

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR ..Andrea Rodrigues..
..Esposito..... E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM ..25.10.2010.


.....
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

**Crescimento de fibrocondrócitos sobre
arcabouço de PLDLA/PCL-T para aplicação
como prótese de menisco**

Autor: Andrea Rodrigues Esposito
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Crescimento de fibrocondrócitos sobre arcabouço de PLDLA/PCL-T para aplicação como prótese de menisco

Autor: Andrea Rodrigues Esposito

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Curso: Engenharia Mecânica

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2010
S.P. – Brasil

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

E65c Esposito, Andrea Rodrigues
Crescimento de fibrocondrócitos sobre arcabouço de
PLDLA/PCL-T para aplicação como prótese de menisco
/ Andrea Rodrigues Esposito. --Campinas, SP: [s.n.],
2010.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Fibrocondrócitos. 2. Menisco (Anatomia). 3.
Polímeros na medicina. 4. Biomateriais. I. Duek, Eliana
Aparecida de Rezende. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III.
Título.

Título em Inglês: Fibrochondrocytes ingrowth on PLDLA/PCL-T scaffolds as
meniscus prosthesis

Palavras-chave em Inglês: Fibrochondrocytes, Meniscus (anatomy), Medical
polymers, Biomaterials

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior, Cecília Amélia de
Carvalho Zavaglia

Data da defesa: 25/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO

**Crescimento de fibrocondrócitos sobre
arcabouço de PLDLA/PCL-T para aplicação
como prótese de menisco**

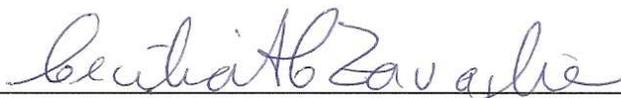
Autor: Andrea Rodrigues Esposito

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

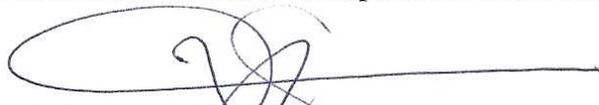
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Prof. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek
Universidade Estadual de Campinas/FEM/DEMA, Campinas, SP.



Prof. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Universidade Estadual de Campinas/FEM/DEMA, Campinas, SP.



Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior
Universidade Federal do ABC, Santo André, SP.

Campinas, 25 de fevereiro de 2010.

Dedicatória:

Dedico este trabalho em especial a minha família, meus irmãos Adriano e Isabela, ao meu namorado e meus avós. A vocês, a quem muito amo, ofereço esta conquista.

Agradecimentos

Agradeço a todos pelo carinho não somente nestes dois anos, mas sempre:

Aos meus pais que acompanharam o meu crescimento e apoiaram minhas metas.

Aos meus queridos e maravilhosos avós que sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao meu namorado por toda a compreensão, expectativa e carinho.

A minha orientadora, que depois de muito trabalho, estudo, viagens e dedicação, me deu o necessário incentivo para atingir todos os objetivos. Em você encontro palavras de orientação. Obrigada!

A todos os professores pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Luigi Ambrosio e Dr. Antonio Gloria pela oportunidade, carinho e atenção especial.

Aos meus queridos amigos e colegas de trabalho que estiveram comigo nos dias e horas simples, a todos os pequenos gestos e pequenas atenções que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação, meu reconhecimento e gratidão.

Aos alunos Marlon Moda, Silvia Cattani, Diego Silva, Gracy Santana, Bruna Más, Cintia Cristina Santos, Lucas Moura e André Messias pela convivência, incentivo, amizade e precisão na execução do trabalho.

Ao Dr. Túlio Cardoso pelo acompanhamento e oportunas sugestões no trabalho.

A Professora Dra. Maria Lourdes Peris Barbo e as alunas Juliana Barbieri e Monique Munhoz pela avaliação histopatológica.

A todos os funcionários da patologia, em especial a Cris, Vilma e Rose, que me receberam sempre tão bem, auxiliando nos procedimentos experimentais.

Ao Dr. Nelson Brancaccio pela atenção e apoio.

A Claudinete pela atenção e dedicação nas longas horas de microscopia.

Ao senhor Valdir e Reginaldo pela dedicação e disponibilidade, sempre atenciosos comigo.

A todo grupo do Laboratório de Biomateriais da PUC/SP pelas alegrias, desafios e vitórias.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** pela a bolsa concedida n° do processo 2008/01963-9.

Ao Instituto de Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofabricação - **BIOFABRIS** pelo financiamento.

“Há uma grandeza nessa visão de vida... a partir de um início tão simples, infinitas formas, as mais belas e mais maravilhosas evoluíram e continuam evoluindo”

Charles Darwin

Resumo

ESPOSITO, Andrea Rodrigues, *Crescimento de fibrocondrócitos sobre arcabouço de PLDLA/PCL-T para aplicação como prótese de menisco*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 117 p. Dissertação (Mestrado).

A engenharia tecidual utilizando células fibrocartilaginosas e arcabouços poliméricos representa uma alternativa para o tratamento de lesões do menisco. Neste estudo, arcabouços de PLDLA/PCL-T (90/10) contendo sacarose (50% m/v) foram obtidos por evaporação de solvente. Fibrocondrócitos provenientes do menisco de coelhos foram isolados e semeados diretamente sobre os arcabouços. Estudos *in vitro* demonstraram que o arcabouço não apresentou citotoxicidade e permitiu a adesão e o crescimento de fibrocondrócitos, bem como manutenção da síntese de matriz extracelular colágena nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo. Os implantes de PLDLA/PCL-T foram realizados no menisco medial do joelho de 20 coelhos, após a meniscectomia total, obtendo-se três tratamentos: arcabouço com pré-cultivo celular por 21 dias, arcabouço sem células e controle. Após 12 e 24 semanas, as análises histológicas dos “neomeniscos” apresentaram a formação de fibrocartilagem nos implantes com os arcabouços. A presença de tecido fibrocartilaginoso maduro com fibras colágenas organizada foi predominantemente observada nos implantes realizados com os arcabouços pré-cultivados em comparação com os implantes sem células após 24 semanas. Este estudo demonstrou que a regeneração de uma importante estrutura fibrocartilaginosa pode ser alcançada utilizando arcabouço polimérico biorreabsorvível e células alógenas dentro dos princípios da engenharia de tecidos.

Palavras Chave: PLDLA/PCL-T, Cultura de Fibrocondrócitos, Estudo *in vivo*, Menisco.

Abstract

ESPOSITO, Andrea Rodrigues, *Fibrochondrocytes ingrowth on PLDLA/PCL-T scaffolds as meniscus prosthesis*, Campinas, Faculty of Mechanical Engineering, State University of Campinas, 2010. 117 p. Dissertation (Master Degree in Mechanical Engineering).

Tissue engineering of meniscus using fibrochondrocyte-like cells and bioreabsorbable polymer scaffolds could be an alternative option to treat meniscus injury. In this study PLDLA/PCL-T (90/10) scaffolds containing sucrose (50% m/v) were obtained by casting. Allogeneic meniscal cells were isolated from rabbit meniscus and directly seeded onto the scaffolds. *In vitro* studies showed that scaffolds did not present cytotoxicity and allowed fibrochondrocytes adhesion and ingrowth, as well as collagen extracellular matrix synthesis at 7, 14, 21 and 28 days of culture. The PLDLA/PCL-T implants were performed in the medial meniscus of 20 rabbit knee after total meniscectomy, obtained three treatments: pre-seeded 21 days scaffold, unseeded scaffold and control. Histology analysis of “neomenisci” sections at 12 and 24 weeks revealed the presence of fibrocartilage in the polymer implants. The presence of mature fibrocartilaginous tissue with organized collagen fibers was predominantly observed in the pre-cultured implants compared to unseeded implants after 24 weeks. This study demonstrates that regeneration of an important fibrocartilaginous structure can be achieved using a bioreabsorbable polymer scaffold and allogeneic cells-based tissue engineering approaches.

Key Words

PLDLA / PCL-T, Fibrochondrocyte culture, *In vivo* study, Meniscus.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Esquema simplificado da degradação e vias metabólicas de alguns polímeros biorreabsorvíveis.	9
Figura 2– Anatomia do menisco humano.....	21
Figura 3 - Fluxograma da metodologia empregada.....	30
Figura 4 – Comparação entre o menisco original (à esquerda) e o arcabouço de PLDLA/PCL-T (à direita) implantado <i>in vivo</i>	31
Figura 5 – Fluxograma do procedimento experimental realizado na etapa <i>in vitro</i>	32
Figura 6 – Procedimento cirúrgico para o implante dos arcabouços com o pré-cultivo de fibrocondrócitos e arcabouços sem células.	38
Figura 7 – Citotoxicidade direta após 24 h de semeadura em arcabouços de PLDLA/PCL-T.	Errore. Il segnalibro non è definito.
Figura 8 – Adesão celular de fibrocondrócitos nos arcabouços de PLDLA/PCL-T após 2 horas de cultivo.....	43
Figura 9 – Micrografias obtidas por MEV do arcabouço polimérico de PLDLA/PCL-T 90/10....	46
Figura 10 – Micrografias obtidas por MEV do arcabouço polimérico de PLDLA/PCL-T 90/10 com o cultivo de fibrocondrócitos.....	49
Figura 10 – (cont.) Micrografias obtidas por MEV do arcabouço polimérico de PLDLA/PCL-T 90/10 com o cultivo de fibrocondrócitos.....	50
Figura 12- Análise colorimétrica com o corante Sirius Red após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em arcabouços de PLDLA/PCL-T.	51
Figura 13- Fotomicrografias de cortes transversais dos arcabouços de PLDLA/PCL-T após 28 dias de cultivo celular corados com AT.	55
Figura 14– Fotografias macroscópicas da retirada dos implantes após 24 semanas.	58

Figura 15 - Imagens macroscópicas após 12 semanas de implante.....	58
Figura 16 - Fotomicrografia do menisco medial normal de coelho	60
Figura 17 – Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T 90/10 sem células após 12 semanas	63
Figura 18 – Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T com pré-cultivo de fibrocondrócitos após 12 semanas.....	64
Figura 19 – Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) submetido a meniscectomia medial total após 12 semanas	65
Figura 20 – Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T sem células após 24 semanas.....	71
Figura 21 – Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T com pré-cultivo de fibrocondrócitos após 24 semanas.....	72
Figura 22 – Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) submetidos a meniscectomia medial total após 24 semanas.....	73

Lista de Abreviaturas e Siglas

Letras Gregas

$\sigma_{\text{máx}}$ – Tensão máxima a tração

Subscritos

₁₂ - 12 semanas pós-implante

₂₄ - 24 semanas pós-implante

Abreviações

ANOVA - Análise de variância

AT - Azul de toluidina

bFGF - Fator de crescimento de fibroblasto básico

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

E - Módulo de elasticidade

HE - Hematoxilina e Eosina

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

Mn - Massa molar média numérica

MPa - Mega Pascal

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium

Mw - Massa molar média ponderada

PBS - Solução tampão fosfato salino

PCL-T - Poli(caprolactona triol)

PGA - Poli(ácido glicólico)

PLA - Poli(ácido láctico)

PLDLA - Poli(L-co-DL-ácido láctico)

PLGA - Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLGA-GHC - Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) - gelatina/condroitina/ácido hialurônico

PLLA - Poli(L-ácido láctico)

PPD - Poli(*p*-dioxanona)

PS - Poliestireno

PVA - Poli Álcool Vinílico
rpm – Rotações por minuto
SFB - Soro Fetal Bovino
Tg - Temperatura de transição vítrea
TGF-β - Fator transformador de crescimento beta

Siglas

3D - Tridimensional
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA - Ácido desoxirribonucléico
FCMS – Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde
ISO - Organização Internacional para Padronização de Experimentos
PUC-SP - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
RNA - Ácido ribonucléico
UNIVAP - Universidade do Vale do Paraíba
USA – Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 BIOMATERIAIS.....	4
2.2 POLÍMEROS BIORREABSORVÍVEIS.....	7
2.3 POLI(L-CO-DL, ÁCIDO LÁCTICO) PLDLA/POLI(CAPROLACTONA TRIOL) PCL-T.....	10
2.4 SUBSTRATOS TRIDIMENSIONAIS – ARCABOUÇOS.....	13
2.5 CULTURA DE CÉLULAS PARA ENGENHARIA TECIDUAL.....	16
2.6 BIOLOGIA DO MENISCO.....	19
2.7 REGENERAÇÃO DO MENISCO.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Preparação das Soluções Poliméricas.....	31
3.2 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	32
3.2.1 Obtenção de fibrocondrócitos a partir de menisco de coelhos.....	32
3.2.2 Ensaio de adesão celular e Teste de citotoxicidade.....	33
3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
3.2.4 Ensaio colorimétrico - Sirius Red.....	35
3.2.5 Análise Citoquímica.....	36
3.3 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	36
3.3.1 Implante do material – Técnica cirúrgica.....	37
3.3.2 Retirada do material - Eutanásia e coleta de tecido.....	39
3.3.3 Processamento do material – Análises histológicas.....	39

3.3.3.1 Embebição em Parafina – Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson.....	39
3.3.3.2. Embebição em Resina Glicol Metacrilato - Azul de Toluidina.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
4.1 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	41
4.1.1 Teste de citotoxicidade direta e Ensaio de adesão celular.....	41
4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
4.1.3 Ensaio colorimétrico - Sirius Red.....	51
4.1.4 Análise Citoquímica.....	54
4.2 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	56
5 CONCLUSÕES.....	78
6 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8 ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	117

Capítulo 1

Introdução

A utilização de polímeros biorreabsorvíveis como dispositivos temporários já é uma constante nos procedimentos médicos. As vantagens do uso desses implantes são indiscutíveis, pois os mesmos degradam no tecido vivo, via hidrólise, formando como subprodutos dessa degradação metabólitos comuns ao organismo os quais são excretados na forma de CO₂ e H₂O.

Dentre os polímeros mais estudados para aplicações médicas destaca-se a classe dos poli(α -hidróxi ácidos), dentre eles, o poli(L-ácido láctico), PLLA, e seus copolímeros. A degradação *in vivo* ocorre de forma controlada, por meio das composições dos monômeros que compõem a cadeia do polímero, enquanto o material implantado substitui uma função particular por um período pré-determinado.

Como as interações entre o implante biorreabsorvível e o tecido devem ser as melhores possíveis, torna-se extremamente importante a obtenção de biomateriais com propriedades que proporcionem uma boa biocompatibilidade, atendendo as necessidades específicas de cada aplicação. Entretanto, a dificuldade em se encontrar polímeros puros que atendam a todas as necessidades requeridas para uma determinada aplicação, levou os pesquisadores a buscar por alternativas, como por exemplo, a síntese de copolímeros e preparação de blendas.

O poli(L-co-D,L ácido láctico), PLDLA, faz parte desses materiais, sendo um copolímero formado por dois tipos de enantiômeros do ácido láctico em sua cadeia, sendo eles: o L-ácido láctico que tem como característica conferir boas propriedades mecânicas ao material e o D,L

ácido láctico que diminui a cristalinidade que o L-ácido láctico sozinho conferiria ao material. Dessa forma o PLDLA se apresenta amorfo e portanto mais susceptível a degradação hidrolítica do que o homopolímero poli(L-ácido láctico), PLLA, cujo tempo de degradação é muito longo, podendo ainda ser verificado fragmentos do polímero até 5 anos pós-implante (WALTON e COTTON, 2007).

Embora o PLDLA apresente boas propriedades mecânicas e um tempo de degradação compatível com o requerido para algumas aplicações (IKA VALKO *et al.*, 2007), o copolímero apresenta elevada rigidez e baixo alongamento. A adição de poli(caprolactona-triol), PCL-T, ao PLDLA proporciona a obtenção de um polímero mais flexível, com maior deformação na ruptura (DUARTE, 2007) e que apresenta tempo para completa degradação de aproximadamente 24 semanas, características estas compatíveis com o crescimento do tecido fibrocartilagenoso.

O menisco é reconhecido como um componente integral da articulação do joelho e a sua presença é vital para o bom desempenho do mesmo e sensibilidade das articulações. Ele é responsável pela distribuição da força sobre a área da tíbia, absorção de choques durante o carregamento dinâmico, estabilização articular e lubrificação da junta. No mínimo 50% da carga total imposta na junta do joelho é sustentada pelo menisco (ZUKOR *et al.*, 1990).

Por se tratar de uma estrutura sujeita a diversas lesões e apresentar limitada capacidade regenerativa, esse tecido vêm sendo alvo de estudos, onde diferentes estratégias foram utilizadas nas últimas décadas, focando principalmente sua recuperação (WEBBER, 1990). No entanto, o uso de materiais naturais e sintéticos embora tenha proporcionado a formação de um neotecido com características semelhantes à fibrocartilagem (KLOMPMAKER *et al.*, 1996), falharam ao conferir capacidade protetora para as cartilagens articulares após longos períodos (RIJK, 2004).

Por outro lado, estes trabalhos demonstraram que uma das características para aplicação em prótese de menisco é presença de poros interconectados para o crescimento tecidual, agindo como arcabouço¹ físico e substrato adesivo no crescimento celular, permitindo que o neotecido adquira o formato desejado, enquanto o polímero vai sendo degradado (KLOMPMAKER *et al.*, 1996; DE

GROOT *et al.*, 1997; ARNOCKY, 1999; VAN TIENEN *et al.*, 2002; WOODFIELD *et al.*, 2002; DENG *et al.*, 2003; WOODFIELD *et al.*, 2004; MALDA *et al.*, 2005; MAHMOOD *et al.*, 2005; WOODFIELD *et al.*, 2005).

Com os avanços científicos na área da engenharia tecidual, o estudo do crescimento de células fibrocartilaginosas sobre suportes poliméricos biorreabsorvíveis e posterior implante no animal representa uma alternativa para o tratamento de lesões do menisco (KANG *et al.*, 2006). Diversos estudos têm demonstrado o potencial de reparação do tecido fibrocartilaginoso utilizando os princípios e técnicas da engenharia tecidual (PERETTI *et al.*, 2004; MARTINEK *et al.*, 2006; WEINAND *et al.*, 2006a; WEINAND *et al.*, 2006b; WILLIAMS, 2006; ANGELE *et al.*, 2008; KON *et al.*, 2008; WEINAND *et al.*, 2009).

Apesar dos recentes progressos na área, a regeneração do menisco após meniscectomia total é um grande desafio. Os trabalhos desenvolvidos até o momento mostram a regeneração do menisco com cultivo celular por meniscectomia parcial, enquanto essa proposta visa a completa regeneração de toda a estrutura fibrocartilaginosa do menisco.

Pelo exposto acima, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do pré-cultivo de fibrocondrócitos, obtidos a partir de cultura primária de menisco de coelhos albinos, sobre arcabouços de PLDLA/PCL-T (90/10) para aplicação como prótese de menisco, verificando a influência do material no crescimento celular *in vitro* e na regeneração tecidual *in vivo*.

¹ O termo arcabouço aqui empregado corresponde à tradução literal do termo *scaffold*, largamente empregado na literatura no idioma inglês, que se refere ao uso de estruturas tridimensionais porosas utilizadas como suportes.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

O grande avanço no desenvolvimento dos biomateriais se deve à necessidade de promover a capacidade regenerativa aos tecidos lesionados e não apenas substituí-los. Nesse contexto, a Engenharia Tecidual tem um papel fundamental e visa, principalmente, desenvolver arcabouços capazes de permitir adesão, proliferação e diferenciação celular por meio de interações específicas com o biomaterial.

Neste estudo será abordada uma pequena revisão bibliográfica sobre os polímeros biorreabsorvíveis e seu uso como arcabouço, bem como o potencial do uso da cultura de células segundo as técnicas da engenharia tecidual para regeneração do menisco.

2.1 Biomateriais

O aumento da prática de atividades esportivas, a exposição humana a certas condições de trabalho e a procura por momentos de lazer podem desencadear situações acidentais adversas que, em geral, elevam o número de casos de lesões teciduais (SOUZA *et al.*, 1993).

A perspectiva para substituir áreas danificadas ou não-funcionais resultou no desenvolvimento de pesquisas conjuntas nas áreas da ciência e engenharia de materiais, biológica e médica (GRIFFITH e NAUGHTON, 2002). Os biomateriais fazem parte desta área interdisciplinar de pesquisa que surgiu nas últimas décadas, com o avanço científico e tecnológico de novos materiais e da adaptação dos já existentes para o uso médico e odontológico (PINTO, 2007).

A definição de biomateriais vem sofrendo mudanças em função do avanço das pesquisas na área. A definição adotada na *Cocensus Conference of the European Society for Biomaterials* caracteriza um biomaterial como todo material não vivo usado em dispositivo médico, ou biomédico, objetivando interação com o sistema biológico (WILLIAMS, 1987).

Em consonância com essa consideração, em seu artigo de revisão mais recente Williams (2009) sugere uma definição mais refinada que é apresentada como:

"Um biomaterial é uma substância desenvolvida em uma forma definida que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, através do controle das interações com os componentes vivos, em seres humanos ou na medicina veterinária".

Desta forma, são considerados como biomateriais todos os materiais de origem natural ou sintética que interagem em contato com tecidos vivos, a fim de direcionar, complementar ou substituir as funções dos organismos vivos, minimizando os efeitos indesejáveis ou rejeição. Para isso, a natureza do material é crítica para criar as condições desejadas para a formação tecidual (BET *et al.*, 2003).

As propriedades físico-químicas dos biomateriais os distinguem em cinco categorias: metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e materiais de origem biológica (RATNER *et al.*, 1996). Uma classificação mais geral distingue os biomateriais poliméricos em duas macro-classes: materiais não degradáveis e materiais degradáveis, os quais são utilizados como implantes permanentes e temporários, respectivamente (BARBANTI *et al.*, 2005).

O conhecimento das propriedades dos biomateriais, os indica para determinadas aplicações, como por exemplo: substratos para cultura de células (BARBANTI *et al.*, 2002), sistemas de liberação de fármacos (TSANG e BHATIA, 2004, LIU *et al.*, 2006), regenerações óssea, cartilaginosa e nervosa (SPOERKE *et al.*, 2005, PIHLAJAMAKI *et al.*, 2006, SUL *et al.*, 2006; MORADIAN-OLDAK *et al.*, 2006; CHIARI *et al.*, 2006, RAMASWAMY *et al.*, 2006; AN *et*

al., 2006), peles artificiais (SEAL *et al.*, 2001) e órgãos como o fígado, intestino e bexiga (SCHULTHEISS *et al.*, 2005; LLOYD *et al.*, 2006; HOSHIBA *et al.*, 2006, UNDERHILL *et al.*, 2007), bem como outras aplicações em biotecnologia.

A compatibilidade com o ambiente biológico é um dos desafios das aplicações dos biomateriais. Para tanto, princípios e normas para avaliação biológica de materiais e dispositivos são necessários antes de sua aplicação clínica e comercialização. A Organização Internacional para Padronização de Experimentos (ISO 10993) inclui testes desde a seleção dos materiais (propriedades mecânicas, químicas e etc), suas considerações em relação às avaliações biológicas (aditivos, contaminantes, entre outros) e análises baseadas nas aplicações de uso final que incluem testes *in vitro* e *in vivo*.

O conceito de biocompatibilidade está relacionado com a possível resposta imune do tecido adjacente ao material estranho implantado e resguarda todo o conjunto de propriedades relacionadas com a interação do dispositivo com o corpo, uma vez que o dispositivo desempenha um papel dentro da organização tecidual. Sendo assim, o requisito básico para qualquer implante artificial é que o mesmo não gere rejeição ou severa resposta inflamatória (BATCHELOR e CHANDRASEKARAN, 2004).

Em adição, foi demonstrado que as reações biológicas que são adversas para um material em uma determinada aplicação, podem não ser adversas para o mesmo material em uma diferente aplicação (OREFICE *et al.*, 2006).

De acordo com estas necessidades, o termo biocompatibilidade, atualmente refere-se à capacidade de um material em “exercer uma resposta adequada do tecido em uma situação específica”. Ou seja, é definido não apenas pelo tipo de resposta inflamatória, mas também pela biofuncionalidade deste material, o que lhe permite apoiar interações célula/biomaterial de acordo com a situação local e órgão específico, onde o biomaterial é aplicado (WILLIAMS, 2008).

Guiados por trabalhos clínicos e experimentais efetuados no decorrer das últimas décadas, estudos nessa área não buscam reproduzir todas as complexidades envolvidas no desenvolvimento tecidual, mas pretendem promover um ambiente que permite a capacidade nata das células de integrar-se, diferenciar-se e desenvolver-se em novos tecidos (LAVIK & LANGER, 2004).

Desta forma, a principal dificuldade encontrada quanto a um biomaterial é conciliar as suas propriedades físicas, químicas e mecânicas para a funcionalidade do implante com um nível aceitável de reação inflamatória, a qual geralmente é causada por moléculas solúveis ou íons liberados dos materiais utilizados como implantes (PRAZERES *et al.*, 2007).

2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis

O termo biorreabsorvível é definido para polímeros sólidos que sofrem degradação, principalmente por hidrólise, através da cisão das ligações ésteres, formando produtos atóxicos, biocompatíveis, e que depois são reabsorvidos pelo organismo e eliminados por caminhos naturais, após a sua metabolização (VERT *et al.*, 1992).

Os polímeros biorreabsorvíveis são amplamente utilizados na área biomédica como disponíveis em uma vasta gama de composições e propriedades, podendo ser facilmente moldados em diversos formatos e estruturas complexas. As propriedades finais do dispositivo dependem tanto da estrutura intrínseca molecular do polímero quanto dos processos químicos e físicos sofridos por ele, podendo ser modificados para atender às necessidades das diversas aplicações.

No entanto, a preparação de materiais poliméricos para implantes requer o controle de suas características químicas, hidrofiliabilidade, superfície de contato com as células, toxicidade dos subprodutos da degradação (BATCHELOR e CHANDRASEKARAN, 2004), à possibilidade de esterilização, de forma a minimizar quadros infecciosos (REZWAN *et al.*, 2006), a porosidade, forma do implante, manutenção das propriedades mecânicas no interior do corpo (CHANIKOF *et*

al., 2002), além de sua capacidade de induzir a invasão e proliferação celular e síntese dos elementos da matriz, sem que, no entanto, estimule uma exacerbada resposta inflamatória ou que impossibilite a remodelação tecidual (KUMARASURIYAR *et al.*, 2005). Todos estes requisitos reduzem o número de polímeros que são candidatos potenciais pra aplicações biomédicas (BLUMM e OWEN, 1995).

Os poli(α -hidróxi ácidos) são polímeros biorreabsorvíveis muito promissores para uso como implantes temporários (BARBANTI *et al.*, 2005). Esses polímeros são poliésteres alifáticos, representados pela fórmula geral $-(O-CHR-CO)-$ (VERT *et al.*, 1992) e sofrem degradação principalmente por hidrólise, através da cisão das ligações ésteres (DUEK *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2007), originando produtos solúveis e atóxicos de grupos terminais carboxila e hidroxila. Estes polímeros possuem grande potencial em aplicações biomédicas, pois além de biorreabsorvíveis, são biocompatíveis (SAKATA *et al.*, 2004) e eliminam a necessidade de remover o implante.

Os polímeros biorreabsorvíveis mais estudados para aplicações medicas são a poli(*p*-dioxanona) – PPD, o poli(ácido láctico) - PLA, poli(ácido glicólico) - PGA e seus copolímeros PLLA e PLGA (RAHMAN e TSUCHIYA, 2001; MA *et al.*, 2003; JAKLENEC *et al.*, 2008; JEON *et al.*, 2008; RUITTER *et al.*, 2008; YOON *et al.*, 2008) que podem ser utilizados em diversas aplicações (SAKATA *et al.*, 2004), incluindo no tecido cartilaginoso (GABLER *et al.*, 2007; JEON *et al.*, 2007).

Estes polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são geralmente fáceis de processar e apresentam características mecânicas semelhantes a dos tecidos moles, com a vantagem de eliminar a necessidade de uma segunda cirurgia após a recuperação do tecido (BARBANTI *et al.*, 2005). Além disso, há possibilidade de alterar química ou fisicamente sua superfície, bem como a capacidade de imobilizar moléculas no seu interior ou na superfície.

Entretanto, apesar das características apresentadas, os polímeros biorreabsorvíveis não substituem os dispositivos metálicos e cerâmicos em aplicações que exigem elevadas propriedades mecânicas e baixo coeficiente de atrito.

O entendimento da degradação dos polímeros biorreabsorvíveis é baseado no estudo *in vitro*, mimetizando o meio fisiológico e é considerado como sendo heterogêneo. Uma vez em meio aquoso, o polímero absorve água e inicia-se a clivagem hidrolítica das ligações, ocasionando uma diminuição da massa molar. Os principais produtos da hidrólise das ligações ésteres são CO_2 e H_2O , figura 1. No início, a degradação é mais rápida na superfície do que no centro devido ao gradiente de absorção de água. Entretanto, após a difusão dos produtos presentes na superfície da matriz para o meio, a baixa taxa de difusão dos produtos da reação no interior do material gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que as estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentem uma degradação mais acentuada no centro (KELLOMÄKI *et al.*, 2004). Logo, a concentração de grupamentos ácidos carboxílicos catalisa a degradação (PEZZIN *et al.*, 2002).

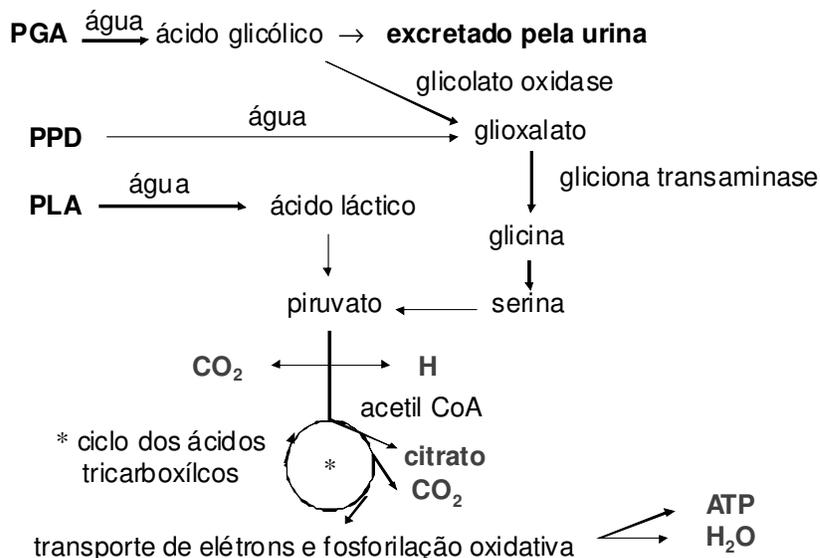


Figura 1 - Esquema simplificado da degradação e vias metabólicas de alguns polímeros biorreabsorvíveis.

O fato de ocorrer inicialmente uma perda da massa molar (M_w) do polímero, seguido posteriormente pela perda de massa polimérica é um indicativo de que a degradação é *in bulk* (KOHN e LANGER, 1996). Este tipo de erosão ocorre quando a taxa em que a água penetra no dispositivo excede aquela em que o polímero é convertido em materiais solúveis.

Entretanto, sabe-se que as taxas de degradação dos polímeros são dependentes de vários fatores como: razão molar dos meros provenientes na cadeia do polímero, massa molar do polímero, grau de cristalinidade, local do implante, pH e morfologia do dispositivo (MILLER *et al.*, 1977; HOLLINGER e BATTISTONE, 1986; DUEK *et al.*, 1999; ATALA, 2000).

Outro fator pouco discutido, mas que tem influência na taxa de degradação do polímero é o local do implante. A capacidade em eliminar os produtos ácidos originários da degradação, assim como a taxa de degradação do polímero são de suma importância para se evitar algum tipo de reação inflamatória ou mesmo algum tipo de resposta tóxica por parte do tecido circunjacente ao implante (ATHANASIOU *et al.*, 1998; SUGANUMA e ALEXANDRE, 1993).

2.3 Poli(L-co-D,L ácido láctico) PLDLA/ Poli(caprolactona triol) PCL-T

Copolímeros e blendas biorreabsorvíveis tem sido produzidos com distintas intenções e com diferentes compostos (REZWAN *et al.*, 2006). Uma das vantagens da mistura de polímeros é a combinação de suas propriedades, produzindo materiais para diferentes aplicações, nas quais os polímeros individuais não são adequados. Além da melhoria das propriedades mecânicas e físico-químicas, em alguns casos, a adição de um polímero a outro resulta num material com melhor processabilidade e aparência final (PRAZERES *et al.*, 2009).

Copolímeros são polímeros que apresentam na estrutura de suas macromoléculas dois ou mais tipos de meros. Para um copolímero a porcentagem dos componentes (monômeros) bem como o tipo de distribuição dos meros nas macromoléculas são características importantes, as quais interferem em suas propriedades (BILLMEYER JR., 1984). A copolimerização é um

processo que resulta, portanto, numa grande versatilidade de propriedades e desempenho que se pode obter dos materiais (MOTTA, 2002).

O poli(ácido láctico) existe em duas formas químicas específicas: poli(L-ácido láctico) e poli(D,L-ácido láctico), possíveis de serem combinados para formar um copolímero com propriedades diferentes daquelas exibidas por cada um desses homopolímeros isolados (MOTTA e DUEK, 2007). Essa diferenciação é ainda mais acentuada quando comparamos o copolímero PLGA com o homopolímero PLLA e seu copolímero PLDLA.

O tempo de absorção do PLLA pelo organismo pode levar mais de 36 meses, enquanto para o PLDLA esse tempo pode ser reduzido em aproximadamente 6 meses, dependendo da proporção existente entre os meros (MOTTA, 2002). Essa capacidade de controlar o tempo que o material levará para ser degradado no organismo é, sem dúvida, notável, o que justifica a grande quantidade de pesquisas que vem sendo realizadas com esses materiais.

Desta forma, a vantagem do copolímero poli(L-co-D,L ácido láctico) PLDLA é aliar as particularidades mecânicas do poli(ácido láctico) sem o elevado tempo de degradação requerido por esse homopolímero, decorrente de sua alta cristalinidade. Isso é possível, pois o poli(D,L ácido láctico) ao contrário, apresenta maior taxa de degradação, apesar de possuir propriedades mecânicas aquém as do poli(ácido láctico). Assim, com a combinação dos homopolímeros é possível obter um produto com boas propriedades mecânicas e tempo de degradação necessário para aplicações cirúrgicas (MOTTA e DUEK, 2007).

Além disso, a adição de moléculas de baixa massa molar como a poli(caprolactona-triol), PCL-T, ao copolímero PLDLA proporciona a obtenção de um polímero mais hidrofílico, aumentando a mobilidade da cadeia e que, conseqüentemente, possui características que facilitam sua interação com as células e tecidos (DUARTE, 2007).

O comportamento mecânico do copolímero PLDLA exhibe características típicas de um polímero vítreo, com módulo de elasticidade igual a 1564 (± 141) MPa, resistência à tração ($\sigma_{\text{máx}}$)

igual a 21 (± 5.5) MPa e deformação na ruptura de 8,7 (± 1.2) %. Com a adição de 10% de PCL-T ocorre uma diminuição significativa de cerca de 50% no módulo de elasticidade (E) para 795 (± 198) MPa (DUARTE, 2009). A autora sugere que o PCL-T atua como um plastificante reduzindo a interação polímero-polímero, promovendo assim a diminuição do módulo de elasticidade.

A massa molar é um parâmetro fundamental na caracterização dos materiais poliméricos, já que características tais como, força de adesão, impacto, tensão, fragilidade, dureza e fusão são governadas pela massa molar (MOTTA, 2002). O PLDLA/PCLT (90/10) apresenta alta massa molar média ponderada (M_w) e alta massa molar média numérica (M_n) com valores na ordem de 10^5 g/mol.

A literatura ainda relata que o grau de cristalinidade e o ponto de fusão dos polímeros estão diretamente relacionados com a massa molar que estes apresentam (LEWIS, 1990; WU, 1995). A T_g (temperatura de transição vítrea) do PLDLA/PCL-T é aproximadamente 55°C , acima da temperatura fisiológica (37°C), o que o torna vítreo nas condições naturais e por isso é rígido à temperatura ambiente (DUARTE, 2009).

Comumente, diversos fatores de influência são avaliados conjuntamente para seleção de um biomaterial. A composição química durante a degradação *in vitro* de membranas de PLDLA/PCL-T nas composições de 100/00, 90/10, 70/30 e 50/50 foi avaliada por Duarte (2009). A autora concluiu que a variação da concentração de PCL-T influencia na degradação do material. No decorrer do tempo de hidrólise verificou-se que a degradação era maior para as composições 100/0 e 90/10 em relação as 70/30 e 50/50.

Ensaio mecânicos de tração para as amostras de PLDLA/PCLT em diferentes composições, durante o estudo da degradação *in vitro*, mostraram que a composição 90/10 apresentou maior deformação na ruptura em relação às outras composições e que esse valor aumentou após 4 semanas de degradação (DUARTE, 2009). Além disso, estudos realizados *in*

vivo, demonstraram que o material não desencadeou uma resposta inflamatória exacerbada (DUARTE, 2008).

Variações no tempo de degradação são um dos fatores que direcionam a aplicação do material, sendo o copolímero PLDLA mais indicado para fixação de fraturas (BARBER, 1998) e reparos da região craniomaxilofacial (PIETRZAK *et al.*, 1997), enquanto que a adição de 10% PCL-T ao PLDLA proporciona um material mais flexível voltado como suporte para culturas de células e neste trabalho prótese de menisco.

Portanto, os polímeros selecionados nas aplicações como prótese devem preencher muitos requisitos, como biocompatibilidade, cinética de biodegradação adequada e propriedades mecânicas razoáveis, além de fácil processamento e reprodutibilidade e baixo custo para aplicações clínicas (LEWIS, 1990; WU, 1995).

Diante disso, a composição de PLDLA/PCL-T 90/10 foi selecionada por apresentar maior deformação na ruptura, maior flexibilidade, maior hidrofiliabilidade e tempo de degradação de aproximadamente 24 semanas, quando comparada ao PLDLA puro (Duarte, 2009), características estas que foram consideradas adequadas para o crescimento de tecido fibrocartilagenoso.

2.4 Suportes tridimensionais – Arcabouços

Considerando de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais, quanto do tipo de tecido e reparo necessário, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa a seleção do suporte para a cultura de células. A seleção leva em consideração tanto o tipo e o local da lesão, como a sua extensão, podendo seguir basicamente duas estratégias de aplicação quando preparado com polímeros biorreabsorvíveis (HUTMACHER, 2000).

Na primeira, o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, da inoculação até o implante no organismo hospedeiro. O implante do conjunto polímero e células ocorre com um tecido prematuro formado no qual o polímero é

remodelado pela degradação *in vivo*, numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substrato mecânico/estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua biorreabsorção completa (BARBANTI *et al.*, 2005).

Na segunda estratégia, o implante ocorre com um tecido maduro formado. O suporte polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequado para a inoculação das células até a sua inserção num bioreator, onde ocorrerá a formação do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam e secretam matriz extracelular durante a cultura *in vitro*, enquanto o polímero é degradado gradualmente, permitindo espaço para proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Somente após a formação do tecido o implante é inserido no organismo (BARBANTI *et al.*, 2005).

Baseando-se nestas estratégias, a primeira etapa inicia-se com o desenvolvimento, seleção e processamento adequado dos arcabouços. Para tanto, o uso de polímeros biorreabsorvíveis como suporte para a cultura de células vêm se destacando na engenharia tecidual (KELLOMAKI e TORMALA, 2004).

Como morfologia preferencial para a engenharia tecidual, suportes porosos têm sido preparados por diversas técnicas e ainda representam um importante enfoque em desenvolvimento. Segundo a literatura, poros uniformemente distribuídos e interconectados em um polímero permitiriam uma distribuição das células através do dispositivo e contribuiria para a organização de estruturas semelhantes a tecidos (SANTOS JR *et al.*, 2001; CIAPETTI *et al.*, 2003).

Arcabouços porosos podem ser obtidos por vários métodos, dependendo das características desejadas. Entre as técnicas podemos destacar: evaporação do solvente e lixiviação, inversão de fase, blendas, injeção de gás, litografia e prototipagem rápida, entre outras (BARBANTI *et al.*, 2005).

Um procedimento comumente utilizado é a técnica de lixiviação de porógenos (substâncias adicionadas aos polímeros com o intuito de produzir poros) (BARBANTI, 2001). Diversas partículas solúveis, incluindo sais e carboidratos ou sistemas hidrofóbicos são usados como materiais porógenos. Apesar das vantagens, existe o inconveniente da permanência de resíduos do porógeno e do solvente (SARAZIN *et al.*, 2004). Além disso, em processos como o de lixiviação, o parâmetro de controle da arquitetura dos suportes, como tamanho e forma dos poros, porosidade e interconectividade, resulta essencialmente do processo de produção ao invés de serem conduzidos por um *design* pré-definido. A funcionalidade do arcabouço seria altamente melhorada pelo uso de técnicas de fabricação controladas por computador, as quais poderiam controlar tais parâmetros (LEE *et al.*, 2008), como ocorre na técnica de prototipagem rápida (WILLIAMS *et al.*, 2005; MORONI *et al.*, 2006).

Sabe-se que o tamanho e o grau de interconexão entre os poros é um pré-requisito importante (KARAGEORGIU E KAPLAN, 2005). Segundo Mikos *et al.* (1993) a taxa de penetração e crescimento celular em estruturas porosas de polímeros biorreabsorvíveis está diretamente relacionada com o tamanho e a distribuição de tamanho dos poros no material.

Substratos tridimensionais porosos têm sido utilizados como arcabouço para cultura de fibrocondrócitos (ARNOCZKY, 1999; WOODFIELD *et al.*, 2002; WOODFIELD *et al.*, 2004; MALDA *et al.*, 2005; WOODFIELD *et al.*, 2005). Entretanto, as condições para obtenção de arcabouços adequados para crescimento celular e tecidual envolvem outros quesitos como design apropriado do dispositivo (BARBANTI *et al.*, 2004), assim como uma boa adesão entre o tecido e o substrato (SANTOS *et al.*, 2001).

A necessidade de desenvolver novos materiais biocompatíveis e que possuam boa adesão, crescimento e diferenciação celular, além de propriedades mecânicas adequadas para cada uso representam um dos atuais desafios, uma vez que esses materiais deverão repor a função mecânica temporariamente e degradar a uma taxa apropriada com o tempo de regeneração do tecido (SEAL *et al.*, 2001).

2.5 Cultura de células para Engenharia Tecidual

Com o avanço das pesquisas que exploram o conhecimento científico acerca dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na biologia e regeneração de tecidos e juntamente com os conhecimentos da ciência dos materiais, propiciou-se o desenvolvimento de trabalhos multidisciplinares com o objetivo de criar dispositivos biocompatíveis que fornecessem suporte para o crescimento celular e que apresentassem propriedades mecânicas similares ao tecido original, cujos princípios fomentaram a progressão do campo científico da engenharia tecidual (KOSE *et al.*, 2003; WILLIAMS, 2004).

Sabe-se que a biocompatibilidade dos materiais está diretamente associada ao comportamento das células em contato com o material e particularmente pela adesão na superfície. As características da superfície do material são essenciais à adesão celular aos biomateriais (ANSELME, 2000). A adesão e proliferação celular são parâmetros importantes em estudos da biocompatibilidade e citocompatibilidade *in vitro* (LUCCHESI, 2006) e correspondem à primeira fase na interação célula/material, que irá influenciar na capacidade das células de se diferenciarem em contato com o implante, promovendo a reconstituição inicial do tecido original (PU *et al.*, 2002, BARBANTI *et al.*, 2004, VAN KOOTEN *et al.*, 2004, WAN *et al.*, 2005).

Quando as células entram em contato com um material implantado não significa que elas farão contato direto com a superfície. Mas a rápida adsorção de proteínas oriundas do sangue (ou do soro) traduz efetivamente a estrutura e composição da superfície estranha em uma linguagem biológica (WILSON *et al.*, 2005). Sabe-se que a topografia da superfície também pode alterar o comportamento celular (LIN *et al.*, 2007) em situações de implante e na cultura celular.

Desta forma, a cultura de células é uma ferramenta importante na ciência dos biomateriais e tem recebido atenção especial como uma alternativa para o tratamento de lesões teciduais (BARBANTI, 2001). Os experimentos envolvendo o cultivo celular têm varias vantagens em comparação com aqueles implantados diretamente no organismo. No caso da cultura de células, as condições experimentais podem ser controladas de forma mais rigorosa, mediante a

manipulação das condições de crescimento e do meio utilizado no cultivo de um tipo celular específico (ECA, 2004).

Portanto, o estudo dos polímeros biorreabsorvíveis *in vitro* tem como intenção avaliar as respostas celulares após interações com materiais, visando analisar o nível de segurança do biomaterial para emprego em humanos e correlacionar o desempenho nas reações provocadas pelo implante do material em situações clínicas reais (OREFICE *et al.*, 2006), promovendo um ambiente que permita que as células se integrem, diferenciem-se e desenvolvam-se em novos tecidos (LAVIK e LANGER, 2004).

Além disso, uma abordagem nova incentiva a criação de substitutos biológicos focando a utilização de materiais naturais ou sintéticos, como sistemas transportadores de célula para promover a regeneração de tecidos.

A determinação das condições ideais para a expansão *ex vivo* de células é uma condição essencial para o futuro da engenharia tecidual, onde fatores de crescimento desempenham um papel crucial no desenvolvimento de células e tecidos *in vitro* (CARLSON, 2005). Estas informações poderiam permitir o uso de biomateriais e técnicas de cultura de células para desenvolver estruturas que estimulem mecanicamente e fisiologicamente características *in vivo* (SANTOS JR *et al.*, 2005).

As condições para promover a proliferação, crescimento e diferenciação tecidual esbarram nas características do suprimento vascular, o que exige investimento científico no esclarecimento do papel da estrutura tridimensional e de fatores de crescimento e fatores angiogênicos como moléculas-chave da viabilidade celular (CARLSON, 2005).

Deve-se salientar que estimular células para produzir uma nova matriz sob condições nas quais normalmente não a fariam, não é uma tarefa fácil. Além do mais, ainda é preciso obter o tipo celular requerido, determinar o momento em que os sinais dados às células devem ser suprimidos e avaliar o funcionamento do tecido resultante (WILLIAMS, 2006).

A homeostase celular é dependente da síntese e degradação regulada de colágeno. A remodelação tecidual para degradar e propiciar sua síntese ocorre durante o avanço da resposta cicatricial do tecido (MARUCCI *et al.*, 2002). Na engenharia tecidual, o controle da taxa de síntese e degradação de colágeno de forma compatível pode levar a um maior sucesso no reparo, integração e funcionamento do dispositivo usado (ABRAHAM *et al.*, 2007).

Desta forma, o cultivo *in vitro* de células oferece uma importante ferramenta na tentativa de elucidar a biologia destas células e é considerado como um recurso extremamente útil na análise da matriz extracelular (SANTOS e WADA, 2007).

Inúmeras pesquisas buscam aperfeiçoar e intensificar o uso de suportes de biomateriais para expansão de células do menisco a fim de permitir sua recomposição após intervenção médica. A interação célula-suporte deve ser avaliada para se firmar condições de adesão, crescimento e diferenciação celular, como requisitos essenciais para a formação de um neotecido *in vitro*. Esse tecido substituto deve apresentar propriedades biomecânicas equivalentes ao tecido original, tornando-se capaz de desenvolver a função primária da região lesada, através da morfologia diferenciada de suas células e do arranjo organizado das moléculas que compõem sua matriz extracelular (IBARRA *et al.*, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 2005; REGUZZONI *et al.*, 2005; CHIARI *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2006; RAMASWAMY *et al.*, 2006; TIENEN *et al.*, 2006).

A partir dessa necessidade, várias metodologias para o cultivo celular foram estudadas e desenvolvidas nos últimos anos (BENYA *et al.*, 1982; GREEN *et al.*, 1984; FIGUEIREDO e JOAZEIRO, 2005). O desenvolvimento destas técnicas oferece os benefícios de se trabalhar com um grande número de células, as quais são obtidas a partir de um número reduzido de animais em experimentação. Estas células, uma vez isoladas, reduzem ou eliminam o risco de se obter resultados incorretos devido à influência de outros tipos celulares.

Além disso, é possível realizar diversos testes relacionados ao metabolismo, às respostas celulares após a utilização de fármacos e substâncias tóxicas (ARAÚJO, 2000), a manipulação

das condições de crescimento (ECA, 2004) e interações célula/biomateriais como uma alternativa para o tratamento de lesões teciduais (BARBANTI *et al.*, 2004).

Trabalhos iniciais conduzidos com cultura celular em poli(ácido láctico), PLLA, e em experimentação animal têm mostrado que as células podem proliferar e sintetizar matriz sem um suprimento sanguíneo se o meio extracelular é mantido (SILVA, 2007). O que se busca é justamente entender quais as condições necessárias para desenvolver a capacidade proliferativa e sintetizante destas células.

Portanto, os estudos para aprimoramento de implantes visando o desenvolvimento nessa perspectiva encaminham o diagnóstico e avaliação da interação célula/biomaterial com uma dimensão em escala nanométrica (TAYLOR *et al.*, 2009).

Considerando-se que o objetivo principal da engenharia tecidual está em desenvolver substitutos vivos para tecidos a partir de células cultivadas em substratos tridimensionais, a cultura de células representa o enfoque das pesquisas em implantes temporários com menor custo e menor tempo de reabilitação, além de viabilizar um único procedimento invasivo para colocação do implante devido ao uso de arcabouços biorreabsorvíveis.

2.6 Biologia do Menisco

O tecido cartilaginoso está presente em regiões específicas do corpo sendo formado por células denominadas condrócitos e por uma matriz extracelular intersticial altamente especializada. Esta é constituída por uma rede macromolecular, onde encontram-se ácido hialurônico, proteoglicanos e proteínas de adesão em íntima associação com as fibras do Sistema Colágeno e do Sistema Elástico (HARDINGHAM e FOSANG, 1992; HEINEGARD e OLDBERG, 1989; MAROUDAS, 1975).

De acordo com a composição da matriz extracelular, as cartilagens diferenciam-se em três tipos: hialina, elástica e fibrocartilagem (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Nos mamíferos, a

fibrocartilagem é encontrada nos discos intervertebrais, na sínfise púbica, nos meniscos das articulações do joelho e articulações temporomandibular, esternoclavicular e do ombro, ou seja, sua presença indica locais onde os tecidos precisam resistir à compressão e ao desgaste (GHOSH e TAYLOR, 1987).

A fibrocartilagem é um tecido conjuntivo avascular, sem pericôndrio, formado por poucas células e uma grande quantidade de matriz extracelular constituída principalmente de colágeno tipo I e proteoglicanos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os meniscos dos joelhos são fibrocartilagens com formato semilunar, interpostas entre o côndilo femoral e o platô tibial (MCDEVITT e WEBBER, 1990). A superfície do menisco em contato com o côndilo é côncava, enquanto que a superfície em contato com o platô tibial é ligeiramente convexa (COHEN *et al.*, 2003).

Nos humanos, os meniscos se apresentam aos pares, de forma que cada indivíduo possui 4 meniscos, sendo 2 mediais e 2 laterais. O menisco medial é uma estrutura em forma de “C”, com o raio maior que o do menisco lateral e com o corno posterior mais largo que o anterior. Já o menisco lateral possui forma mais circular, abrangendo até 2/3 da superfície articular tibial subjacente (figura 2) (COHEN e ABDALLA, 2003).

Os dois meniscos estão conectados pelo ligamento transversal que passa do menisco medial anterior para o menisco lateral anterior. São fixados à capsula articular e presos ao côndilo tibial através dos cornos anterior e posterior. Outros pontos de fixação são o ligamento colateral, ligamento menisco-femoral e cápsula (AUFDERHEIDE e ATHANASIOU, 2004).

Dentre suas funções, é importante destacar a capacidade de suportar e distribuir de 50 a 70% do peso corporal, resistindo a pressões, através da qual promovem absorção de impacto, lubrificação e adaptação às superfícies da tíbia, à forma dos côndilos femorais e promovem a estabilização da articulação durante momentos de flexão e extensão, cujas atribuições são garantidas por uma organização específica das células da matriz extracelular desse tecido

(SHRIVE *et al.*, 1978; TIENEN *et al.*, 2006). Essas funções são essenciais para a proteção da articulação e prevenção de lesões, como a osteoartrose.

Os meniscos dos joelhos são estruturas amplamente avascularizadas, exceto nas proximidades de sua inserção periférica (ARNOCZKY e WARREN, 1982). A porção externa do menisco, que é vascularizada tem a habilidade intrínseca de auto-regenerar e pode ser referida como região vermelha. Esta área do menisco também possui grandes feixes de nervos orientados circunferencialmente e nervos menores em orientação radial. A porção interna é avascular e sem inervação, também referida como zona branca (AUFDERHEIDE e ATHANASIOU, 2004).

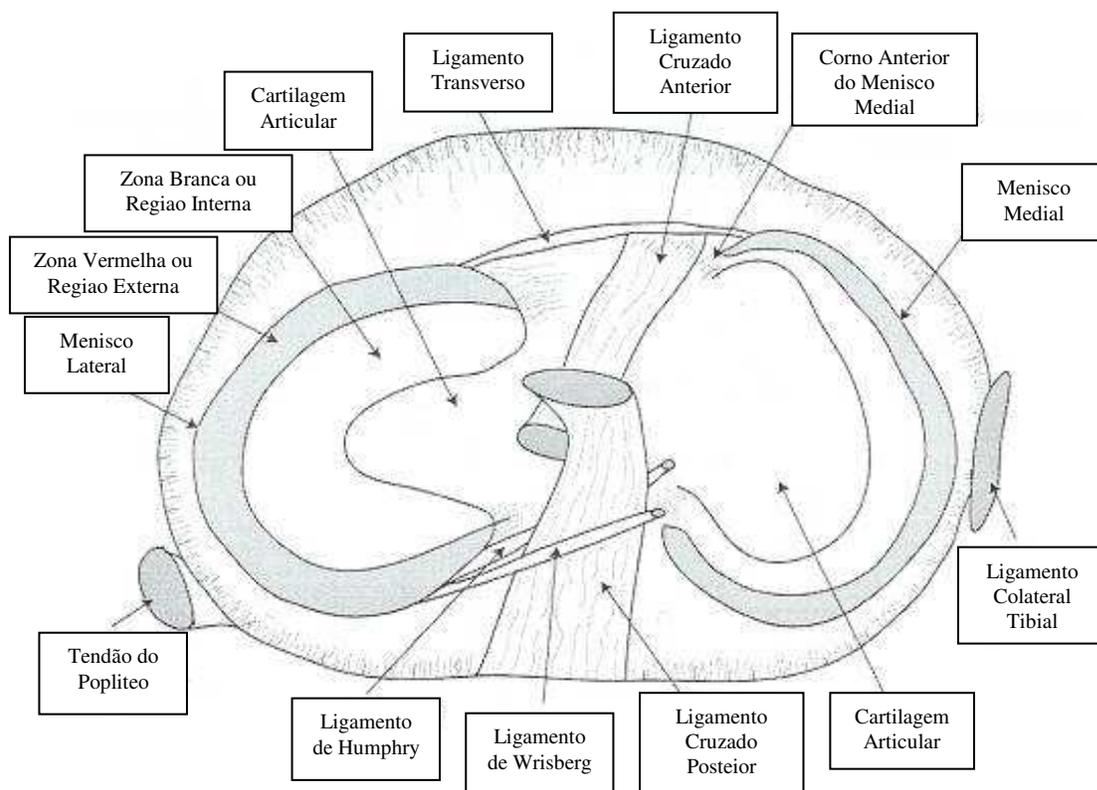


Figura 2– Anatomia do menisco humano (AUFDERHEIDE e ATHANASIOU, 2004).

Desta forma, os meniscos apresentam uma única combinação de atributos celulares particulares garantidas pela sua arquitetura e ultra-estrutura diferenciada. De acordo com estas especificidades, agrupa um conjunto de três populações celulares, as quais são classificadas

segundo seu aspecto morfológico: células com perfil alongado, células poligonais e células denominadas fibrocondrócitos, caracterizadas pelo formato arredondado semelhante a condrócitos, porém com síntese predominante de colágeno tipo I como os fibroblastos, daí a origem da nomenclatura (TANAKA *et al.*, 1999).

O tecido que compõe o menisco é, portanto, típico fibrocartilaginoso composto por poucas células, cercadas por uma matriz extracelular abundante, composta principalmente de colágeno tipo I (90%), mas outros colágenos tipos II, III, IV (GUNJA e ATHANASIOU, 2007), proteoglicanos, glicoproteínas e elastina estão presentes em menores quantidades, especialmente associados ao fenótipo da fibrocartilagem (ROUGHLEY e WHITE, 1992).

O colágeno tipo II é mais expresso na região interna do menisco e ausente nas regiões vasculares. O agregado é o proteoglicano mais encontrado, mas outros glicosaminoglicanos como decorim, biglicam e fibromulim também estão presentes em menores concentrações (INGMAN, *et al.*, 1974; HERWING, *et al.*, 1984).

A matriz extracelular da fibrocartilagem é, então, sólida, firme e flexível, sendo responsável pelas propriedades elásticas, característica essencial para proporcionar a resistência à tensão e compressão (MCDEVITT e WEBBER, 1990).

Desta forma, os meniscos são geralmente descritos como um tecido bifásico com uma fase líquida composta por água e eletrólitos e uma fase sólida compreendida pela matriz extracelular e glicosaminoglicanos. Esta forma viscoelástica implica que o stress e as tensões desenvolvidas dentro do tecido são dependentes não só da carga aplicada, mas também da taxa de carregamento (MOW *et al.*, 1992).

Embora tanto o menisco quanto a cartilagem articular apresentem propriedades viscoelásticas, o módulo de elasticidade para esses tecidos são 0,09 e 0,15 MPa (SWEIGART e ATHANASIOU, 2001) para o menisco e na faixa de 0,53 - 1,34 MPa para a cartilagem (HU e ATHANASIOU, 2003).

É válido ressaltar que suas propriedades viscoelásticas auxiliam não só na absorção de choques, transferência de forças e estabilização da articulação, mas também no suplemento de nutrientes para cartilagem articular, na qual o fluido é difundido através da retomada de repetidos movimentos de compressão e relaxamento do tecido, criando uma prática essencial para nutrição das células (FITHIAN *et al.*, 1989).

O menisco também é cerca de cinco vezes menos permeável ao fluxo de fluídos que a cartilagem articular. Isto significa que a água não pode sair tão facilmente quando o tecido é submetido a uma carga tornando o menisco, portanto, um excelente amortecedor (FITHIAN *et al.*, 1990).

Sem os meniscos, a cartilagem tibial em contato com a cartilagem articular seria predominantemente no centro do platô tibial e isso diminuiria a estabilidade da junta. Quando o joelho se dobra, os côndilos femorais giram e deslizam através do platô tibial. Durante este movimento há deformação dos meniscos em direção ao platô tibial posterior para manter a sua função (FU e THOMPSON, 1992).

Como pode ser visto, as propriedades do tecido que compõe o menisco são exclusivamente estruturadas para servir o seu papel na biomecânica do joelho. A presença de lesões do menisco do joelho causa grande desconforto e pode levar a lesões não passíveis de regeneração da cartilagem na superfícies articulares do fêmur e da tíbia, levando ao progressivo desenvolvimento de osteoartrites (inflamação da cartilagem) e artroses (degeneração da cartilagem) que ainda representam um grande desafio para traumatologia e ortopedia internacional (KRAUSE *et al.*, 1976).

2.7 Regeneração do Menisco

A meniscectomia já foi considerada um procedimento inócuo. Hoje sabe-se que esse fato não é verdadeiro. A fibrocartilagem dos meniscos é de fundamental importância para o desempenho mecânico, estabilidade e sensibilidade da articulação (MESSNER e GAO, 1998).

Embora o menisco possua propriedades mecânicas excelentes, a exposição a pressões ou tensões anormais pode exceder sua elasticidade e ocasionar lesões. Com incidência anual de 60 casos por cem mil habitantes (HEDE *et al.*, 1990), um número crescente de lesões no menisco, ocasionando a meniscectomia parcial e procedimentos de sutura são atribuídos principalmente, às causas traumáticas devido ao excesso de atividades esportivas e doenças degenerativas (PROCTOR *et al.*, 1989).

Injúrias na fibrocartilagem do menisco, em geral, resultam em processos cicatriciais lentos e difíceis, proporcionais a sua extensão. Além disso, existe um padrão cicatricial diferente de acordo com a região acometida (ERIKSSON, 2003).

O sucesso nos procedimentos reparadores de menisco depende de fatores como idade do paciente, técnicas de reparo, material a ser utilizado (materiais biorreabsorvíveis e não-biorreabsorvíveis) ou da complexidade da cirurgia de reparação (reparo de menisco e de ligamento cruzado, por exemplo) (WARREN *et al.*, 1985; BARRETT *et al.*, 1995; DEHAVEN, 1999).

Além disso, transplantes meniscais enfrentam inúmeras dificuldades, que vão desde tamanhos inadequados entre doador e receptor (MILACHOWSKI *et al.*, 1994; STONE, 1996; MESSNER, 1999), até as temidas infecções cruzadas (ITO *et al.*, 2004).

Conseqüentemente por se tratar de uma estrutura sujeita às diversas lesões e apresentar limitada capacidade regenerativa a fixação cirúrgica com suturas representa, em algumas condições, um método insuficiente para lesões extensas. Portanto, esse tecido vem sendo alvo de

estudos, nas últimas décadas e diferentes estratégias foram utilizadas focando principalmente sua recuperação (WEBBER, 1990; PANGBORN e ATHANASIOU, 2005; CHIARI *et al.*, 2006; RAMASWAMY *et al.*, 2006; BAKER e MAUCK, 2007).

Dentre elas, optou-se pela reposição do menisco com matérias autólogos, como tendão (KOHN *et al.*, 1992), tecido adiposo (KOHN *et al.*, 1997) e pericôndrio (BRUNS *et al.*, 1998). No entanto, o uso desses materiais naturais mostrou resultados insatisfatórios, devido a suas propriedades mecânicas desfavoráveis, às dificuldades em mantê-los fixados no local do implante, bem como a limitação na obtenção desses substitutos naturais (ARNOCZKY *et al.*, 1988; WEBBER *et al.*, 1988).

Quanto ao uso de próteses, não há materiais artificiais que apresentem propriedades mecânicas similares ao menisco original (BUMA *et al.*, 2004). A aplicação de materiais sintéticos não absorvíveis, embora permita a invasão celular, deposição de colágeno tipo I e II e formação de um neotecido com características semelhantes à fibrocartilagem (KLOMPMAKER *et al.*, 1996), falham ao conferir capacidade protetora para as cartilagens articulares após longos períodos (RIJK, 2004).

No que se refere ao uso de materiais naturais, Reguzzoni *et al.* (2005) avaliaram aspectos morfológicos de reparo através do uso de matrizes comerciais de colágeno após meniscectomia parcial em humanos. Seus resultados mostraram que o suporte de colágeno não induziu resposta imunológica e favoreceu a invasão tecidual, em contraste, estudos em animais reportam extensa reabsorção do material após 6 semanas, propiciando futuros sítios de degeneração articular (STONE *et al.*, 1990).

O estudo do composto aromático 4,4-difenilmetano e diisocianato poroso como menisco artificial foi realizado por Tienen *et al.* (2006), onde a infiltração de tecido fibrovascular e a diferenciação fenotípica especificamente localizada foram observações importantes. No entanto, os implantes não suprimiram a degeneração da cartilagem articular. Esses resultados se

assemelham aos de Kobayashi *et al.* (2005) ao utilizarem um menisco artificial de hidrogel-poli-ácido vínilico (PVA-H), onde observaram sítios de degeneração articular.

Diante destas dificuldades, o uso de polímeros hidroliticamente degradáveis na regeneração de menisco tem sido estudado (ELEMA *et al.*, 1990; FREED *et al.*, 1993a; PEZZIN *et al.*, 2003; TIENEN *et al.*, 2003; BECKER *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2009).

Em um procedimento de meniscectomia medial, Pezzin *et al.* (2003) utilizaram blendas de poli(ácido láctico)/poli(p-dioxanona) para estimular a formação de um neomenisco. A análise de seus resultados indicou que a blenda propiciou a formação de um tecido fibrocartilagenoso com células do tipo condrócitos e que permitiu a proteção das cartilagens articulares quando comparado ao grupo controle sem implante.

Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre a seqüência de eventos bioquímicos e biomecânicos ligados à aplicação de forças, na determinação do processo inflamatório ou mudanças degenerativas da fibrocartilagem e de que forma essas interações agem no estabelecimento da artrite (SHIN *et al.*, 2003).

A determinação dos componentes da matriz extracelular e a compressão de sua síntese, do ponto de vista temporal e quantitativo, compreendem objetivos a serem alcançados em estudos futuros. Tienen *et al.* (2003) realizaram experimentos *in vivo* em cães, mediante secção de determinadas porções do menisco lateral e avaliaram a resposta de reconstituição com a inserção de uma blenda de poli(caprolactona)/poli(L-ácido láctico) (50/50) ou na ausência desta. Os resultados mostraram deposição de colágeno tipo II e síntese de proteoglicanos apenas nos testes em que o polímero foi utilizado.

A necessidade de uma fonte celular para propiciar a formação de um neotecido representa um dos princípios da regeneração humana (CARLSON, 2005). A compreensão acerca das características proliferativas e da diferenciação das células progenitoras naturais de um tecido permite o desenvolvimento de meios que as mantenham ou que estimulem a sua expansão *in vitro*

antes de implantá-las em áreas lesadas (RISBUD e SITTINGER, 2002). Como pré-requisito para estimular as etapas iniciais de regeneração tecidual é inegável o papel suporte da matriz extracelular local (BADYLAK, 2002; HOSHIBA *et al.*, 2006).

Devido às suas características de degradação e biorreabsorção (DUEK *et al.*, 1999), os poli (α -hidroxi ácidos) representam uma alternativa promissora para regeneração tecidual e fazem parte de uma família amplamente utilizada na área biomédica (ZHAO *et al.*, 2003), pois além de biorreabsorvíveis, são biocompatíveis (SAKATA *et al.*, 2004).

Não obstante, a engenharia tecidual fibrocartilaginosa, utilizando células do menisco e arcabouços poliméricos, representa uma alternativa para o tratamento de lesões do menisco (KANG *et al.*, 2006).

Freed e colaboradores (1993a) comprovaram que o tecido cartilaginoso pode ser regenerado através de uma cultura de condrócitos em um substrato poroso de PGA (FREED *et al.*, 1993b; FREED *et al.*, 1994). Grande *et al.* (1997) relatou que células cartilaginosas cultivadas em poliésteres como PLLA e PGA tendem a ter um aumento na síntese de proteoglicanos e de colágeno quando comparadas com células cultivadas em matriz de colágeno.

Ibarra *et al.* (1997) obtiveram tecido fibrocartilaginoso através do uso de substrato poroso de poli(ácido glicólico) (PGA) e fibrocondrócitos de menisco isolados em cultura. Os fibrocondrócitos cresceram e se expandiram no substrato biorreabsorvível e ao serem implantados no subcutâneo de ratos formaram, após algumas semanas, um tecido semelhante ao tecido do menisco (IBARRA *et al.*, 1997).

Como resultado do uso de células-tronco mesenquimais para regeneração de cartilagem em um suporte híbrido de PLGA-GHC, Fan *et al.* (2006) observaram o aumento da proliferação celular e da síntese de glicosaminoglicanos em relação aos resultados obtidos com implante de PLGA puro. No entanto, estes materiais têm sido utilizados para a regeneração parcial do tecido fibrocartilaginoso e não completa regeneração de toda a estrutura do menisco.

O sucesso para cultura de tecido fibrocartilaginoso está na seleção do tipo celular adequado. Estas células devem ser capazes de prosperar em um ambiente avascular, que se baseia na difusão de nutrientes do líquido sinovial e de formar uma conexão em torno da matriz do menisco que será submetido aos movimentos da articulação normal (MARSANO *et al.*, 2006). Uma escolha óbvia é a utilização de células nativas do menisco, os fibrocondrócitos (WEINAND *et al.*, 2006b).

Os resultados observados no cultivo de fibrocondrócitos em suportes de membranas de PLLA e arcabouços de PLGA e PLDLA demonstraram que houve uma adequada biocompatibilidade desse material ao ser usado como substrato, permitindo a adesão, o crescimento e a organização dos elementos da matriz extracelular (SILVA, 2007; ESPOSITO *et al.*, 2008b; ESPOSITO *et al.*, 2009c).

Como recurso para promoção do crescimento e da diferenciação celular, a utilização de bioreatores pode melhorar a uniformidade da distribuição de células e da produção de moléculas da matriz extracelular, com contribuição ímpar para o avanço da engenharia tecidual (AUFDERHEIDE e ATHANASIOU, 2005; VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2005).

Estudos recentes comprovaram que o cultivo de células sobre substratos poliméricos e posterior implante pode aumentar a viabilidade do processo de cura de lesões na cartilagem, se eficientes materiais forem desenvolvidos, como polímeros fibrosos biorreabsorvíveis e outras estruturas porosas (PERETTI *et al.*, 2004; MARTINEK *et al.*, 2006; WEINAND *et al.*, 2006a; WEINAND *et al.*, 2006b; WILLIAMS, 2006; WEINAND *et al.*, 2009). No entanto, nenhum trabalho foi encontrado citando a regeneração do menisco pelo procedimento de meniscectomia medial com co-cultivo celular e o tipo celular ideal para este propósito ainda não foi identificado. Células autólogas e alógenas de meniscos, condrócitos articulares, fibrocondrócitos, fibroblastos e células-tronco mesenquimais representam possíveis fontes celulares (MULLER-RATH *et al.*, 2004; HOBEN e ATHANASIOU, 2006; YAMASAKI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; SEGAWA *et al.*, 2009).

Desta forma, a criação de novas fronteiras para ciência dos materiais desafia os pesquisadores na geração de dispositivos para uso médico capazes de efetivamente dirigir os processos envolvidos na reconstituição tecidual e ganhos de função de uma parte lesada ou órgão (SILVA, 2007).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

O fluxograma abaixo (figura 3) ilustra a sequência de etapas empregadas desenvolvidas na metodologia deste trabalho.

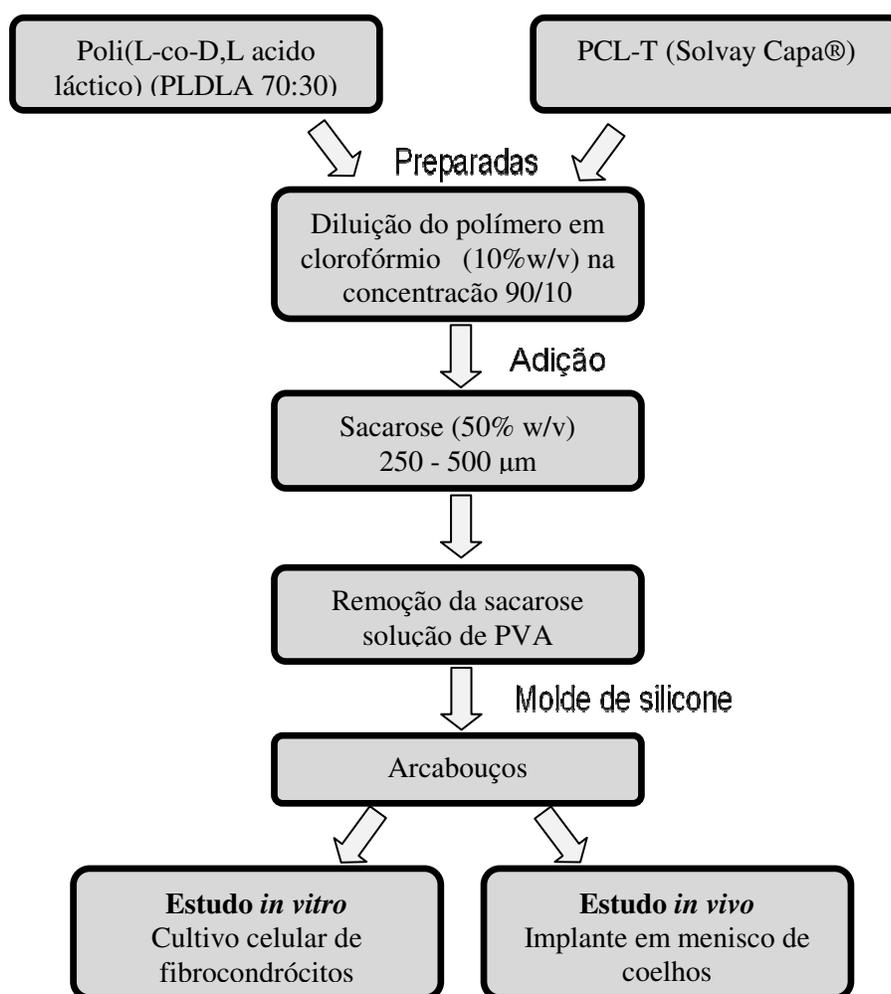


Figura 3 - Fluxograma da metodologia empregada.

3.1 Preparação das Soluções Poliméricas

O poli(L-co-D,L ácido láctico) (70:30), PLDLA, foi sintetizado no Laboratório de Biomateriais – PUC-SP, com massa molar média de $265028 \text{ g.mol}^{-1}$. A poli(caprolactona triol), PCL-T, cujo nome químico é 2-oxepanona, polímero com 2-etil-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, foi fornecida pela Solvay[®] (CAPA 3091), com massa molar média de 900 g.mol^{-1} .

Soluções de PLDLA/PCL-T na composição 90/10 foram preparadas por diluição do polímero em clorofórmio (Merck[®]) (10% m/v). Após completa dissolução dos polímeros foi adicionada sacarose (Synth[®]) 50% m/v com granulometria controlada entre 250 e 500 μm . As soluções foram vertidas em moldes de silicone confeccionados nas mesmas dimensões do menisco de coelho com espessura entre 0,1 e 0,2 mm. A figura 4 mostra o arcabouço produzido e sua comparação com o menisco medial (em seu formato biológico).

Após evaporação do solvente e remoção da sacarose em PVA (Poli Álcool Vinílico) os arcabouços foram submetidos ao cultivo celular de fibrocondrócitos para posterior implante.

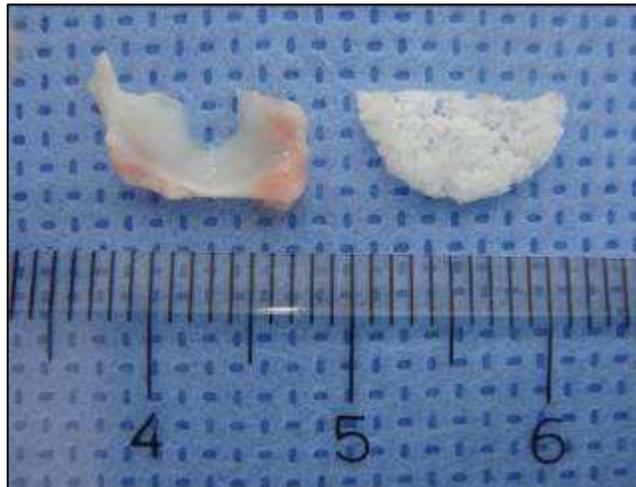


Figura 4 – Comparação entre o menisco original (à esquerda) e o arcabouço de PLDLA/PCL-T (à direita) implantado *in vivo*.

3.2. Estudo *in vitro* - Estudo da cultura de células

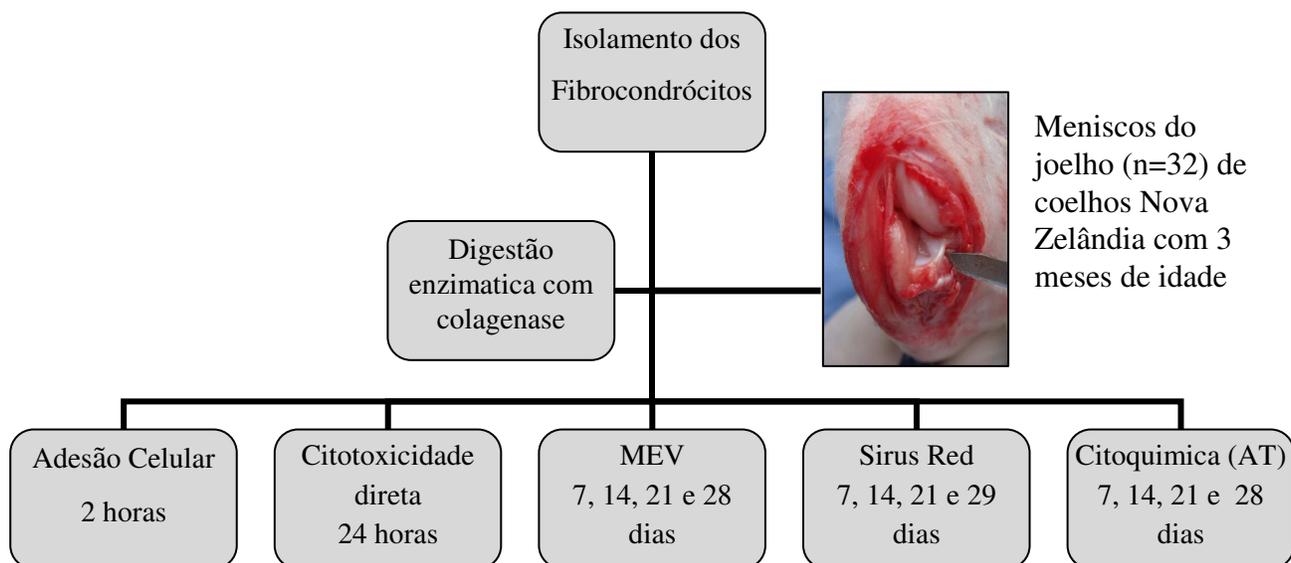


Figura 5 – Fluxograma do procedimento experimental realizado na etapa *in vitro*.

Em todos os ensaios as amostras foram pré-incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas, conforme as normas da ISO 10993-5 (1992) recebendo 100 µL de Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) sem soro fetal bovino (SFB).

3.2.1. Obtenção de fibrocondrócitos a partir de meniscos de coelhos

As culturas de fibrocondrócitos, isoladas a partir de um pool de meniscos ($n = 32$), foram obtidas de acordo com adaptações do protocolo padronizado por Figueiredo e Joazeiro (2005), como descrito a seguir. Neste procedimento foram utilizados 8 coelhos albinos machos, com idade aproximada de 90 dias. Os animais foram anestesiados utilizando uma combinação de cloridrato de xilazina (3.33 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (16.6 mg/Kg), administrados por meio de injeção intramuscular e sacrificados por aprofundamento de anestesia com tiopental de acordo com o estatuto do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto de lei PL 1153/95. As fibrocartilagens foram retiradas através da secção transversal da cápsula articular e os meniscos mediais e laterais esquerdo e direito foram coletados e mantidos em meio de cultura DMEM com 0,2M de L-glutamina, suplementado com 10% de SFB (Cultilab®),

adicionado de 50 mg/L de gentamicina (Sigma[®]) e 2,5 mg/L de anfotericina B (Sigma[®]). Em ambiente estéril, os tecidos moles adjacentes às fibrocartilagens foram cuidadosamente retirados. As fibrocartilagens foram posteriormente fragmentadas e submetidas à digestão enzimática para extração celular em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1mg/mL de colagenase tipo IA (Sigma[®]) durante 3 horas a 37°C. Em seguida realizou-se a centrifugação, em três etapas de 10 minutos a 1000 rpm, com subsequente ressuspensão em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após a centrifugação foi realizada a quantificação da viabilidade celular com emprego do corante vital Azul de Tripan em câmara hemocitométrica (Neubauer).

Os fibrocondrócitos obtidos foram semeados em uma densidade de aproximadamente 10⁶ células/mL diretamente nos arcabouços contendo o meio de cultura DMEM, suplementado com SFB. Os frascos foram incubados a 37°C em atmosfera saturada de vapor d'água e 5% de CO₂, onde as células puderam aderir e proliferar. Placas de 24 poços com lamínulas de vidro foram utilizadas para controle do crescimento celular. As trocas do meio de cultura foram realizadas sempre que houve a acidificação do mesmo bem como o monitoramento dos cultivos celulares em microscópio invertido Eclipse TS 100 (Nikon[®]).

3.2.2. Teste de citotoxicidade direta e Ensaio de adesão celular

Para os ensaios de adesão celular e citotoxicidade direta foi utilizado uma modificação do método descrito por Mosmann, 1983. Os arcabouços foram colocados no fundo de placas de cultura com 96 poços (Corning/Costar Corporation[®], Cambridge, USA). Em conjunto com os arcabouços, empregaram-se discos de teflon e a própria placa de poliestireno, tradicionalmente utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo nos ensaios de adesão celular ($n = 6$). Para determinar a citotoxicidade dos arcabouços, a própria placa de polipropileno foi utilizada como controle negativo e fenol (1%) como controle positivo ($n = 6$).

Após a ambientação dos arcabouços, o meio foi retirado e os poços semeados com aproximadamente 10⁶ células/mL em meio DMEM com 10% de SFB.

As placas foram incubadas durante 2 horas para análise de adesão e 24 horas para análise da citotoxicidade em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação, o meio foi retirado e os poços lavados rapidamente com o mesmo meio. Posterior a lavagem, adicionou-se a cada poço 100µL de meio fresco sem SFB e 50 µL de meio contendo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium MTT (5mg/mL), seguindo-se um período de incubação de 4 horas a 37°C no escuro. Após esse tempo, os 150 µL contendo MTT foram substituídos por uma solução de 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 25 µL de tampão Glicina/Sorensen. Em seguida, 100 µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa e a absorbância do MTT foi lida em leitor de microplacas BioTek®, Elx 800, USA com emprego de comprimento de onda de 570 nm. Foram realizadas análises estatísticas para ambos os experimentos envolvendo o MTT.

As mitocôndrias de células vivas, por meio da enzima succinato de hidrogenase, são capazes de reduzir a substância amarelada solúvel em água MTT convertendo-a em um composto insolúvel em água, o formazan, o qual é solubilizado pelo DMSO. A quantidade de formazan produzida, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional a atividade metabólica e ao número de células vivas.

Previamente a realização dos ensaios envolvendo o MTT, as amostras foram incubadas em condições semelhantes aos testes de adesão celular e citotoxicidade com a diferença de se adicionar meio sem células para verificar uma possível reação do MTT com os suportes.

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para investigar a morfologia da superfície dos arcabouços e morfologia celular sobre os arcabouços. As amostras poliméricas foram fraturadas em nitrogênio líquido, fixadas em um suporte metálico e recobertas com uma fina camada de ouro.

Os fibrocondrócitos foram observados após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo. As amostras foram fixadas durante 1 hora a temperatura ambiente em solução fixadora contendo 2,5%

paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído, 0,06% ácido pícrico, 1% ácido tânico dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e desidratadas em concentrações crescentes de etanol. As amostras foram secas em Ponto Crítico (Balzers[®] CTD 030), recobertas por ouro (Balzers[®] SCD 050) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL[®] JXA 860A). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.4. Ensaio colorimétrico - Sirius Red

O ensaio com o corante Sirius Red foi realizado de acordo com metodologia descrita por Tullberg-Reinert e Jundt (1999). O método é baseado na ligação seletiva do Sirius Red, um corante aniônico, com proteínas colágenas e tem sido aplicado para mensuração estimada da deposição de colágeno em culturas de células (GIORDANO *et al.*, 2004; SARUWATARI *et al.*, 2005).

Os arcabouços foram colocados no fundo de placas de cultura com 96 poços (Corning/Costar Corporation[®], Cambridge, USA) ($n = 6$). Em conjunto com os arcabouços, empregou-se a própria placa de poliestireno para ser utilizada como controle da cultura celular. Após o cultivo por 7, 14, 21 e 28 dias, o meio foi retirado e os poços lavados intensamente com tampão fosfato salino (PBS). Foram adicionados 100 μ L de solução fixadora - Fluído de Bowin - incubando-se durante 1 hora. Após este tempo, a solução de cada poço foi removida e foram realizadas 3 lavagens de 5 min com PBS. O excesso de PBS foi removido e o corante Sirius Red adicionado. Após o tempo de 1 hora, o máximo do corante excedente foi removido e procedeu-se a lavagem com 150 μ L de solução de ácido hidroclicóric 0,01 M por 30 segundos para remoção do corante que não se ligou. Em seguida, o corante foi retirado das camadas celulares com a adição de solução de NaOH 0,1 M durante 30 minutos. Alíquotas de 100 μ L das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância das alíquotas foi medida em um leitor de microplacas BioTek[®], Elx 800, USA, utilizando-se filtro no comprimento de onda de 570 nm.

Com o intuito de padronizar as análises, todos os arcabouços foram mantidos sob as mesmas condições sem células, avaliando-se assim a absorvência do material pelo corante. Estes resultados foram descontados dos resultados obtidos pós-cultivo celular obtendo-se assim, a real absorvência apresentada pelos cultivos celulares sobre os arcabouços durante os tempos.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste ANOVA, com níveis de significância $\alpha = 0.01$.

3.2.5. Análise Citoquímica

A citoquímica mostra a atividade metabólica das células cultivadas nos suportes. Após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% a 4°C. Após 1 hora as amostras foram lavadas em PBS, desidratadas em séries crescentes de etanol, embebidas e inclusas em moldes contendo resina glicol metacrilato. As amostras foram colocadas em estufa a 37°C por 48 horas para a polimerização da resina. Cortes de 2 μm foram preparados em micrótomo Leica[®] RM2245 e corados com azul de toluidina (AT), pH 4,0, um corante básico que cora com grupos aniônicos. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico com luz polarizada (Eclipse E800 – Nikon[®]). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3. Estudo *in vivo* – Implante dos arcabouços e controles

Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIVAP n° do protocolo A047/CEP/2009 (Anexo I).

Com base na literatura (PERETTI *et al.*, 2004; MARTINEK *et al.*, 2006) e nos resultados obtidos no ensaio colorimétrico desenvolvido na etapa *in vitro* deste estudo, selecionou-se o tempo de 21 dias de cultivo para aplicação na etapa *in vivo*.

O mesmo inoculo celular e as mesmas condições de cultivo utilizadas na etapa *in vitro* foram utilizadas no preparo dos arcabouços para o procedimento *in vivo*.

3.3.1. Implante do material – Técnica cirúrgica

Neste trabalho, foram utilizados 20 coelhos albinos, Nova Zelândia, de ambos os sexos, com idade mínima de 150 dias e metodologia utilizada por Cardoso (2002). Os animais foram submetidos à anestesia geral via intramuscular com solução de cloridrato de cetamina 5% (30 mg/kg de peso), associado a cloridrato de xilazina 2% (3 mg/kg de peso). Antes da cirurgia os animais permaneceram em jejum por 12 horas. Foi realizada tricotomia da área a ser operada. Os coelhos foram posicionados em mesa cirúrgica apropriada, em decúbito dorsal horizontal. A assepsia foi feita com solução de álcool iodado a 50% aplicado com gazes estéreis. A cirurgiã fez uso de luvas cirúrgicas estéreis e materiais cirúrgicos esterilizados em autoclave à 120°C.

A via de acesso utilizada para o implante foi a parapatelar medial, longitudinal, com aproximadamente 5 cm de extensão, seguida de dissecação do tecido subcutâneo, capsulotomia parapatelar medial, deslocamento do aparelho extensor do joelho (tendão quadricipital e tendão patelar) lateralmente, secção do ligamento colateral medial na interlinha articular, ressecção cuidadosa do menisco medial *in toto*, sem danificar a cartilagem articular do côndilo femoral medial e implante do arcabouço (figura 6).

A fixação do implante foi feita com fio de sutura de nylon monofilamentado nº 5-0, com 2 pontos, sendo um anterior e outro perifericamente na porção média da prótese. A sutura envolveu o arcabouço polimérico (prótese) e tecidos capsulares perimeniscais. Após a implantação, foi realizado o fechamento por planos, os cortes foram suturados com mono nylon 4-0 em pontos separados na cápsula, reparo do ligamento colateral medial e sutura contínua na pele. O curativo pós-operatório foi feito com gaze estéril embebida em álcool iodado a 50%.

Os animais foram colocados em gaiolas individuais suspensas, imediatamente após a cirurgia e mantidos no Biotério da FCMS-PUC/SP, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.



Figura 6 – Procedimento cirúrgico para o implante dos arcabouços com o pré-cultivo de fibrocondrócitos e arcabouços sem células. A via de acesso utilizada para o implante foi a parapatelar medial.

Grupos

Os coelhos foram divididos em 4 grupos cada um com 5 animais, onde os tempos de 12 e 24 semanas indicaram quantas semanas decorreram entre a cirurgia e a eutanásia:

Grupo A₁₂ - designa o lado direito para o implante da prótese alógena (i.e. previamente cultivada com fibrocondrócitos provenientes de outros indivíduos da mesma espécie).

Grupo B₁₂ - designa o lado direito para o implante da prótese polimérica (arcabouço de PLDLA/PCL-T).

Grupo A₂₄ - designa o lado direito para o implante da prótese alógena.

Grupo B₂₄ - designa o lado direito para o implante da prótese polimérica (arcabouço de PLDLA/PCL-T).

Controles - designa o lado esquerdo de todos os grupos como sendo o controle, onde será realizada a meniscectomia por incisão parapatelar medial.

3.3.2. Retirada do material - Eutanásia e coleta de tecido

Para este procedimento, em tempos pré-determinados de 12 e 24 semanas (MARTINEK *et al.*, 2006; WEINAND *et al.*, 2006a; WEINAND *et al.*, 2006b; ANGELE *et al.*, 2008), os coelhos foram sacrificados com overdose de halotano (anestésico inalante). Após a constatação da morte dos animais os mesmos foram posicionados em decúbito dorsal horizontal. Por via de acesso parapatelar medial, foram retirados os “neomeniscos” (prótese e tecido ao redor) dos dois joelhos. Estes tecidos foram fotografados e colocados imediatamente em fluído de Bowin (composto de ácido pícrico, formaldeído e ácido acético) para fixação por um período de 24 horas, em recipientes de vidro individualmente identificados, que mantem a integridade dos tecidos após a morte, sem alterar a estrutura celular e a composição química.

3.3.3. Processamento do material – Análises histológicas

As amostras foram processadas para análise histológica de acordo com as técnicas convencionais utilizadas para microscopia de luz.

3.3.3.1. Embebição em Parafina – Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM)

As amostras foram submetidas aos seguintes processos: lavagem; desidratação em soluções crescentes de etanol; diafanização em etanol absoluto/xilol na proporção de 1:1 por 30 minutos; em seguida xilol puro por 30 minutos; embebição em xilol/parafina (Histosec-Merck®) a 60°C na proporção 1:1 por 30 minutos; seguida de parafina pura por 3 horas e inclusão em parafina líquida à temperatura ambiente.

Após estas etapas, o material foi colocado em formas de aproximadamente 5 cm³ e preenchido com parafina a 60°C, formando blocos. Esses blocos de parafina com o material incluído foram deixados em repouso durante 24 horas em temperatura ambiente para o endurecimento da mesma. Em seguida, foi realizado o aparado dos blocos para o processo de corte.

Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo Leica[®] RM2245 com espessura de 5 µm e prosseguiu-se com a coloração das lâminas com HE e TM.

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico com luz polarizada (Eclipse E800 – Nikon[®]).

3.3.3.2. Embebição em Resina Glicol Metacrilato - Azul de Toluidina (AT)

Após fixadas, as amostras foram processadas conforme a seguir: lavagem em tampão fosfato 0,02 M (pH 7,4); desidratação em gradiente crescentes de etanol; embebição em etanol a 100% e resina na proporção de 1:1, por 2 horas. Em seguida, resina pura e embebição em resina para posterior polimerização.

Os preparados foram seccionados com navalhas de vidro em micrótomo Leica[®] RM2245 a uma espessura de 2µm e posteriormente corados com solução de Azul de Toluidina 0,1% em Bórax a 1%, pH 4,0.

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico com luz polarizada (Eclipse E800 – Nikon[®]).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Estudo *in vitro*

O desenvolvimento de biomateriais capazes de orientar diretamente o comportamento celular é uma área de pesquisa em crescimento. As aplicações incluem dispositivos para substituição e regeneração de tecidos, bem como substratos para cultura celular em engenharia tecidual. Em ambas as situações as interações celulares com os biomateriais precisam ser analisadas (SANTOS JR. *et al.*, 2004).

4.1.1. Teste de citotoxicidade direta e Ensaio de adesão celular

Sabe-se que os principais parâmetros da interação célula/biomaterial incluem toxicidade, adesão celular e proliferação (VAN KOOTEN *et al.*, 2004; WAN *et al.*, 2005).

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade e adesão celular obtidos por MTT após o cultivo de fibrocondrócitos sobre arcabouços de PLDLA/PCL-T 90/10 podem ser observados nas figuras 7 e 8.

O teste Tukey foi usado para comparar as amostras quanto citotoxicidade dos arcabouços de PLDLA/PCL-T e seus respectivos controles. Após 24 horas de cultivo (figura 7), o controle positivo utilizado (fenol 1%) mostrou-se estatisticamente menor que todas as amostras ($p < 0,01$). A viabilidade celular conferida pelo arcabouço de PLDLA/PCL-T foi maior quando comparada

ao controle negativo (poliestireno), sendo de $0,602 \pm 0,129$ e $0,324 \pm 0,030$, respectivamente; e mais de três vezes em relação ao controle positivo (fenol 1%), $0,168 \pm 0,004$. Esses resultados indicam que o material estimula e sustenta a viabilidade de células fibrocartilaginosas.

Como os controles positivos e negativos exibiram diferença significativa entre as médias ($p < 0,01$), estes nos fornecem dados consistentes para controles padronizados, com os quais se podem comparar a citotoxicidade de materiais.

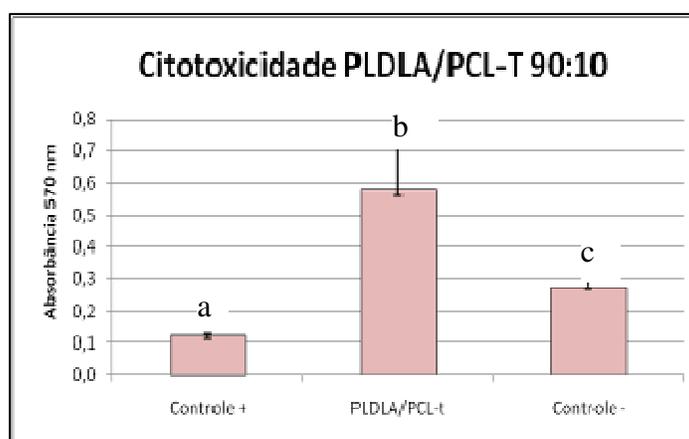


Figura 7 – Citotoxicidade direta após 24 horas de semeadura em arcabouços de PLDLA/PCL-T. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 6$). O arcabouço apresenta resultado superior ($p < 0,01$) a ambos os controles. Controle positivo = Fenol 1% e Controle negativo = PS. As letras indicam que as amostras são significativamente diferentes entre si.

Os resultados do teste ANOVA mostraram diferença significativa ($p < 0,01$) entre as amostras na análise de adesão (figura 8). O arcabouço de PLDLA/PCL-T apresentou resultado significativamente diferente entre ambos os controles, ou seja, maior absorbância quando comparado ao controle negativo (teflon) ($p < 0,01$) e menor absorbância quando comparado ao controle positivo (poliestireno, PS) ($p < 0,01$).

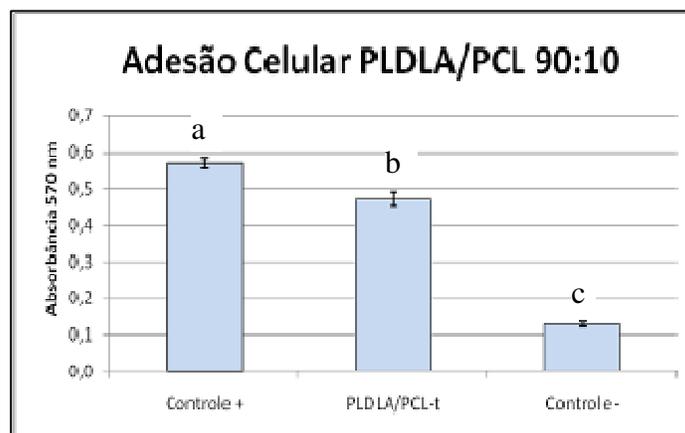


Figura 8 – Adesão celular de fibrocondrócitos nos arcabouços de PLDLA/PCL-T após 2 horas de cultivo. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n = 6). O arcabouço apresenta resultado superior ($p < 0,01$) ao seu respectivo controle negativo. Controle positivo = PS e Controle negativo = Teflon. As letras indicam amostras significativamente diferentes entre si.

O primeiro passo para seleção de um material a ser utilizado como implante em humanos é avaliar a sua toxicidade e os danos que ele pode causar aos tecidos. A grande maioria dos compostos desenvolvidos é rejeitada nesta etapa por serem tóxicos as células, causando sua morte ou por promoverem uma forte reação tecidual com grande processo inflamatório ou, até mesmo, necrose tecidual.

Entretanto, afirmar que um material não é tóxico para as células não representa que ele será um bom substrato. Também é necessário que as células interajam com o biomaterial através da adesão celular.

A afinidade celular é um fator de suma importância no que se refere ao uso de materiais poliméricos biorreabsorvíveis como suporte para cultura de células e engenharia tecidual (YANG *et al.*, 2002). A afinidade celular inclui dois fatores importantes: ancoragem e o crescimento celular. A ancoragem celular pertence a primeira fase da interação célula/material e a qualidade dessa fase irá influenciar na capacidade de proliferação e diferenciação celular em contato com o material.

A interação das células com os materiais depende do reconhecimento entre receptores específicos de adesão celular presentes na superfície da membrana celular e de proteínas da matriz extracelular (fibronectina, vitronectina e colágeno) que possuem o domínio de ligações celulares (YANG *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2004). Através da adsorção de proteínas ao substrato há formação de um complexo o qual induz à célula a adesão e a proliferação (SHIN, 2007).

Muitos estudos têm provado que a hidrofiliicidade/hidrofobicidade, energia de superfície, interações entre cargas e forças eletrostáticas do material influenciam fortemente a adesão celular e o crescimento celular no material (YANG *et al.*, 2002), visto que as células, geralmente, exibem boa adesão celular em materiais com moderada hidrofiliicidade (YAMAGUCHI *et al.*, 2004).

Uma gama de estudos vêm sendo realizada na tentativa de produzir materiais e dispositivos que sirvam como próteses para preencher defeitos causados por lesões ou doenças degenerativas em articulações devido à baixa capacidade de um tecido avascular como o tecido cartilaginoso se regenerar. Os polímeros biorreabsorvíveis, além de seus copolímeros e blendas, destacam-se como substitutos temporários para tais aplicações (SANTOS e WADA, 2007), entretanto poliésteres sintéticos biorreabsorvíveis como o PLGA, PLLA e o PLDLA possuem reconhecida lenta adesão celular (YAMAGUCHI *et al.*, 2004) em comparação com substratos de poliestireno, apesar de sua biocompatibilidade (SANTOS JR *et al.*, 2001; SANTOS JR *et al.*, 2004; BARBANTI *et al.*, 2005; MALVEZZI *et al.*, 2008) devido à hidrofobicidade desses materiais (DUARTE *et al.*, 2007).

Estudos prévios já haviam demonstrado que o copolímero PLDLA não apresenta toxicidade aferida pelo ensaio do MTT a células osteoblásticas (IGNATIUS e CLAES, 1996; MESSIAS *et al.*, 2008; MAS *et al.*, 2008) e a células fibrocartilaginosas (ESPOSITO *et al.*, 2008b; ESPOSITO *et al.*, 2009a; ESPOSITO *et al.*, 2009b). Além disso, a adição de PCL-T a este mesmo copolímero foi capaz de aumentar a adesão e viabilidade de células osteoblásticas graças ao acréscimo da hidrofiliicidade (COPPINI *et al.*, 2006).

Da mesma forma, a análise com MTT revelou que o arcabouço de PLDLA/PCL-T 90/10 não é tóxico para as células deste estudo, pois não afetou a atividade mitocondrial dos fibrocondrócitos. Embora uma substância tóxica não afete apenas uma estrutura molecular, considerou-se que a imediata determinação da atividade mitocondrial como suficiente para validar a viabilidade das células (LUCCHESI *et al.*, 2008).

4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As eletromicrografias da superfície e da superfície de fratura dos arcabouços de PLDLA/PCL-T na composição 90/10 estão apresentadas na figura 9. O arcabouço apresentou superfície irregular, porosa, com distribuição heterogênea no tamanho dos poros, fato este resultante do processo de produção obtido pela técnica de lixiviação (figura 9A). A superfície de fratura (figura 9B) apresentou o mesmo aspecto morfológico, revelando a presença de poros dispersos, característica importante para o cultivo celular.

Sabe-se que a porosidade nos substratos poliméricos é considerada como morfologia preferencial para aplicação na engenharia tecidual (TANG e HUNT, 2006). Os poros aumentam a área superficial das amostras promovendo, assim, espaço adequado para a invasão celular e vascular, facilitando a difusão dos fluidos orgânicos e a deposição de elementos da matriz extracelular durante a cultura de células e quando implantado no organismo hospedeiro (MIKOS e TEMENOFF, 2000; KARAGEORGIU e KAPLAN, 2005)

No entanto, o tamanho, a distribuição do tamanho e as interconexões entre os poros variam em função do tamanho das células invasoras e das propriedades mecânicas requeridas do implante (SARAZIN *et al.*, 2004; DECLERCQ *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2005; ARAI *et al.*, 2008).

Os estudos de polímeros com macroporos, entre 250 - 500µm de diâmetro, para uso como prótese de menisco, demonstraram propriedades superiores com respeito à formação de tecido e manutenção das propriedades mecânicas (KLOMPMAKER *et al.*, 1993; VAN TIENEN *et al.*,

2003; MAHMOOD *et al.*, 2005) em comparação com poros menores entre 50 – 300 μm no cultivo de fibrocondrócitos (KLOMPMAKER *et al.*, 1993; VAN TIENEN *et al.*, 2002).

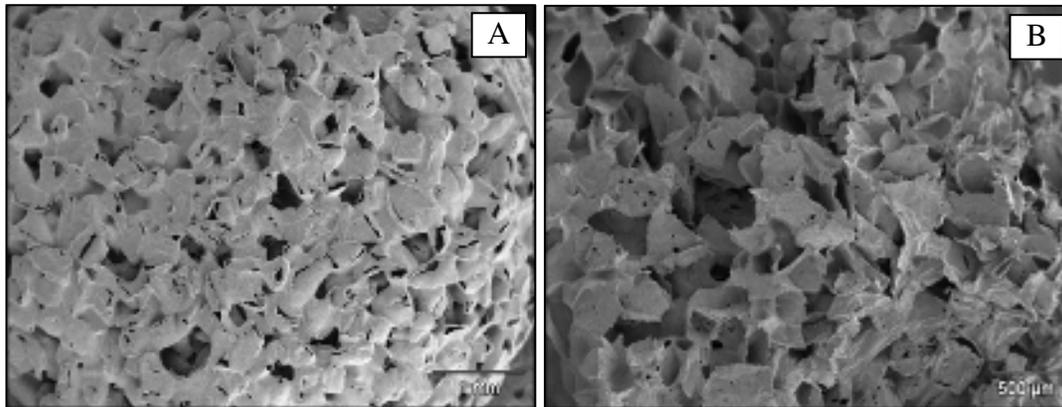


Figura 9 – Micrografias obtidas por MEV do arcabouço polimérico de PLDLA/PCL-T 90/10. (A) Superfície do arcabouço e (B) Superfície de fratura do arcabouço.

Os resultados obtidos através da MEV evidenciaram que os arcabouços de PLDLA/PCL-T, independentemente do tempo de cultura, permitiram que os fibrocondrócitos se estabelecessem nos arcabouços, aderindo, seguido pela extensão de projeções citoplasmáticas e posterior colonização celular (figura 10). Padrões semelhantes de morfologia celular foram observados entre os arcabouços e controles (lamínulas de vidro) e resultados previamente obtidos pelo grupo em diferentes arcabouços poliméricos (ESPOSITO *et al.*, 2008a; ESPOSITO *et al.*, 2008b; ESPOSITO *et al.*, 2009a; ESPOSITO *et al.*, 2009b).

Após 7 dias, as células cultivadas sobre os arcabouços encontraram-se bem espreiadas e aderidas, apresentando morfologia alongada e estrelada, com grande quantidade de prolongamentos celulares intercomunicando-as (figura 10A e B).

Estes resultados também foram obtidos por Figueiredo e Joazeiro (2005), Hellio Le Graverand *et al.* (2001), Isoda e Saito (1998), Tanaka *et al.* (1999) e Webber *et al.* (1985), demonstrando que fibrocondrócitos quando cultivados em cultura apresentaram mudança na morfologia celular para alongada, com aparência fibroblástica e presença de prolongamentos

celulares que facilitam a comunicação celular e conseqüentemente, a secreção dos fatores de crescimento *in vitro* influenciando o ambiente celular.

Além disso, substratos tridimensionais porosos fornecem maior espaço físico, permitindo o crescimento e colonização das células entre os poros e por conseqüência, há um maior número de pontos que favorecem a adesão celular, resultando em uma morfologia predominantemente estrelada (LAWRENCE e MADIHALLY, 2008).

Foi possível observar pequenos agrupamentos de células em certas regiões dos arcabouços, assim como nos controles, característica esta importante para iniciar uma resposta reparadora, já que os fibrocondrócitos apresentam como habilidade intrínseca aderir em pequenos grupos (grumos) celulares e esta característica pode ser perdida ao longo da primeira passagem na expansão do cultivo *in vitro* (ARAUJO, 2000).

Notou-se também a presença de material particulado entrelaçado em certas regiões sobre os arcabouços. A presença deste material foi também constatada na lamínula controle, no entanto, este se apresentou em menor quantidade e igualmente distribuído sobre o controle, quando comparado aos arcabouços (figura 10).

Sabe-se que a presença de elementos fibrilares depositados junto às células evidencia a manutenção da capacidade de síntese celular (SILVA, 2007) e que a adesão celular ao substrato não somente estimula a proliferação, mas também sua atividade biossintética (LOMBELLO *et al.*, 2000).

Nas imagens observadas após 21 e 28 dias cultivo (figura 10G, H, J, K) notou-se um aumento crescente na densidade de células e presença de material particulado sobre os arcabouços. Os fibrocondrócitos mostraram-se achatados e espalhados, de acordo com o perfil celular caracterizado por Verdonk *et al.* (2005).

A partir do tempo de 21 dias observou-se que o grande número de células agrupadas e justapostas em pequenos espaços, em algumas regiões sobrepondo os poros, dificultou a definição dos limites celulares (figura 10G, H, J, K), indicando o início da formação de um tapete celular de difícil distinção.

Conforme observado na figura 10L, o controle já não sustenta mais a cultura celular no tempo de 28 dias devido à formação de uma monocamada, limitação de espaço por contato e consequente desprendimento das células da lâmina de vidro. Este comportamento não foi observado nos arcabouços, possivelmente devido a estrutura tridimensional.

Após a confluência, as células perdem sua motilidade e passaram a apresentar inibição por contato que é observado em culturas primárias. Essas alterações, descritas por Abercrombie e Heaysman (1953; 1954), demonstraram que as células controlam a sua densidade populacional de maneira análoga ao sistema de retroalimentação negativo, por meio da influência dos fatores de crescimento e das proteínas da matriz extracelular.

Diversos trabalhos citam a colonização celular completa em biomateriais observada em microscopia eletrônica de varredura. Embora estes autores pesquisem diferentes tipos celulares sobre diversos materiais, é comum encontrar monocamadas em confluência com limites celulares indefinidos, formando um tapete contínuo que cobre a superfície do suporte (HELEN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Estes resultados estão de acordo com Woodfield *et al.* (2005), que demonstraram a viabilidade do cultivo de fibrocondrócitos sobre polímeros tridimensionais, onde as células foram capazes de expressar o seu fenótipo e sintetizar matriz extracelular semelhante a original *in vivo*. Da mesma forma, suportes de PLDLA, quando utilizados como substrato para cultura celular, permitiram a proliferação de diferentes tipos celulares, bem como a manutenção na capacidade de síntese destas células (MESSIAS *et al.*, 2008; MAS *et al.*, 2008; ESPOSITO *et al.*, 2008b).

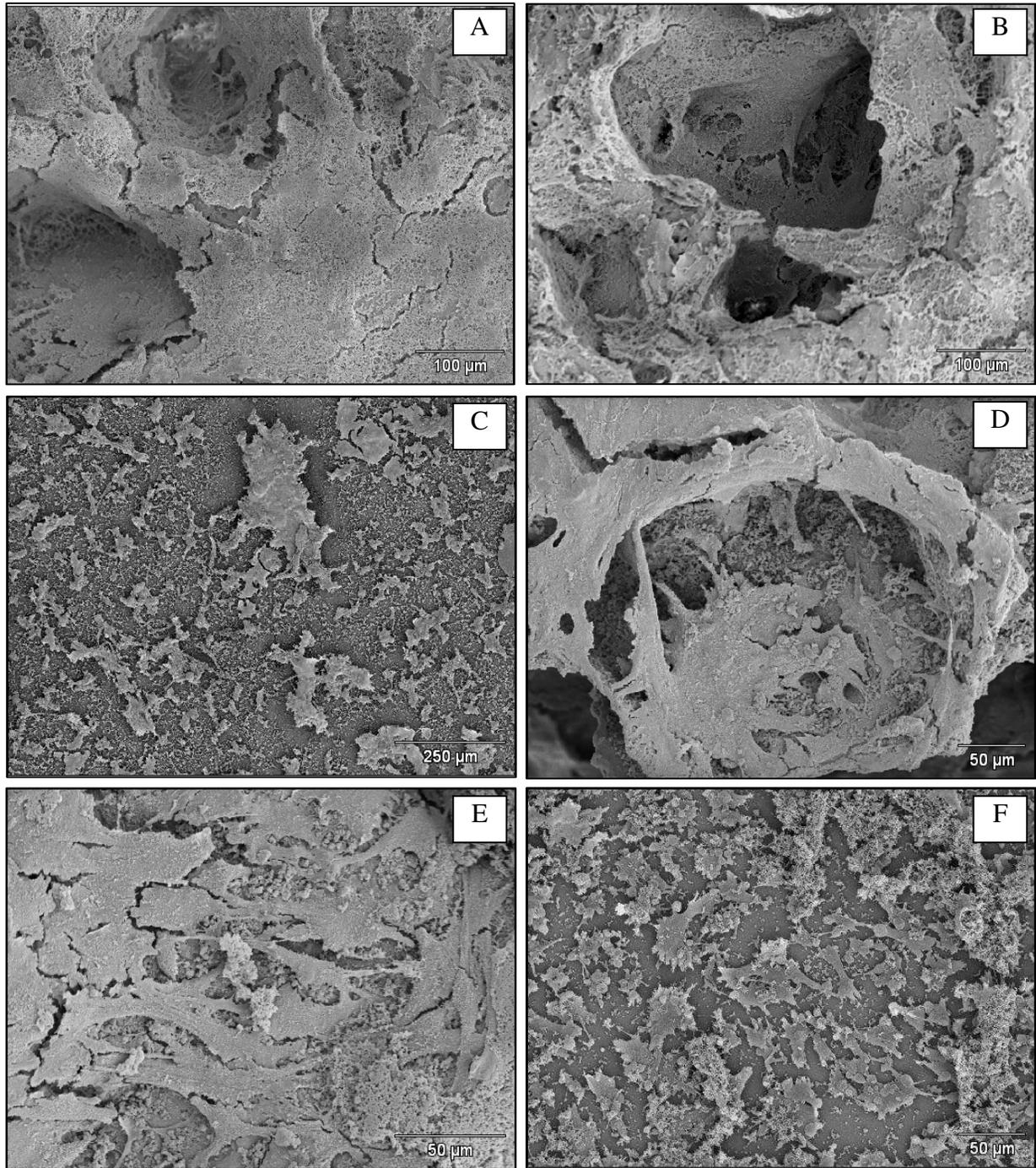


Figura 10 – Micrografias obtidas por MEV do arcabouço polimérico de PLDLA/PCL-T 90/10 com o cultivo de fibrocondrócitos. (A) PLDLA/PCL-T 7 dias de cultivo; (B) PLDLA/PCL-T 7 dias de cultivo; (C) Lamínula de vidro, 7 dias de cultivo; (D) PLDLA/PCL-T 14 dias de cultivo; (E) PLDLA/PCL-T, 14 dias de cultivo; (F) Lamínula de vidro, 14 dias de cultivo.

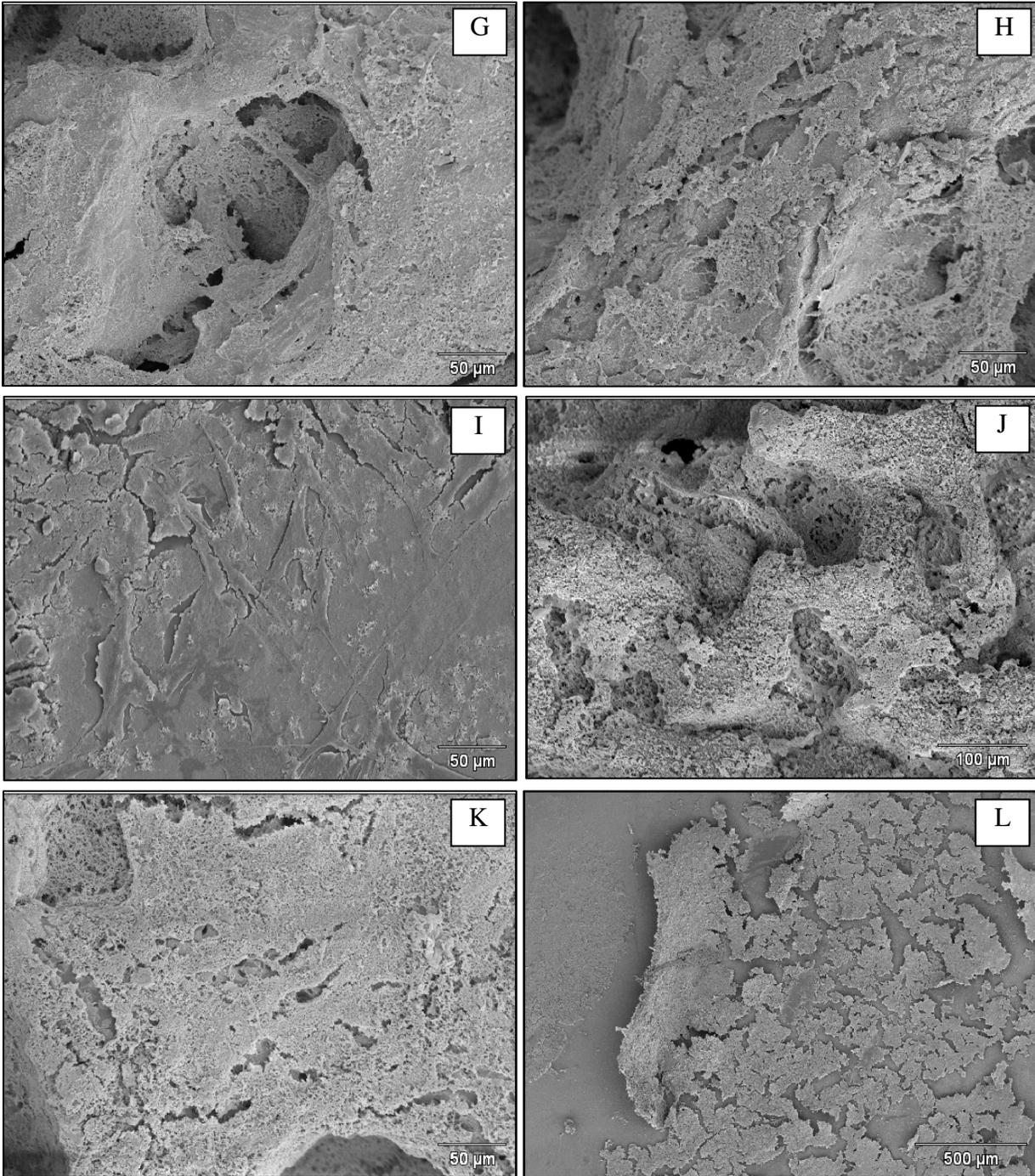


Figura 110 – (Cont.) Micrografias obtidas por MEV do arcabouço polimérico de PLDLA/PCL-T 90/10 com o cultivo de fibrocondrócitos. (G) PLDLA/PCL-T 21 dias de cultivo; (H) PLDLA/PCL-T 21 dias de cultivo; (I) Lamínula de vidro, 21 dias de cultivo; (J) PLDLA/PCL-T 28 dias de cultivo; (K) PLDLA/PCL-T 28 dias de cultivo; (L) Lamínula de vidro, 28 dias de cultivo.

4.1.3. Ensaio colorimétrico - Sirius Red

Os resultados obtidos a partir dos ensaios colorimétricos com Sirius Red podem ser observados na figura 12. Os ensaios refletem a quantidade de colágeno geral disposta na matriz extracelular secretada pelos fibrocondrócitos sobre os arcabouços de PLDLA/PCL-T 90/10 e controles.

Os resultados do teste ANOVA demonstraram que em todos os tempos de cultivo ocorreu diferença significativa entre o arcabouço e seu respectivo controle (poliestireno) utilizado nesta análise ($p < 0,01$). Pode-se notar que a síntese de matriz aumentou significativamente nos arcabouços de PLDLA/PCL-T entre os tempos de 7, 14 e 21 dias ($p < 0,01$) (figura 12). Este comportamento não foi verificado nas amostras controle, uma vez que os grupos apresentaram resultados similares entre os tempos de 14, 21, 28 dias ($p > 0,01$), demonstrando que o arcabouço estimulou a síntese de matriz extracelular pelos fibrocondrócitos.

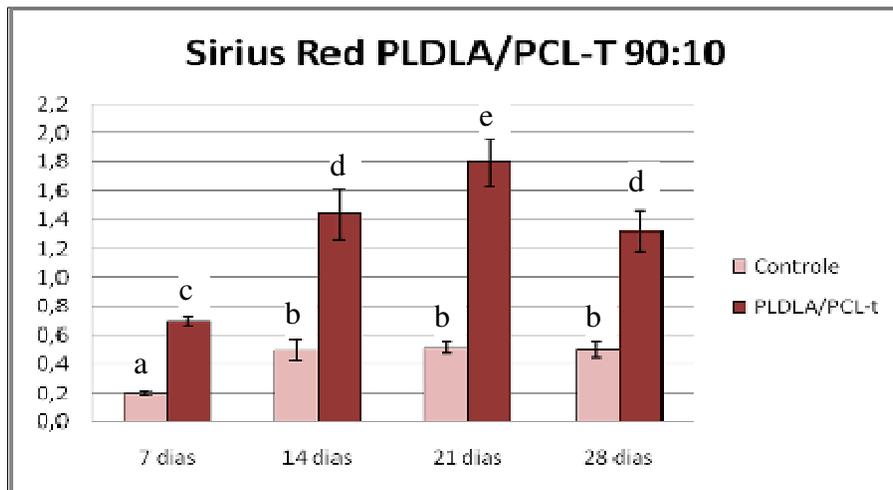


Figura 12- Análise colorimétrica com o corante Sirius Red após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em arcabouços de PLDLA/PCL-T. Os valores representam a média \pm desvio padrão ($n = 6$). O ensaio demonstrou que os arcabouços de PLDLA/PCL-T são superiores ao controle em todos os tempos ($p < 0,01$), mostrando que o arcabouço estimulou a síntese de matriz extracelular pelos fibrocondrócitos. Controle = PS. As letras indicam que as amostras diferem significativamente entre si.

Independente do tecido lesado, o colágeno, do ponto de vista funcional, é o componente mais importante na reparação dos tecidos (THORNTON e BARBUL, 1997; GOTTRUP, 1981). O colágeno também está envolvido nos processos de adesão, diferenciação, migração e proliferação celular (STEVENS e LOWE, 1995).

O equilíbrio da matriz extracelular é controlado pelos fibrocondrócitos através dos mecanismos de síntese e degradação de colágeno (ABRAHAM *et al.*, 2007), mediante ação de metaloproteases e seus inibidores (MARUCCI *et al.*, 2002). As células reconhecem o colágeno, via receptores do tipo integrina, e são capazes de induzir a produção de enzimas ou ainda ativar cascatas de sinalização para controle da migração, síntese e morte celular (VOGEL, 2001; TIAN *et al.*, 2002).

Quando este equilíbrio é alterado, a função da fibrocartilagem é prejudicada possibilitando o surgimento de osteoartrite precoce (CALVO *et al.*, 2001), uma vez que as numerosas fibras de colágeno tipo I, presentes nesta matriz, são responsáveis por promover a integridade estrutural do menisco (ATALA, 2004).

No entanto, estudos mostraram que as fibras colágenas apresentaram diferenças nos arranjos estruturais *in vitro* e *in vivo* (EYRE e WU, 1983; ARAÚJO, 2000; BAKER e MAUCK, 2007). Este comportamento pode estar relacionado ao fato de que na cultura, as células não estão submetidas a pressões como na articulação dos joelhos (CULAV *et al.*, 1999; SETTON *et al.*, 1999). Vários trabalhos têm mostrado que quando estimuladas mecanicamente, as células podem alterar significativamente a síntese dos componentes da matriz extracelular (SUZUKI *et al.*, 2006; NATSU-UME *et al.*, 2005; FINK *et al.*, 2001; IMLER *et al.*, 2004; GUNJA e ATHANASIOU, 2007; AUFDERHEIDE e ATHANASIOU, 2004).

Em seu trabalho de revisão, Lawrence e Madihally (2008) citaram diversos experimentos *in vitro* demonstrando que as células possuem diferentes tipos de respostas em relação à colonização, diferenciação celular e alteração biossintética quando cultivadas em arcabouços

tridimensionais em comparação a tradicional cultura em monocamada bidimensional. Neste estudo, a estrutura tridimensional do arcabouço apresentou influência positiva, uma vez que favoreceu a síntese de colágeno, componente predominante da matriz fibrocartilaginosa, quando comparado ao controle (lamínula de vidro).

Recentemente, uma ampla gama de fatores de crescimento vem sendo estudada devido ao seu uso potencial exógeno no aumento da produção de matriz extracelular fibrocartilaginosa entre diferentes tipos celulares. Destes, o TGF- β (fator transformador de crescimento tipo beta) tem se mostrado o mais promissor em termos de produção de glicosaminoglicanos e colágeno por células provenientes do menisco cultivadas em monocamada ou sobre arcabouços de poli(ácido glicólico) (PANGBORN e ATHANASIOU, 2005; STEWART *et al.*, 2007; JAKLENEC, *et al.*, 2008).

Segundo Rezwan *et al.* (2006), o PLDLA tem sido estudado e utilizado pela engenharia tecidual devido à suas excelentes características no que se diz respeito à estabilidade mecânica, biocompatibilidade e potencial osteoindutor. Neste estudo, a síntese de matriz colágena por células de menisco cultivadas sobre arcabouços de PLDLA/PCL demonstrou o potencial do material em associação com o oligômero PCL-T para aplicações na regeneração de tecido fibrocartilaginoso.

A análise dos resultados aqui apresentados confirma as observações realizadas por Tanaka *et al.* (1999), Deng *et al.* (2003) e Silva (2007), onde parâmetros bioquímicos e morfológicos foram utilizados para demonstrar a viabilidade da cultura de fibrocondrócitos, que apresentou a capacidade de manter sua morfologia e sintetizar matriz extracelular sobre o arcabouço polimérico estudado. Além disso, a presença de poros na estrutura sugere uma influência positiva na capacidade de produção de matriz extracelular.

4.1.4. Análise Citoquímica

O azul de toluidina, pH 4,0, é um corante básico que cora proteínas específicas como DNA, RNA e glicosaminoglicanos (SANTOS JR. *et al.*, 2005).

Em todos os tempos de cultivo (7, 14, 21 e 28 dias) observaram-se células bem espreiadas e estendidas pela superfície do material e dentro dos poros, sugerindo que os fibrocondrócitos foram capazes de migrar para o interior dos poros, criando um arranjo tridimensional, como pode ser visto na figura 13, no tempo de vinte e oito dias.

Em ambos os períodos foram encontradas células com perfil oval ou alongado com núcleo grande de formato regular e citoplasma volumoso de aspecto basófilo, corados pelo azul de toluidina. Segundo Stabellini *et al.* (2002) a presença de citoplasma basófilo sugere que as células são capazes de sintetizar glicosaminoglicanos, entretanto estas produzem suas moléculas na forma solúvel em meio de cultura. Webber *et al.* (1985) demonstraram que fibrocondrócitos de coelho sintetizam proteoglicanos *in vitro* e *in vivo*. O estudo mostrou que há diferença significativa na quantidade de proteoglicanos sulfatados sintetizados conforme a região do menisco. Tanaka *et al.* (1999) revelou que as células provenientes da zona interna de meniscos humanos sintetizaram mais proteoglicanos quando comparadas às células da região externa.

A presença de material particulado fortemente corado foi verificada dentro dos poros (figura 13A). Este material pode ser proveniente da síntese de matriz extracelular ou da precipitação de proteínas presentes no soro fetal bovino.

Não foram encontradas alterações citoquímicas induzidas pelo arcabouço. Um padrão similar de comportamento foi encontrado em células Vero e fibrocondrócitos cultivados em outros materiais demonstrando que as células foram capazes de produzir matriz extracelular sobre substratos poliméricos (SANTOS JR. *et al.*, 2003; SANTOS JR. *et al.*, 2005, ESPOSITO *et al.*, 2007).

O grande papel dos arcabouços na engenharia tecidual é proporcionar um ambiente 3D temporário que promova a adesão e proliferação celular, através do uso de suportes mecânicos como guias de crescimento para o novo tecido (TABATA, 2009). Por conseguinte, a análise confirma os resultados apresentados nesta etapa *in vitro*, indicando que o arcabouço de PLDLA/PCL-T é qualificado para uso como substrato para cultura celular e engenharia tecidual, uma vez que permitiu a adesão e o crescimento de fibrocondrócitos em todo arcabouço.

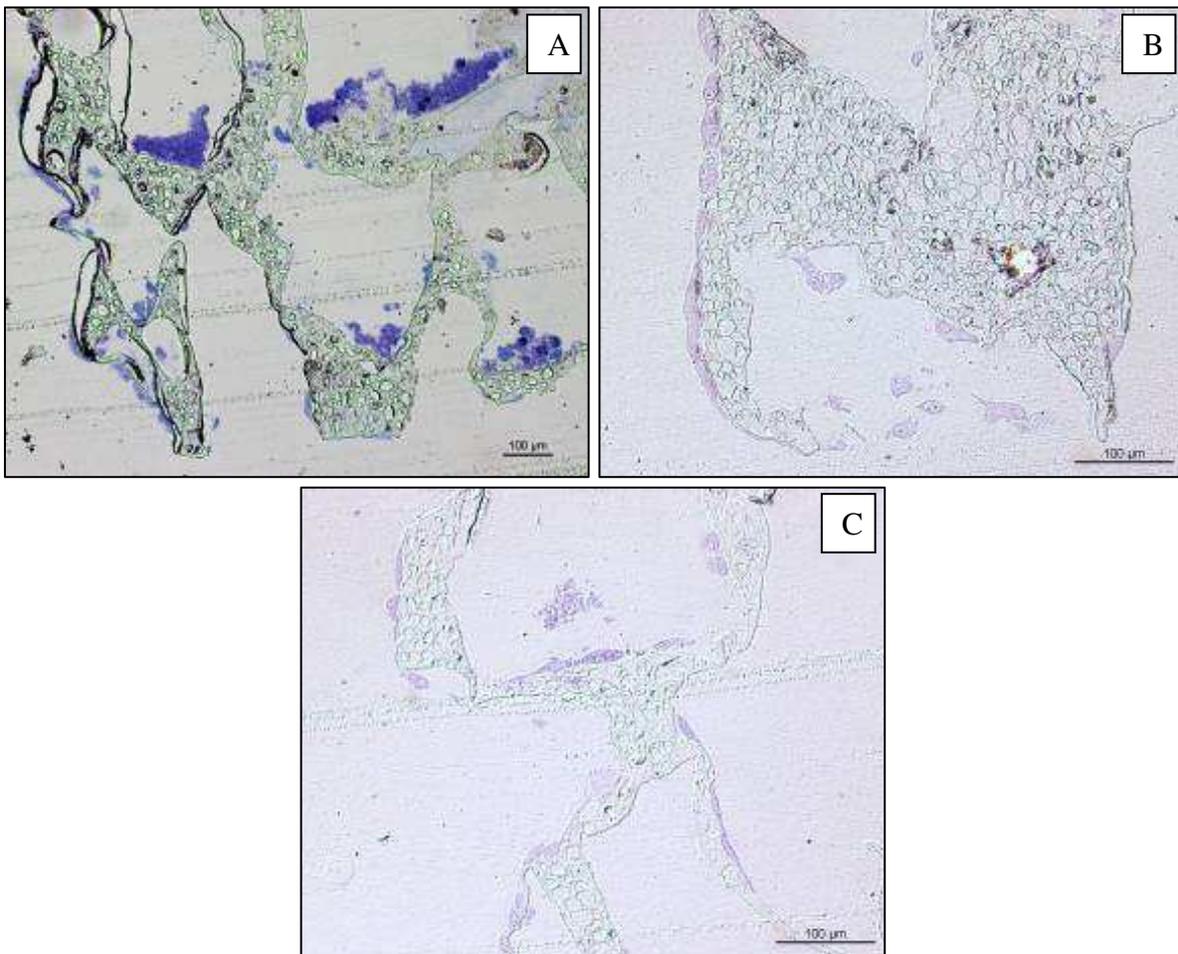


Figura 13- Fotomicrografias de cortes transversais dos arcabouços de PLDLA/PCL-T após 28 dias de cultivo celular corados com AT. (A) Observa-se a presença de material particulado no interior dos poros. (B e C) Células espalhadas pela superfície e no interior do material, infiltrando-se nos poros do arcabouço.

4.2. Estudo *in vivo*

Apesar de avanços e resultados significativos serem obtidos em estudos *in vitro*, a avaliação *in vivo* de possíveis substitutos biológicos é essencial para análise da biocompatibilidade, biorreabsorção e potencial de regeneração e remodelação tecidual antes do uso clínico de um biomaterial.

Observações Macroscópicas

Neste estudo, a reparação de defeitos causados por meniscectomia total do menisco medial foi avaliada em modelo animal de coelhos albinos com a combinação de um recente material biorreabsorvível e cultura de fibrocondrócitos.

Duas estratégias diferentes foram utilizadas: implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T puro e implante do mesmo arcabouço pré-cultivado com fibrocondrócitos por 21 dias em cultura.

A escolha do material foi baseada na manutenção, por até 4 semanas, das propriedades mecânicas apresentadas pela composição 90/10, as quais foram consideradas adequadas para regeneração do tecido fibrocartilaginoso (DUARTE, 2009).

Quando utilizado em ratos, membranas e pinos de PLDLA/PCL-T apresentaram-se promissores na reparação de defeitos no tecido ósseo e implante subcutâneo, respectivamente (FEDRIZZI e DUEK, 2007; DUARTE, 2009). Além disso, bons resultados obtidos com uso de polímeros biorreabsorvíveis na regeneração de menisco são encontrados na literatura (PEZZIN *et al.*, 2003; MARIANO *et al.*, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2009).

Entretanto, não foram encontradas descrições do uso de arcabouços de PLDLA/PCL-T para regeneração de menisco. Além disso, os trabalhos citados demonstraram a regeneração de lesões do menisco com cultivo de células por meniscectomia parcial, enquanto essa proposta visa a meniscectomia total.

Durante o período de pré-cultivo celular os arcabouços mantiveram suas dimensões até o momento do implante.

Todos os animais sobreviveram até os tempos de eutanásia, apresentando comportamento semelhante aos coelhos não operados, mostrando agilidade e movimentação normal. Não ocorreram complicações aparentes pós-operatórias.

A avaliação macroscópica demonstrou que todos os animais apresentaram completa cicatrização da incisão, sem a presença de qualquer cicatriz externa (figura 14A). Nenhuma diferença clínica pôde ser detectada entre os implantes com célula, sem célula e controles.

Em 14 animais dos 20 joelhos esquerdos (controle) observou-se a presença de tecido com aparência fibrosa ligando o côndilo femoral ao platô tibial (figura 14C). A presença deste tecido também foi encontrada no interior do defeito, entretanto, a maior parte do defeito permaneceu vazia ou preenchida por tecido adiposo.

Na retirada das próteses o material implantado apresentou-se bem adaptado com os tecidos circundantes, sem rejeição aparente, infecção ou resposta crônica inflamatória (figura 14B).

Após 12 e 24 semanas os implantes realizados com os arcabouços poliméricos independentemente do cultivo celular mostraram que o neotecido manteve o formato biológico (figuras 15A e B). Este resultado não foi observado nos controles, uma vez que o tecido recém formado se desenvolveu fixado ao platô tibial na região posterior e não preencheu toda a área anteriormente ocupada pelo menisco.

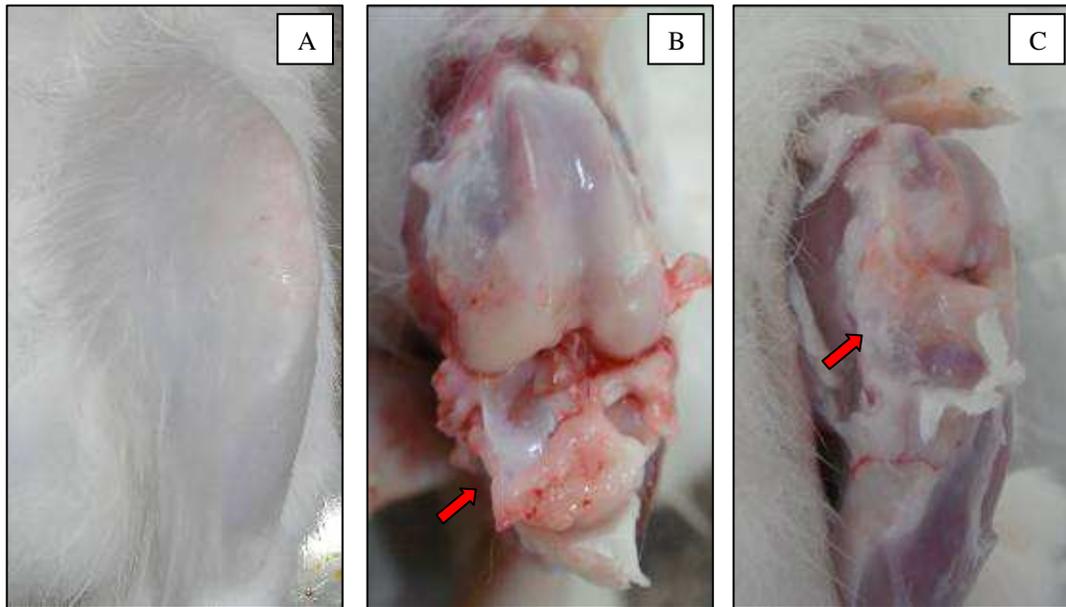


Figura 14– Fotografias macroscópicas da retirada dos implantes após 24 semanas. (A) Tricotomia da região operada totalmente regenerada. Nota-se a cicatrização completa do tecido epitelial, sem cicatriz externa em todos os tratamentos; (B) Implante com células – “Neomenisco” medial (seta) com morfologia semelhante ao menisco biológico; (C) Controle - Presença de fibrose (seta) ligando lateralmente o cômulo femoral ao platô tibial.

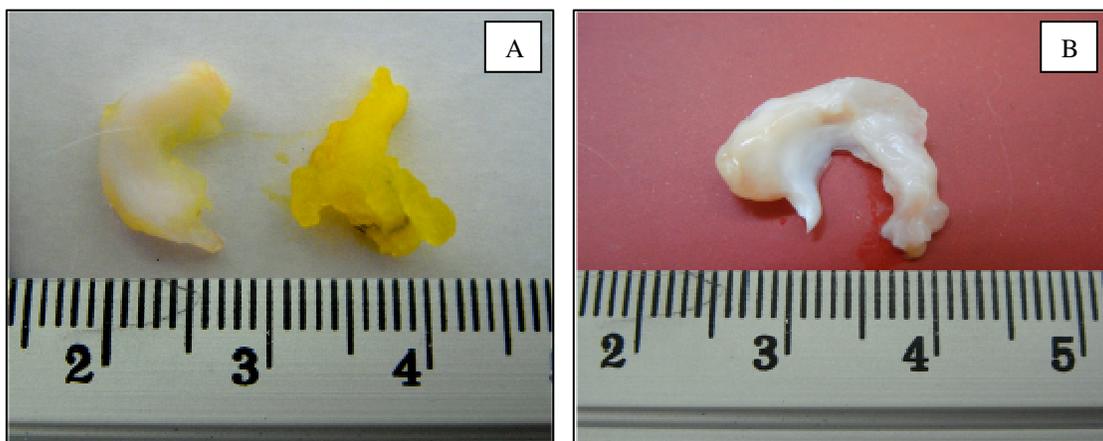


Figura 15 - Imagens macroscópicas após 12 semanas de implante. (A) Comparação entre o menisco original (branco) e o tecido neoformado em arcabouço de PLDLA/PCL-T sem células (amarelo). (B) “Neomenisco” recém formado a partir de arcabouço de PLDLA/PCL-T pré-cultivado com fibrocondrócitos após 12 semanas, evidencia-se a semelhança anatômica do neotecido com o menisco.

Morfologia do Menisco Normal

Características histomorfológicas dos meniscos normais mediais de coelhos albinos, Nova Zelândia, foram analisadas e comparadas com o neotecido formado. Os cortes foram corados com HE e tricrômico de Masson para detecção de fibras colágenas, respectivamente (figura 16D). A zona externa do menisco e cornos (pontas) consistem principalmente de fibras colágenas circunferenciais delgadas e algumas fibras radialmente orientadas, ambas com poucas células com morfologia mais alongada semelhante às células encontradas em tecido fibroso. Mais internamente, correspondendo a zona central do menisco, observam-se numerosos fibrocondrócitos com morfologia arredondada e formação de grupos isogênicos axiais, permeados por uma matriz composta de fibras colágenas que se destacam como traços irregulares, geralmente paralelos entre si, de cor vermelho-alaranjada (figura 16B). Esse aspecto caracteriza este tipo de cartilagem como fibrosa, uma vez que sua matriz é mais espessa e abundante, além de ser mais rica em colágeno tipo I do que a cartilagem hialina (DI FIORI, 1997).

O termo fibrocondrócitos foi introduzido em 1985 devido às características peculiares da população de células deste tecido (WEBBER *et al.*, 1985). Os fibrocondrócitos da parte interior do menisco são arredondados ou ovais e estão localizados na parte avascular, mostrando uma forte associação com a matriz, com intensa presença de proteoglicanos pericelulares. Cada fibrocondrócito encontra-se envolvido por uma “cápsula” (área territorial) e possui núcleo arredondado bem corado e central (MCDEVITT *et al.*, 2002). Células fibroblásticas estão localizadas nas regiões periféricas do menisco (porção vascular) e apresentam extensões celulares que as conectam com outras células e diferentes partes da matriz extracelular (HELIO *et al.*, 2001). Um terceiro tipo de população celular no menisco está situado na zona superficial que contém células com formato ligeiramente fusiforme, denominadas “células da zona superficial do menisco”. Estas células não apresentam extensões citoplasmáticas (BRACHT *et al.*, 2007).

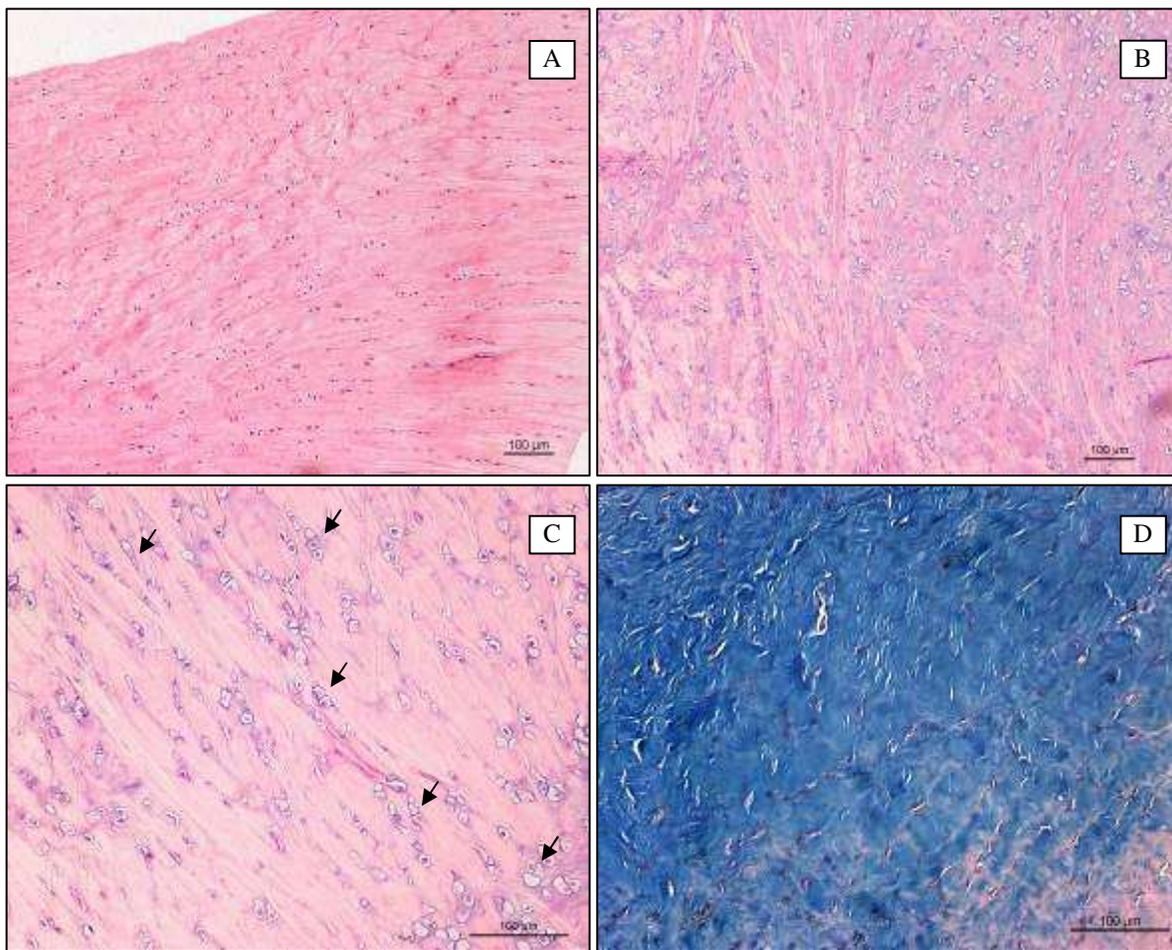


Figura 16 - Fotomicrografia do menisco medial normal de coelho. (A) Corno (ponta) do menisco, consiste principalmente de fibras colágenas delgadas circunferencialmente orientadas e poucas células com morfologia alongada, HE, 100X; (B) Região central do menisco, observa-se inúmeros fibrocondrócitos com morfologia arredondada envolvidos por fibras colágenas, HE, 100X; (C) Enfatiza-se a presença de fibrocondrócitos e grupos isogênicos axiais (seta), HE, 200x; (D) Substância fundamental (matriz extracelular) percorrida por numerosas fibras colágenas do tipo I que se destacam como feixes irregulares, geralmente paralelos entre si, Tricrômico de Masson, 200x.

12 Semanas de Implante

As fotomicrografias das amostras após 12 semanas de implantes com arcabouços de PLDLA/PCL-T sem células estão apresentadas na figura 17. Em todos os casos foi observada reação granulomatosa do tipo corpo estranho, com células gigantes e células mononucleares, englobando fragmentos do polímero, indicando que o material ainda não havia degradado completamente (figura 17D). Esta reação também foi constatada ao redor do local dos pontos de sutura. Observa-se também a presença de vasos sanguíneos e pouco tecido adiposo (figura 17A). A presença de vasos mostrando uma boa irrigação no tecido conjuntivo recém formado é uma característica importante para resposta inflamatória, migração de células mesenquimais, nutrição e consequente regeneração tecidual.

Verificou-se a presença de neotecido com aspecto semelhante a fibrocartilagem (figura 17B e C). Nestas regiões, não foi observado vascularização, uma vez que o baixo teor de oxigenação é considerado como um fator base para a diferenciação celular de fibrocondrócitos (ATALA, 2004). A coloração com Tricrômico de Masson evidenciou a presença de colágeno denso orientado em fibras (figura 17C).

Nos implantes com pré-cultura observou-se a presença de tecido semelhante a fibrocartilagem (figura 18A) contendo, aparentemente, mais fibrocondrócitos do que os observados nas lâminas de implante sem células. Da mesma forma, há presença de reação gigante celular do tipo corpo estranho (figura 18C). Notam-se células dispostas em padrão alinhado, lembrando grupos isomorfos (figura 18B), sugerindo fibrocartilagem jovem.

As imagens realizadas em historesina e coradas com azul de toluidina apresentam metacromasia (figura 18D). A alteração na cor do corante de azul para rosa deve-se a presença de glicosaminoglicanos sulfatados, que é uma característica da fibrocartilagem. Segundo Angele *et al.* (2008) a presença de metacromasia detectada na matriz extracelular é mais fortemente pronunciada na região medial do menisco que contém predominantemente colágeno tipo II e glicosaminoglicanos, distinguindo-se das regiões anterior e posterior.

No grupo controle (figura 19) foi observada a presença de tecido adiposo em meio ao tecido recém formado e inúmeros capilares sanguíneos (figura 19A e D). Verificou-se a presença de pequenas áreas com formação de tecido semelhante a fibrocartilagem, com poucas células inseridas na matriz desorganizada (figura 19B e C) e sem reação inflamatória, uma vez que não foi implantado nenhum material. Aparentemente há menos substância fundamental e menos colágeno que nos casos com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T.

Após um procedimento cirúrgico existe sempre um trauma. Mesmo na ausência do implante haverá a resposta tecidual à agressão. Isto começa com a inflamação e prossegue através dos passos para cura da ferida. Adicionado a este fenômeno existe a "reação de corpo estranho" devido à presença do material reconhecido como não pertencente ao hospedeiro (ONUKI *et al.*, 2008).

Em geral, a regeneração do menisco inicialmente é determinada pela formação de um tecido fibroso vascularizado que, após alguns meses, se diferencia em um tecido fenotipicamente fibrocartilaginoso (DE HAVEN, 1999).

Em relação à reação granulomatosa do tipo corpo estranho, não obstante ela ter sido comum a todos os casos, ela parece não ter significado maior em relação aos objetivos pretendidos, ou seja, neoformação de fibrocartilagem. Os diversos trabalhos com o uso de polímeros biorreabsorvíveis da família dos poli(α -hidróxi ácidos) para regeneração de tecidos, mostraram aspecto semelhante em relação à reação inflamatória de corpo estranho a qual costuma desaparecer após a degradação total dos polímeros (PEZZIN *et al.*, 2003; SAKATA *et al.*, 2004; REZENDE *et al.*, 2005; MALUF *et al.*, 2006; BARAUNA *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2007; FEDRIZZI e DUEK, 2007; PULLIAINEN *et al.*, 2007; PIERUCCI *et al.*, 2008; PIETRO *et al.*, 2008; DUARTE, 2009; ESPOSITO *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2009).

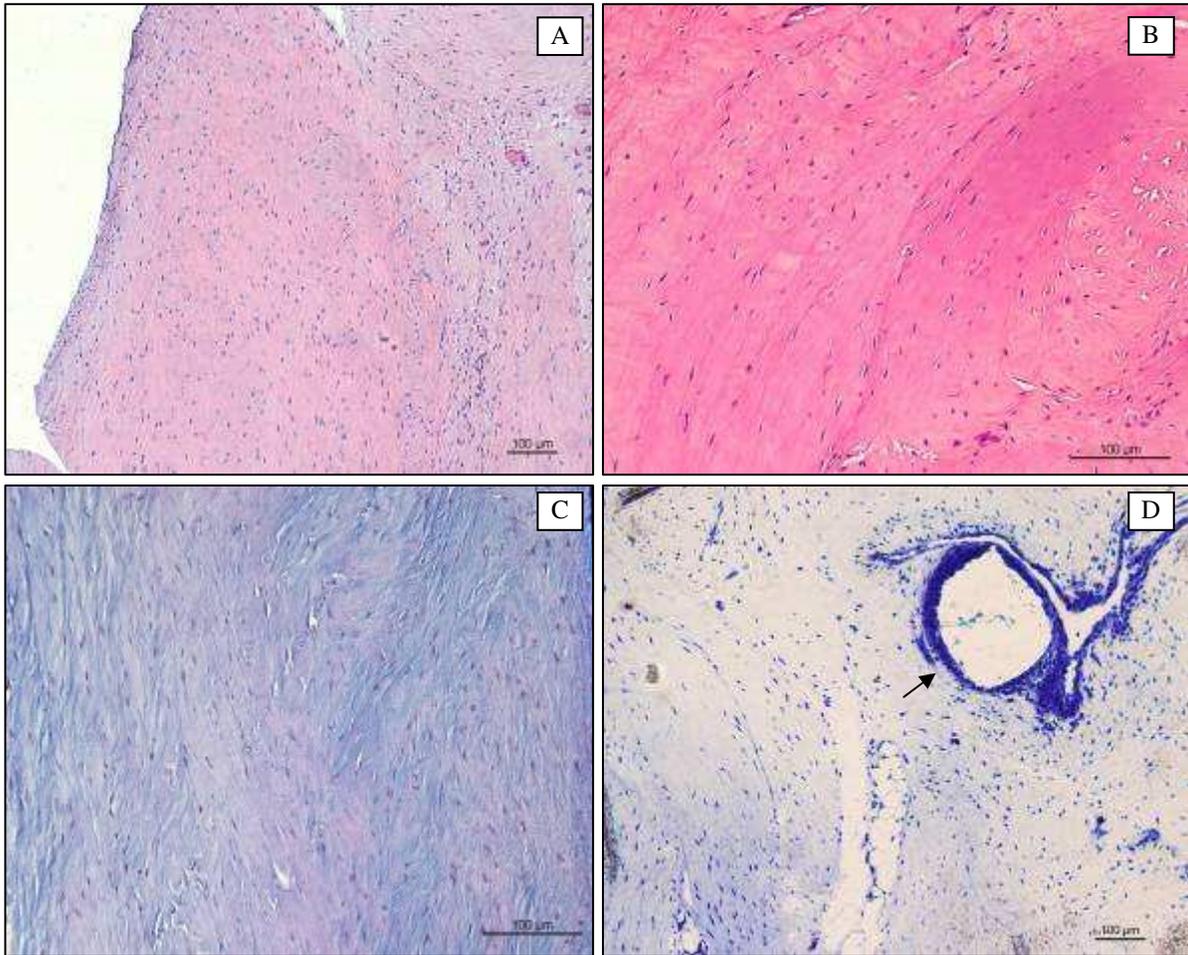


Figura 17 – Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T 90/10 sem células após 12 semanas. (A) Observa-se a presença de tecido conjuntivo e capilares sanguíneos, HE, 100x; (B) Área com aspecto semelhante à fibrocartilagem, HE, 200x; (C) Pode-se evidenciar a presença de colágeno tipo I orientado em feixes, Tricrômico de Masson, 200x; (D) Reação granulomatosa do tipo corpo estranho englobando fragmentos do polímero (seta), AT, 100x.

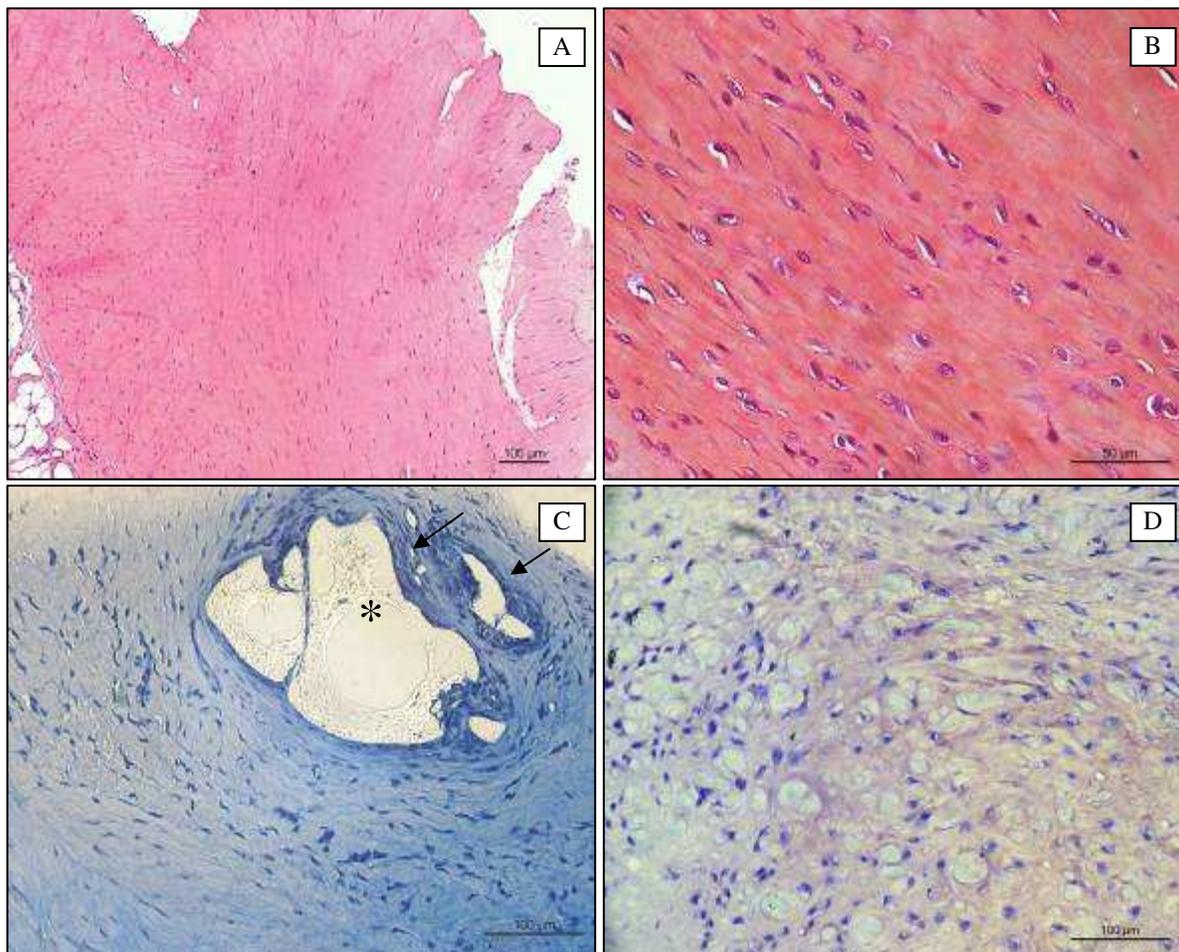


Figura 18 –Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T com pré-cultivo de fibrocondrócitos após 12 semanas. (A) Observa-se a presença de tecido semelhante a fibrocartilagem nas pontas, HE, 100x; (B) Região central do neotecido, notam-se células dispostas em padrão alinhado, lembrando grupos isomorfos, HE, 400x; (C) Discreta reação gigante celular do tipo corpo estranho (setas), envolvendo fragmentos do polímero (*), Tricrômico de Masson, 200x; (D) Metracromasia, indicando a presença de glicosaminoglicanos sulfatados, AT, 200x.

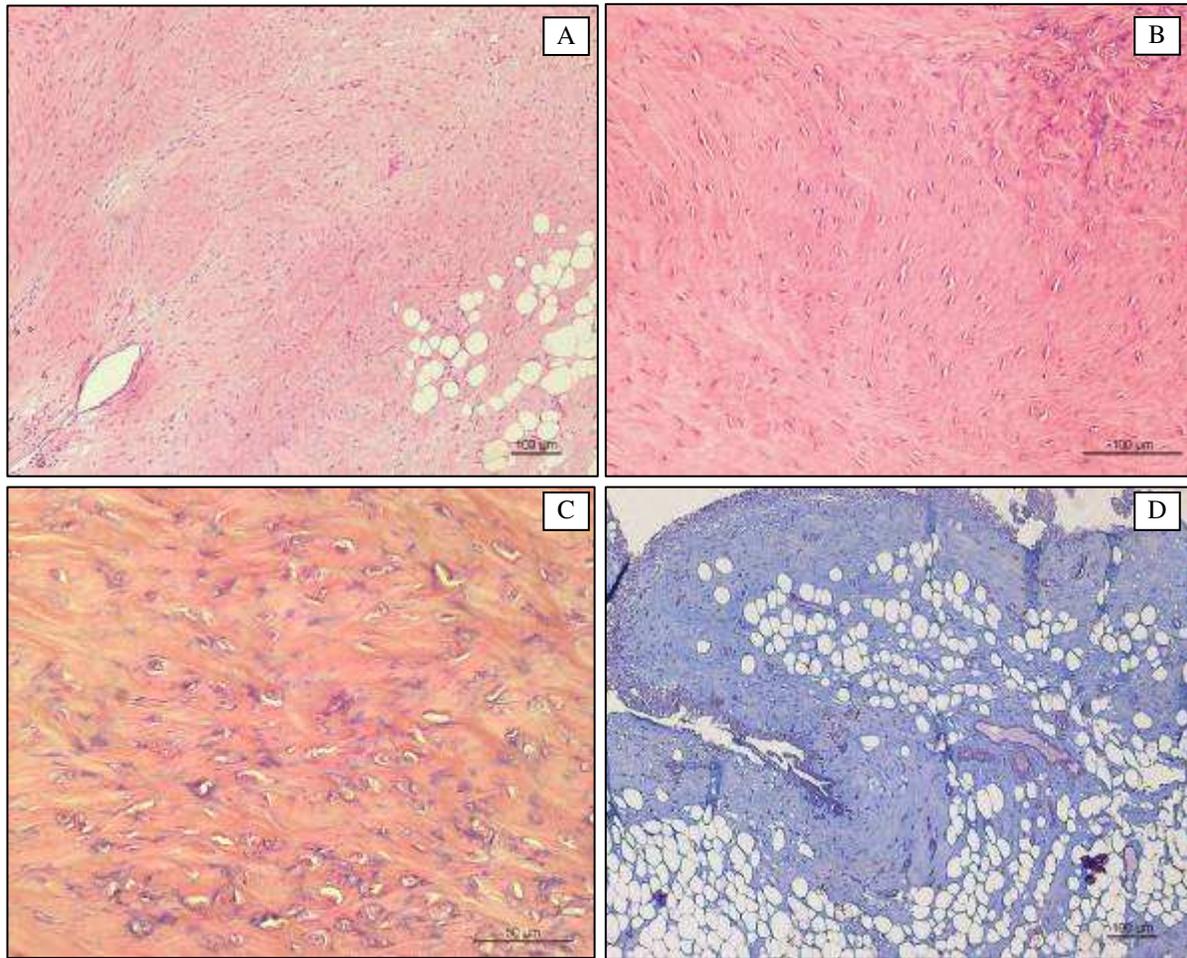


Figura 19 – Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) submetido a meniscectomia medial total após 12 semanas. (A) Observa-se a presença de tecido adiposo em meio ao tecido conjuntivo recém formado e capilares sanguíneos, HE, 100x; (B) Área de tecido com aspecto semelhante à fibrocartilagem, HE, 200x; (C) Pequena área com tecido semelhante à fibrocartilagem, HE, 400x; (D) Grande quantidade de tecido adiposo e capilares sanguíneos em meio ao neotecido, Tricrômico de Masson, 100x.

24 Semanas de Implante

Após 24 semanas, nos implantes sem células, observou-se a formação de tecido semelhante a fibrocartilagem com fibrocondrócitos desorganizados e fibras colágenas dispostas de forma irregular. Reconhece-se a sinóvia de aspecto usual delicado e vascular. Há presença de capilares sanguíneos periféricos, pequena quantidade de cartilagem hialina jovem com estroma basófilo, fibrocondrócitos solitários ou em grupos isógenos com 2 células (figura 20B e C) e metacromasia (figura 20D). Ainda foi encontrada reação granulomatosa do tipo corpo estranho e presença de adipócitos nas porções periféricas (figura 20A).

Nos implantes previamente cultivados com células, há presença de fibrocartilagem madura e organizada sugerindo a morfologia original do menisco (figuras 21A e B) com arranjo paralelo das fibras de colágeno do tipo I e fibrocondrócitos imersos ao longo da matriz (figura 21C). Três casos em cinco apresentaram nas bordas locais recoberto por pequenos granulomas do tipo corpo estranho em contigüidade lateral com membrana sinovial normal. Verificou-se a presença de metacromasia em todas as lâminas (figura 21D).

Os controles apresentaram cicatrização com formação de cartilagem hialina central (figura 22B e D) e presença de coxim adiposo e fibrose com pequenas áreas de aspecto sugestivo de fibrocartilagem concentrando-se nas bordas (figura 22A e C).

Sabe-se que o menisco de coelho quando removido não possui a capacidade de reparação tecidual com formação de tecido fibrocartilaginoso (HEATLEY, 1980). Da mesma forma, o menisco humano quando lesionado na porção interna é impassível de regeneração espontânea. Este fato está diretamente relacionado com a baixa vascularização do tecido. Em humanos, a região externa do menisco, devido ao suplemento sanguíneo perimeniscal, é capaz de produzir uma resposta reparatória, com proliferação celular e remodelação similar a observada nos outros tecidos conjuntivos (ARNOCZKY e WARREN, 1983). No entanto, quando as lesões estão situadas na parte central e interna, avascular do menisco, não existe nenhuma tendência para a

cura espontânea e nenhum método cirúrgico disponível até o presente momento (PEZZIN *et al.*, 2002).

As células do menisco humano são diferentes das dos animais (VERBRUGGEN *et al.*, 1996), além disso, a habilidade de cura das regiões periféricas sugere diferenças no metabolismo entre as populações celulares do menisco, diferindo de acordo com a zona acometida (CASSIDY e SHAFFER, 1981; DEHAVEN *et al.*, 1989; HAMBERG *et al.*, 1983; TANAKA *et al.* 1999; MAUCK *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos para regeneração do defeito controle concordam com as observações previamente descritas por outros autores, onde meniscos de coelhos são significativamente incapazes de exibir resposta reparatória intrínseca (CABAUD *et al.*, 1981; ARNOCZKY e WARREN, 1983; GHADIALLY *et al.*, 1986; ANGELE *et al.*, 2008).

Entretanto, a presença de cartilagem hialina na zona interna do tecido recém formado também foi constatada em coelhos do grupo controle no estudo realizado por KANG *et al.* (2006). Seus resultados indicaram maior quantidade de colágeno tipo II na zona interna do menisco, característico de cartilagem hialina, ao passo que a zona externa do neotecido era fibrosa e quase completamente composta por colágeno tipo I. Esses resultados são semelhantes aos resultados encontrados no grupo controle deste estudo.

Sabe-se que as células respondem diretamente a estímulos mecânicos como compressão e tração, concomitantemente a alterações na sua atividade biossintética. Desta forma, deve ser considerado que mudanças no tipo de resposta reparatória observadas em modelos animais com controles negativos (defeitos vazios) também podem ocorrer devido a alterações de forças. De modo semelhante, podemos supor que quando da retirada total do menisco há profundas modificações na biomecânica da articulação do joelho.

Em joelhos submetidos à menissectomia, a área de contato é reduzida em aproximadamente 50% (AHMED e BURKE, 1983). Este fato aumenta a carga por unidade de área na cartilagem

articular e resulta em dano e degeneração da cartilagem, causando osteoartrite e artrose e consequentemente, dor no paciente (BECKER *et al.*, 2005).

Além disso, foi demonstrado que o grau de osteoartrite, após a meniscectomia, é diretamente proporcional a quantidade de menisco removida (VAZIRI *et al.*, 2008). Em um estudo experimental, a retirada de porções correspondendo de 15% a 34% do menisco aumentaram as pressões de contato em mais de 350% (RADIN *et al.*, 1984).

Haja vista que o tecido do menisco apresenta limitada capacidade regenerativa e injúrias na fibrocartilagem, em geral, resultam em processos cicatriciais lentos e difíceis, proporcionais a sua extensão (ERIKSSON, 2003), o uso de técnicas da engenharia tecidual representa uma possível alternativa no reparo do menisco lesionado, a fim de preservar as funções do tecido e portanto, prevenir a doença articular degenerativa (WEINAND *et al.*, 2006).

Desta forma, a construção e a manutenção de uma interface apropriada à formação de tecido fibrocartilaginoso é um ponto crítico para o sucesso na utilização de suportes ou implantes na engenharia tecidual (RISBUD e SITTINGER, 2002), pois a técnica envolve a expansão *in vitro* de células viáveis sobre suportes de biomateriais (KOSE *et al.*, 2003; WILLIAMS, 2004).

A porosidade dos arcabouços é uma característica importante que pode favorecer a obtenção de tecido semelhante a fibrocartilagem do menisco (DE GROOT *et al.*, 1997; CHUNG e BURDICK, 2008), pois fornecerá um aumento de superfície sobre a qual as células poderão proliferar e sintetizar matriz extracelular aumentando, assim, a interface entre o polímero e os fluídos corpóreos (SARAZIN *et al.*, 2004; DECLERCQ *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2005; ARAI *et al.*, 2008).

Com base na literatura (VAN TIENEN *et al.*, 2002; WOODFIELD *et al.*, 2002; DENG *et al.*, 2003; WOODFIELD *et al.*, 2004) uma das características desejadas para aplicação em prótese de menisco é a presença de poros interconectados para direcionar a invasão celular e vascular no interior do suporte e propiciar a formação/crescimento tecidual.

Estes arcabouços tridimensionais devem agir como suporte físico e adesivo para o crescimento celular, permitindo que o neotecido adquira o formato desejado enquanto o polímero vai sendo degradado (CHAIKOF *et al.*, 2002).

Para tanto, deve-se considerar o tempo de indução da formação de fibrocartilagem na seleção do material, já que os arcabouços serão previamente cultivados em meio de cultura líquido iniciando seu processo de degradação antes do implante. Em seu estudo Elema *et al.* (1990) descreveram que o tempo de formação fibrocartilaginosa em humanos é considerado muito longo, entorno de 20 semanas.

Com o intuito de induzir o crescimento de tecido fibrocartilaginoso e reconstruir o menisco lesado, uma prótese porosa de poliuretana foi desenvolvida e implantada em cães. Após 18 semanas a prótese continha apenas fibrocartilagem. Contudo, foi observada a degeneração da cartilagem articular, embora em menor quantidade comparada à meniscectomia. (DE GROOT *et al.*, 1996).

Com a finalidade de avaliar os danos causados à cartilagem e a interação entre tecido e prótese, PEZZIN *et al.* (2003) implantaram blendas de PLLA/PCL (poli-ácido láctico/poli-caprolactona) 80/20 em meniscos de coelhos. Após 6 semanas, a prótese se mostrou bem degradada e praticamente quase toda invadida por tecido. Seus resultados demonstraram a presença de fibrocartilagem com fibras orientadas a partir de 14 semanas.

Recentemente, o pré-cultivo de células para posterior implante tem sido estudado para aumentar o processo de cura na regeneração do menisco. Vários estudos relatam o reparo do tecido fibrocartilaginoso utilizando o método da engenharia tecidual (PERETTI *et al.*, 2004; MARTINEK *et al.*, 2006; WEINAND *et al.*, 2006a; WEINAND *et al.*, 2006b).

Desta forma, o uso de técnicas da engenharia tecidual pode fornecer uma abordagem alternativa para reparação de lesões na parte avascular do menisco, pois permite o carregamento de células diretamente no local da lesão (IBARRA *et al.*, 1997; IBARRA *et al.*, 2000).

Peretti *et al.* (2004) mostraram que condrócitos articulares, quando semeados em tecido de menisco alógeno e implantados no interior de uma lesão meniscal em porcos, foram capazes de sintetizar matriz fibrocartilaginosa. Entretanto, o percentual de reparação obtido pela análise histomorfométrica mostrou cura incompleta, com cerca de 30% apenas das margens da lesão nas amostras experimentais tratadas com células, enquanto em todos os grupos controles (menisco sem célula, sutura da lesão e lesão sem tratamento) o reparo tecidual não ocorreu (0 %).

O uso de condrócitos, autólogos e alógenos, cultivados em arcabouço biorreabsorvível comercial de PLGA, Vicryl®, e posterior implante foi demonstrado por Weinand *et al.* (2006). Seus resultados indicaram que o pré-cultivo celular foi capaz de promover a regeneração de uma lesão em alça na região avascular do menisco de porcos com 1 cm de extensão. A marcação fluorescente das células pré-cultivadas demonstrou a presença destas células no neotecido integrado ao menisco nativo após 12 semanas. Não foi observada infiltração linfocitária, o que seria sugestivo de rejeição celular e não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos com cultivo autólogo e alógeno no reparo do menisco.

Kang *et al.* (2006) avaliaram a regeneração de meniscos de coelhos submetidos à meniscectomia medial utilizando próteses porosas de PLGA reforçadas com fibras de PGA e cultura prévia de células do menisco. Os resultados mostraram a formação de tecido com aspecto histológico semelhante a fibrocartilagem do menisco normal. Entretanto a análise histológica da cartilagem articular tibial adjacente revelou que o neomenisco não impediu a degeneração da cartilagem articular após 36 semanas.

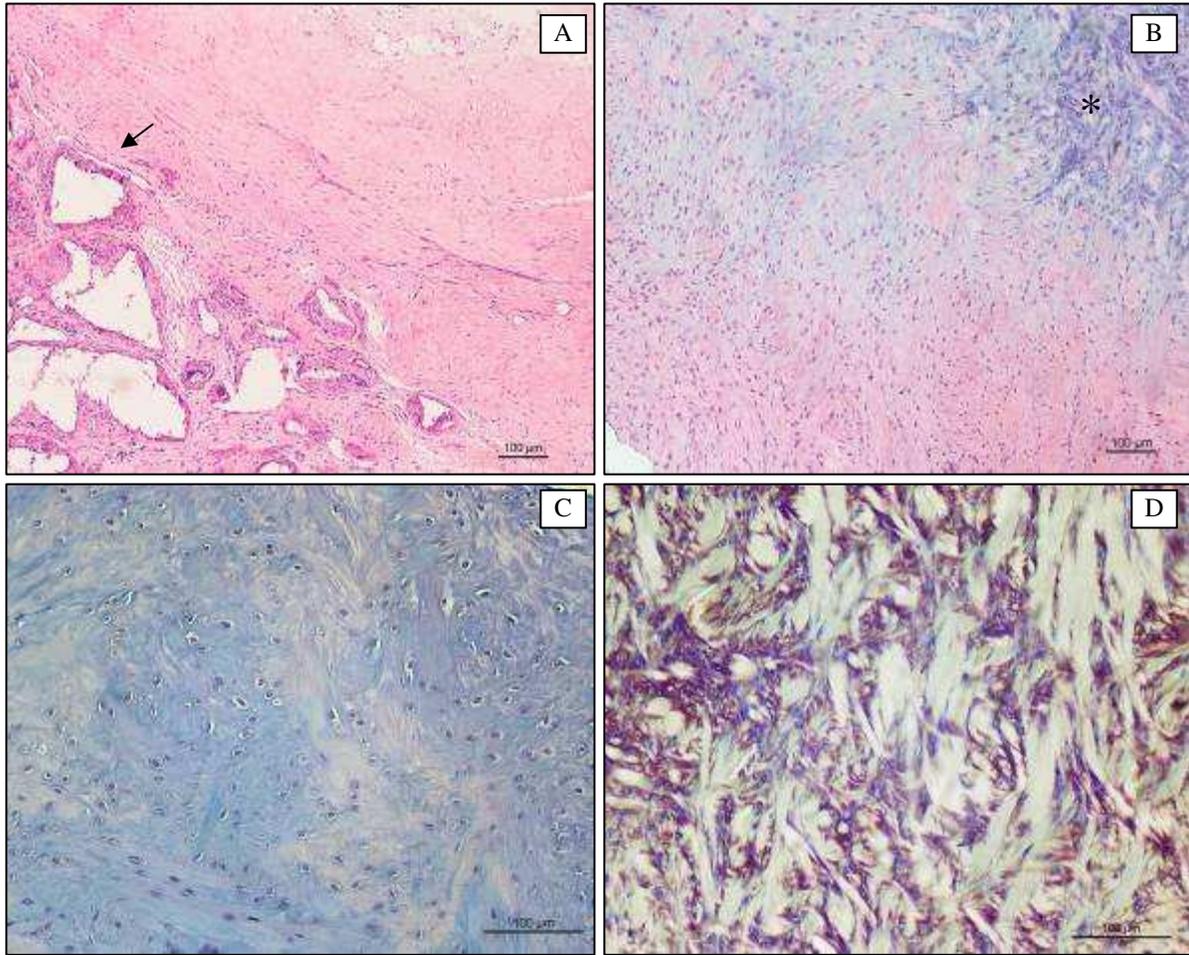


Figura 20 – Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T sem células após 24 semanas. A) Reação granulomatosa do tipo corpo estranho (seta) com presença de adipócitos nas porções periféricas, HE, 100x; B) Presença de cartilagem hialina jovem (*) com estroma basófilo na região central do menisco, HE, 100x; C) Formação de tecido semelhante a fibrocartilagem com células desorganizadas e fibras colágenas dispostas de forma irregular, Tricrômico de Masson, 200x; D) Tecido metacromático semelhante a fibrocartilagem, AT, 200x.

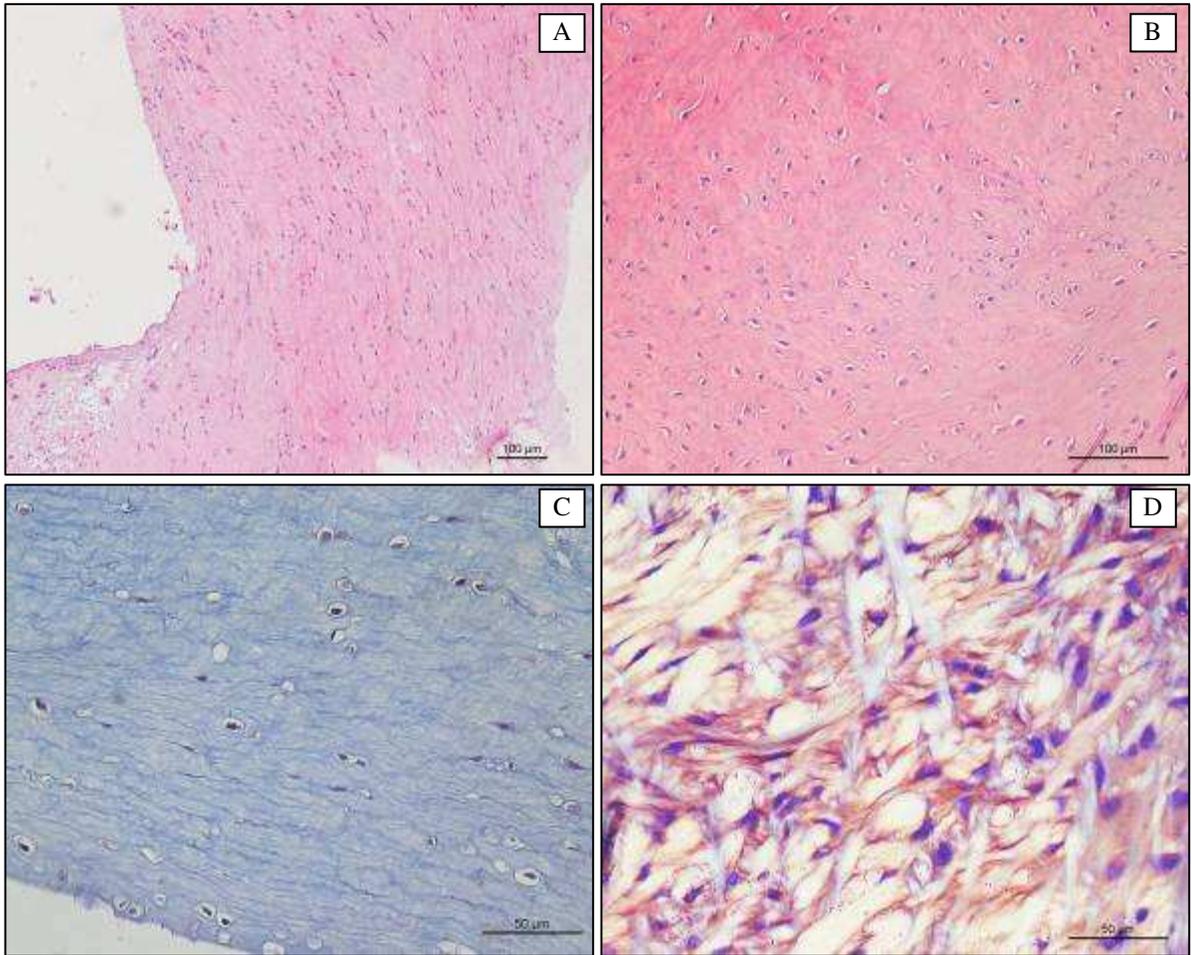


Figura 21 – Fotomicrografia do grupo com implante do arcabouço de PLDLA/PCL-T com pré-cultivo de fibrocondrócitos após 24 semanas. (A) Presença de fibrocartilagem semelhante ao menisco normal nas porções periféricas, HE, 100x; (B) Tecido semelhante ao fibrocartilaginoso maduro, HE, 200x; (C) Arranjo paralelo das fibras de colágeno do tipo I e fibrocondrócitos imersos ao longo da matriz, Tricrômico de Masson, 400x; (D) Metacromasia semelhante a fibrocartilagem, AT, 400x.

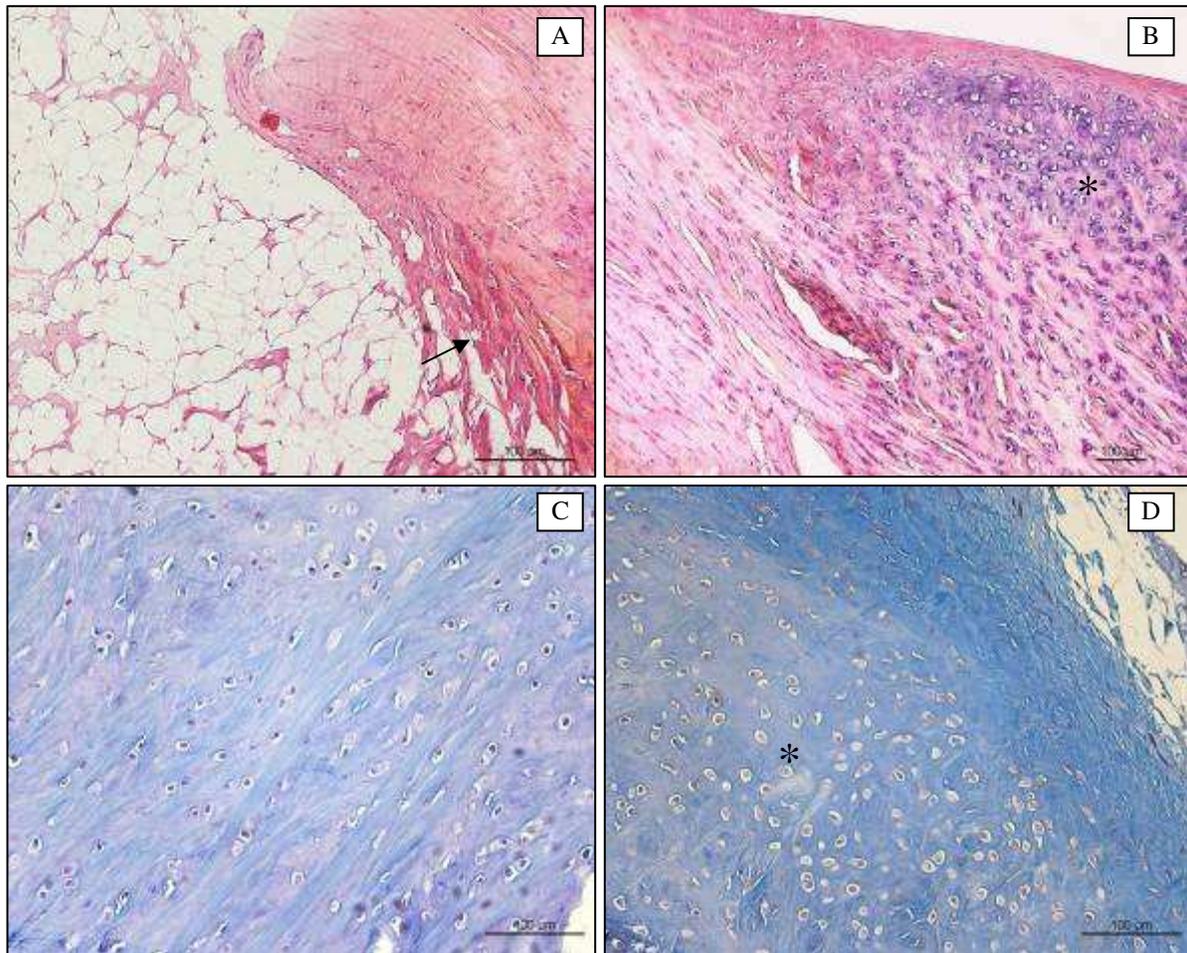


Figura 22 – Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) submetidos a meniscectomia medial total após 24 semanas. (A) Observa-se a presença de grande quantidade de tecido adiposo e fibrose (seta), HE, 200x; (B) Presença de cartilagem hialina (*), HE, 200x; (C) Pequena área de aspecto sugestivo de fibrocartilagem com fibras colágenas orientadas concentrando-se nas bordas, Tricrômico de Masson, 200x; (D) Presença de cartilagem hialina central (*), Tricrômico de Masson, 200x.

No presente trabalho, com intuito de verificar a influência dos tratamentos (arcabouço com células, arcabouço sem células e controle) na degeneração da cartilagem articular, foram realizadas análises histopatológicas dos côndilos femorais mediais submetidos aos implantes (dados não apresentados). Entretanto, não foi possível observar qualitativamente diferenças entre as amostras estudadas. Dessa forma, faz-se necessário um estudo morfométrico através da contagem do número de condrócitos por área da matriz cartilaginosa hialina para comparação entre os tratamentos.

Estudos realizados por GRUBER *et al.* (1997) e FIGUEIREDO (1996) já haviam demonstrado a viabilidade da cultura de fibrocondrócitos, cujo isolamento a partir da fibrocartilagem mostrou-se de fácil reprodutibilidade, além de manter as características fenotípicas, não apenas das células, mas também de síntese da matriz extracelular. ARAÚJO (2000) em seu estudo *in vitro* observou-se que as células da fibrocartilagem não perdem a habilidade intrínseca necessária para iniciar uma resposta reparadora se semeadas diretamente sobre os dispositivos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o arcabouço de PLDLA/PCL-T 90/10 ofereceu um substrato adequado para o crescimento de células fibrocartilaginosas de coelhos. Pode-se verificar que as células proliferaram e se infiltraram no arcabouço, criando um arranjo tridimensional.

Um outro fator importante na engenharia tecidual do menisco é o desenvolvimento de um bom ambiente biofísico (FINK *et al.*, 2001; SHIN *et al.*, 2003). Semelhante a outros tecidos, como a cartilagem hialina, as células do menisco precisam de estímulos físicos para manter o seu fenótipo e sua capacidade de produção de matriz (GUILAK *et al.*, 1994). Entrementes, diversos estudos têm demonstrado o efeito positivo de estímulo físico intermitente sobre o comportamento de fibrocondrócitos (GUNJA *et al.*, 2009). Para otimizar o processo de engenharia do menisco, os projetos futuros deverão fazer uso de bioreatores com condições controladas e que simulem as propriedades dinâmico mecânicas naturais (SWEIGART e ATHANASIOU, 2001; AUGST *et al.*, 2008; ELDER e ATHANASIOU, 2009).

Espera-se também que a adição de fatores de crescimento, como o fator transformador de crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), possam promover um ambiente mais apropriado para diferenciação e crescimento das células em cultura, sugerindo uma resposta melhor com regeneração tecidual mais rápida e específica (MARTINEK *et al.*, 2001; PANGBORN e ATHANASIOU, 2005; STEWART *et al.*, 2007; JAKLENEC, *et al.*, 2008).

Angele *et al.* (2008) utilizaram arcabouços porosos de ácido hialurônico e gelatina na proporção 70/30 com e sem a pré-cultura de células mesenquimais provenientes da medula óssea. Os resultados indicaram que o uso de fatores de crescimento durante a cultura teve efeito positivo sobre a regeneração do menisco e formação de tecido semelhante a fibrocartilagem, quando comparado ao implante sem o pré-cultivo. Durante a discussão, os autores sugeriram que a combinação de arcabouço poroso contendo células e fatores de crescimento deve resultar em uma maior retenção celular, uma vez que as células já estariam incorporadas em uma possível matriz cartilaginosa e que o pré-tecido cartilaginoso formado deveria apresentar maior resistência para suportar as forças biomecânicas do local, conduzindo assim, um melhor reparo.

Com o número de amostras realizadas neste trabalho, os resultados aqui apresentados após 12 semanas de implantes, mostraram que o arcabouço de PLDLA/PCL-T independentemente do pré-cultivo celular, produziram uma resposta reparatória melhor quando comparados ao controle. Neste tempo não foi verificada diferença qualitativa na produção de tecido com aparência fibrocartilaginosa entre os tratamentos com e sem células.

As análises histológicas do tecido recém formado após 24 semanas de implante indicaram que o “neomenisco” apresentou-se mais organizado que tecido fibrocartilaginoso encontrado após 12 semanas.

A presença de fibrocartilagem madura com fibras organizada foi predominantemente observada nos implantes realizados com os arcabouços pré-cultivados com fibrocondrócitos

alógenos após 24 semanas. Isto pode ser verificado através das colorações por HE e tricrômico de Masson, nas quais se observa a presença fibras colágenas do tipo I, orientadas na direção circunferencial na substancia fundamental dos neomeniscos, assim como ocorre no menisco normal. A presença de glicosaminoglicanos sulfatados no neotecido também foi um parâmetro importante notado.

Neste estudo, nenhuma resposta imunológica foi observada na regeneração tecidual dos meniscos com uso de células alógenas, ou seja, células provenientes da mesma espécie, porém de animais diferentes, quando comparados aos implantes sem o cultivo.

O uso de células alógenas neste trabalho se deve a fácil obtenção dos fibrocondrócitos alógenos provenientes do menisco, sendo mais acessível que células autólogas para transplante. Da mesma forma, a realização de uma biópsia para obtenção de células geraria uma resposta tecidual de cicatrização, dificultando o acesso e a regeneração tecidual após a cirurgia para implante dos arcabouços e um número muito pequeno de células por animal seria obtido, necessitando sua expansão em cultura por semanas, para posterior semeadura e cultivo (WEINAND *et al.*, 2006b).

Além disso, diversos estudos reportam a ausência de rejeição imunológica com uso de células alógenas, pré-cultivo e implante (OCHI *et al.*, 1995; KANG *et al.*, 2006; WEINAND *et al.*, 2006a; WEINAND *et al.*, 2006b) ou meniscos criopreservados para transplante (ARNOCZKY *et al.*, 1990).

Embora os resultados apresentem a formação de fibrocartilagem em tempos menores com relação a estudos anteriores, a regeneração do menisco ainda representa um dos atuais desafios da engenharia tecidual. Análises imunológicas e moleculares, bem como tempos mais longos de implante são importantes para consolidar os resultados aqui apresentados.

Uma das limitações no uso de coelhos como modelo animal para a regeneração de meniscos é que eles não apresentam um padrão de distribuição de força e marcha próximo a dos seres

humanos (ANGELLE *et al.*, 2008). Desta forma, o implante de arcabouços previamente cultivados em modelo animal de grande porte, como porcos e ovelhas, é necessário antes de aplicações clínicas.

Apesar destas limitações, diante da metodologia utilizada e de acordo com os resultados obtidos, este estudo demonstrou que a regeneração de uma importante estrutura fibrocartilaginosa como o menisco pode ser alcançada utilizando arcabouço polimérico biorreabsorvível e células alógenas, dentro dos princípios da engenharia tecidual.

Capítulo 5

Conclusões

O arcabouço polimérico de PLDLA/PCL-T 90/10 permitiu o crescimento de fibrocondrócitos em arranjo tridimensional, confirmando sua citocompatibilidade.

O arcabouço apresenta potencial para ser utilizado em aplicações biomédicas, já que o material permitiu a formação de um tecido fibrocartilaginoso, uma estrutura de extrema importância para reparação de lesões ou até mesmo substituição do menisco.

Este estudo demonstra o grande potencial do uso da cultura de células alógenas para regeneração de menisco.

Capítulo 6

Sugestões para Próximos Trabalhos

- Verificar a presença, distribuição e influência do pré-cultivo através de marcação prévia das células e posterior implante;
- Realizar análises para quantificação de proteínas da matriz extracelular como colágeno e glicosaminoglicanos, bem como sua comparação com o menisco normal;
- Avaliar as propriedades mecânicas do menisco normal em comparação com o neomenisco;
- Análises imunológicas e moleculares da expressão de proteínas e genes específicos;
- Comparar estatisticamente a regeneração do tecido fibrocartilaginoso entre os tratamentos;
- Realizar estudo *in vivo* em animais de grande porte com distribuição de forças mais próxima a humana;
- Avaliar a degeneração da cartilagem articular em tempos de implante mais longos;
- Pré-cultura de células-tronco em arcabouço polimérico e implante no menisco.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

ABERCROMBIE, M.; HEAYSMAN, J.E. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. **Experimental Cell Research**, v. 5, n. 1, p. 111-131, 1953.

ABERCROMBIE, M.; HEAYSMAN, J.E. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 6, n. 2, p. 293-306, 1954.

ABRAHAM, L.C.; DICE, J.F.; FINN, P.F.; MESIRES, N.T.; LEE, K.; KAPLAN, D.L. Extracellular matrix remodeling – Methods to quantify cell-matrix interactions. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 151-161, 2007.

AHMED, A.M.; BURKE, D.L. *In vitro* measurement of static pressure distribution in synovial joints. I. Tibial surface of the knee. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 105, n. 3, p. 216-225, 1983.

AN, Y.; TSANG, K.K.; ZHANG, H. Potential of stem cell based therapy and tissue engineering in the regeneration of central nervous system. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 1, n. 2, p. 38-44, 2006.

ANGELE, P.; JOHNSTONE, B.; KUJAT, R.; ZELLNER, J.; NERLICH, M.; GOLDBERG, V.; YOO, J. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 85, n.2, p. 445-55, 2008.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000.

ARAI, K.; TANAKA, M.; YAMAMOTO, S.; SHIMOMURA, M. Effect of pore size of honeycomb films on the morphology, adhesion and cytoskeletal organization of cardiac myocytes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 313, 314, n. 1, p. 530-535, 2008.

ARAÚJO, Verônica Garcez. **Estudo ultra-estrutural da matriz extracelular dos grumos celulares formados na cultura de fibrocondrócitos de meniscos de coelhos**. 2000. 99p. Dissertação (Mestrado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

ARNOCZKY, S.P.; WARREN, R.F. Microvasculature of the human meniscus. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 10, n. 2, p. 90-95, 1982.

ARNOCZKY, S.P.; WARREN, R.F. The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 11, n. 3, p. 131-141, 1983.

ARNOCZKY, S.P.; WARREN, R.F.; SPIVAK, J.M. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in the dog. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 70, n. 8, p. 1209-1217, 1988.

ARNOCZKY, S.P.; WARREN, R.F.; MCDEVITT, C.A. Meniscal replacement using a cryopreserved allograft. An experimental study in the dog. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 252, n. 1, p. 121-128, 1990.

ARNOCZKY, S. P. Building a meniscus – biologic considerations. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 367, n. 1, p. 244-253, 1999.

ATALA, A. Tissue engineering of artificial organs. **Journal of Endourology**, v. 14, n. 1, p. 49-57, 2000.

ATALA, A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. **Rejuvenation Research**, v. 7, n. 1, p. 15-31, 2004.

AUFDERHEIDE, A.C.; ATHANASIOU, K.A. Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 8, p. 1161-1174, 2004.

AUFDERHEIDE, A.C.; ATHANASIOU, K.A. Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1095-1104, 2005.

ATHANASION, K.A.; AGRAWAL, C.E.; BARBER, F.A.; BURKHART, S.S. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymer. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 14, n. 7, p. 726-737, 1998.

AUGST, A.; MAROLT, D.; FREED, L. E.; VEPARI, C.; MEINEL, L.; FARLEY, M.; FAJARDO, R.; PATEL, N.; GRAY, M.; KAPLAN, D. L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Effects of chondrogenic and osteogenic regulatory factors on composite constructs grown using human mesenchymal stem cells, silk scaffolds and bioreactors. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 25, p. 929 – 939, 2008.

BADYLAK, S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 13, n. 5, p. 377-383, 2002.

BAKER, B.M.; MAUCK, R.L. The effect of nanofiber alignment on the maturation of engineered meniscus constructs. **Biomaterials**, v. 28, n. 11, p. 1967-1977, 2007.

BARAUNA, G.S.; PIERUCCI, A.; OLIVEIRA, A.; DUARTE, M.A.T.; DUEK, E.A.R. Estudo da degradação *in vivo* de poli(L-co-D-L ácido láctico) aplicado como prótese para regeneração nervosa periférica. **Revista Matéria**, v. 12, n. 2, p. 298-306, 2007.

BARBANTI, S.H. **Morfologia de polímeros bioreabsorvíveis como suporte para cultura de osteoblastos**. 2001. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Porous and dense poly (L-lactic acid) membranes: *in vitro* degradation. **Acta Microscopica**, v. 11, n. 1, p. 85-89, 2002.

BARBANTI, S.H.; SANTOS JR., A.R.; ZAVAGLIA, A.C.; DUEK, E.A.R. Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: *in vitro* degradation in culture medium and osteoblasts culture. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 12, p. 1315-1321, 2004.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARBER, F.A. Resorbable fixation devices: a product guide. **Orthopedic Special Edition**, v. 4, n. 11, p. 1111-1117, 1998.

BARRETT, G.R.; RICHARDSON, K.; KOENING, V. T-fix endoscopic meniscal repair: Technique and approach to different types of tears. **Arthroscopy**, v. 11, n. 2, p. 245-251, 1995.

BATCHELOR, A.W.; CHANDRASEKARAN, M. **Service characteristics of biomedical materials and implants**. England: Imperial College Press, 2004. 242p.

BECKER, R.; WIRZ, D.; WOLF, C.; GOPFERT, B.; NEBELUNG, W.; FRIEDERICH, N. Measurement of meniscofemoral contact pressure after repair of bucket-handle tears with biodegradable implants. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 125, n. 4, p. 254-260, 2005.

BENYA, P.D.; SHAFFER, J.K. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. **Cell**, v. 30, n. 1, p. 215-224, 1982.

BET, M.R.; GOISSIS, G.; VARGAS, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. **Biomaterials**, v. 24, n. 1, p. 191-137, 2003.

BILLMEYER JR., F.W. **Textbook of Polymer Science**. New York: John Wiley & Sons, 1984. 608p.

BLÜMM, E.; OWEN, A.J. Miscibility, crystallization and melting of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(l-lactide) blends. **Polymer**, v. 36, n. 21, p. 4077-4081, 1995.

BRACHT, H.V.; VERDONK, R.; VERBRUGGEN, G.; ELEWAUT, D.; VERDONK, P. Cell-based meniscus tissue engineering. In: ASHAMMAKHI, N.; REIS, R.; CHIPELLINI, E. **Topics in Tissue Engineering**, vol. 3. Expertissues E-book, 2007. Cap. 3, p. 1-13.

BRUNS, J.; KAHRS, J.; KAMPEN, J.; BEHRENS, P.; PLITZ, W. Autologous perichondral tissue for meniscal replacement. **Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume**, v. 80, n. 5, p. 918-923, 1998.

BUMA, P.; RAMRATTAN, N.N.; VAN TIENEN, T.G.; VETH, R.P.H. Tissue engineering of the meniscus. **Biomaterials**, v. 25, n. 9, p. 1523-1532, 2004.

CABAUD, H.E.; RODKEY, W.G.; FITZWATER, J.E.; Medical meniscus repairs. An experimental and morphologic study. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 9, n. 3, p. 129-134, 1981.

CAI, K.; YAO, K.; YANG, Z.; QU, Y.; LI, X. Histological study of surface modified three dimensional poly (D,L-lactic acid) scaffolds with chitosan *in vivo*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 10, p. 2017-2024, 2007.

CALVO, E.; PALACIOS, I.; DELGADO, E.; RUIZ-CABELLO, J.; HERNANDEZ, P.; SANCHEZ-PERNAUTE, O.; EGIDO, J.; HERRERO-BEAUMONG. High resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 5, p. 463-472, 2001.

CARDOSO, Túlio Pereira. **Prótese meniscal de polímero bioabsorvível: estudo em coelhos**. 2002. 92p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARLSON, B.M. Some principles of regeneration in mammalian systems. **Anatomical Record. Part B: New Anatomist**, v. 287, n. 1, p. 4-13, 2005.

CASSIDY, R.E.; SHAFFER, A.J. Repair of peripheral meniscus tear. A preliminary report. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 9, n. 4, p. 209-214, 1981.

CHAIKOF, E.L.; MATTHEW, H.; KOHN, J.; MIKOS, A.G.; PRESTWICH, G.D.; YIP, C.M. Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. **New York Academy of Sciences**, v. 961, n. 1, p. 96-105, 2002.

CHIARI, C.; KOLLER, U.; DOROTKA, R.; EDER, C.; PLASENZOTTI, R.; LANG, S.; AMBROSIO, L.; TOGNANA, E.; KON, E.; SALTER, D.; NEHRER, S. A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 10, p. 1056-1065, 2006.

CHUNG, C.; BURDICK, J.A. Engineering cartilage tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 243-262, 2008.

CIAPETTI, G.; AMBROSIO, L.; SAVARINO, L.; GRANCHI, D.; CENNI, E.; BALDINI, N.; PAGANI, S.; GUIZZARDI, S.; CAUSA, F.; GIUNTI, A. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3815-3824, 2003.

COHEN, M.; ABADALLA, R.J.; BARRETO, F.A.Q.M.; BOUCHABKI, E.T.; OLIVEIRA, E.C.; EJNISMAN, B. Estudo radiográfico experimental da vascularização de meniscos humanos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 28, n. 5, p. 263-272, 1993.

COHEN, M.; ABDALLA, R.J.; FILHO, M.F.; NAKANO, K. K. Joelho diagnóstico e tratamento. Lesões Meniscais. In: COHEN, Moisés; ABDALLA, Rene Jorge (Ed.). **Lesões nos esportes. Diagnóstico, prevenção, tratamento**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora REVINTER, 2003. chap. 40, p. 514-521.

COPPINI, Larissa P.; DUARTE, Marcia A.T.; LUCCHESI, Carolina; DUEK, Eliana A. R. Cultura de osteoblastos sobre blendas de PLDLA/PCL-T. **In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Foz do Iguaçu. Anais...Foz do Iguaçu: Anais do 4^o CBeCiMat, 2006, v. 1.**

CULAV, E.M.; CLARK, C.H.; MERRILEES, M.J. Connective tissues: composition and its relevance to physical therapy. **Physical Therapy**, v. 79, n. 3, p. 308-319, 1999.

DE GROOT, J.H.; DE VRIJER, R.; PENNING, A.J.; KLOMPMAKER, J.; VETH, R.P.H.; JANSEN, H.W.B. Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prosthesis. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 163-173, 1996.

DEHAVEN, K.E. Meniscus repair. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 27, n. 2, p. 242-250, 1999.

DEHAVEN, K.E.; BLACK, K.P.; GRIFFITHS, H.J. Open meniscus repair technique and two to nine year results. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 17, n. 6, p. 788-795, 1989.

DENG, Y.; LIN, X.; ZHENG, Z.; DENG, J.; CHEN, J.; MA, H.; CHEN, G. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes *in vitro*. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4273-4281, 2003.

DECLERCQ, H.A.; VERBEECK, R.M.; DE RIDDER, L.I.; SCHACHT, E.H.; CORNELISSEN, M.J. Calcification as an indicator of osteoconductive capacity of biomaterials in osteoblastic cells cultures. **Biomaterials**, v. 26, n. 24, p. 4964-74, 2005.

DI FIORE, M.S.H. **Atlas de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 229p.

DUARTE, Márcia A.T.; COPPINI, Larissa P.; LUCHESI, Carolina; DUEK, Eliana A. R. Influência da adição do PCL-T em membranas de PLDLA/PCL-Triol. **In: 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, Campina Grande. Anais...Campina Grande: Anais do 9º CBPol, 2007.**

DUARTE, Márcia A.T.; ARANTES, William M.; LUCCHESI, Carolina; BARBO, Mona L.P.; DUEK, Eliana A.R. Análise da interação tecido/implante com membranas de PLDLA/PCL-Triol no subcutâneo de ratos. **In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Ouro Preto, 2008. Anais...Ouro Preto: Anais do 5º COLAOB, 2008.**

DUARTE, Márcia Adriana Tomaz. **Influência das Concentrações do PCL-T em Membranas de PLDLA. Estudo *in vitro* e *in vivo***. 2009. 116p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Campinas, Campinas.

DUEK, E.A.R.; ZAVAGLIA, C.A.C.; BELANGERO, W.D. *In vitro* study of poly(lactic acid) pin degradation. **Polymer**, v. 40, n. 23, p. 6465-6473, 1999.

ECA, L.P.M. **Biologia Molecular – Guia Prático e Didático**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 262p.

ELDER, B.D.; ATHANASIOU, K.A. Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration. **Tissue Engineering**, v. 15, n. 1, p. 43-53, 2009.

ELEMA, H.; DE GROOT, J. H.; NIJENHUIS, A. J.; PENNING, A. J.; VETH, R.P.H.; KLOMPMAKER, J.; JANSEN, H.W.B. Use of biodegradable polymer implants in meniscus reconstruction. Biological evaluation of porous biodegradable implants in menisci. **Colloid Polymer Science**, v. 268, n. 1 p. 1082-1088, 1990.

ERIKSSON, E. Meniscus repair. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 11, n. 1, p. 1, 2003.

EYRE, D.R.; WU, J.J. Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. **FEBS Letters**, v. 158, n. 2, p. 265-270, 1983.

ESPOSITO, A.R.; LUCCHESI, C.; FERREIRA, B.M.P.; DUEK, E.A.R. Estudo da Interação Célula Vero/PLGA após a Modificação da Superfície por Plasma de Oxigênio. **Revista Matéria**, v. 12, n. 1, p. 164-172, 2007.

ESPOSITO, Andrea R.; LUCCHESI, Carolina; PRAZERES, Luciana; DUEK, Eliana A. R. Cultura de Fibrocondrocitos sobre Blendas de Poli(p-dioxanona)/Poli(hidroxi butirato) PPD/PHB. **In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Ouro Preto. Anais...Ouro Preto: Anais do 5º COLAOB, 2008a.**

ESPOSITO, Andrea R.; MAS, Bruna A.; MESSIAS, André D.; ARAGONES, Aguedo; DUEK, Eliana A.R. Cultura de Fibrocondrocitos sobre Arcabouços de PLDLA. **In:** Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, Porto de Galinhas. Anais...Porto de Galinhas: Anais do 18° CBeCiMat, 2008b.

ESPOSITO, Andrea R.; ARAGONES Aguedo; DUEK Eliana A. R. Cellular behaviour of knee meniscal fibrochondrocytes-like cells culture on PLGA and PLDLA scaffolds. **In:** Internacional Conference on Tissue Engineering (ICTE), Leiria. Anais...Leiria: Proceedings of Internacional Conference on Tissue Engineering. Lisboa: IST Press, 2009. v. 1. p. 131-138.

ESPOSITO, Andrea R.; MESSIAS, André D.; MAS, Bruna A.; SANTOS, Cintia C.; DUEK, Eliana A.R. Avaliação da citocompatibilidade de arcabouços de PLDLA/PCL-T como dispositivos para prótese de menisco. **In:** 10° Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu. Anais...Foz do Iguaçu: Anais do 10° CBPol, 2009b.

ESPOSITO, Andrea R.; SILVA, Diego R.; MODA, Marlon; ALBERTO-RINCON, Maria do Carmo; ARAGONES, Aguedo; CARDOSO, Túlio P.; DUEK, Eliana A.R. Cell-based therapy on PLGA scaffolds for knee meniscal repair. *In vivo* study. **In:** Internacional Conference on Tissue Engineering (ICTE), 2009, Leiria. Anais...Leiria: Proceedings of Internacional Conference on Tissue Engineering. Lisboa: IST Press, 2009c. v. 1. p. 147-154.

FAN, H.; HU, Y.; ZHANG, C.; LI, X.; LV, R.; QIN, L.; ZHU, R. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a PLGA-gelatin/chondroitin/hyaluronate hybrid scaffold. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4573–4580, 2006.

FEDRIZZI, Vitor; DUEK, Eliana A.R. Estudo de blendas de Poli(L-co-D,L ácido láctico)/Poli(caprolactona triol) para aplicações em dispositivos ortopédicos. **In:** 15° Encontro de Iniciação Científica da PUC-SP, 2007.

FIGUEIREDO, Cristina Adelaide. **Avaliação morfológica de fibrocondrócitos em cultura e detenção bioquímica dos proteogliganos sintetizados**. 1996. Dissertação (Mestrado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

FIGUEIREDO, C.A.; JOAZEIRO, P.P. Cultura primária de fibrocondrócitos de menisco de coelho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 263-268, 2005.

FINK, C.; FERMOR, B.; WEINBERG, J.B.; PISETSKY, D.S.; MISUKONIS, M.A.; GUILAK, F. The effect of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 5, p. 481-487, 2001.

FITHIAN, D.C.M.;SCHMIDT, M.B.; RATCLIFFE, A.; MOW, V.C. Human meniscus tensile properties: regional variation and biochemical correlation. **Transactions - Orthopaedic Research Society**, v. 14, n. 1, p. 205, 1989.

FITHIAN, D.C.M.; KELLY, M.A.; MOW, V.C. Material properties and structure-function relationships in the menisci. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 252, n. 1, p. 19-31, 1990.

FREED, L.E.; MARQUIS, J.C.; NOHRIA, A.; EMMANUAL, J.; MIKOS, A.G.; LANGER, R. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 27, n. 1, p. 11-23, 1993a.

FREED, L. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; LANGER, R. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. **Journal Cellular Biochemist**, v. 51, n. 3, p. 257-264, 1993b.

FREED, L.E.; MARQUIS, J.C.; LANGER, R.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Kinetics of chondrocyte growth in cell-polymer implants. **Biotechnology and Bioengineering**, v.43, n. 7, p. 597-604, 1994.

FU, F.H.; THOMPSON, W.O. Biomechanics and kinematics of meniscus. In: FINERMAN, Gerald A.M.; NOYES, Frank R. (Eds). **Biology and biomechanics of the traumatized synovial joint: the knee as a model**. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992. Cap. 9, p. 153-183.

GABLER, F.; FRAUENSCHUH, S.; RINGE, J.; BROCHHAUSEN, C.; GÖTZ, P.; KIRKPATRICK, C.J.; SITTINGER, M.; SCHUBERT, H.; ZEHBE, R. Emulsion-based synthesis of PLGA-microspheres for the in vitro expansion of porcine chondrocytes. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 5, p. 515-520, 2007.

GHADIALLY, F.N.; WEDGE, J.H.; LALONDE, J.M. Experimental methods of repairing injured menisci. **Journal of Bone and Joint Surgery (Br)**, v. 68, n. 1, p. 106-110, 1986.

GHOSH, P.; TAYLOR, T.K. The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 224, n. 1, p. 52-63, 1987.

GIORDANO, V.; PALLOTTINO, A.B.; ALMEIDA, R.N.; GIORDANO, M.; AMARAL, N.P.; APFEL, M.I.R.; BASTOS, J.S.A. Estudo experimental comparativo de duas técnicas de sutura para reparo do tendão de Aquiles: análise bioquímica, histológica e mecânica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 39, n. 10, p. 590-600, 2004.

GOTTRUP, F. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum-Collagen distribution and relation to mechanical strength. **The American Journal of Surgery**, v.141, n.2, p.222-227, 1981.

GRANDE, D.A.; HALBERSTADT, C.; NAUGHTON, G.; SCHWARTZ, R.; MANJI, R. Evolution of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 34, n. 2, p. 211-220, 1997.

GREEN, P.W.B.; FOX, R.R.; SOKOLOF, F. Spontaneous degenerative spinal disease in the laboratory rabbit. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 2, n. 2, p. 161-168, 1984.

GRIFFITH, L.G.; NAUGHTON, G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1009-1014, 2002.

GRUBER, H.E.; STASKY, A.A.; HANLEY, E.N. Characterization and phenotypic stability of human disc cells *in vitro*. **Matrix Biology**, v. 16, n. 5, p. 285-288, 1997.

GUILAK, F.; MEYER, B.C.; RATCLIFFE, A.; MOW, V.C. The effects of matrix compression on proteoglycan metabolism in articular explants. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 2, n. 2, p. 91-101, 1994.

GUNJA, N.J.; ATHANASIOU, K.A. Passage and reversal effects on gene expression of bovine meniscal fibrochondrocytes. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 5, p. 1. R93, 2007.

GUNJA, N.J.; UTHAMANTHIL, R.K.; ATHANASIOU, K.A. Effects of TGF-B and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, n. 4, p. 565-573, 2009.

HAMBERG, P.; GILLQUIST, J.; LYSHOLM, J. Suture of new and old peripheral meniscal tears. **The Journal of Bone and Joint Surgery (Am)**, v. 65, n. 2, p. 193-197, 1983.

HARDINGHAM, T.E.; FOSANG, A.J. Proteoglycans: many forms and functions. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 6, n. 3, p. 861-870, 1992.

HEATLEY, F.W. The meniscus-can it be repaired? An experimental investigation in rabbits. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 62. n. 3, p.397-402, 1980.

HEDE, A.; JESEN, D.B.; BLYME, P.; SONNE-HOLM, S. Epidemiology of meniscal lesions in the knee. 1,215 open operations in Copenhagen 1982-84. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 61, n. 5, p. 435-437, 1990.

HEINEGARD, D.; OLDBERG. A structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 3, n. 9, p. 2042-2051, 1989.

HELEN, W.; MERRY, C.L.; BLAKER, J.J.; GOUGH, J.E. Three-dimensional culture of annulus fibrosus cells within PDLLA/Bioglass composite foam scaffolds: assessment of cell attachment, proliferation and extracellular matrix production. **Biomaterials**, v. 28, n. 11, p. 2010-20, 2007.

HELLIO LE GRAVERAND, M.P.; OU, Y.; SCHIELD-YEE, T.; BARCLAY, L. ; HART, D.; NATSUME, T.; RATTNER, J.B. The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. **Journal of Anatomy**, v. 198, n. 5, p. 525-535, 2001.

HERWING, J.; EGNER, E.; BUDDECKE, E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. **Annals of Rheumatic Diseases**, v. 43, n. 4, p. 635-640, 1984.

HOBEN, G.M.; ATHANASIOU, K.A. Meniscal repair with fibrocartilage engineering. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, v. 14, n. 3, p. 129-137, 2006.

HOLLINGER, J.O.; BATTISTONE, G.C. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v. 207, n. 1, p. 290-305, 1986.

HOSHIBA, T.; CHO, C.S.; MURAKAWA, A.; OKAHATA, Y.; AKAIKE, T. The effect of natural extracellular matrix deposited on synthetic polymers on cultured primary hepatocytes. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4519-4528, 2006.

HU, J.C.Y.; ATHANASIOU, K. Structure and function of articular cartilage. In: AN, Yuehuei H.; MARTIN, Kylie L. (Eds). **Handbook of histology methods for bone and cartilage**. New Jersey: Humana Press, 2003, cap. 4. p. 73-98.

HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529-2543, 2000.

IBARRA, C.; JANNETTA, C.; VACANTI, C.A.; CAO, Y.; KIM, T.H.; UPTON, J.; VACANTI, J.P. Tissue engineered meniscus: a potential new alternative to allogeneic meniscus transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 29, n. 1-2, p. 986-988, 1997.

IBARRA, C.; KOSKI, J.A.; WARREN, R.F. Tissue Engineering meniscus: cells and matrix. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 31, n. 3, p. 411-418, 2000.

IGNATIUS, A.A.; CLAES, L.E. *In vitro* biocompatibility of bioresorbable polymers: poly (L, DL lactide) and poly (L-lactide-glycolide). **Biomaterials**, v.17, n. 8,p.831-839, 1996.

IKA VALKO, M.; SKYTТА, E.T.; BELT, A. One-year results of use of poly-l/d-lactic acid joint scaffolds and bone packing in revision metacarpophalangeal arthroplasty. **Journal of Hand Surgery**, v. 32, n. 4, p. 427–433, 2007.

IMLER, S.M.; DOSHI, A.N.; LEVENSTON, N.E. Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 9, p. 736-744, 2004.

INGMAN, A.M.; GHOSH, P.; TAYLOR, T.K.F. Variation of collagen and non-collagenous proteins of human knee joint with age and degeneration. **Gerontology**, v. 20, n. 4, p. 212-223, 1974.

ISODA, K.; SAITO, S. *In vitro* and *in vivo* fibrocondrocytes growth behaviour in fibrin gel an immunohistochemical study in the rabbit. **American Journal of Knee Surgery**, v. 11, n. 4, p. 209-216, 1998.

ITO, Y.; TANAKA, N.; FUJIMOTO, Y.; YASUNAGA, Y.; ISHIDA, O.; AGUNG, M.; OCHI, M. Bone formation using novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic hybridized with cultures marrow stromal stem cells derived from Green rat. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 69, n. 3, p. 454-461, 2004.

JAKLENEC, A.; HINCKFUSS, A.; BILGEN, B.; CIOMBOR, D. M.; AARON, R.; MATHIOWITZ, E. Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta(1) from PLGA microsphere-based scaffolds. **Biomaterials**, v. 29, n. 10, p. 1518-1525, 2008.

JEON, O.; SONG, S.J; YANG, H.S.; BHANG, S.H.; KANG, S.W.; SUNG, M.A.; LEE, J.H.; KIM, B.S. Long-term delivery enhances *in vivo* osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 2, p. 774-80, 2008.

JEON, Y.H.; CHOI, J.H.; SUNG, J.K.; KIM, T.K.; CHO, B.C.; CHUNG, H.Y. Different effects of PLGA and chitosan scaffolds on human cartilage tissue engineering. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 6, p. 1249-1258, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KANG, S.; SON, S.; LEE, J.; LEE, E.; LEE, K.; PARK, S.; PARK, J.; KIM, B. Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 78, n. 3, p. 659-671, 2006.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, 2005.

KELLOMÄKI, M.; TÖRMÄLÄ, P. Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue-engineering scaffolds. **Methods In Molecular Biology**, v. 238, n. 1, p. 1-10, 2004.

KLOMPMAKER, J.; JANSEN, H. W.B.; VETH, R.P.H.; NIELSEN, H.K.L.; DE GROOT, J.H.; PENNING, A.J. Porous implants for knee joint meniscus reconstruction: a preliminary study on the role of pore sizes in ingrowth and differentiation of fibrocartilage. **Clinical Materials**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 1993.

KLOMPMAKER, J.; VETH, R.P.; JANSEN, H.W.; NIELSEN, H.K.; DE GROOT, J.H.; PENNING, A.J. Meniscal replacement using a porous polymer prosthesis: a preliminary study in the dog. **Biomaterials**, v. 17, n. 12, p. 1169-1175, 1996.

KOBAYASHI, M.; CHANG, Y.S.; OKA, M. A two year *in vivo* study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3243-3248, 2005.

KOHN, D.; WIRTH, C.J.; REISS, G.; PLITZ, W.; MASCHKE, H.; ERHARDT, W.; WULKER, N. Medial meniscus replacement by a tendon autograft: experiments in sheep. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 74, n. 6, p. 910-917, 1992.

KOHN, J.; LANGER, R. **Bioresorbable and bioerodible materials**. **Biomaterials Science**. New York: Academic Press, 1996. p. 64- 72.

KOHN, D.; RUDERT, M.; WIRTH, C.J.; PLITZ, W.; REISS, G.; MASCHKE, H. Medial meniscus replacement by a fat pad autograft. An experiments in sheep. **International Orthopaedics**, v. 21, n. 4, p. 232-238, 1997.

KON, E.; CHIARI, C.; MARCACCI, M.; DELCOGLIANO, M.; SALTER, D.M.; MARTIN, I.; AMBROSIO, L.; FINI, M.; TSCHON, M.; TOGNANA, E.; PLASENZOTTI, R.; NEHRER, S. Tissue engineering for total meniscal substitution: animal study in sheep model. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 6, p. 1067-1080, 2008.

KÖSE, G.T.; BER, S.; KORKUSUZ, F.; HASIRCI, V. Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) based tissue engineering matrices. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 2, p. 121-126, 2003.

KRAUSE, W.R.; POPE, M.H.; JOHNSON, R.J.; WILDER, D.G. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. **The Journal of Bone and Joint Surgery (Am)**, v. 58, n. 5, p. 599-604, 1976.

KUMARASURIYAR, A.; JACKSON, R.A.; GRONDAHL, L.; TRAU, M.; NURCOMBE, V.; COOL, S.M. Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) supports *in vitro* osteogenesis. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1281-1295, 2005.

LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2004.

LAWRENCE, B.J.; MADIHALLY, S.V. Review Cell colonization in degradable 3D porous matrices. **Cell Adhesion & Migration**, v. 2, n. 1, p. 9-16, 2008.

LEE, S.J.; KANG, H.W.; PARCK, J.K.; RHIE, J.W.; HAHN, S.K.; CHO, D.W. Application of microstereolithography in the development of three-dimensional cartilage regeneration scaffolds. **Biomedical Microdevices**, v. 10, n. 2, p. 233-41, 2008.

LEWIS, D. H. Controlled release of biologically active agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin, Mark; Langer Robert S. (Eds). **Biodegradable polymers as drugs delivery systems**. New York: Marcel Dekker, 1990. cap. 1. p. 1-41.

LIN, J.Y.; DREISS, A.D.; ZHOU, Z.; HANSEN, J.C.; SIEDLECKI, C.A.; HENGSTEBECK, R.W.; CHENG, J.; WINOGRAD, N.; DONAHUE, H.J. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. **Biomaterials**, v. 28, n. 10, p. 1787-1797, 2007.

LIU, R.; HUANG, S.S.; WAN, Y.H.; MA, G.H.; SU, Z.G. Preparation of insulin-loaded PLA/PLGA microcapsules by a novel membrane emulsification method and its release *in vitro*. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 51, n. 1, p. 30-38, 2006.

LLOYD, D.A.; ANSARI, T.I.; GUNDABOLU, P.; SHUREY, S.; MAQUET, V.; SIBBONS, P.D.; BOCCACCINI, A.R.; GABE, S.M. A pilot study investigating a novel subcutaneously implanted pre-cellularised scaffold for tissue engineering of intestinal mucosa. **European Cells & Materials Journal**, v. 31, n. 11, p. 27-33, 2006.

LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F.; Morphology of fibroblastic cells cultured on poly(HEMA-co-AA) substrates. **Cytobios**, v. 101, n. 397, p. 115-122, 2000.

LUCCHESI, Carolina. **Cultura de células Vero sobre membranas de poli(hidroxibutirato-cohidroxivalerato) (PHBV) tratadas por plasma gasoso**. 2006. 71p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LUCCHESI, C.; FERREIRA, B.M.P.; DUEK, E.A.R.; SANTOS JR., A.R.; JOAZEIRO, P.P. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 635-643, 2008.

MA, Z.; GAO, C.; GONG, Y.; SHEN, J. Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups. **Biomaterials**, v. 24, n. 21, p. 3725-3730, 2003.

MAHMOOD, T.A.; SHASTRI, V.P.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; LANGER, R.; RIESLE, J. Tissue engineering of bovine articular cartilage within porous poly(ether ester) copolymer scaffolds with different structures. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1244-1253, 2005.

MALDA, J.; WOODFIELD, T.B.F.; VAN DER VLOODT, F.; WILSON, C.; MARTENS, D.E.; TRAMPER, J.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; RIESLE, J. The effect of PEGT/PBT scaffold

architecture on composition of tissue engineered cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 1, p. 63-72, 2005.

MALUF, L.C.V.; SILVA, D.; DUEK, E.A.R.; ALBERTO RINCON, M.C. Morphometrical analysis of multinucleated giant cells in subdermal implants of poly(lactic acid) in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 481-485, 2006.

MALVEZZI, Helena; MESSIAS, André D.; CORAÇA, Débora; PAVANI, Aristides F.; DUEK, Eliana A.R. Procedimento histológico de implantes ósseos de suporte de poli(L-co-D,L ácido láctico) PLDLA litografados e cultivados com osteoblastos. **In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Ouro Preto. Anais...Ouro Preto: Anais do 5ºCOLAOB, 2008.**

MARIANO, Elisama C.; DUEK, Eliana A.R. **Análise histológica da blenda PLLA/PCL poli(ácido-láctico)/poli(ε-caprolactona) para aplicação como prótese de menisco.** 2004. 35p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação)- Faculdade de Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade de São Paulo, Sorocaba.

MAROUDAS, A. Biophysical chemistry of cartilaginous tissue with special reference to solute and fluid transport. **Biorheology**, v. 12, n. 3-4, p. 233-248, 1975.

MARSANO, A.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; MARTIN, I. Towards tissue engineering of meniscus substitutes: selection of cell source and culture environment. **In: Annual International Conference (EMBS), 2006, New York. Anais...New York: Proceedings of the 28th IEEE, 2006. p. 3656-13658.**

MARTINEK, V.; MARTINEK, S.; PELINKOVIC, D.; FUKUSHIMA, K.; CELECHOVSKY, C.; FU, F.H.; HUARD, J. Proliferative stimulation of human fibrochondrocytes originating from the avascular zone with IGF-1, TGF- α and VEGF. **Journal of the Japanese Orthopaedic Association**, v. 75, n. 2, p. S253, 2001.

MARTINEK, V.; UEBLACKER, P.; BRAUN, K.; NITSCHKE, S.; MANNHARDT, R.; SPECHT, K.; GANSBACHER, B.; IMHOFF, A. B. Second generation of meniscus transplantation: in-vivo study with tissue engineering meniscus replacement. **Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery**, v. 126, n. 4, p. 228-234, 2006.

MARUCCI, D.D.; YU, Y.; MCTAVISH, J.; FIONA BONAR, S.; POOLE, M.D.; WALSH, W.R. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone remodelling following distraction osteogenesis of the sheep mandible. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 30, n. 4, p. 208–212, 2002.

MAS, Bruna A.; ESPOSITO, Andrea R.; DUTRA, André. M.; DUEK, Eliana A.R.; ARAGONES, Aguedo. Cultura de osteoblastos sobre arcabouços de PLDLA. **In: 18º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, Porto de Galinhas. Anais...Porto de Galinhas: Anais do 18º CBeCiMat, 2008.**

MAUCK, R.L.; MARTINEZ-DIAZ, G.J.; YUAN, X.; TUAN, R.S. Regional multilineage differentiation potential of meniscal fibrochondrocytes: implications for meniscus repair. **The Anatomical Record**, v. 290, n. 1, p. 48-58, 2007.

MCDEVITT, C.A.; WEBBER, R.J. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 252, p. 8-18, 1990.

MESSIAS, André D.; LUCCHESI, Carolina; PAVANI, Aristides F.; CORAÇA, Débora C.; DUEK, Eliana A.R. Citocompatibilidade de células osteoblásticas sobre suportes porosos e lisos de PLDLA. **In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Ouro Preto. Anais... Ouro Preto: Anais do 5ºCOLAOB, 2008.**

MESSNER, K. Meniscal regeneration or meniscal transplantation? **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 9, n. 3, p. 162-167, 1999.

MESSNER, K.; GAO, J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and rationale for clinical treatment. **Journal Anatomy**, v. 193, n. 2, p. 161-178, 1998.

MIKOS, A.G.; SARAKINOS, G.; LYMAN, M. D.; INGBER, D.E.; VACANTI, J.P.; LANGER, R. Prevascularization of porous biodegradable polymers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 6, p. 716-723, 1993.

MIKOS, A.G.; TEMENOFF, J.S. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 5, p. 431-440, 2000.

MILACHOWSKI, K.A.; KOHN, D.; WIRTH, C.J. Transplantation of allogeneic menisci. **Orthopade**, v. 23, n. 2, p. 160-163, 1994.

MILLER, R.A.; BRADY, J.M.; CUTRIGHT, D.E. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 11, n. 5, p. 711-719, 1977.

MORADIAN-OLDAK, J.; WEN, H.B.; SCHNEIDER, G. B.; STANFORD, C. M. Tissue engineering strategies for the future generation of dental implants. **Journal of Periodontology**, v. 41, n. 1, p. 157-176, 2006.

MORONI, L.; DE WIJN, JR.; VAN BLITTERSWIJK, C.A. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. **Biomaterials**, v. 27, n. 7, p. 974-985, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTA, A.C.; DUEK E.A.R. Síntese e caracterização do Copolímero Poli(L-co-D,L ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 123-129, 2007.

MOTTA, Adriana Cristina de Menezes Monteiro. **Síntese e caracterização de dispositivos de poli(L-co-D,L ácido láctico): estudo da degradação *in vitro* e *in vivo***. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MOW, V.C.; RATCLIFFE, A.; CHERN, K.Y.; KELLY, M.A. Structure and function relationships of the menisci of the knee. In: MOW, Van C.; ARNOCHY, Steven P.; JACKSON, Douglas W. (Eds). **Knee Meniscus: Basic and Clinical Foundations**. New York: Raven Press, p. 37-57, 1992.

MULLER-RATH, R.; MUMME, T.; MILTNER, O.; ANDEREVA, S.; SCHNEIDER, U. Meniscus replacement: current aspects in the field of tissue engineering. **Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete**, v. 142, n. 5, p. 540-545, 2004.

NATSU-UME, T.; MAJIMA, T.; RENO, C.; SHRIVE, N. G.; FRANK, C.B.; HART, D. A. Menisci of the rabbit knee require mechanical loading to maintain homeostasis: cyclic hydrostatic compression *in vitro* prevents depression of catabolic genes. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 10, n. 4, p. 396-405, 2005.

OCHI, M.; ISHIDA, O.; DAISAKU, H.; IKUTA, Y.; AKIYAMA, M. Immune response to fresh meniscal allografts in mice. **Journal of Surgical Research**, v. 58, n. 5, p. 478-484, 1995.

OLIVEIRA, A.L.; MALAFAYA, P.B.; COSTA, S.A.; SOUSA, R.A.; REIS, R.L. Micro-computed tomography (micro-CT) as a potential tool to assess the effect of dynamic coating routes on the formation of biomimetic apatite layers on 3D-plotted biodegradable polymeric scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 2, p. 211-23, 2007.

ONUKE, Y.; BHARDWAJ, M.P.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F.; BURGESS, D.J. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 2, n. 6, p. 1003-1015, 2008.

OREFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538p.

Organização Internacional para Padronização de experimentos. **ISO 10993: Biological evaluation of medical devices**. Genebra, 1992.

Organização Internacional para Padronização de experimentos. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – part 5 - Tests for cytotoxicity: in vitro methods**. Genebra, 1992.

PANGBORN, C.A.; ATHANASIOU, K.A. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. **Journal Orthopedic Research**, v. 23, n. 5, p. 1184-1190, 2005.

PERETTI, G.M.; GILL, T.J.; XU, J.; RANDOLPH, M.A.; MORSE, K.R.; ZALESKE, D.J. Cell-based therapy for meniscal repair – A large animal study. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 1, p. 146-158, 2004.

PEZZIN, A.P.T.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Estudo da degradação *in vitro* de blendas de poli(p-dioxanona)/ poli(L-ácido láctico) (PPD/PLLA) preparadas por evaporação de solvente. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 12, n. 4, p. 285-294. 2002a.

PEZZIN, A.P.T.; CARDOSO, T.P.; RINCÓN, M.C.A.; DUEK, E.A.R. Prótese de menisco biorreabsorvível: uma nova alternativa para a substituição de meniscos. **Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal**, v. 3, n. 1, p. 38-44, 2002b.

PEZZIN, A.P.T.; CARDOSO, T.P.; RINCÓN, M.C.A.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Bioreabsorbable polymer scaffold as temporary meniscal prosthesis. **Artificial Organs**, v. 27, n. 5, p. 428-431, 2003.

PIERUCCI, A.; DUEK, E.A.R.; OLIVEIRA, A.L.R. Peripheral nerve regeneration through biodegradable conduits prepared by solvent evaporation. *Tissue Engineering*. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 5, p. 595-606, 2008.

PIETRO, L.; SILVA, D.R.M.; ALBERTO RINCON, M.C.; DUEK, E.A.R. The microscopical characterization of membranes poly(L-lactic-co-glycolic acid) with and without added plasticizer: an *in vivo* study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1069-1074, 2008.

PIETRZAK, W.S.; VERSTYNEN, B.S.; SARVER, D.R. Bioabsorbable fixation devices: status for the craniomaxillofacial surgeon. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 8, n.2, p. 92-96, 1997.

PIHLAJAMAKI, H.; SALMINEN, S.; LAITINEN, O.; TYNNINEN, O.; BOSTMAN, O. Tissue response to polyglycolide, polydioxanone, polylevolactide, and metallic pins in cancellous bone: An experimental study on rabbits. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 8, p. 1597-1606, 2006.

PINTO, Marcelo Roberto. **Osteointegração de Blendas de PLDLA/PCL. Estudo *in vitro* e *in vivo***. 2007. 89p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PINTO, M.R.F.; ELISAMA, C.M.; ALBERTO-RINCON M.C.; DUEK, E.A.R. Análise histológica da Blenda PLLA/PCL como prótese de menisco. **Revista Matéria**, v. 14, n. 4, PP. 1162-1171, 2009.

PRAZERES, Luciana; GRIGULL, Vitor H.; GARCIA, Michele C.F.; DUEK, Eliana A.R.; ESPOSITO, Andrea R.; SCHNEIDER, Andréa; PEZZIN, Ana P.T. Avaliação da miscibilidade de blendas de poli(p-dioxanona) e poli(3-hidroxi-butirato). **In:** 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2007, Paraíba. Anais... Paraíba: Anais do 9º CBPol, 2007.

PRAZERES, L.; GARCIA, M.C.F.; DUEK, E.A.R.; ESPOSITO, A.R.; SCHNEIDER, A.L.S.; PEZZIN, A.P.T. Avaliação da miscibilidade de blendas de poli(p-dioxanona) e poli(3-hidroxi-butirato). **Revista UNIVILLE**, v. 14, n. 1, p. 52-62, 2009.

PROCTOR, C.S.; SCHMIDT, M.B.; WHIPPLE, R.R.; KELLY, M.A.; MOW, V.C. Material properties of the normal medial bovine meniscus, **Jornal Orthopaedics Research**, v. 7, n. 6, p. 771-782, 1989.

PU, F.R.; WILLIAMS, R.L.; MARKKULA, T.K.; HUNT, J.A. Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells *in vitro*. **Biomaterials**, v.23, n. 11, p.2411-2428, 2002.

PULLIAINEN, O.; VASARA, A.I.; HYTTINEN, M.M.; TIITU, V.; VALONEN, P.; KELLOMAKI, M.; JURVELIN, J.S.; PETERSON, L.; LINDAHL, A.; KIVIRANTA, I.; LAMMI, M.J. Poly-L-D-lactic acid scaffold in the repair of porcine knee cartilage lesions. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 6, p. 1347-1355, 2007.

RADIM, E.L; LAMOTTE, F.; MAQUET, P. Role of the menisci in the distribution of stress in the knee. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 185, n. 1, p. 290-294, 1984.

RAHMAN, M.S.; TSUCHIYA, T. Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 6, p. 781-790, 2001.

RAMASWAMY, S.; WANG, D.A.; FISHBEIN, K.W.; ELISEEFF, J.H.; SPENER, R.G. An analysis of the integration between articular cartilage and nondegradable hydrogel using magnetic resonance imaging. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 77, n. 1, p. 144-148, 2006.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science. An introduction to materials and medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. 484p.

REGUZZONI, M.; MANELLI, A.; RONGA, M.; RASPANTI, M.; GRASSI, F.A. Histology and ultrastructure of a tissue-engineered collagen meniscus before and after implantation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 74, n. 2, p. 808-816, 2005.

REZENDE, C.A.; LUCCHESI, C.; BARBO, M.L.P.; DUEK, E.A.R. Membranas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2005.

REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACINI, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

RIJK, P.C. Meniscal allograft transplantation – Parte II: alternative treatments, effects on articular cartilage, and future directions. **Arthroscopy**, v. 20, n. 8, p. 851-859, 2004.

RISBUD, M.V.; SITTINGER, M. Tissue engineering: advances *in vitro* cartilage generation. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 8, p. 351- 356, 2002.

ROUGHLEY, P.J.; WHITE, R.J. The dermatan sulfate proteoglycans of the adult human meniscus. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 10, n. 5, p. 631-367, 1992.

RUITER, G.C.; ONYENEHO, I.A.; LIANG, E.T.; MOORE, M.J.; KNIGHT, A.M.; MALESSY, M.J.; SPINNER, R.J.; LU, L.; CURRIER, B.L.; YASZEMSKI, M.J.; WINDEBANK, A.J. Methods for *in vitro* characterization of multichannel nerve tubes. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 84, n. 3, p. 643-651, 2008.

SAKATA, M.M.; ALBERTO-RINCON, M.C.; DUEK, E.A.R. Estudo da interação polímero/cartilagem/osso utilizando poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) e poli(p-dionaxona) em côndilo femoral de coelhos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 3, p. 176-180, 2004.

SANTOS JR., A.R.; BARBANTI, S.H.; DUEK, E.A.R.; DOLDER, H.; WADA, R.; WADA, M.L.F. Vero cell growth and differentiation on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters. **Artificial Organs**, v. 25, n. 1, p. 7-13, 2001.

SANTOS JR., A.R.; DOLDER, H.; WADA, M.L. Dexamethasone and fetal calf serum effects in differentiation of Vero cells cultured on type I collagen gel. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 35, n. 1, p. 35-42, 2003.

SANTOS JR., A.R.; FERREIRA, B.M.P.; DUEK, E.A.R.; DOLDER, H.; WADA, R. S.; WADA, M.L.F. Differentiation Pattern of Vero cells cultured on Poly(L-Lactic Acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) Blends. **Artificial Organs**, v. 28, n. 4, p. 381-389, 2004.

SANTOS JR., A.R.; FERREIRA, B.M.P.; DUEK, E.A.R.; DOLDER, H.; WADA, M.L.F. Use of blends of bioabsorbable poly(L-lactic Acid)/poly(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) as surfaces for Vero cell culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 11, p. 1623-1632, 2005.

SANTOS JR., A.R.; WADA, M.L.F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. **Polímeros**. v. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.

SARAZIN, P.; ROY, X.; FAVIS, B.D. Controlled preparation and properties of porous poly(l-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. **Biomaterials**, v. 25, n. 28, p. 5965–5978, 2004.

SARUWATARI, L.; AITA, H.; BUTZ, F.; NAKAMURA, H.K.; OUYANG, J.; YANG, Y.; CHIOU, W.A.; OGAWA, T. Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 11, p. 2002-2016, 2005.

SCHULTHEISS, D.; GABOUEV, A.I.; CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; WALLES, T.; SCHLOTE, N.; WEFER, J.; KAUFMANN, P.M.; HAVERICH, A.; JONAS, U.; STIEF, C.G.; MERTSCHING, H. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeded technique and short-term implantation in a porcine model. **Brazilian Journal of Urology**, v. 173, n. 1, p. 276–180, 2005.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering Reports**, v. 34, n. 4, p. 147-230, 2001.

SEGAWA, Y.; MUNETA, T.; MAKINO, H.; NIMURA, A.; MOCHIZUKI, T.; JU, Y.; EZURA, Y.; UMEZAWA, A.; SEKIYA, I. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 4, p. 435-441, 2009.

SETTON, L.A.; GUILAK, F.; HSU, E.W.; VAIL, T.P. Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 367, n. 1, p. 254-72, 1999.

SHIN, H. Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 126-133, 2007.

SHIN, S.; FERMOR, B.; WEINBERG, J.B.; PISETSKY, D.S.; GUILAK, F. Regulation of matrix turnover in meniscal explants: role of mechanical stress, interleukin-I, and nitric oxide. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 1, p. 308-313, 2003.

SHRIVE, N.G.; O'CONNOR, J.J.; GOODFELLOW, J.W. Load bearing in the knee joint. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 131, n. 1, p. 279-287, 1978.

SILVA, Débora Regina Machado. **Membranas de poli-l(ácido láctico): suporte para fibrocondrócitos isolados de menisco e comportamento in vivo no tecido subcutâneo**. 2007. 140p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia – Universidade Federal de Campinas, Campinas.

SOUZA, J.M.G.; FONSECA, E.A.; CERQUEIRA, N.B. Lesão intersticial do menisco. Descrição de manobra que identifica a lesão. **Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia**, v. 28, n. 8, p. 523-526. 1993.

SPOERKE, E.D.; MURRAY, N.G.; LI, H.; BRINSON, L.C.; DUNAND, D.C.; STUPP, S.I. A bioactive titanium foam scaffold for bone repair. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 5, p. 523-533, 2005.

STABELLINI, G.; CALASTRINI, C.; SCAPOLI, L.; LOCCI, P.; DE MATTEI, M.; DELLAVIA, C.; MOSCHENI, C.; VERTEMATI, M.; BEDANI, P.L. The effect of polyamines and dialysate fluid on extracellular matrix synthesis in VERO cell cultures. **Journal of Neuphrology**, v. 15, n. 5, p. 539 – 546, 2002.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia**. São Paulo: Manole, 1995, 378p.

STEWART, K.; PABBRUWE, M.; DICKINSON, S.; SIMS, T.; HOLLANDER, A.P.; CHAUDHURI, J.B. The effect of growth factor treatment on meniscal chondrocyte proliferation and differentiation on polyglycolic acid scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 2, p. 271-280, 2007.

STONE, K.R.; RODKEY, W.G.; WEBBER, R.J.; MCKINNEY, L.; STEADMAN, J.R. Future directions. Collagen based prostheses for meniscal regeneration. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 252, n. 1, p. 129-135, 1990.

STONE, K.R. Meniscus replacement. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 15, n. 3, p. 557-571, 1996.

SUGANUMA, J.; ALEXANDRE, H. Biological response of intramedullary bone to poly(l-lactid acid). **Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 4, n. 1, p. 13-27, 1993.

SUL, Y.T.; JOHANSSON, C.; ALBREKTSSON, T. Which surface properties enhance bone response to implants? Comparison of oxidized magnesium, TiUnite, and Osseotite implant surfaces. **International Journal of Prosthodontics**, v. 19, n. 4, p. 319-328, 2006.

SUZUKI, T.; TOYODA, T.; SUZUKI, H.; HISAMORI, N.; MATSUMOTO, H.; TOYAMA, Y. Hydrostatic pressure modulates mRNA expressions for matrix proteins in human meniscal cells. **Biorheology**, v. 43, n. 5, p. 611-622, 2006.

SWEIGART, M.A.; ATHANASIOU, K.A. Toward tissue engineering of the knee meniscus. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 111-129, 2001.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, n. 6, p. 311-324, 2009.

TANAKA, T.; FUJII, K.; KUMAGAE, Y. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 7, n. 2, p. 75-80, 1999.

TANG, Z.G.; HUNT, J.A. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation *in vitro*. **Biomaterials**, v. 27, n. 25, p. 4409-4418, 2006.

TAYLOR, A.; LIPERT, K.; KRÄMER, K.; HAMPEL, S.; FÜSSEL, S.; MEYE, A.; KLINGELER, R.; RITSCHER, M.; LEONHARDT, A.; BÜCHNER, B.; WIRTH, M.P. Biocompatibility of iron filled carbon nanotubes *in vitro*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 10, p. 5709-5716, 2009.

THORNTON, F.J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surgery Clinics of North America**, v.77, n. 3, p. 549-573, 1997.

TIAN, B.; LESSAN, K.; KAHM, J.; KLEIDON, J.; HENKE, C. Integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24667-24675, 2002.

TIENEN, T.G.; HEIJKANTS, R.G.J.C.; BUMA, P.; DE GROOT, J.H.; PENNING, A.J.; VETH, R.P.H. A porous polymer scaffold for meniscal lesions repair – a study in dogs. **Biomaterials**, v. 24, n. 14, p. 2541-2548, 2003.

TIENEN, T.G.; HEIJKANTS, R.G.J.C.; DE GROOT, J.H.; SCHOUTEN, A.J.; PENNING, A.J.; VETH, R.P.H.; BUMA, P. Meniscal replacement in dogs. Tissue regeneration in two different materials with similar properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 76, n. 2, p. 389-396, 2006.

TSANG, T.L.; BHATIA, S.N. Three-dimensional tissue fabrication. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 11, p. 1635-1647. 2004.

TULLBERG-REINERT, H.; JUNDT, G. *In situ* measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor

B2 and ascorbic and 2-phosphate. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 112, n. 4, p. 271-276, 1999.

UNDERHILL, G.H.; CHEN, A.A.; ALBRECHT, D.R.; BHATIA, S.N. Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 256-270, 2007.

VAN KOOTEN, T.G.; SPIJKER, H.T.; BUSSCHER, H.J. Plasma treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1735-1747, 2004.

VAN TIENEN, T.; HEIJKANTS, R.; BUMA, P.; DE GROOT, J.; PENNING, A.; VETH, R. Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and porosizes. **Biomaterials**, v. 23, n. 8, p. 1731-1738, 2002.

VAZIRI, A.; NAYEB-HASHEMI, H.; SINGH, A.; TAFTI, B.A. Influence of meniscectomy and meniscus replacement on the stress distribution in human knee joint. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 8, p. 1335-1344, 2008.

VERBRUGGEN, G.; VERDONK, R.; VEYS, E.M.; VAN DAELE, P.; DE SMET, P.; VAN DEN ABEELE, K.; CLAUS, B.; BAETEN, D. Human Meniscal proteoglycan metabolism in long-term tissue culture. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 4, n. 1, p. 57-63, 1996.

VERDONK, P.C.M.; FORSYTH, R.G.; WANG, J.; ALMQVIST, K.F.; VERDONK, R.; VEYS, E.M.; VERBRUGGEN, G. Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, n. 7, p. 548-560, 2005.

VERT, M.; LI, M.S.; SPENLEHAUER, G.; GUERIN, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science**, v. 3, n. 6, p. 432-446, 1992.

VOGEL, W.F. Collagen-receptor signaling in health and disease. **European Journal of Dermatology**, v. 11, n. 6, p. 506-514, 2001.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; MEINEL, L.; ALTMAN, G.; KAPLAN, D. Bioreactor cultivation of osteochondral grafts. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 8, N. 3, p. 209-218, 2005.

WALTON, M.; COTTON, N. Long-term *in vivo* degradation of poly(L-lactide) PLLA in bone. **Journal of Biomaterials Applications**, 21, n. 4, p. 395-411, 2007.

WAN, Y.; WANG, Y.; LIU, Z.; QU, X.; HAN, B.; BEI, J.; WANG, S. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nono-scale topography structured poly (L-lactide). **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4453-4456, 2005.

WANG, Y.; KIM, U.; BLASIOLI, D.J.; KIM, H.J.; KAPLAN, D.L. *In vitro* cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 7082-7094, 2005.

WANG, Y.; KIM, H.J.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. **Biomaterials**, v. 27, n. 36, p. 6064-6082, 2006.

WARREN, R.F. Arthroscopy meniscus repair. **Arthroscopy**, v. 1, n. 3, p. 170-172, 1985.

WEBBER, R.J.; HARRIS, M.; HOUGH, A.J. Cell culture of rabbit Meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 3, n. 1, p. 36-42, 1985.

WEBBER, R.J.; ZITAGLIO, T.; HOUGH, A.J. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 6, n. 1, p. 13-23, 1988.

WEBBER, R.J. *In vitro* culture of meniscal tissue. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 252, p. 114-120, 1990.

CHENG, W.; LI, H.; CHANG, J. Fabrication and characterization of h-dicalcium silicate/poly(d,l-lactic acid) composite scaffolds. **Materials Letters**, v. 59, n. 17, p. 2214– 2218, 2005.

WEINAND, C.; PERETTI, G.M.; ADAMS, S.B.; RANDOLPH, M.A.; SAVVIDIS, E.; GILL, T.J. Healing potential of transplanted allogeneic chondrocytes of three different sources in lesions of the avascular zone of the meniscus: a pilot study. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 126, n. 9, p. 599-605, 2006a.

WEINAND, C.; PERETTI, G.M.; ADAMS, S.B.; BONASSAR, L.J.; RANDOLPH, M.A.; GILL, T.J. An allogenic cell-based implant for meniscal lesions. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 11, p. 1779-1789, 2006b.

WEINAND, C.; XU, J.W.; PERETTI, G.M.; BONASSAR, L.J.; GILL, T. J. Conditions affecting cell seeding onto there-dimensional scaffolds for cellular-based biodegradable implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 91, n. 1, p. 80-87, 2009.

WILLIAMS, D.F. **Definitions In Biomaterials - Progress In Biomedical Engineering**. New York : Elsevier, 1987, 72p.

WILLIAMS, D.F. Benefit and risk in tissue engineering. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 24-29, 2004.

WILLIAMS, J.M.; ADEWUNMI, A.; SCHEK, R.M.; FLANAGAN, C.L.; KREBSBACH, P.H.; FEINBERG, S.E.; HOLLISTER, S.J.; DAS, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4817-4827, 2005.

WILLIAMS, D.F. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. **Trends Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 4-8, 2006.

WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20 p. 2941 – 2953, 2008.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

WILSON, C.J.; CLEGG, R.E.; LEAVESLEY, D.; PEARCY, M. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins. A review. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 1-2, p. 1-18, 2005.

WOODFIELD, T.B.F.; BEZEMER, J.M.; PIEPER, J.S.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; RIESLE, J. Scaffolds for tissue engineering of cartilage. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 12, n. 3, p. 209-236, 2002.

WOODFIELD, T.B.F.; MALDA, J.; DE WIJN, J.; PETERS, F.; RIESLE, J.; VAN BLITTERSWIJK, C.A. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fibre-deposition technique. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4149–4161, 2004.

WOODFIELD, T.B.F.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; DE WIJN, J.; SIMS, T.J.; HOLLANDER, A.P.; RIESLE, J. Polymer Scaffolds Fabricated with Pore-Size Gradients as a Model for Studying the Zonal Organization within Tissue-Engineered Cartilage Constructs. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 9-10, p. 1297-1311, 2005.

WU, X.S. Preparation characterization and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable latic/glycolic acid polymer. In: WISE, Donald L.; TRANTOLO, Debra J.; ALTOBELLI, David E. YASZEMKI, Michael J.; GRESSER, Joseph D.; SCHWARTZ, Edith R. (Eds). **Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering**. New York: Marcel Dekker, 1995. cap. 42. p. 1151-1200.

YAMAGUCHI, M.; SHINBO, T.; KANAMORI, T.; WANG, P.C.; NIWA, M.; KAWAKAMI, H.; NAGAOKA, S.; HIRAKAWA, K.; KAMIYA, M. Surface modification of poly(L-lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology, and cell growth. **Artificial Organs**, v.7, n. 4, p.187-193, 2004.

YAMASAKI, T.; DEIE, M.; SHINOMIYA, R.; IZUTA, Y.; YASUNAGA, Y.; YANADA, S.; SHARMAN, P.; OCHI, M. Meniscal regeneration using tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 75, n. 1, p. 23-30, 2005.

YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Enhanced cell affinity of poly(D,L-Lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. **Biomaterials**, v. 23, n. 12, p.2607-2614, 2002.

YOON S.J.; KIM, S.H.; HA, H.J.; KO, Y.K.; SO, J.W.; KIM, M.S.; YANG, Y.I.; KHANG, G.; RHEE, J.M.; LEE, H.B. Reduction of Inflammatory Reaction of Poly(D,L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Using Demineralized Bone Particles. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 4, p. 539-547, 2008.

ZHANG, X.; HUA, H.; SHEN, X.; YANG, Q. *In Vitro* Degradation And Biocompatibility Of Poly(L-Lactic Acid)/Chitosan Fiber Composites. **Polymer**, v. 48. n. 4, p. 1005-1011. 2007.

ZHAO, K.; DENG, Y.; CHEN, J.C.; CHEN, G.Q. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1041-1045, 2003.

ZUKOR, D.J.; CAMERON, J.C.; BROOKS, P.J.; OAKESHOTT, R.D.; FARINE, I.; RUDAN, J.F.; GROSS, A.E. The fate of human meniscal allografts. In: Ewing, Whit J. (Ed). **Articular Cartilage and Knee Joint Function - Basic Science and Arthroscopy**. New York: Raven Press Ltd, 1990.

Anexo I - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA UNIVAP CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A047/CEP/2009, sobre "*Crescimento de fibrocondrócitos sobre arcabouços de PDLA/PCL-I para aplicação como prótese de menisco*", sob a responsabilidade da *Profa. Dra. Eliana A.R. Dreck*, foi *aprovado* por esta Comissão de Ética em Pesquisa por estar de acordo com os Princípios Éticos seguindo as Diretrizes Nacionais e Internacionais da pesquisa envolvendo animais.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 20 de novembro de 2009.

PROFA. DRA. CRISTINA PACHECO SOARES

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade do Vale do Paraíba-UNIVAP

PROFA. MSc. VANIA MARIA DE ARAUJO GIARETTA

Membro do Comitê de Ética

Universidade do Vale do Paraíba-UNIVAP

PROF. DR. DRAUZIO EDUARDO NARETTO RANGEL

Membro do Comitê de Ética

Universidade do Vale do Paraíba-UNIVAP