0091\ ts$ com coeficiente de correlação = 0,777
- controle : $Yc = 0,326 + 0,0118\ ts$ com coeficiente de correlação = 0,429
- cartilagem normal : $Yn = 0,447 - 0,0061\ ts$ com coeficiente de correlação = -0,190

Assim, verificou-se que para o implante e para o controle, houve uma tendência de aumento de Y com o tempo de seguimento (ts), o que não aconteceu para a cartilagem normal, apesar da média ter sido diferente para cada grupo.