

Análise histológica da Blenda PLLA/PCL como prótese de menisco

PINTO, M.R.F.; MARIANO, E.C.; ALBERTO-RINCON, M.C.; DUEK, E.A.R.

Laboratório de Biomateriais – CCMB/PUCSP, Sorocaba, São Paulo, SP. CEP: 18030-230
e-mail: marcelop@fem.unicamp.br, elimariano@ig.com.br, arincon@yahoo.com.br, eliduek@pucsp.br

RESUMO

Os inúmeros artigos científicos aplicando polímeros biorreabsorvíveis como biomaterial, desde 1966, mostram o crescente interesse dos pesquisadores em várias partes do mundo devido a sua ampla gama de aplicações na área médica, tais como regeneração guiada de tecidos, liberação controlada de drogas, suporte para cultura de células, implantes ortopédicos, entre outros. Com o intuito de analisar histologicamente a blenda PLLA/PCL poli(ácido- láctico/poli(ε- caprolactona) na composição 70/30 com 3% de plastificante para aplicação como prótese de menisco, foi realizado um estudo *in vivo* em coelhos, os quais foram submetidos à remoção total do menisco medial do joelho, sendo que em um dos joelhos foi implantada a prótese da blenda e o outro, sem implante, serviu como controle. Após 8, 16 e 24 semanas, foram recolhidos deles, a prótese juntamente com o tecido ao seu redor, o côndilo femural da prótese e o côndilo femural controle. Os materiais foram submetidos à análise histológica por microscopia óptica. Os resultados mostraram que após 24 semanas, ocorreu a formação de um tecido do tipo fibrocartilagem, indicando que a blenda estudada apresenta grande potencial para ser utilizada para aplicação em questão, já que o material favorece a formação de um tecido muito semelhante ao do menisco.

Palavras-chave: PLLA, PCL, menisco e prótese.

Histological analysis of PLLA/PCL as a meniscal prosthesis

ABSTRACT

The numerous scientific papers applying bioreabsorbable polymers as biomaterial, since 1966, shows the growing interest of researchers in various parts of the world due to its wide range of applications in medicine, such as guided tissue regeneration, controlled release of drugs, support for cells culture, orthopaedic implants, among others. In order to analyze the histologically PLLA / PCL poly (lactic-acid / poly (caprolactone) blends composition 70/30 with 3% of plasticizer for application as a meniscal prosthesis, a study was performed in vivo in rabbits, which were subjected to total removal of the medial meniscus of the knee, and in one of the knees was implanted in the prosthesis and blend another without implant, served as control. after 8, 16 and 24 weeks, were collected them, along with a prosthesis the tissue around it, the femoral condyle of the prosthesis and the femoral condyle control. The materials were subjected to histological analysis by optical microscopy. The results showed that after 24 weeks, there was the formation of a tissue-type fibrocartilage, indicating that the blend studied presents great potential to be used for application in question, since the material promotes the tissue formation o very similar to the meniscus.

Keywords: PLLA, PCL meniscus, prosthesis.

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de desenvolvimento de novos materiais e a adaptação dos já existentes para uso médico/odontológico levaram ao surgimento de uma nova área de pesquisa: a dos biomateriais. Segundo WILLIAMS, biomateriais são todos os materiais não vivos usados em dispositivos médicos ou biomédicos e que interagem com um sistema biológico [1].

De forma geral, os dispositivos utilizados como implantes podem ser classificados em temporários e permanentes. Como exemplos de implantes permanentes podemos citar as próteses articulares, como as próteses de joelho, quadril, cotovelo, etc. Ao contrário dos permanentes, o objetivo dos dispositivos temporários é reparar o defeito até que se tenha completado o processo natural de recuperação do tecido. Como exemplo de implantes temporários podemos citar as fraturas ósseas, onde são implantados dispositivos como placas, pinos e parafusos.

Implantes biorreabsorvíveis têm sido experimentados e utilizados como órgãos e peles artificiais [2-3]; suturas cirúrgicas [4-5]; em procedimentos cirúrgicos ortopédicos, incluindo fixação de fraturas, substituição óssea, reparo de cartilagem, meniscos e fixação de ligamentos [6-7]; suporte para cultura de células [8]; liberação controlada de drogas [9]; regeneração de tecidos [10], entre outros.

Para que os biomateriais possam ser implantados no corpo humano, devem satisfazer uma série de exigências. Além de biocompatível e biofuncional, deve ser atóxico, fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas adequadas dependendo do propósito da aplicação [11]. De um modo geral, um material biocompatível não deve provocar reação inflamatória crônica ou aguda do tecido e não deve apresentar diferenças significativas entre o material implantado e o material circunvizinho [1]. A biocompatibilidade inclui também fenômenos biológicos, tais como, a resposta imunológica, carcinogenicidade e trombogenicidade [11].

A degradação de polímeros é de considerável importância em engenharia médica e tecnologia farmacêutica, pois nos implantes dos biomateriais nos tecidos do corpo, é esperado que eles permaneçam por um considerável período de tempo [12].

Entre os polímeros que vem sendo utilizados a mais de duas décadas na área médica, estão os poliésteres. Alguns exemplos destes polímeros sintéticos são o poli (ácido L-lático) (PLLA), poli (ácido D-lático) (PDLA), poli(ácido DL-lático) (PDLLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(β -hidroxibutirato) (PHB), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e a polidioxanona (PDS).

Entretanto, nem sempre um homopolímero apresenta todas as características necessárias para uma determinada aplicação, dessa forma, as pesquisas têm se direcionado para o estudo de blendas e copolímeros. Nesses casos, podem-se otimizar as propriedades fundamentais destes biomateriais, tais como: permeabilidade, taxa de biodegradação e propriedades elásticas [13].

O interesse na aplicação médica de PLLA reabsorvível vem desde 1970, quando eram usados experimentalmente como suturas e para fixação interna de fraturas ósseas e lesões esqueléticas [14].

O PLLA e o PGA estão ganhando crescente importância em formação de tecido e transplante de células em uma tentativa para determinar os efeitos de uma variedade de materiais biodegradáveis em proliferação de cartilagem e produção de matriz extracelular [15], [16].

Segundo HAISH *et al.*, os polímeros PLLA/PGA vem sendo utilizados para reconstrução de cartilagem de orelha, pois estudos *in vivo* revelaram que ocorreu a formação de neocartilagem com presença de componentes específicos da matriz extracelular e que o modelo de cartilagem formado satisfaz todas as exigências de biocompatibilidade para maturação *in vivo* em transplantes de cartilagem [17].

Uma das aplicações possíveis para as blendas de PLLA/PDS é como reparo para defeitos de meniscos, ou a própria substituição do menisco. Uma substituição meniscal para ter sucesso, deve apresentar uma função mecânica exata da cartilagem do menisco original [18]. A estrutura de um menisco regenerado competente tem que permitir sua função como um absorvente de choque, estabilizador e lubrificador. Uma prótese que regenera o tecido tem que responder pela forma completa do menisco.

Polímeros porosos podem ser úteis para substituição de menisco, contanto que sejam aperfeiçoadas substâncias químicas e propriedades físicas. Estudos realizados com lesões de menisco que se estendem na parte avascular do menisco que não tem cura por qualquer outro meio, tem sido consertadas por implantes de polímeros porosos que mostraram que o tecido fibroso transforma-se mais tarde em fibrocartilagem [19].

O principal objetivo deste projeto foi analisar histologicamente a blenda PLLA/PCL poli(ácido-lático)/poli(caprolactona) na composição 70/30 com 3% de plastificante para aplicação como prótese de menisco em joelhos de coelhos, bem como o comportamento da cartilagem femural.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação das membranas

A blenda de PLLA/PCL na composição 70/30 foi preparada pós-dissolução dos polímeros em cloreto de metileno 10% (m/v) com adição de 3% de trietil citrato de sódio. Após completa dissolução, a solução foi vertida em uma placa de vidro, colocada em uma cuba saturada com o vapor do solvente. Após 24hs formou-se a membrana, a qual foi seca sob vácuo e armazenada em um dessecador até o momento do implante.

2.2 Implante do material

As membranas selecionadas para o implante, foram cortadas no formato do menisco, com o auxílio de punção e esterilizadas com óxido de etileno.

Neste trabalho foram utilizados 30 coelhos Nova Zelândia, brancos, de ambos os sexos, com idade aproximada de três meses, 2,5 – 3,0 Kg; os quais foram separados em grupos de 3 tempos: 8, 16 e 24 semanas. Esses animais permaneceram no Biotério do CCMB-PUC-SP recebendo ração comercial e água, durante todo o período pós-operatório.

Antes da cirurgia, os animais permaneceram em jejum durante 12 horas e foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma mistura de drogas: atropina/quetamina 5%/xilazina 2% (0,2 mg/Kg). O material cirúrgico foi esterilizado em autoclave a 120°C.

Os coelhos foram submetidos à meniscectomia total do menisco medial, por incisão parapatelar medial e artrotomia, sendo que em um dos joelhos foi implantada a prótese do polímero e o outro, sem implante, serviu como controle. Foram realizadas tricotomias na região do implante e, seguida à implantação, os cortes foram suturados e foi feita aplicação de álcool iodado no local para a prevenção de infecções.

2.3 Retirada do Material

Em tempo pré-determinado de 8, 16 e 24 semanas, os animais foram sacrificados passando, em seguida por uma nova cirurgia no joelho. Foram recolhidos desses coelhos, a prótese juntamente com o tecido ao seu redor, o côndilo femural da prótese e o côndilo femural controle (ao lado onde foi realizada a remoção do menisco). Os materiais coletados foram devidamente separados de acordo com o processamento e submetidos à análise histológica por microscopia óptica.

2.4 Processamento do material

Todo este procedimento foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Centro de Ciências Médicas e Biológicas da Pontifícia Universidade Católica e Laboratório de Histologia da Universidade de Campinas.

As amostras foram fixadas e processadas pelas técnicas de Parafina e Histoiresina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1A e 1B mostram as fotomicrografias de um menisco normal de coelho. Verifica-se a presença de fibrocondrócitos alinhados e imersos em uma matriz extracelular com predominância de fibras de colágeno orientadas do tipo I. Este procedimento foi realizado para futura comparação com o neomenisco.

A análise histológica da prótese após 8 semanas de implante, mostrou a invasão de tecido conjuntivo típico em algumas regiões da prótese (Figura 2A). Foi observado a presença de células do tipo fibroblastos e macrófagos ao redor da prótese. A região clara corresponde à blenda ainda não degradada (Figura 2B). Com a luz polarizada, verifica-se mais detalhadamente a prótese ainda não degradada, representada pelas regiões brilhantes na foto (Figura 3A). A Figura 3B mostra a presença de células gigantes de corpo estranho englobando algumas partes da prótese. Não foram observadas células típicas de menisco.

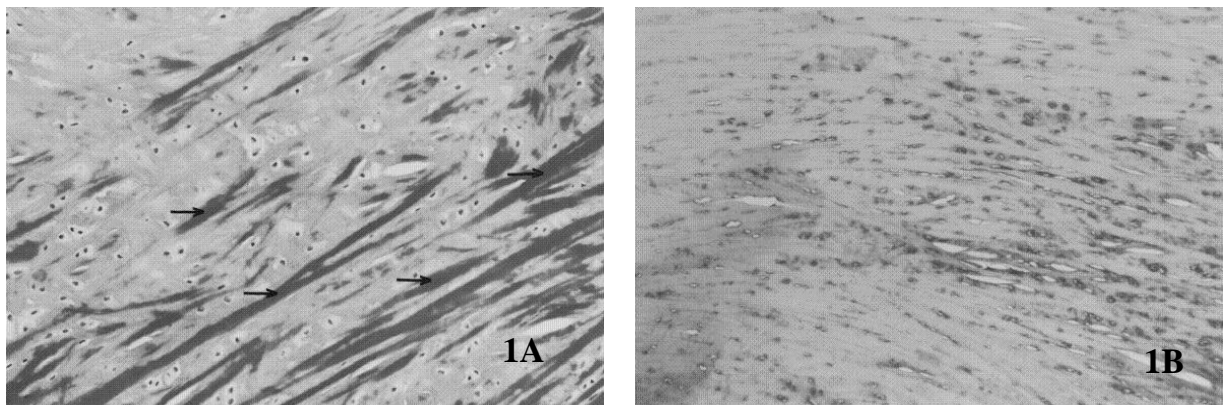


Figura 1: A) Micrografia de um corte transversal de menisco de coelho, mostrando os fibrocondrócitos dispersos em uma matriz extracelular e o padrão de orientação das fibras de colágeno (seta). HE. 200 x. B) Micrografia de um corte transversal de menisco de coelho, mostrando o padrão de orientação das fibras de colágeno. HE.100 x.

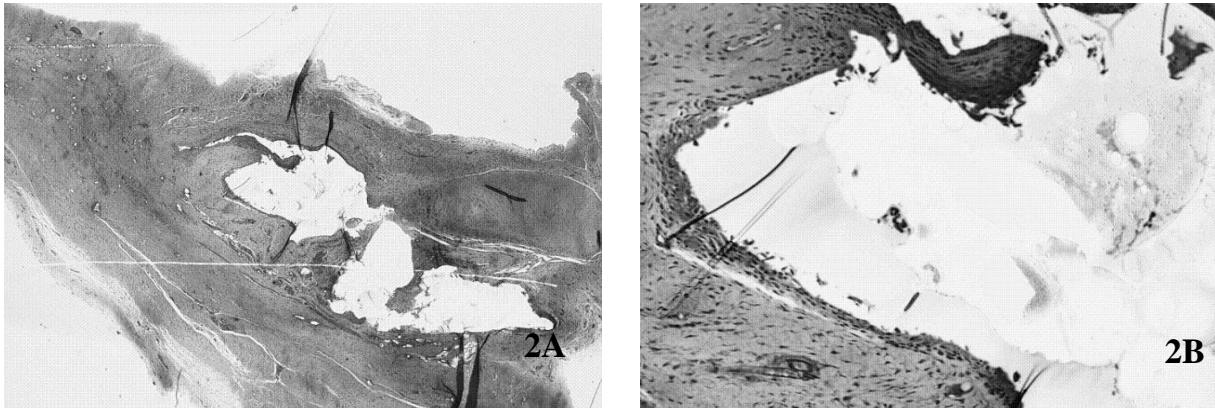


Figura 2: A) Micrografia de um corte transversal da prótese 8 semanas após o implante. Observa-se a invasão de tecido conjuntivo típico em algumas regiões da prótese. Azul de toluidina. 20x. B) Micrografia de um corte transversal da prótese 8 semanas após o implante. Observa-se ao redor da prótese um tecido conjuntivo típico com presença de fibroblastos e macrófagos. Azul de toluidina. 100x.

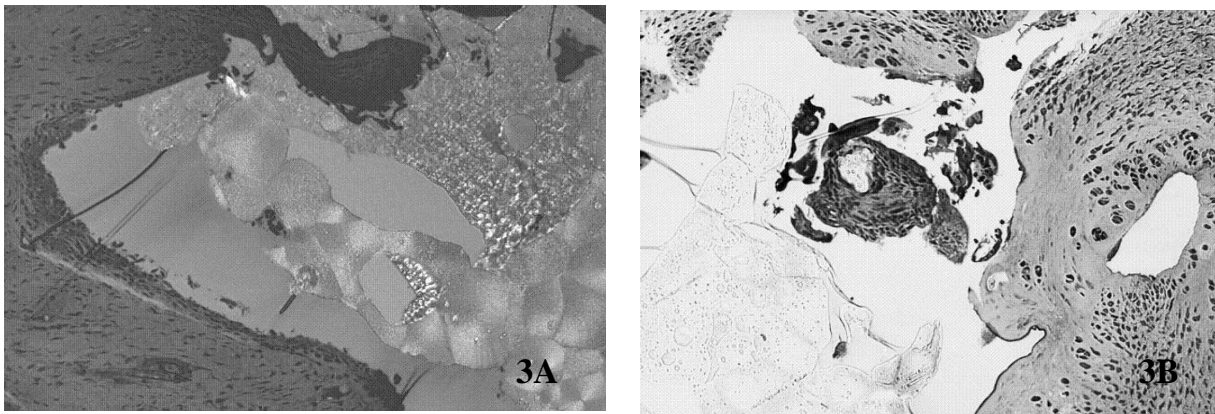


Figura 3: A) Micrografia Polarizada de um corte transversal da prótese 8 semanas após o implante, mostrando mais detalhadamente a polímero. Azul de toluidina. 100x. B) Micrografia de um corte transversal da prótese 8 semanas após o implante. Nota-se a presença de células gigantes de corpo estranho englobando a prótese. Azul de toluidina. 100x.

Após 16 semanas, verifica-se o início do processo de degradação da prótese e consequentemente uma maior invasão tecidual comparado com 8 semanas (Figura 4A). Foi ainda observada áreas na lâmina de tecido conjuntivo típico com células do tipo fibroblastos e macrófagos englobando fragmentos da blenda (Figura 4B). A Figura 5A mostra que em certas áreas não foi possível encontrar a prótese, mas um tecido do tipo fibrocartilagem com fibras colágenas desorganizadas. A Figura 5B mostra um detalhe da figura anterior, onde é possível verificar os fibrocondrócitos ainda não orientados.

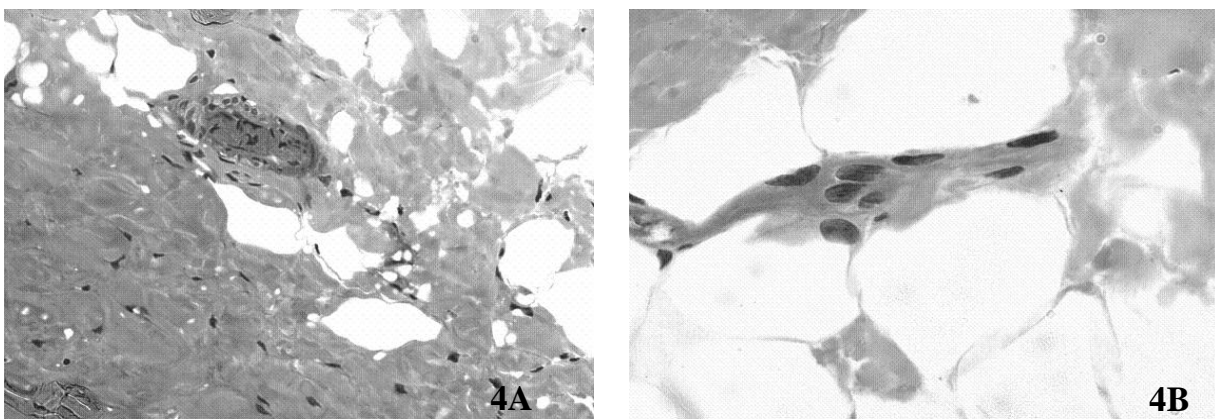


Figura 4: A) Micrografia de um corte transversal da prótese 16 semanas após o implante. Observa-se início do processo de degradação da prótese e uma maior invasão tecidual. Azul de toluidina. 200x. B) Micrografia de um corte transversal da prótese 16 semanas após o implante. Nota-se ainda a presença de tecido conjuntivo típico com macrófagos ao redor do polímero. Azul de toluidina. 400x.

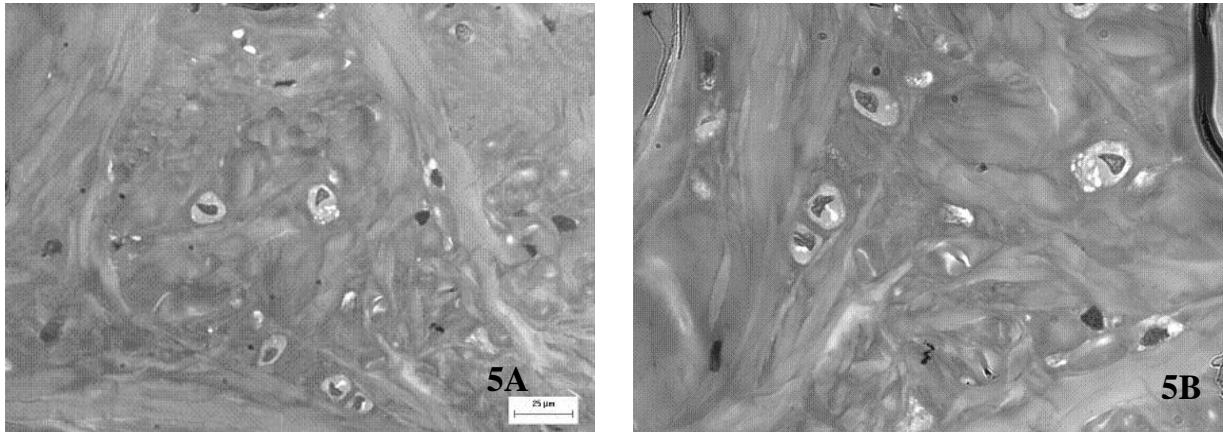


Figura 5: A) Micrografia de um corte transversal 16 semanas após o implante, mostrando a formação de uma fibrocartilagem com fibras colágenas desorganizadas. Azul de toluidina. 200x. B) Detalhe da figura anterior mostrando a presença de fibrocondrócitos e fibras colágenas. Notar que os fibrocondrócitos ainda não estão alinhados. Azul de toluidina. 400x.

Após 24 semanas, ainda verifica-se a presença da prótese e de células gigantes de corpo estranho englobando fragmentos do polímero (Figura 6A). Foi observado uma área de tecido conjuntivo típico com células do tipo fibroblasto e macrófagos ao redor da prótese e uma área mais adjacente de tecido do tipo fibrocartilagem com fibrocondrócitos (Figura 6B). Verifica-se que em certas áreas da lâmina, onde a prótese não estava presente, foi possível encontrar fibrocartilagem com um arranjo paralelo das fibras de colágeno ao longo dos fibrocondrócitos (Figura 7A). A Figura 7B mostra um detalhe da figura anterior, onde é possível observar que os fibrocondrócitos estão organizados.

A análise morfológica do côndilo onde foi implantada a prótese após 8 semanas, mostrou a presença de uma cartilagem mais íntegra, com maior celularidade e maior organização dos condrócitos quando comparado ao côndilo controle (Figura 8A). No côndilo controle de 8 semanas, a matriz da cartilagem se apresenta mais desorganizada e com menor celularidade quando comparado ao côndilo da prótese (Figura 8B).

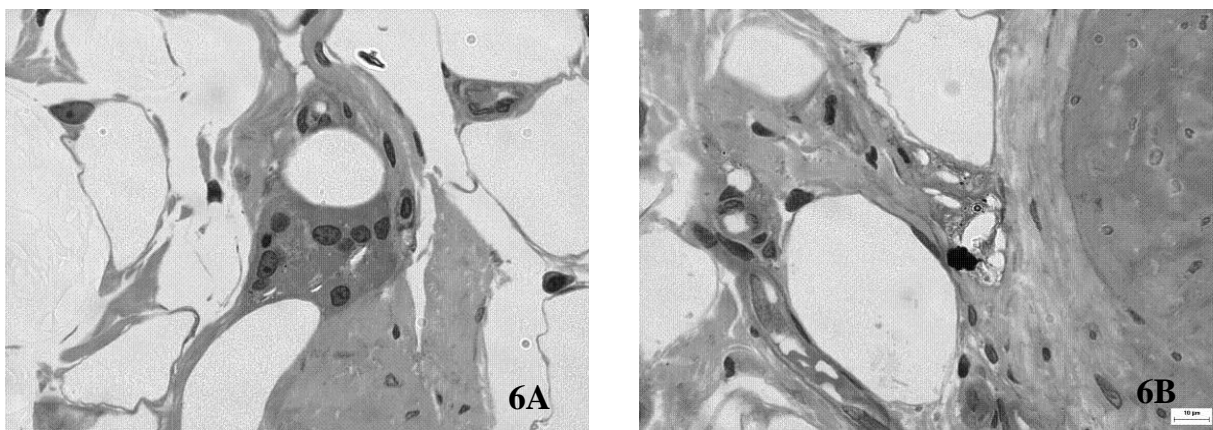


Figura 6: A) Micrografia de um corte transversal de 24 semanas, mostrando ainda a presença da prótese. Notar a presença de células gigantes englobando fragmentos do polímero. Azul de toluidina. 400x. B) Micrografia de um corte transversal da prótese de 24 semanas. Observa-se uma área de tecido conjuntivo com presença de fibroblastos e macrófagos ao redor da prótese e uma área mais adjacente de fibrocartilagem com presença de fibrocondrócitos. Azul de toluidina. 400x.

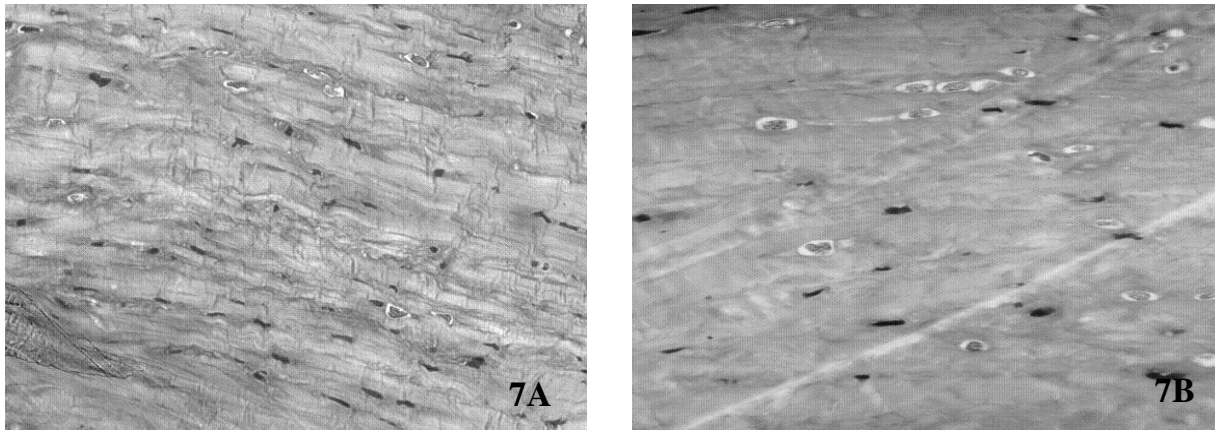


Figura 7: A) Micrografia de um corte transversal 24 de semanas, mostrando fibrocartilagem com as fibras orientadas ao longo dos fibrocondrócitos. Azul de toluidina. 200x. B) Detalhe da figura anterior mostrando os fibrocondrócitos organizados. Azul de toluidina. 400x.

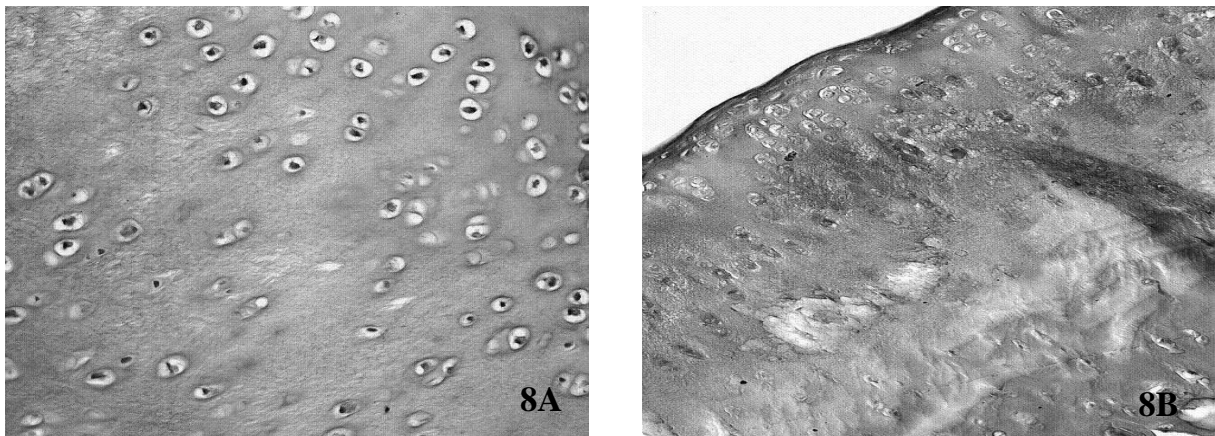


Figura 8: A) Micrografia de um corte transversal do cõndilo da prótese com 8 semanas. Observa-se uma cartilagem mais celular e íntegra. HE. 200x. B) Micrografia de um corte transversal do cõndilo controle com 8 semanas. Nota-se uma matriz mais desorganizada e menos celular. HE.200x.

Após 16 semanas de implante, verifica-se que a matriz do cõndilo da prótese se apresenta íntegra e com igual celularidade (Figura 9A). Apesar do cõndilo controle apresentar igual celularidade ao do cõndilo da prótese, os condrócitos do cõndilo controle se mostram mais desorganizados (Figura 9B).

Após 24 semanas de implante, observa-se que a cartilagem do cõndilo com a prótese apresenta os condrócitos dispostos em toda sua extensão (Figura 10A). Por outro lado, a cartilagem do cõndilo controle apresenta os condrócitos dispostos mais superficialmente. (Figura 10B).

Dados da literatura comprovam que nem sempre um polímero bioreabsorvível poroso promove a formação de fibrocartilagem. DE GROOT *et al.* desenvolveu uma prótese a base de colágeno, sintetizada a partir do tecido do tendão de Achiles bovino e implantou em cães. Entretanto, essas próteses de colágeno apresentaram um tempo de degradação relativamente curto (cerca de 6 semanas) e o agente de reticulação liberado na degradação, o glutaraldeído, é considerado tóxico [20]. Além disso, o tempo de indução da formação de fibrocartilagem é considerado muito alto, cerca de 20 semanas [21]. Apesar desses resultados mostrarem um tempo menor de formação de fibrocartilagem em relação ao estudo em questão, a aplicação desta prótese a base de colágeno fica comprometida, uma vez que a degradação libera produtos tóxicos, fato que não ocorre com a prótese utilizada neste estudo.

Com o intuito de induzir o crescimento de tecido fibrocartilaginoso e reconstruir o menisco lesado, foi desenvolvida uma prótese porosa de poliuretana implantada em cães [20]. Após 18 semanas a prótese continha apenas fibrocartilagem. A degeneração da cartilagem articular diminuiu comparada à meniscectomia, mas ainda foi observada. Dessa maneira, pode-se verificar que o tempo de formação de fibrocartilagem foi menor em comparação com este trabalho, uma vez que o autor acima utilizou uma prótese porosa, a qual é mais facilmente degradada enquanto este estudo utiliza uma prótese porosa/densa.

Utilizando um compósito bioreabsorvível à base de colágeno e polidioxianona foi observado um neomenisco após 1 ano em ovelhas [22]. Entretanto, as ovelhas não foram sacrificadas antes de 1 ano. Embora já sido observado a formação de um neomenisco, o trabalho não apresenta dados histológicos e o neomenisco formado apresentou propriedades mecânicas inferiores comparados ao menisco normal. Apesar de não demonstrar dados histológicos, o projeto em questão mostra-se mais eficiente já que promove a formação de fibrocartilagem com 24 semanas.

Segundo ZUKOR, após a meniscectomia a área de contato decresce, produzindo um aumento nas forças de contato que podem levar a uma osteoartrose precoce, artrite degenerativa e degeneração da cartilagem, isso concorda com os dados obtidos, pois no cômulo controle houve uma degeneração da cartilagem, com diminuição do número de condrócitos no tempo de 8 semanas, porém depois de um tempo a cartilagem consegue se manter sem o menisco [23].

A literatura descreve vários fatores que afetam a diferenciação. A formação *in vitro* de condrócitos, foi determinada por células mesenquimais [24-25]. Estas células podem se diferenciar em condrócitos sob certas circunstâncias. A diferenciação foi controlada por densidade celular. Com alta densidade a maioria das células se diferenciaram para condrócitos, com densidade intermediária apenas alguns condrócitos se desenvolveram e com baixa densidade nenhum desenvolvimento foi observado. Foi mostrado também que quando expostas a forças compressivas intermitentes, as culturas de condrócitos de alta densidade mostraram um aumento na produção de fibrocartilagem [26]. Em adição a isso, condrócitos podem crescer em uma matriz tridimensional de agarose [27], colágeno ou scaffold de polímero poroso [28], mas se eles crescem em uma monocamada eles se diferenciam em células com aparência de fibroblastos. Esses fatores demonstram que pode ser possível que o implante estimule a condrogênese a partir de células precursoras por alteração local da densidade celular, oferecendo uma matriz tridimensional para crescer e adicionando forças compressivas às células. Quando o defeito não é preenchido com o implante, o tecido reparado apresenta tecido fibroso inferior.

Com o intuito de avaliar os danos causados à cartilagem do cômulo femural e a interação entre tecido e prótese, [29] implantou uma blenda de PLLA/PCL (poli-ácido lático/poli-caprolactona) na proporção 80/20 em joelhos de coelhos. Após 4 semanas, a prótese se mostrou bem mais degradada quando comparada ao de 2 semanas e praticamente quase toda invadida pelo tecido. Além disso, o material implantado apresentou-se bem adaptado com o tecido, não mostrando nenhuma rejeição. Dessa maneira, podemos verificar que esta composição da prótese se mostrou mais eficiente na sua proporção que a do estudo em questão uma vez que a degradação ocorreu mais rapidamente.

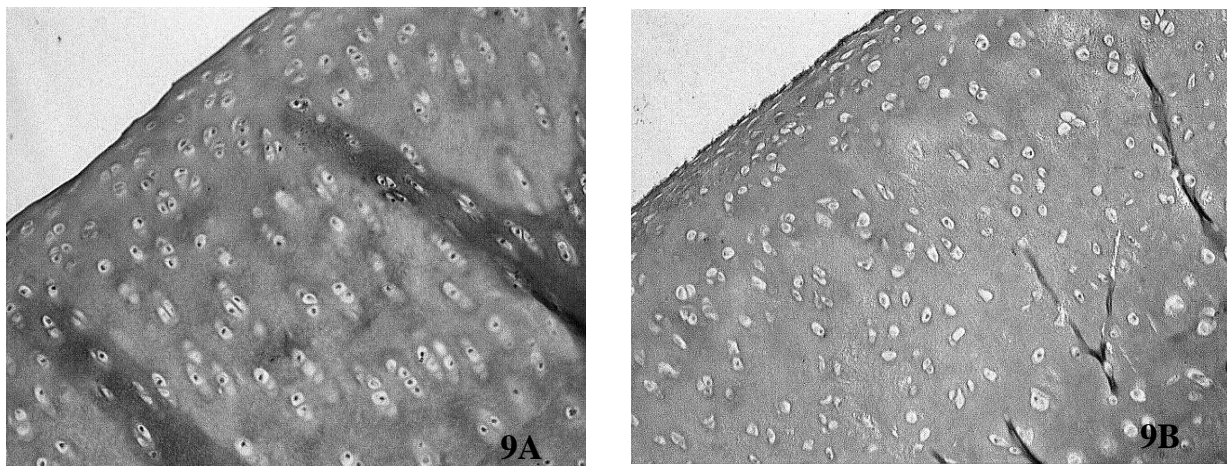


Figura 9: A) Micrografia de um corte transversal do cômulo da prótese com 16 semanas, apresentando uma cartilagem mais íntegra e organizada. HE.200x. B) Micrografia de um corte transversal do cômulo controle com 16 semanas, apresentando uma cartilagem mais desorganizada, porém com igual celularidade. HE.200x.

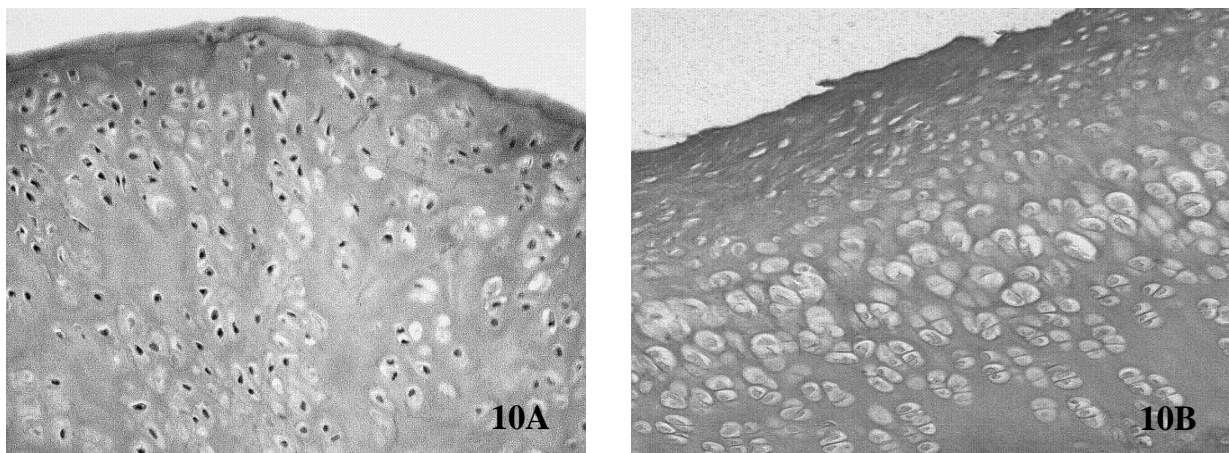


Figura 10: A) Micrografia de um corte transversal do cõndilo da prótese com 24 semanas, apresentando os condrócitos em toda a extensão do cõndilo. HE.200x. B) Micrografia de um corte transversal do cõndilo controle com 24 semanas, mostrando os condrócitos aglomerados e situados mais superficialmente. HE. 200x.

4 CONCLUSÃO

De acordo com a literatura, após a retirada do menisco ou perda natural total ou parcial ocorre uma osteoartrose pelo aumento das forças de contato ocasionando uma artrite degenerativa do próprio menisco. Inúmeros experimentos estão sendo realizados com biomateriais poliméricos no intuito de reverter esse processo *in vivo* na tentativa de regenerar ou bloquear esse processo degenerativo no tecido fibrocartilaginoso, porém nem sempre trabalhos com polímeros promovem resultados satisfatórios. Alguns estudos a base de matriz de colágeno mostraram que esse material não degrada no tempo esperado e seu resultado *in vivo* não melhora as condições de proliferação e regeneração tecidual. Contudo estudos com polímeros bioreabsorvíveis sintéticos e suas blendas poliméricas a base de poli(ácido lático) vêm sendo amplamente estudadas por suas vantagens no tempo de degradação quanto nos resultados *in vivo* que promovem. Nesse trabalho podemos concluir que a prótese de PLLA/PCL (poli-ácido lático/poli-caprolactona) *in vivo* sofre degradação gradual sem acarretar problemas ao sistema biológico/histológico ao redor da área de implante. A blenda estudada (PLLA/PCL) apresenta grande potencial para ser utilizada para aplicações como próteses de menisco visto que o material tende a favorecer uma formação sadia e natural de um tecido semelhante histologicamente ao menisco.

5 BIBLIOGRAFIA

- [1] WAN, Y., QU, X., LU, J., *et al.*, "Characterization of surface property of poly(lactide-co-glycolide) after oxigen plasma treatment", *Biomaterials*, v. 25, n. 19, pp. 4777-4783, August 2004.
- [2] NEMUT, M.V., EASOM, P., HIRST, E.M.A., *et al.*, "Cell/substratum adhesions in RSV-transfoemed rat fibroblasts", *Experimental Cell research*, v. 193, n. 2, pp. 382-397, April 1991.
- [3] KLEBER, R.J., BENTLEY, K.L., SCHOEN, R.C., "Adhesive substrates for fibronectin", *Journal Cell Physiology*, v. 109, n. 3, pp. 481-488, December 1981.
- [4] 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, pp. 115-122, January 2000.
- [5] REGINATO, A.M., IOZZO, R.V., JIMENEZ, A.S., "Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate", *Arthritis and rheumatism*, v. 37, n. 9, pp. 1338-1349, September 1994.

- [6] SANTOS JR, A.R., FERREIRA, B.M.P., DUEK, E.A.R., *et al.*, (2004), "Differentiation Pattern of Vero cells cultured on Poly(L-Lactic Acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-hHydroxyvalerate) Blends", *Artificial Organs*, v. 28, n. 4, pp. 381-389, April 2004.
- [7] FERREIRA, B.M.P., *Obtenção, caracterização, estudo in vitro e in vivo de blendas de PLLA/PHB*, Tese de D.Sc., FEM/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 2002.
- [8] PIETRO, L., SILVA, D.M.R., ALBERTO-RINCON, M. C., DUEK, E. A. R. "The influence of triethylcitrate on the properties of poly(L-lactic-co-glycolic acid) membranes", *Journal of Materials science; Materials in Medicine*, v. 17, pp. 849-857, 2006.
- [9] FAVIA, P., SARDELLA, E., GRISTINA, R., *et al.*, "Plasma microstructuring of polymers for contact guidance of cells", *In: International Conference on Advances of Biomaterials for Reconstructive Medicine*, pp. 74-75, Capri, June 2002.
- [10] CHU, P.K., CHEN, J.Y., WANG, L.P., *et al.*, "Plasma-surface modification of biomaterials", *Materials Science and Engineering Review*, v. 36, n. 5-6, pp. 143-206, March 2002.
- [11] SILVA, D.M.R., SCAPIN, S.M.N., JOAZEIRO, P.P., ALBERTO-RINCON, M. C., LUCIANO, R. M., DUEK, E. A. R. "In vivo interaction of cells on poly L- (lactic acid)membranes containing plasticizer" *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, v. 13, n. 3, pp. 327-332, 2004.
- [12] KAMINSKA, A., KACZMAREK, H., KOWALONEK, J., "The influence of side groups and polarity of polymers on the kind and effectiveness of their surface modification by air plasma action", *European Polymer Journal*, v. 38, n. 9, pp. 1915-919, September 2002.
- [13] PINTO, M.R., "PLDLA/PCL blends; in vivo and in vitro study", *Masters thesis*, FEM/UNICAMP, Campinas, 2007.
- [14] LUCIANO, R.M., DUEK, E.A.R., ALBERTO-RINCÓN, M.C., "The effect of triethylcitrate on the porosity and biocompatibility of poly(lactic acid) membranes", *Brazilian Journal of Morphology Science*, v. 18, pp. 7-13, 2001.
- [15] BARBANTI, S, H., ZAVAGLIA, C, A, C., DUEK, E, A, R., "Effect of salt leaching on PLGA(50/50) resorbable scaffolds". *Materials Research*, v. 11, n. 01, pp. 75-80, 2008.
- [16] JR, A.R.S., BARBANTI, S.H., DUEK, E.A.R., *et al.*, "Vero cell growth and differentiation on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters", *Artificial Organs*, v. 25, n. 01, pp. 07-13, January 2001.
- [17] MA, Z., GAO, C., GONG, Y., *et al.*, "Chondrocyte behaviors on poly-L-lactic acid (PLLA) membranes containing hydroxyl, amide or carboxyl groups", *Biomaterials*, v. 24, n. 21, pp. 3725-3730, September 2003.
- [18] WAN, Y., YANG, J., YANG, J., *et al.*, "Cell adhesion on gaseous plasma modified poly- (L-lactide) surface under shear stress field", *Biomaterials*, v. 24, n. 21, pp. 3757-3764, September 2003.
- [19] TEZCANER, A., BUGRA, K., HASIRCI, V., "Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly (hydroxybutyrate – co – hydroxyvalerate) thin films", *Biomaterials*, v. 24, n. 25, pp. 4573-4583, November 2003.
- [20] GENARI, S.C., DOLDER, M.A.H., WADA, M.L.F., "Scannig and transmission electron microscopy of transformed VERO cells, with altered *in vitro* growth characteristics", *Journal Submicroscopy Cytology Pathology*, v. 28, n. 4, pp. 565-572, October 1996.
- [21] PINHO, F.O., JOAZEIRO, P.P., SANTOS JR., A.R., "Avaliação do Crescimento e Diferenciação de Células Osteoblásticas Humanas sobre Matriz Óssea Desmineralizada (MOD)", *In: Congresso Latino Americano de Biomateriais*, pp. 164, Campinas, Julho 2004.
- [22] REZENDE, C.A., DUEK, E.A.R., "Blendas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)/ poli (ácido láctico): degradação in vitro", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 1, pp. 36-44, January 2003.

- [23] KWEON, H.Y., YOO, M.K., PARK, I.K., *et al.*, “A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering”, *Biomaterials*, v. 24, n. 5, pp. 801-808, February 2003.
- [24] YAMAGUCHI, M., SHINBO, T., KANAMORI, T., *et al.*, “Surface modification of poly(L-lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology, and cell growth”, *Artificial Organs*, v. 7, n. 4, pp. 187-193, December 2004.
- [25] WAN, Y., WANG, Y., LIU, Z., *et al.*, “Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly (L-lactide)”, *Biomaterials*, v. 26, n. 21, pp. 4453-4456, July 2005.
- [26] BERRY, C., CAMPPBELL, G., SPADICINO, A., *et al.*, “The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility”, *Biomaterials*, v. 25, n. 26, pp. 5781-5788, November 2004.
- [27] SANTOS JR, A.R., DOLDER, H., WADA, M.L.F., “Dexamethasone and fetal calf serum effects in differentiation of Vero cells cultures on type I collagen gel”, *Journal Submicroscopy Cytology Pathology*, v. 35, n. 1, pp. 35-42, January 2003.