

1 INTRODUÇÃO

1.1 Articulação sinovial

A articulação sinovial é composta pela interação entre duas superfícies cartilaginosas congruentes. A cavidade articular é contida pela membrana de tecido sinovial. Na camada íntima da membrana sinovial são encontradas células especializadas denominadas sinoviócitos, responsáveis pela produção do líquido sinovial (MCCULLOCH *et al.*, 2017) (**Figura 1**). O líquido sinovial atua como meio de lubrificação, diminuindo o coeficiente de atrito e permitindo a nutrição do tecido cartilagenoso por difusão. O adequado funcionamento das articulações sinoviais depende da interação e integridade de todos seus componentes (SOPHIA *et al.*, 2009).

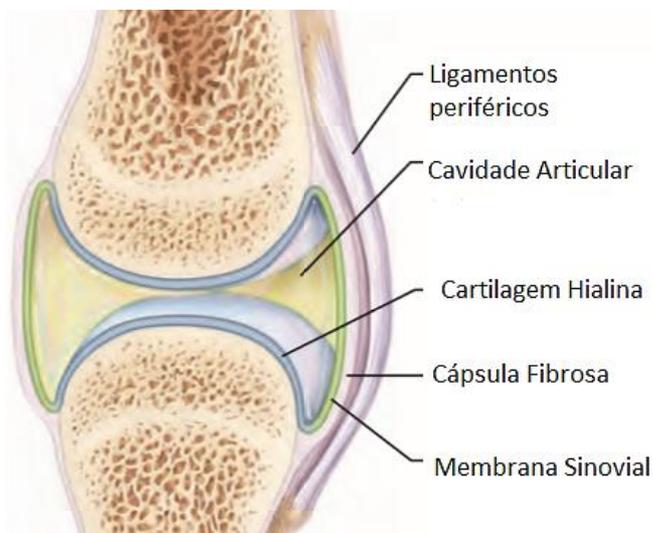


Figura 1. Anatomia da articulação sinovial. (Modificado de McCULLOCH *et al.*, 2017).

1.1.1 Cartilagem articular hialina

A cartilagem hialina está presente nas articulações sinoviais do esqueleto

humano. Tal tecido altamente especializado é caracterizado por alto percentual de água, permitindo o fluxo constante de solutos no meio extracelular auxiliando à absorção das forças compressivas que atuam nas articulações sinoviais de carga (quadril, joelho e tornozelo) (SOPHIA *et al.*, 2009). Seu baixo coeficiente de atrito favorece a distribuição das forças atuantes na cartilagem articular hialina sem que ocorra desgaste abrasivo entre suas superfícies durante o movimento (JACKSON *et al.*, 2001). O percentual de água presente na cartilagem hialina varia entre 65 e 85 % do seu volume total. Sua distribuição não ocorre de modo uniforme, estando em maior concentração na camada superficial da cartilagem (SOPHIA *et al.*, 2009).

Os condrócitos representam cerca de 2 e 5% do peso seco da cartilagem articular hialina. São originados a partir das células mesenquimais indiferenciadas (CMI), sendo responsáveis pela síntese e manutenção dos componentes da matriz extracelular (MEC) e atuando como agentes reguladores da homeostase (equilíbrio) articular (MCCULLOCH *et al.*, 2017). A atividade celular dos condrócitos é controlada por estímulos bioquímicos secretados por fibroblastos presentes na camada íntima da membrana sinovial (MCCULLOCH *et al.*, 2017). Os condrócitos são células com baixa atividade celular, justificando em parte o baixo potencial de regeneração do tecido após a ocorrência de lesões (JACKSON *et al.*, 2001).

Os componentes não celulares da cartilagem hialina podem ser divididos em proteínas colágenas e não colágenas. Dentre as proteínas colágenas, a principal é representada pelo colágeno tipo II (COL II), formada por três cadeias alfa em tripla hélice. Além do COL II, estão presentes também os colágenos tipo V, VI, IX, X, XI, XII, XIV em menores proporções (SOPHIA *et al.*, 2009). Os proteoglicanos são componentes da MEC em conjunto com as proteínas colágenas, constituindo até 12% do peso seco, sendo divididos em grupo carboxila e grupo sulfatado (sulfato de

queratan / sulfato de condroitina) (JACKSON *et al.*, 2001). Tais macromoléculas tem sua concentração aumentada na camada profunda do tecido cartilaginoso e próximo ao osso subcondral. As cargas eletronegativas dos componentes sulfatados são responsáveis pelo fluxo e manutenção de água dentro da MEC, fornecendo resistência às forças de compressão exercidas sobre o osso subcondral (TYNYI e KARLSSO, 2000). A molécula de ácido hialurônico possui papel fundamental na manutenção estrutural da MEC. Proteínas de ligação conectam as moléculas de hialuronato às cadeias de sulfato de queratan e sulfato de condroitina dispostas em formato de 'escova', formando macromoléculas chamadas de agregana. A associação entre os monômeros de agracan e as moléculas de ácido hialurônico formam em conjunto com as fibras colágenas o arcabouço estrutural da MEC responsável pela integridade do tecido cartilaginoso (JACKSON *et al.*, 2001) (**Figura 2**).

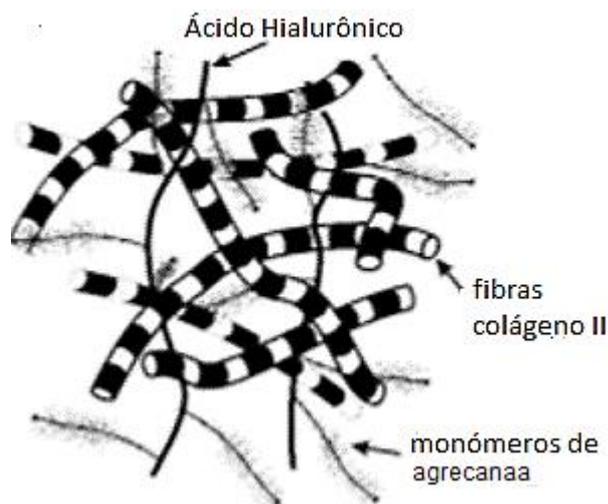


Figura 2. Componentes da matriz extracelular da cartilagem articular. Os monómeros de sulfato de condroitina e sulfato de queratan formam a macromolécula de agregana. A associação da agregana com as fibras de colágeno tipo II e a molécula de ácido hialurônico são responsáveis pela integridade da matriz extracelular. (Modificado de Jackson *et al.*, 2001).

As forças mecânicas, quando aplicadas de modo contínuo na cartilagem sinovial, geram alterações estruturais na MEC, levando à diminuição da concentração de proteoglicanos e à indução de morte celular programada dos condrócitos presentes

na camada superficial (LEWIS *et al.*, 2003). As alterações estruturais na cartilagem sinovial ocorrem de acordo com a magnitude das forças aplicadas, assim como a frequência dos picos de pressão sobre a articulação, ocorrendo principalmente na camada superficial do tecido cartilaginoso (MILENTIJEVIC e TORZILLI 2005).

1.1.2 Camadas da cartilagem articular

Microscopicamente, a cartilagem articular é dividida em quatro camadas com características distintas (PRITZKER *et al.*, 2006) (**Figura 3**). A camada superficial é caracterizada pela presença de fibras de COL II dispostas de modo paralelo em contato com proteínas de colágeno tipo IX, conferindo resistência típica às forças de cisalhamento. (JACKSON *et al.*, 2001; SOPHIA *et al.*, 2009). A camada superficial da cartilagem articular é coberta por tecido hialino acelular, denominado 'lâmina *splendens*' (MACCONAILL *et al.*, 1951).

A camada intermediária é composta por condrócitos de formato esférico, isolados por fibras colágenas dispostas de modo oblíquo, conferindo a essa região maior resistência às forças compressivas e auxiliando também na distribuição de carga para a camada profunda. Abaixo da camada intermediária encontra-se a camada profunda, onde as fibras de colágeno se encontram com uma orientação perpendicular em relação à camada de cartilagem calcificada, conferindo resistência às forças de compressão. Por fim, a camada de cartilagem calcificada possui a zona descrita como linha de transição. Tal estrutura separa a cartilagem articular do osso subcondral, conferindo forças de adesão, para evitar o destacamento do tecido cartilaginoso do osso subjacente (JACKSON *et al.*, 2001; SOPHIA *et al.*, 2009).

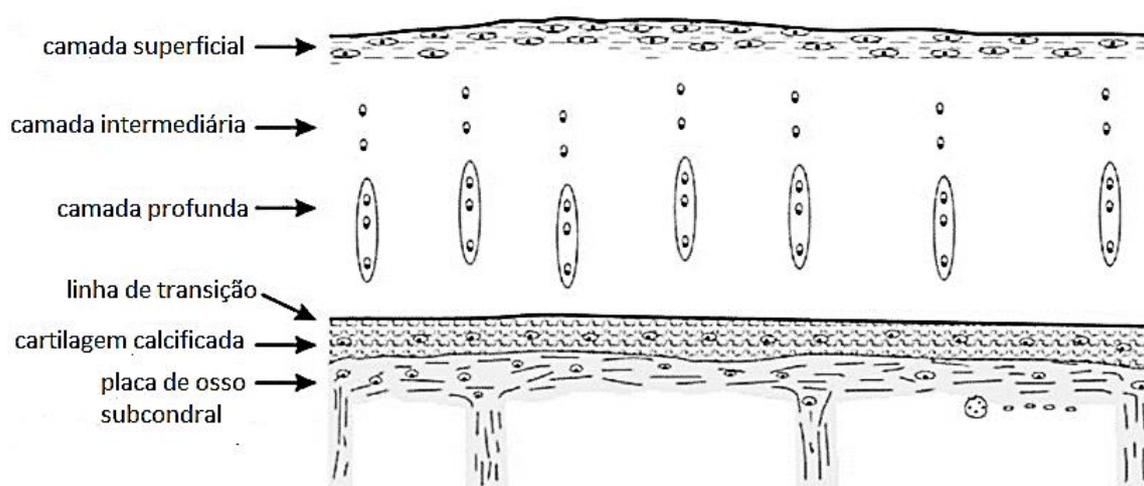


Figura 3. Camadas da cartilagem articular. (Modificado de Pritzker *et al.*, 2006).

1.2 Articulação do joelho

A articulação do joelho possui seis planos de movimento, sendo estes divididos em dois grandes grupos. Um grupo composto por movimentos rotacionais: flexão-extensão, rotação interna-externa e rotação em varo-valgo. Enquanto o outro grupo é formado pelos movimentos de translação: anterior-posterior, medial-lateral e compressão-distração (HIRSCHMANN *et al.*, 2015). A ampla mobilidade articular associada a constante solicitação durante a prática esportiva, torna a articulação do joelho foco de inúmeras lesões. As lesões osteocondrais (LO) na cartilagem do joelho estão associadas a dor, derrame articular, bloqueio mecânico da articulação e degeneração precoce da superfície articular (SAFRAN e SEIBER, 2010).

Visando melhorar a acurácia diagnóstica e padronizar opções de tratamento para as LO, foi elaborada uma classificação para estas lesões identificadas durante o procedimento de artroscopia (exame endoscópico do interior de uma articulação) do joelho, sendo classificadas do tipo I ao tipo IV de Outerbridge (RODRÍGUEZ e GÓMEZ 2010) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Classificação artroscópica de Outerbridge das lesões osteocondrais na articulação do joelho. (Modificado de Merchán e Cardero 2010).

Grau	Patologia
I	Amolecimento e edema da cartilagem articular
II	Fragmentação e fissura afetando uma área < 0.5 polegadas
III	Fragmentação e fissura afetando uma área > 0.5 polegadas
IV	Erosão da cartilagem até o osso subcondral

A Sociedade Internacional de Reparo da Cartilagem (*International Cartilage Repair Society - ICRS*) elaborou sua classificação modificando a descrição previamente elaborada por Outerbridge (BRITTBERG e WINALSKI, 2003). Os autores buscaram subdividir os critérios descritos anteriormente e avaliar a integridade óssea adjacente à superfície articular (**Tabela 2**).

Tabela 2. Classificação da ICRS para diagnóstico das lesões osteocondrais. (Modificado de BRITTBERG e WINALSKI, 2003).

Descrição	Subgrupo
Grau 0 Cartilagem normal	Cartilagem intacta
Grau 1 Amolecimento da cartilagem, fissuras, lesões superficiais, lacerações.	1A Lesão superficial ou amolecimento
	1B Fissuras superficiais e lacerações
Grau 2	Lesões, fissuras com extensão menor que 50% de profundidade
Grau 3 Perda da cartilagem com extensão maior que 50% de profundidade, incluindo a camada de cartilagem calcificada	3A >50% sem acometer a camada de cartilagem calcificada
	3B lesão abaixo da camada de cartilagem calcificada
	3C sem acometer a placa de osso subcondral
	3D >50% com cistos subcondrais
Grau 4 Lesão de espessura total com exposição do osso subcondral	4A defeito ósseo até a placa subcondral
	4B defeito ósseo abaixo da placa subcondral

1.3 Incidência de lesões osteocondrais na articulação do joelho

Diversos estudos foram realizados para identificar a incidência das LO na articulação do joelho (MAFFULLI *et al.*, 1993; CURL *et al.*, 1997; AROEN *et al.*, 2004). Em uma população de 993 pacientes com idade média de 35 anos foram identificadas LO de espessura total (Grau IV de Outerbridge) em 11% dos mesmos durante a cirurgia de artroscopia do joelho (AROEN *et al.*, 2004). Realizando a revisão do relato operatório de 31.516 artroscopias de joelho, foram identificadas LO em 63% dos pacientes operados. Os autores não relataram a dimensão das lesões dos pacientes que tinham sintomas decorrentes do dano articular (CURL *et al.*, 1997). Ao serem avaliados 106 pacientes do sexo masculino com hemartrose (presença de sangue na articulação) associada a trauma esportivo no joelho foi identificada a presença de LO em 18 % dos casos durante o ato cirúrgico (MAFFULLI *et al.*, 1993).

Um grupo de atletas com LO no joelho submetidos a reconstrução do ligamento cruzado anterior foi acompanhado durante 12 anos visando avaliar a história natural dessas lesões. O tamanho médio das LO foi de 1.7 cm². Todas as lesões apresentavam comprometimento maior que 50 % da espessura articular (grau III de Outerbridge). Ao final do seguimento não foi identificada diferença na capacidade de realizar atividades esportivas entre os pacientes com ou sem lesão articular, demonstrando a natureza benigna das LO menores que 2,0cm² (JARI *et al.*, 2003).

1.4 Tratamento das lesões da cartilagem articular

O tratamento das LO é dividido em métodos que culminam na formação de tecido fibrocartilagenoso com predomínio de colágeno tipo I e III, ou que sejam capazes de restaurar a superfície articular com cartilagem hialina formada predominantemente

por COL II (RICHTER *et al.*, 2016). As técnicas de microfratura e nanofratura são procedimentos de reparo da cartilagem através da formação de fibrocartilagem na área lesionada. Os métodos capazes de restaurar a presença de cartilagem hialina típica são o transplante autólogo osteocondral (TAO), o transplante osteocondral alógeno (TOA) e o transplante autólogo de condrócitos (TAC) (BRITTBERG e WINALSKI 2003; MITHOEFER *et al.*, 2005; RICHTER *et al.*, 2016). O tecido fibrocartilaginoso possui menor resistência às forças de compressão e cisalhamento, diminuindo a capacidade de absorção de carga levando a degeneração articular precoce (BRITTBERG, 2010; RICHTER *et al.*, 2016). O método a ser utilizado depende da prática do cirurgião, do tamanho da lesão e da integridade do osso subcondral (RICHTER *et al.*, 2016) (**Tabela 3**). Em pacientes abaixo de 50 anos e ativos, o procedimento de artroplastia total do joelho (ATJ) possui resultados insatisfatórios associado a falha precoce e maior percentual de insatisfação do paciente (HARRYSSON *et al.*, 2004, KEENEY *et al.*, 2011).

Tabela 3. Técnicas de reparo ou restauração da cartilagem articular de acordo com as dimensões da lesão osteocondral. (Modificado de RICHTER *et al.*, 2016).

Tamanho da lesão em cm ²	Procedimento indicado
< 2,0	Microfratura / TAO ^a
2 – 4	TAO / TAC
> 4,0	TAC / TOA ^b

TAO (transplante autólogo osteocondral), TAC (transplante autólogo de condrócitos), TOA (transplante osteocondral alógeno). ^a Pacientes de alta demanda. ^b Perda ou deformidade óssea.

1.4.1 Procedimentos de reparo por estimulação da medular

A técnica de microfratura é realizada através de microperfurações no osso subcondral. Tal procedimento cria um meio de comunicação entre o tecido medular

ósseo e a zona de lesão cartilaginosa. Com isso, espera-se que haja a chegada de células mesenquimais indiferenciadas (CMI), as quais passariam por diferenciação tornando-se condrócitos (STEDMANN *et al.*, 1997) (**Figura 4**). O procedimento está relacionado a melhora da dor e função da articulação do joelho quando realizado em lesões menores que 2,0cm² (STEDMANN *et al.*, 2008). A maturação do tecido formado pode demorar até 1 ano após o procedimento, tornando a técnica inviável para pacientes que pretendem retornar a prática esportiva competitiva (SETH *et al.*, 2014). As vantagens relacionadas ao procedimento são seu baixo custo, pouca morbidade cirúrgica e a facilidade técnica para sua realização (RICHTER *et al.*, 2016).

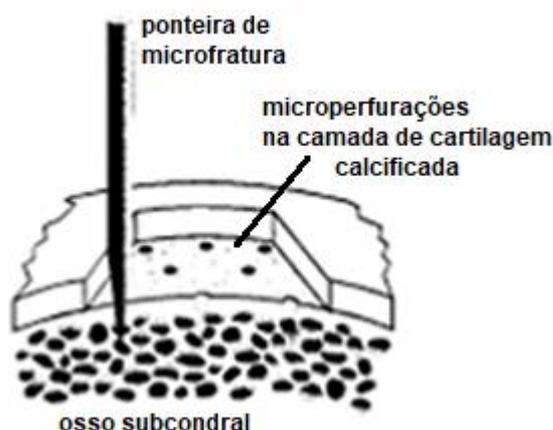


Figura 4. Técnica de microfratura. Após a regularização dos bordos da lesão uma ponteira de microfratura é utilizada para realizar microperfurações permitindo a chegada de células mesenquimais indiferenciadas na zona de lesão. (Modificado de JACKSON *et al.*, 2001).

A tomografia computadorizada foi utilizada para avaliar o resultado após o reparo de LO no joelho com a técnica de microfratura em modelos animais. Após 6 meses foram identificados cistos subcondrais em 63% dos espécimes e osteófito (formação óssea ectópica) intralesional em 26% dos casos. Os achados descritos são vistos como alterações degenerativas caracterizando a falha do procedimento (ORTH *et al.*, 2012). A técnica de microfratura foi recentemente criticada pela limitada penetração ao osso subcondral e por compactar as trabéculas ósseas, obstruindo a microvascularização e limitando a chegada de CMI na lesão. Tais achados são

relacionados a formação de tecido fibrocartilaginoso com limitado potencial terapêutico (ZEDDE *et al.*, 2016).

Com objetivo de melhorar os resultados da técnica de microfratura, foi desenvolvido o princípio da nanofratura. Neste procedimento um dispositivo metálico com 1mm de diâmetro realiza nanoperfurações no osso subcondral com 9 mm de profundidade. A análise radiológica por microtomografia computadorizada comprovou a melhor penetração no osso medular sem a obstrução da microcirculação local com a técnica de NF em modelo animal (ZEDDE *et al.*, 2016).

1.4.2 Transplante autólogo osteocondral

O TAO foi descrito como procedimento capaz de restaurar LO com cartilagem hialina nas articulações sinoviais de carga. Na presença de lesão de até 1,0 cm², um único fragmento é transplantado. Para o tratamento de lesões maiores, múltiplos fragmentos podem ser transplantados. Após a visualização da lesão e a delimitação de sua dimensão, um ou mais fragmentos cilíndricos são retirados da superfície lesionada. No segundo ato cirúrgico, o tecido a ser transplantado é retirado da porção superior lateral ou medial da tróclea femoral e colocado sobre pressão no local da lesão. A região próxima ao intercôndilo femoral também pode ser utilizada como fonte de tecido osteocondral para o procedimento (HANGODY e FULES, 2003) (**Figura 5**).

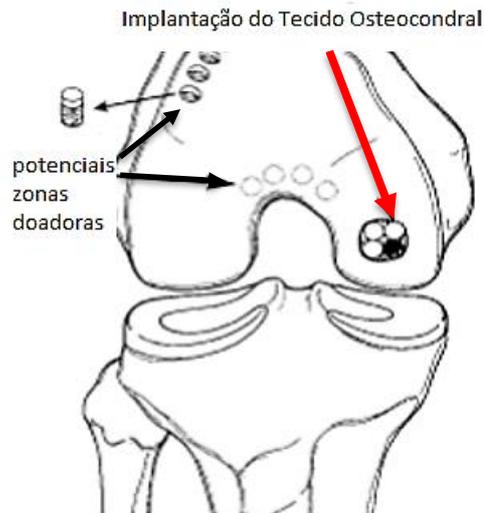


Figura 5. Técnica de transplante autólogo osteocondral. Potenciais zonas doadoras (setas pretas) Transplante do tecido osteocondral após regularização da zona receptora (seta vermelha). (Modificado de JACKSON *et al.*, 2001).

O TAO possui a vantagem de restaurar a superfície articular com cartilagem e matriz composta por COL II. Como desvantagens são citadas a morbidade associada a região doadora, a incapacidade de preencher lesões com perda óssea associada e a hemartrose na articulação (HANGODY e FULES, 2003). Os melhores resultados do TAO são descritos no tratamento de lesões osteocondrais contidas por tecido cartilaginoso íntegro na área de carga do côndilo medial do joelho (GRACITELLI *et al.*, 2016).

O acompanhamento de 112 pacientes pelo período médio de 26 meses após a realização de TAO para LO não traumáticas no joelho (BALTZER *et al.*, 2016). A média de idade da população estudada foi de 48 anos. Ao final do seguimento, houve melhora significativa funcional medida pelo escore de WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis*) (BELLAMY *et al.*, 1988), assim como a diminuição da dor medida pela escala visual analógica nos pacientes operados. O tamanho da lesão, assim como o número de fragmentos transplantados não tiveram relação com o resultado. As lesões na superfície articular da patela foram relacionadas aos piores resultados.

1.4.3 Transplante autólogo de condrócitos

A técnica de TAC foi desenvolvida visando restaurar LO de diferentes dimensões com cartilagem hialina. A técnica cirúrgica consiste na retirada de um fragmento osteocondral do côndilo femoral, fora de sua área de carga, como fonte autóloga de condrócitos. Após essa etapa, os condrócitos são isolados e cultivados *in vitro* por 21 dias. No segundo ato cirúrgico, uma membrana de periósteo retirada da porção proximal da tíbia é colocada recobrando a lesão cartilaginosa, sendo fixada com sutura simples (posteriormente modificada pela vedação com selante ou cola de fibrina). Após estabilizada a membrana de periósteo, os condrócitos cultivados são injetados no local (BRITTBERG *et al.*, 1994) (**Figura 6**). A membrana de periósteo teria a ação de cobrir a área transplantada e estimular a proliferação celular dos condrócitos (PETERSON *et al.*, 2002). Após a descrição original, o procedimento foi reproduzido com bons resultados por outros pesquisadores (MINAS, 2001; MICHELI *et al.*, 2001; FARR, 2007).

O primeiro resultado do TAC descrito na literatura avaliou histologicamente o tecido 2 anos após o procedimento em uma população de 33 pacientes, cuja média de idade era de 27 anos (BRITTBERG *et al.*, 1994). As lesões tratadas não ultrapassavam a extensão do osso subcondral e tinham a dimensão entre 1,6 e 6,5 cm². Os autores observaram os melhores resultados em casos de LO traumáticas no côndilo femoral. A biópsia tecidual identificou a formação de fibrocartilagem ou cartilagem hialina *'like'*.

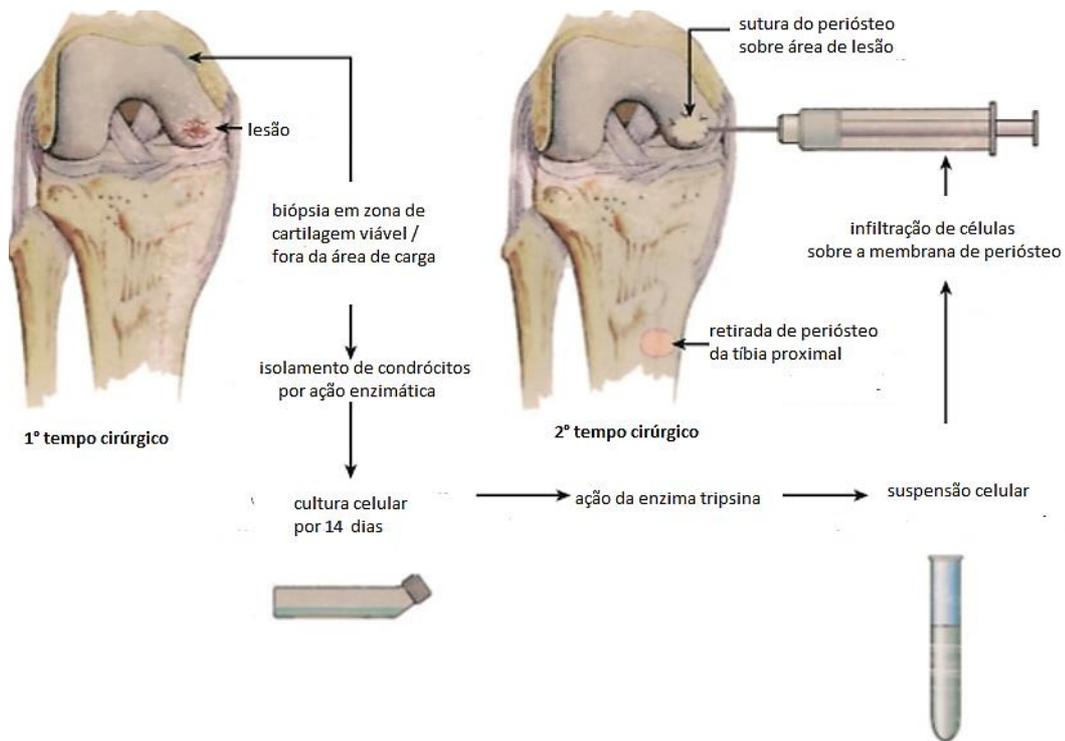


Figura 6. Técnica de TAC de primeira geração. Após a retirada de um fragmento osteocondral fora da área de carga do joelho, os condrócitos são isolados e cultivados *in vitro* sendo inseridos na região da lesão e contidos por perióstio. (Modificado de BRITTBURG *et al.*, 1994).

Um estudo prospectivo randomizado comprovou melhores resultados funcionais relacionados a técnica de TAC de primeira geração, quando comparada ao TAO (BENTLEY *et al.*, 2003). Os autores identificaram melhora das queixas álgicas em 88% dos pacientes submetidos ao TAC. O grupo submetido a técnica de TAO obteve bons resultados em 69% dos casos. Segundo os autores, os melhores resultados foram no tratamento das LO localizadas no côndilo femoral medial. Outro estudo randomizado, com 15 anos de seguimento, selecionou 80 pacientes portadores de LO crônicas no joelho para comparação dos resultados entre as técnicas de microfratura e TAC de primeira geração. Segundo a classificação radiográfica de Kellgren e Lawrence (KELLGREN e LAWRENCE, 1957) 50% dos pacientes tinham osteoartrite ao final do seguimento. Não houve diferença entre os grupos em relação à função do joelho operado e à escala visual analógica de dor (KNUTSEN *et al.*, 2007).

Após o trabalho inicial inovador de Brittberg *et al.* 1994, modificações na técnica visaram o aprimoramento do TAC. A segunda geração do procedimento foi caracterizada pela utilização de membrana sintética composta por colágeno tipo I e colágeno tipo III, substituindo a função do tecido periostal. O procedimento é chamado de transplante de condrócitos autólogos induzidos por matriz. Os condrócitos cultivados *in vitro* são colocados sobre uma membrana de colágeno. As células são então estabilizadas na membrana e todo o tecido é transplantado no local da lesão durante o segundo procedimento cirúrgico (BRITTBURG, 2010) (**Figura 7**).

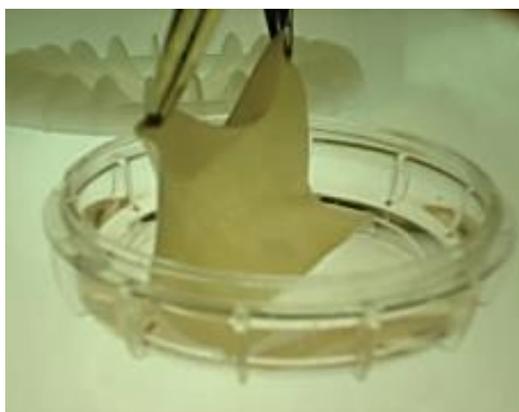


Figura 7. Membrana de colágeno para TAC de segunda geração. Após a fixação das células cultivadas *in vitro* na membrana de colágeno, a mesma é colocada na área de LO no segundo ato cirúrgico. (BRITTBURG, 2010).

Os resultados entre as técnicas de primeira e segunda geração de TAC foram avaliados de modo prospectivo, randomizado e controlado (BARTLETT *et al.*, 2005). Foram selecionados pacientes com a idade média de 33 anos, com lesões de 6,0 cm² em média. Uma biópsia do tecido transplantado identificou presença de cartilagem hialina 'like' ou fibrocartilagem em 43,9% dos pacientes tratados com a técnica de primeira geração e em 36,4% dos tratados com a técnica de segunda geração. Após dois anos de seguimento, os autores não encontraram diferença funcional entre os grupos. São descritas quatro complicações associadas ao TAC, independente da técnica utilizada: hipertrofia do tecido transplantado, delaminação, regeneração

insuficiente e alterações de incorporação junto à área receptora do transplante. Tais alterações comprometem de modo irreversível o resultado do procedimento (NIEMEYER *et al.*, 2008).

1.4.4 Transplante osteocondral alógeno

O TOA representa a única opção de tratamento capaz de repor o estoque ósseo e restaurar a superfície articular com cartilagem hialina. O procedimento é utilizado também nos casos de falha após a tentativa de outros procedimentos para tratamento das LO (ZOUZIAS e BUGBEE 2016; DHOLLANDER *et al.*, 2016). A principal indicação para o TOA é a presença de lesão osteocondral focal com diâmetro superior a 2,0 cm², associada a sintomas álgicos em articulações sinoviais de carga. Os melhores resultados do procedimento estão relacionados a lesões focais no côndilo femoral medial (LAPRADE *et al.*, 2009; GRACITELLI *et al.*, 2015 C; ZOUZIAS e BUGBEE 2016; DHOLLANDER *et al.*, 2016). A técnica cirúrgica consiste na retirada de um cilindro de tecido osteocondral de um doador de tecido musculoesquelético e posterior transferência do mesmo para área de lesão do paciente (WINSLOW e COLE 2005 B) (Figura 8).

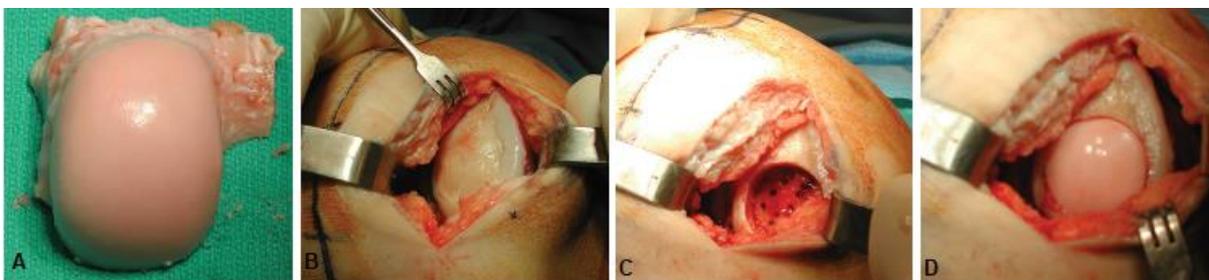


Figura 8 Técnica de transplante de aloenxerto osteocondral. Fragmento de côndilo femoral de doador de tecido musculoesquelético (A). Visualização intraoperatória de lesão osteocondral na articulação do joelho (B). Regularização da lesão para realização do TOA (C). Aspecto final após a realização do TOA (D). (Modificado de Winslow e Cole 2005 B)

A primeira série de casos descrita avaliou os resultados do TOA como opção para evitar o procedimento de ATJ. Os autores realizaram o TOA em oito pacientes com idade entre 52 e 75 anos. Os pacientes foram submetidos ao transplante do côndilo tibial com tecido osteocondral preservado a 4°C, chamado de transplante osteocondral a fresco (TOF) (GROSS *et al.*, 1975). O mesmo grupo de pacientes foi reavaliado após 22 anos de seguimento. Sessenta e nove por cento pacientes mantiveram boa função da articulação do joelho sem precisarem de outro procedimento cirúrgico. A técnica de TOA comprovou bons resultados a longo prazo para o tratamento de LO de grandes dimensões em pacientes e ativos (RAZ *et al.*, 2014; ASSENMACHER *et al.* 2016). Com a evolução da técnica cirúrgica, o TOA foi realizado para o tratamento da osteoartrite pós-traumática em diferentes regiões do joelho (GRACITELLI *et al.*, 2015 A). Trinta e nove pacientes com média de idade de 34 anos foram acompanhados durante o período médio de 6,6 anos. O transplante foi realizado no platô tibial (74,3%), côndilo femoral (15%) e patela (10%). Dezenove casos (49%) precisaram de um segundo procedimento cirúrgico. Dez casos foram considerados como falha do procedimento (26%). Os piores resultados foram em lesões na cartilagem patelar.

Cento e trinta e cinco pacientes com osteocondrite dissecante juvenil, com média de idade de 21 anos, foram avaliados após a realização de TOA (SADR *et al.*, 2016). O tecido transplantado teve em média 7,3 cm². Trinta e quatro pacientes (23%) precisaram de um segundo procedimento cirúrgico. Após avaliação funcional objetiva, 95% dos pacientes ficaram satisfeitos com o procedimento ao final do seguimento (média de 6,3 anos).

A capacidade de retorno à prática esportiva após TOA na articulação do joelho é um tema discutido na literatura. Durante um seguimento médio de 2,5 anos, em uma

população composta por atletas recreacionais, a capacidade de retorno ao mesmo nível de atividade foi de 79% após o TOA na articulação do joelho. Os fatores relacionados ao não retorno ao esporte foram a idade acima de 25 anos e sintomas por mais de 12 meses (KRYCH *et al.*, 2012).

Em uma revisão sistemática da literatura, que avaliou a capacidade de retorno ao esporte como desfecho após as diversas técnicas de reparo ou restauração da cartilagem, não foram encontradas diferenças com significância estatística entre os procedimentos descritos para o tratamento das LO. O retorno ao mesmo nível de atividade esportiva foi em média de 72% (CAMPBELL *et al.*, 2016).

O TOA representa a principal técnica de restauração da cartilagem utilizada para revisão após falha de outros procedimentos descritos para tratamento das LO na articulação do joelho. Os fatores relacionados a falha dos procedimentos são: mau alinhamento do membro inferior, deficiência meniscal, instabilidade articular, tamanho da lesão, integridade do osso subcondral adjacente e lesões localizadas na articulação da patela ou tróclea femoral (GRACITELLI *et al.*, 2015 B; DHOLLANDER *et al.*, 2016).

1.5 Preservação do tecido osteocondral humano

A preservação do tecido osteocondral humano representa um fator chave no sucesso do TOA nas articulações sinoviais. O tempo de armazenamento, assim como os meios de preservação utilizados, estão relacionados à manutenção da viabilidade dos condrócitos após o procedimento (DE CARO *et al.*, 2015; SCHMIDT *et al.*, 2017). Para que seja viável a realização do TOA é preciso aguardar o período mínimo de 14 dias para que sejam realizados os exames sorológicos necessários para prevenir a

transmissão de doenças ao receptor do tecido (SHERMAN *et al.*, 2014; COOK *et al.* 2016).

A temperatura de 4°C é a mais utilizada para a preservação de tecido osteocondral em humanos ou modelos animais (SHERMAN *et al.*, 2014). O resfriamento tecidual abaixo da temperatura corpórea média de 37°C induz a diminuição do metabolismo celular dos condrócitos, levando ao menor consumo dos nutrientes fornecidos pelo meio de preservação utilizado (PEARSALL *et al.*, 2004). O armazenamento nas temperaturas de 25°C e 37°C demonstrou-se eficaz quanto à manutenção da viabilidade celular e seguro no que diz respeito à colonização bacteriana local em modelos animais (PALLANTE *et al.*, 2009; GARRITY *et al.*, 2012; COOK *et al.*, 2014).

Diversas soluções para preservação de tecido osteocondral foram avaliadas na literatura em diferentes modelos de estudo e com metodologias distintas de controle quanto à viabilidade do tecido. Os trabalhos iniciais avaliaram o uso de soro fetal bovino (SFB), comprovando sua eficácia quanto à manutenção da viabilidade celular adequada em modelo animal após 15 dias a 4°C. (BALL *et al.*, 2004; PENNOCK *et al.*, 2006; EMMERSON *et al.*, 2007; DONTCHOS *et al.*, 2008). O SFB é composto por fatores de crescimento, aminoácidos, hormônios, lipídeos e açúcares. Entretanto, seu uso pode estar associado à reação imunológica local, assim como à transmissão de doenças (PENNOCK *et al.*, 2006). Agregados celulares contendo linfócitos, monócitos e células plasmáticas foram identificados após o TOA com meio contendo SFB. Tal achado sugere que o mesmo possa induzir a resposta imune local, culminando em inflamação, necrose tecidual e colapso do enxerto (MALININ *et al.*, 2006). Visando evitar reação inflamatória local, assim como o risco de transmissão de doenças, os meios de cultura celular sem soro (MCCS) passaram a ser utilizados em

pesquisas para avaliação da viabilidade celular dos condrócitos em modelos animais (WILLIAMS *et al.*, 2005; DONTCHOS *et al.*, 2008; TENG *et al.*, 2008; GARRITY *et al.*, 2012; JIANHONG *et al.*, 2016).

Os achados histológicos e a viabilidade celular de fragmentos osteocondrais (FO) retirados da articulação do joelho de cachorros foram comparados utilizando-se o dia zero da eutanásia como grupo controle. Os FO foram preservados em MEM® (*Minimal Essential Medium*) suplementado com SFB, L-glutamato e mantidos a 4°C. A análise de viabilidade celular identificou 97%, 89% e 78% de condrócitos viáveis após 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente. Os autores concluíram que o TOA pode ser realizado mesmo após 4 semanas de preservação na temperatura de 4°C (WILLIAMS *et al.*, 2005).

A variação do pH foi analisada *in vitro* durante a preservação de FO de bovinos (DONTCHOS *et al.*, 2008). Após o isolamento, os condrócitos foram cultivados em solução contendo DMEM/F-12® (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutriente Mixture F-12*). O grupo controle foi mantido em ar ambiente enquanto o grupo experimental foi mantido em dióxido de carbono (CO₂) a 5%. Os autores encontraram uma maior viabilidade celular com significância estatística no grupo experimental, concluindo que a preservação de tecido osteocondral humano sobre CO₂ a 5% deve ser utilizada nos bancos de tecidos. A exposição ao CO₂ levaria a normalização do pH do meio de preservação levando ao aumento da viabilidade celular dos condrócitos.

A ação catabólica do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*Insulin-like growth factor*, IGF-I) sobre a viabilidade celular dos condrócitos foi analisada de como comparativo com os efeitos do inibidor de apoptose celular ZVAD-fmk®. As amostras analisadas foram retiradas do fêmur distal de bovinos adultos. O tecido foi preservado a 4°C. Cinco grupos foram elaborados: ringer lactato (RL), DMEM®,

DMEM® com IGF-1, DMEM® com ZVAD-fmk® e DMEM/F12® suplementado com o meio preconizado pela *Musculoskeletal Transplant Foundation* (MTF®). Após 14 dias de preservação, apenas o grupo DMEM/F12® suplementado com meio da MTF apresentou mais de 86% de condrócitos viáveis. A utilização de IGF-1 recombinante, assim como o ZVAD-fmk® não demonstraram benefício mantendo uma viabilidade de 58,6% e 62,5% respectivamente (TENG *et al.*, 2008).

A troca do meio de preservação a cada 7 dias foi avaliada em modelo animal (LINN *et al.*, 2011). Dois grupos de FO preservados a 4°C foram comparados. O inibidor do fator de necrose tumoral Etarnecept® foi adicionado no grupo experimental, enquanto o grupo controle utilizou DMEM® suplementado com L-glutamina e aminoácidos. Após 28 dias não foi encontrada diferença com significância estatística entre o percentual de células viáveis entre os grupos. O uso de inibidor do *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α), assim como a troca do meio de preservação não demonstraram benefícios quanto a viabilidade celular das amostras avaliadas.

Outro estudo avaliou o efeito da troca do meio de preservação em FO retirados de caprinos (JIANHONG *et al.*, 2016). O meio foi trocado a cada dois dias. O grupo controle não foi submetido a troca do meio. A viabilidade celular foi significativamente maior no grupo onde houve a troca do meio de preservação mantido a 4°C.

A Universidade de Missouri, em Columbia, padronizou a temperatura de 25°C para preservação de FO humanos. Os estudos iniciais avaliaram FO de caninos adultos, comparando as temperaturas de 4°C e 37°C (GARRITY *et al.*, 2012). O tecido foi armazenado por 56 dias em solução contendo DMEM®. Os melhores resultados quanto à viabilidade celular foram encontrados no tecido preservado a 37°C. A incidência de contaminação bacteriana não teve diferença entre os grupos estudados. Após os resultados descritos, o mesmo grupo avaliou a preservação de FO na

temperatura de 25°C (COOK *et al.*, 2014). Como grupo comparativo, utilizou-se o tecido preservado a 4°C. O meio para preservação osteocondral utilizado foi desenvolvido pelo laboratório próprio, *Missouri Osteochondral Allograft Preservation System*® (MOPS), enquanto o grupo controle utilizou o meio de preservação tecidual sem soro. As amostras foram avaliadas após 28 e 60 dias de preservação. Ao final do estudo o grupo preservado com o meio MOPS mantido a 25°C apresentou uma viabilidade celular significativamente maior que o grupo controle, chegando a 82,9% de condrócitos viáveis após 28 dias. Não houve incidência de contaminação bacteriana nas amostras. Os autores consideram que a temperatura de 25°C está associada a maior viabilidade tecidual no momento do TOA.

A suplementação de ácido hialurônico em diferentes pesos moleculares (800 kDa, 1900 kDa, 6000 kDa) foi avaliada em conjunto com o meio da *University of Wisconsin* (UW), CoStorSol® (*Cold Storage Solution*) em FO mantidos a 4°C. Sua ação como adjuvante na preservação celular estaria relacionada aos possíveis efeitos anti-inflamatórios e possível inibição do processo morte celular programada (LISIGNOLI *et al.*, 2001; OZAWA *et al.*, 2015). Na concentração de 800 kDa houve aumento significativo na viabilidade celular em relação ao grupo controle. Entretanto, o uso de ácido hialurônico não foi associado ao percentual de viabilidade celular desejada na preservação de FO (YAMADA *et al.*, 2015).

O grupo da universidade de Kitasato no Japão, avaliou o efeito do uso de soro alógeno sobre a viabilidade celular de condrócitos em ratos Sprague-Dawley. O meio de preservação utilizado continha fosfato de dexametasona, insulina e CoStorSol®. Os fragmentos foram preservados a 4°C. No grupo com concentração de soro alógeno a 10%, a viabilidade celular foi significativamente superior quando comparada ao grupo sem adição do mesmo após 14 dias de armazenamento. Os autores sugerem que a

presença da albumina, hormônios, fatores de crescimento, assim como agentes antioxidantes encontrados no soro alógeno teriam efeitos benéficos na preservação de FO (ONUMA *et al.*, 2012).

Os trabalhos avaliando os diferentes meios de preservação, temperatura e metodologia de pesquisas são apresentados na **tabela 4**.

Tabela 4. Resultados dos estudos avaliando os diferentes meios de preservação celular, indicando a temperatura de preservação tecidual, tempo de armazenamento e o percentual de células viáveis obtido.

Autor	Meio experimental	Suplemento	Temperatura	Tempo (Dias)	Viabilidade celular Resultados
Williams <i>et al.</i> 2005	DMEM® (troca 2 dias)	SFB 10%, L - glutamina, AA	4°C	8	98%
				15	80%
				45	64%
Ball <i>et al.</i> 2004	Ringer Lactato (troca 48/72hs)	L - glutamina, AA	4°C	14	80%
	28			29%	
	DMEM® (troca 48/72hs)	4°C	14	90%	
			28	83%	
Williams <i>et al.</i> 2005	MEM® (troca 7 dias)	SFB 10%, L-glutamina	4°C	14	97%
				21	89%
				28	78%
Malinin <i>et al.</i> 2006	RPMI-1640®	SFB (10%)	4°C	7	Celularidade e matriz preservadas
			4°C	14	Celularidade preservada Alterações na matriz
			4°C	21	Alterações degenerativas
Pennock <i>et al.</i> 2006	SFB 10%	NI	4°C	28	67%
	MEM®	AA, L-glutamina	4°C	28	23%
Dontochos <i>et al.</i> 2008	DMEM/F -12®	SFB 10%	4°C	14	68% (camada superficial)
	DMEM + HEPES®	SFB 10% L-glutamina	4°C	14	83% (camada superficial)
	DMEM/F-12® (CO ₂ 5%)	SFB 10%	4°C	14	85% (camada superficial)
	DMEM/F-12® + HEPES® (CO ₂ 5%)	SFB 10% L-glutamina	4°C	14	92% (camada superficial)
Teng <i>et al.</i> 2008	Ringer Lactato		4°C	14	20%
				28	NI
	DMEM/F-12®	MTF®	4°C	14	86%
				28	45%
	DMEM®		4°C	14	54%
				28	15%
	DMEM®	IGF-1	4°C	14	58%
				28	65%
DMEM®	ZVAD-fmk®	4C	14	62%	
			28	16%	
Pallante <i>et al.</i> 2009	MEM®	SFB 10% L-glutamina AA	4°C	14	±85%

	MEM®	SFB 10% L-glutamina, AA	4°C	28	±65%	
	MEM®	SFB 0% L-glutamina, AA	37°C	28	80%	
	MEM®	SFB 2% L-glutamina AA	37°C	28	80%	
	MEM®	SFB 10% L-glutamina, AA	37°C	28	80%	
Linn <i>et al.</i> 2011	Etarnecept® (troca 7 dias)	SFB L-glutamina, AA	4°C	28	68%	
	DMEM® (troca 7 dias)		4°C	28	62%	
Garrity <i>et al.</i> 2012	DMEM®	ITS, AA, piruvato de sódio, MEM	4°C	28	39%	
				56	27%	
			37°C	28	76%	
				56	69%	
	DMEM® + Dexametasona + RhTGF-β3	ITS, Ácido-linoleico, Albumina bovina, piruvato MEM	4°C	28	33%	
				56	23%	
		37°C	28	56%		
			56	27%		
Pallante <i>et al.</i> 2012	DMEM®	SFB 10% L – glutamina AA	4°C	14	60% (camada superficial)	
	DMEM®		4°	28	60% (camada superficial)	
	NI		-70°C	10	±10% (camada superficial)	
Onuma <i>et al.</i> 2012	UW® (University Wisconsin)	Dexametasona, Insulina Regular	4°C	14	50%	
				21	25%	
	UW® (University Wisconsin) Soro Alógeno 10%		4°C	14	82%	
				21	62%	
Cook <i>et al.</i> 2014	MOPS®		25°	28	83%	
				60	905	
	SOC		25°	28	60%	
				60	53%	
Yamada <i>et al.</i> 2015	CoStorSol®		4°C	14	20%	
	CoStorSol®	HA (800kDa) ARTZ®	4°C	14	40%	
	CoStorSol®	HA (1900kDa) Suvenyl®	4°C	14	NI	
	CoStorSol®	HA (60000KDa) Synvisc®	4°C	14	NI	
Jianhong <i>et al.</i> 2016	MEM®		4 °C	21	80%	
				35	70%	
	MEM® com troca 2/2 dias		4°C	21	88%	
				35	79%	
	MEM®		CO ₂ 5%	37°C	21	70%
					35	55%
	CO ₂ 5%	37°C	21	85%		

	MEM® com troca 2/2 dias			35	78%
--	-------------------------	--	--	----	-----

MEM® (*Minimum Essential Medium*); SFB (soro fetal bovino); HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*); DMEM® (*Dulbecco's Modified Eagle's médium*) DMEM/F-12® (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*); MTF® (*Musculoskeletal Transplant Foundation*); ZVAD-fmk® (inibidor irreversível das proteases capazes); ITS (insulina, transferrina, selênio); Etarcept® (inibidor do fator de necrose tumoral); RhTGF-β3 (*recombinant human transforming growth factor beta-3*) MOPS® (*Missouri Osteochondral Allograft Preservation System*); SOC (*Standard-of-care*); CoStorSol® (*University of Wisconsin*) UW; AA (ácido ascórbico), NI (não informado).

1.6 Escores histológicos de avaliação da cartilagem articular

A avaliação histológica da cartilagem articular representa uma questão discutida na literatura. Diferentes escores e classificações foram elaborados visando compreender o processo de degeneração articular e avaliar os diferentes métodos de tratamento das LO (O'DRISCOLL *et al.*, 1988; MANKIM *et al.*, 1971; MAINIL-VARLET *et al.*, 2003; PRITZKER *et al.*, 2006). O primeiro escore foi elaborado a partir de tecido osteocondral humano retirado da cabeça femoral no momento da cirurgia de substituição articular do quadril. Foram avaliadas 13 amostras retiradas por motivo de fratura do colo do fêmur (n=3) ou osteoartrite na articulação do quadril (n=9), estando um caso relacionado à desarticulação por doença tumoral sinovial. Os autores avaliaram a estrutura das camadas, a celularidade, a integridade da linha de transição entre o osso subcondral e a concentração de proteoglicanos presentes na MEC em lâminas coradas com Safranina O (SO) e Hematoxilina & Eosina (H&E) (MANKIN *et al.*, 1971) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Escore de Mankin para avaliação histológica da cartilagem articular.

Escore de Mankin modificado	
I Estrutura	
A normal	0
B irregularidades na superfície	1
C pannus e irregularidades na superfície	2
D fissuras na zona de transição	3
E fissuras na zona radial	4
F fissuras na zona de calcificação	5
G desorganização completa	6
II Células	
A normal	0
B hiper celularidade difusa	1
C grupos de células	2
D hipocelularidade	3
III Coloração por Safranina O	
B pequena redução	1
A normal	0
C moderada redução	2
D severa redução	3
E não visualizada	4
IV Integridade da linha de transição	
A intacta	0
B vasos sanguíneos atravessando	1

No item I são avaliadas alterações estruturais e formação de pannus inflamatório na superfície articular; no item II, é avaliado o padrão celular do tecido; no item III, é avaliada a coloração por SO (concentração de proteoglicanos na matriz extracelular); no item IV, é avaliada a integridade da zona de transição entre o tecido ósseo subcondral. (Modificado de Mankin *et. al.*, 1971).

Em 2003, a ICRS publicou seu escore histológico para avaliação visual a partir da biópsia de FO humanos de pacientes submetidos a técnica de MF ou TAC, usando

como grupo controle espécimes humanos de adultos submetidos à autópsia (MAINIL-VARLET *et al.*, 2003). O objetivo foi a padronização e a disponibilização dos critérios em um catálogo visual para a comunidade científica, através do site da instituição. Foram analisadas a camada superficial, a matriz extracelular, a distribuição dos condrócitos nas camadas intermediária e profunda, a viabilidade das células e as alterações na camada de cartilagem calcificada e o osso subcondral. Seguindo a mesma linha de pesquisa, o escore foi posteriormente modificado, acrescentando avaliações de possíveis alterações inflamatórias e o padrão de revascularização tecidual (MAINIL-VARLET, 2007).

A *OsteoArthritis Research Society International* (OARSI) elaborou seu escore para avaliação de FO humanos (PRITZKER *et al.*, 2006). Os autores descreveram um escore de avaliação graduado de 1 a 6, de acordo com alterações encontradas em lâminas de tecido fixado em formaldeído à 10% e coradas com SO. Os autores buscaram uma avaliação macroscópica das alterações estruturais da cartilagem articular, incluindo o tecido ósseo adjacente. O escore pode ser aplicado com lâminas coradas em SO ou Azul de Toluidina. (**Tabela 6**).

Tabela 6. Escore de avaliação histológica elaborado pela OARSI. (Modificado de PRITZKER *et al.*, 2006).

Graduação	Crítérios Associados
Grau 0 - Superfície intacta, morfologia da cartilagem intacta	Intacta, sem envolvimento da cartilagem
Grau I - Superfície intacta	Matriz: zona superficial intacta, edema e/ou fibrilações Células: proliferações (grupos), hipertrofia
Grau II Descontinuidades na superfície	As acima acrescentando: Descontinuidade na zona superficial Diminuição na concentração (SO ou Toluidina Azul) acima da zona intermediária Desorientação do padrão colunar
Grau III - Fissuras verticais	As acima acrescentando: Diminuição na concentração (SO ou Toluidina Azul) atingindo a zona profunda da cartilagem Nova formação de colágeno
Grau IV – Erosões	Perda da matriz cartilaginosa Presença de cistos na matriz cartilaginosa
Grau V – Desnudação	Presença de tecido fibrocartilaginoso Osso esclerótico na superfície
Grau VI – Deformação	Remodelamento ósseo Microfratura/ reparo Deformação dos contornos da superfície articular

O escore utiliza lâminas de tecido osteocondral fixadas em formol e coradas com SO ou Toluidina Azul.

Os modelos de estudo realizados, a metodologia de avaliação da viabilidade celular dos condrócitos e o escore de avaliação histológica utilizados nos trabalhos estão sintetizados na **tabela 7**.

Tabela 7. Modelos de estudo, métodos de avaliação da celularidade e escore histológico utilizados nos estudos para avaliação da viabilidade celular de condrócitos.

Autor	Modelo do Estudo	Método de análise viabilidade celular	Escore histológico
Ball <i>et al.</i> , 2004	Humano (fêmur)	BCECF-AM	N/A
Williams <i>et al.</i> , 2005	Canino (fêmur)	Live and Dead®	Mankin modificado
Malinin <i>et al.</i> , 2006	Primata (fêmur)	Live and Dead®	Mankin / Collins
Pennock <i>et al.</i> , 2006	Humano (fêmur)	DAPI	N/A
Dontchos <i>et al.</i> , 2008	Bovino (fêmur)	Live and Dead® DAPI	N/A
Teng <i>et al.</i> , 2008	Bovino jovem (fêmur)	Live and Dead®	N/A
Pallante <i>et al.</i> , 2009	Caprinos adultas (cabeça úmero)	Live and Dead®	Realizado / Não descrito
Linn <i>et al.</i> , 2011	Caprinos adultas (fêmur)	Live and Dead® DAPI	N/A
Pallante <i>et al.</i> , 2012	Bodes adultos (fêmur)	Live and Dead®	Mankin modificado
Garrity <i>et al.</i> , 2012	Caninos adultos (fêmur)	Live and Dead®	N/A
Onuma <i>et al.</i> , 2012	Murino (fêmur)	Live and Dead®	ICRS
Cook <i>et al.</i> , 2014	Caninos adultos (fêmur)	SYTOX®	OARSI (para cachorros)
Yamada <i>et al.</i> , 2015	Murrino (fêmur)	Cell Count Reagent®	Mankin
Jianhong <i>et al.</i> , 2016	caprinos adultos (tálus)	Live and Dead®	ICRS

DAPI (iodeto de propídio); ICRS (*International Cartilage Repair Society*); OARSI (*Osteoarthritis Research Society International*); RN (não realizado); BCECF-AM (*2,7-Bis (2carboxyethyl) -5(6) - carboxyfluorescein, acetoxymethylester*); SYTOX® (*Green Nucleic Acid Stain*), NA (não avaliado).

2 JUSTIFICATIVA

O TOA representa um dos métodos biológicos para o reparo das LO(s) de tamanho superior a 2,0cm² em pacientes ativos, evitando a morbidade associada ao TAO. Os pacientes não tratados adequadamente evoluem com degeneração precoce na articulação, levando à incapacidade funcional e limitações quanto às atividades diárias com impacto na qualidade de vida dessa população.

O presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO), que visa elaborar um protocolo para preservação de tecido osteocondral humano para utilização pelo Banco Multitecidos Institucional. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou em 27/12/2006 a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 220 **(ANEXO A)** na qual autoriza que os bancos de tecidos utilizem, para fins de pesquisa e ensino, amostras de tecidos considerados impróprios para uso terapêutico, bem como aqueles considerados próprios, desde que priorizadas as demandas com finalidade terapêutica.

Estando o Banco Multitecidos (BMT) responsável pela distribuição de tecido osteomuscular em território nacional, torna-se de suma importância a elaboração de um protocolo operacional padrão para a captação, o transporte e o armazenamento de tecido osteocondral humano. A manutenção estrutural da cartilagem articular hialina, assim como a concentração de proteoglicanos, estão relacionados a adequada preservação do tecido, sendo assim indispensável sua avaliação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Elaborar um protocolo para a captação, transporte e preservação de tecido osteocondral humano a ser utilizado pelo BMT que possa ser também reproduzido por outras instituições.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Elaborar um programa operacional padrão de captação e processamento de tecido osteocondral no Banco de Tecidos Musculoesquelético lotado no INTO.

3.2.2 Avaliar a capacidade de preservação estrutural do tecido osteocondral mantido a 4°C. após 15, 30 e 45 dias.

3.2.3 Identificar as alterações histológicas relacionadas a preservação do tecido osteocondral humano para transplante alógeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População do estudo

Após a aprovação pelo CEP de nossa instituição (**ANEXO B**), a população do estudo foi composta pelos doadores de tecido multiesquelético, entre o período de 06/2015 até 31/12/2016, que preencheram os critérios para doação de órgãos do Sistema Nacional de Transplantes (SNT), de acordo com a normativa publicada pelo Ministério da Saúde (MS), Portaria nº2.600, publicado em 21 de outubro de 2009 (**ANEXO C**).

Após a confirmação de possível doador, um membro do BMT realizou o questionário de triagem epidemiológica para doação de tecidos de acordo com as informações fornecidas pelo familiar do mesmo. O doador foi examinado para avaliar a presença de lesões articulares. Duas amostras sorológicas foram coletadas para a realização dos testes laboratoriais preconizados pelo MS.

Foram incluídos no estudo os doadores cadáveres (DC) com idade entre 15 e 45 anos. A articulação de onde foram retirados os FO para análise foram submetidas a avaliação visual do médico processador, sendo excluída no caso de apresentarem lesão na cartilagem articular.

Os DC oriundos de fora do estado do Rio de Janeiro foram excluídos. Este critério considerou o tempo prolongado de transporte do tecido, podendo este ser um viés de seleção. Os DC (s) com idade abaixo de 15 anos e acima de 45 anos foram excluídos da pesquisa. Foram excluídas do estudo as amostras de doadores com história de doença inflamatória articular, relato prévio de infecção na articulação do joelho ou fratura com comprometimento da superfície articular do fêmur. Amostras

com alterações macroscópicas no momento do processamento tecidual também foram excluídas da pesquisa. Após realizada a exclusão segundo os critérios acima, foram selecionados cinco DC (s) para a pesquisa (**Figura 9**).

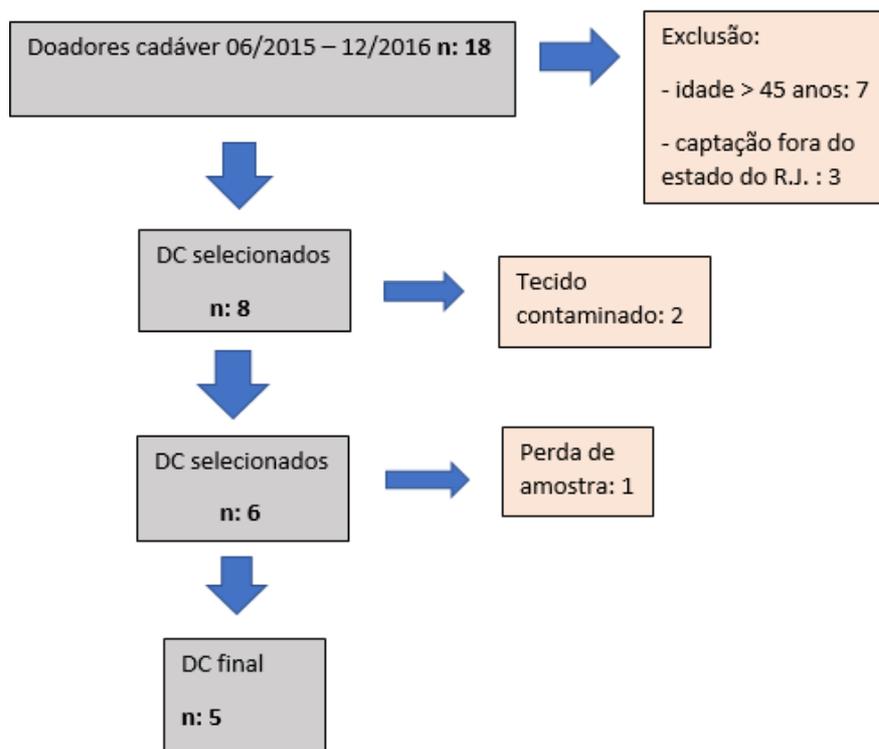


Figura 9. Fluxograma de seleção dos doadores cadáver para pesquisa. DC (doador cadáver).

4.2 Protocolo de captação

A equipe de captação foi composta por seis médicos residentes, sob a orientação de um médico captador, membro do BMT. Após a captação de fígado, rins, coração e córnea, a equipe ortopédica realizou a degermação do doador, iniciando a captação de tecido musculoesquelético através de técnica asséptica. Após incisão mediana no joelho e dissecação subcutânea, foi realizada osteotomia femoral supracondiliana e tibial, 5 cm distal ao tubérculo tibial, com auxílio de serra oscilatória, gerando a peça de bloco de joelho (**Figura 10**). Foram coletados dois swabs da mesma para avaliação de contaminação microbiológica. A articulação foi então

mantida imersa em RL, dentro de uma embalagem tripla ficando armazenada em frascueira térmica na temperatura de 4°C, até a chegada no BMT.



Figura 10. Joelho em bloco captado para análise de tecido osteocondral. Visualização de peça referente ao bloco de joelho para o preparo de tecido osteocondral para transplante alógeno. (Adaptado de Tirico *et al.*, 2017).

4.3 Transporte do tecido osteocondral

O transporte do hospital onde houve a captação do tecido até o BMT foi realizado em uma frascueira térmica própria. A temperatura foi mantida a 4°C, controlada por termômetro local (**Figura 11**). Após a chegada, o tecido foi preservado na mesma temperatura até o início do processamento.



Figura 11. Equipamentos de transporte do tecido osteocondral. Frascueira térmica para transporte de tecido osteocondral (A). Termômetro para controle de temperatura (B). (Arquivo pessoal)

4.4 Protocolo de processamento do tecido osteocondral humano

O processamento do tecido foi realizado por um médico membro da equipe de pesquisa, em sala ISO 5, localizada dentro do BMT. A definição de sala limpa é descrita no **Anexo D**. Com auxílio de serra oscilatória, a porção articular do fêmur distal foi isolada para retirada das amostras de FO. Foram coletados oito fragmentos de tecido osteocondral humano com 2x3cm² para análise histológica do tecido. Os FO selecionados para pesquisa foram preservados a 4°C em meio de preservação composto pelo meio comercial Iscove's[®] (*Modified Dulbecco's Medium*, Thermo Fischer Brasil) (**ANEXO E**) suplementado com albumina humana (VIALEBEX, LFB-Hemoderivados e Biotecnologia Ltda) a 10% e vancomicina 100 µg / ml. Os FO foram analisados após quinze (d15), trinta (d30) e quarenta e cinco dias (d45) de preservação. As amostras retiradas no dia da captação do tecido foram definidas como dia 0 (d0) (**Figura 12**). Neste momento foram colhidos 4ml do líquido utilizado para o transporte do tecido e enviados para cultura de bactérias aeróbias e anaeróbias. Fragmentos de tecido foram também enviados para cultura no laboratório da instituição.

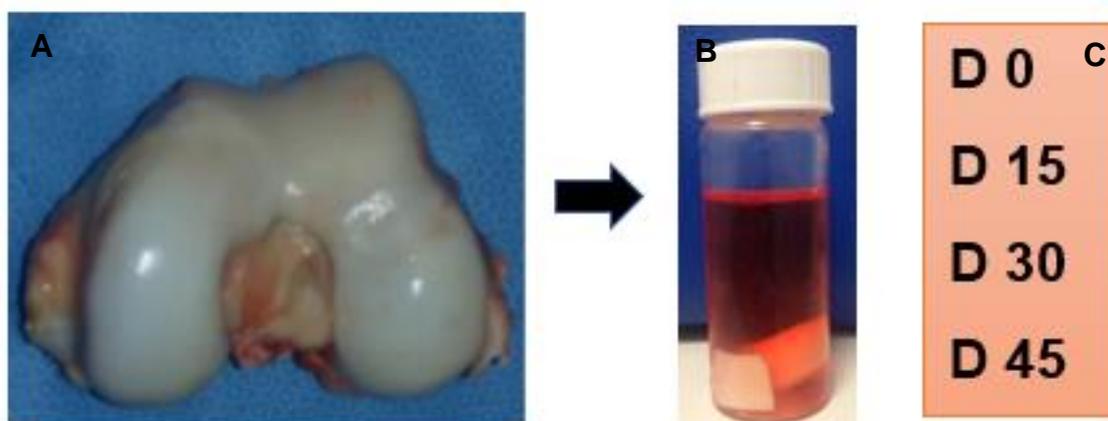


Figura 12. Metodologia de preparo dos fragmentos osteocondrais para análise tecidual. Superfície articular do fêmur distal selecionada para a retirada de FO para análise histológica (A). Os fragmentos foram mantidos no meio de preservação e mantidos a 4°C (B). Período de avaliação de amostra (C). D (dia). (Arquivo pessoal)

4.5 Protocolo de análise tecidual falta rever

As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado por 24 horas, desidratadas em álcool em crescentes concentrações e incluídas em parafina para a obtenção de cortes histológicos com 3 a 4 µm de espessura. As mesmas foram preparadas de acordo com o momento de análise do tecido (D0, D15, D30, D45). Foram realizados 2 cortes histológicos por lâmina e corados pela técnica de H&E para análise global do tecido. Para cada momento de avaliação foram preparadas 2 lâminas por corante utilizado.

Para avaliação do conteúdo de glicosaminoglicanos, as lâminas foram coradas com SO (Apoio em Patologia Cirúrgica, Av. Rebouças, 1104 cj. 24, São Paulo – SP) (**ANEXO F**). As lâminas geradas foram analisadas ao microscópio óptico e fotografadas para registro dos resultados em aumento de 100X. As imagens foram geradas pelo pesquisador principal e foram nomeadas alfabeticamente em A, B, C ou D, de acordo com o tempo de preservação dos FO analisado para que os dois avaliadores (membros da equipe de pesquisa com experiência em doenças na cartilagem articular) fossem cegos quanto ao tempo de preservação do tecido. Os avaliadores receberam as imagens obtidas a partir dos cortes histológicos e aplicaram os dois escores selecionados para a pesquisa. Primeiramente foi utilizado os escores de Mankin (MANKIN *et al.*, 1971). A pontuação obtida varia de 0 a 14 pontos. O outro escore utilizado foi o descrito pela OARSI (PRITZKER *et al.*, 2006). O método de avaliação quantifica as alterações relacionadas à degeneração da cartilagem sinovial, graduando de 0 a 6. A metodologia de avaliação do tecido com os escores citados é apresentada no **ANEXO G**. Os resultados obtidos foram tabulados em Excell.

4.6 Análise estatística

A amostra deste estudo foi formada pelas pontuações obtidas a partir da avaliação visual dos FO nos 4 momentos de avaliação (d0, d15, d30, d45) segundo os dois escores selecionados previamente. Ao todo foram feitas 38 avaliações, que é a dimensão do banco de dados deste estudo. Houve a perda de uma amostra referente ao DC 388 no tempo d0. Os dados coletados foram analisados pelo programa SPSS (*Statistical Package for the Social Science*), versão 22.0. Os gráficos foram construídos no programa Excel Microsoft 2011.

Para caracterização da amostra e análise descritiva das variáveis, dada a natureza qualitativa dos escores, a média e as estatísticas baseadas na média não podem ser calculadas. Por isso os dados foram sintetizados por meio de distribuições de frequências relativas e das estatísticas descritivas como mediana, mínimo e máximo. Seguindo a abordagem não paramétrica de análise, dada a natureza qualitativa ordinal dos escores, a significância da evolução temporal de um escore foi avaliada por testes de Wilcoxon, comparando pareadamente os escores de uma avaliação com os respectivos escores da avaliação anterior. O teste de Wilcoxon também foi usado para comparar os escores iniciais e finais (d0 e d45). Todas as discussões foram realizadas considerando nível de significância máximo de 95% (0,05), ou seja, foi adotada a seguinte regra de decisão nos testes: rejeição da hipótese nula sempre que o p-valor associado ao teste foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Protocolo de captação, transporte e processamento de tecido osteocondral humano

O protocolo de captação foi definido pela retirada do joelho em bloco e imersão do mesmo em Ringer Lactato para o transporte até o BMT. Nos primeiros casos de doação de tecido osteocondral o mesmo médico captador realizou o processamento do tecido. Identificamos que deveríamos dividir o trabalho de captação e processamento do tecido osteocondral por dois profissionais, tendo em vista a fadiga relacionada ao tempo prolongado para a captação e o transporte do tecido. O profissional responsável por captar fazia a entrega da amostra ao profissional responsável pelo processamento do tecido, tão logo o mesmo chegasse ao Banco de Tecidos. Tal alteração no protocolo visou diminuir o tempo de espera para o início do processamento e evitar falhas técnicas inerentes à fadiga gerada durante o processo de captação.

A média de idade dos DC utilizados na pesquisa foi de 25,4 anos, sendo 60% do sexo masculino (n=3) e 40% do sexo feminino (n=2). O tempo médio entre o óbito do doador e o início do processamento no banco de tecidos foi de 12 horas e 55 minutos. Os dados dos doadores cadáver incluídos no estudo são apresentados na **tabela 8**.

Tabela 8. Características demográficas dos doadores selecionados para o estudo.

Doador Cadáver	Idade	Sexo	Altura / Peso estimados	Tempo decorrido desde o óbito até a chegada da equipe no BMT	Causa 'mortis'
331	15	Feminino	1,60 m /65 kg	6 horas 15 minutos	Hemorragia subaracnóide
373	38	Masculino	1,65 m /70 kg	20 horas 30 minutos	Rotura de aneurisma cerebral
273	27	Masculino	1,65 m /74 kg	12 horas	Politraumatismo
386	25	Masculino	1,85 m /70 kg	17 horas 30 minutos	Desconhecida
388	22	Feminino	1,65 m /65 kg	6 horas 30 minutos	Traumatismo craniano

BMT (banco multitecidos), m (metros), kg (quilos).

O fragmento de cômulo femoral gerado após o término do processamento teve suas medidas informadas e disponíveis ao médico transplantador antes da realização do transplante. As medidas foram de aproximadamente 2,5 cm de largura e de 8,0 cm de comprimento (**Figura 13**). Estas medidas variaram de acordo com o sexo e a altura do doador.

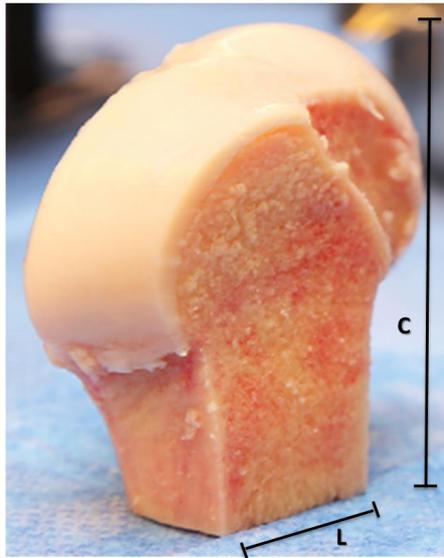


Figura 13. Cômulo femoral gerado após término do processamento. L (Largura), C (Comprimento).

5.2 Avaliação histológica

As lâminas coradas com H&E do tecido proveniente do dia da captação ou dia zero (d0) e no décimo quinto dia de preservação (d15) não apresentaram alterações estruturais na camada superficial da cartilagem articular (**Figura 14, A-B**). Contudo, nas amostras avaliadas após trinta dias (d30) e após quarenta e cinco dias (d45) de preservação, foram identificadas descontinuidades e fissuras na camada superficial da cartilagem (**Figura 14, C-D**).

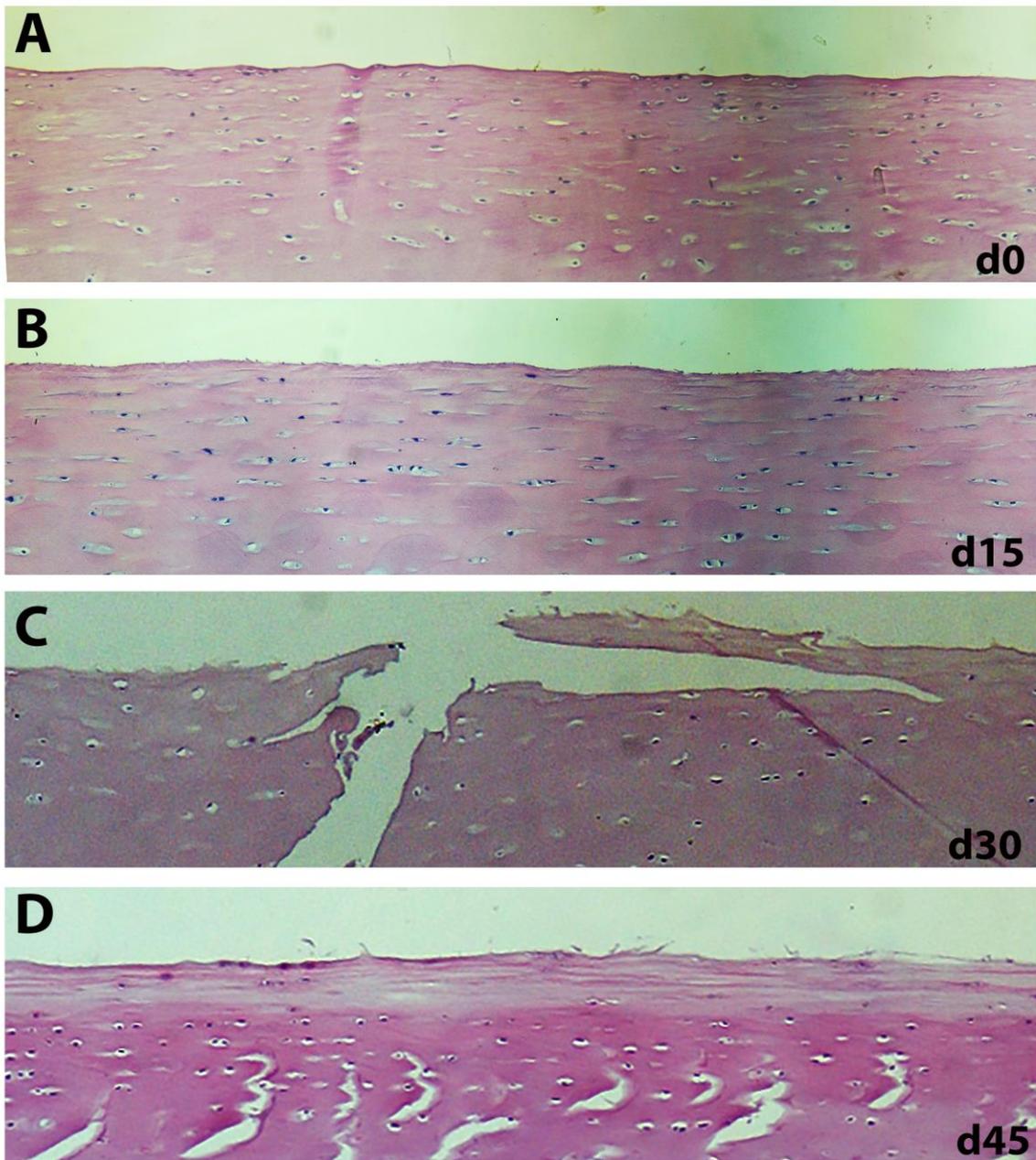


Figura 14. Fotomicrografia da camada de cartilagem superficial preservada a 4°C corada com HE. Cortes histológicos corados com H&E de fragmento osteocondral obtido no dia da captação do tecido (A), corte histológico de fragmento osteocondral após 15 dias de preservação, d15 (B), corte histológico de fragmento osteocondral após 30 dias de preservação, d30 (C) e corte histológico de fragmento osteocondral após 45 dias de preservação, d45 (D).

Ao avaliarmos histologicamente pela coloração de H&E a região da cartilagem intermediária, não foram observadas alterações estruturais nos quatro momentos de avaliação (**Figura 15, A-D**). A camada profunda da cartilagem, assim

como a placa de osso subcondral mantiveram-se preservadas durante o período analisado (**Figura 16, A-D**).

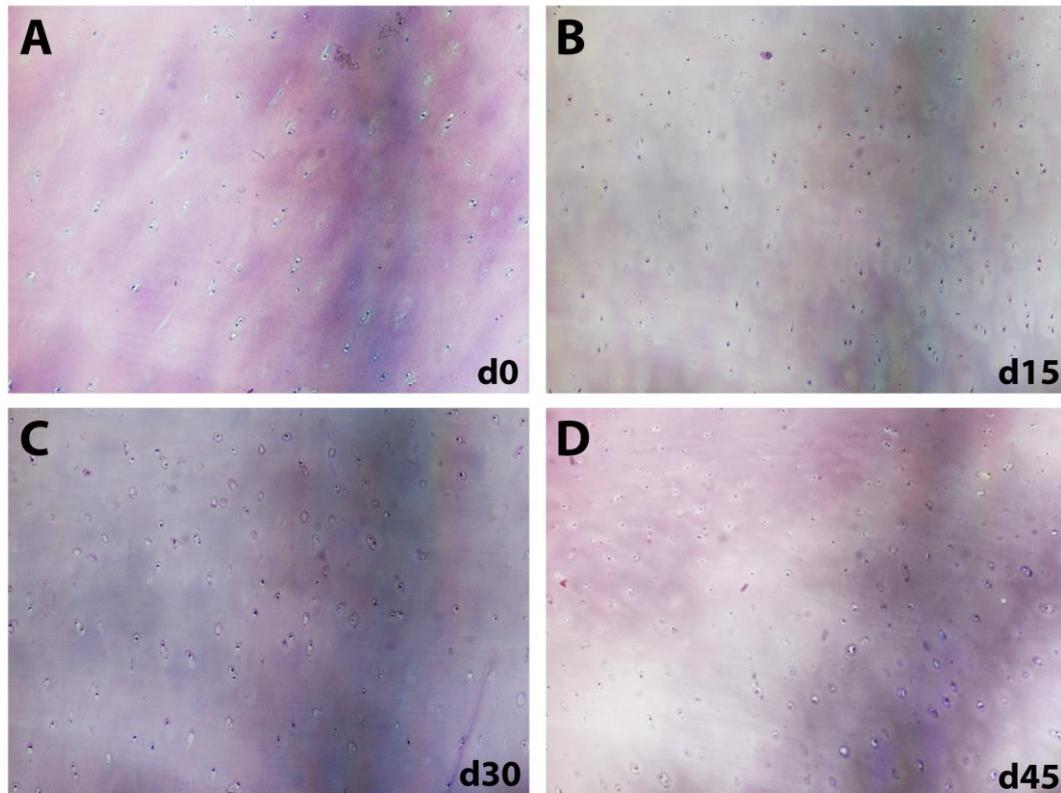


Figura 15. Fotomicrografia dos cortes histológicos da camada intermediária dos fragmentos analisados. Corte histológico corados com H&E de fragmento osteocondral obtido no dia da captação do tecido (A), corte histológico de fragmento osteocondral após 15 dias de preservação, d15 (B), corte histológico de fragmento osteocondral após 30 dias de preservação, d30 (C) e corte histológico de fragmento osteocondral após 45 dias de preservação, d45 (D).

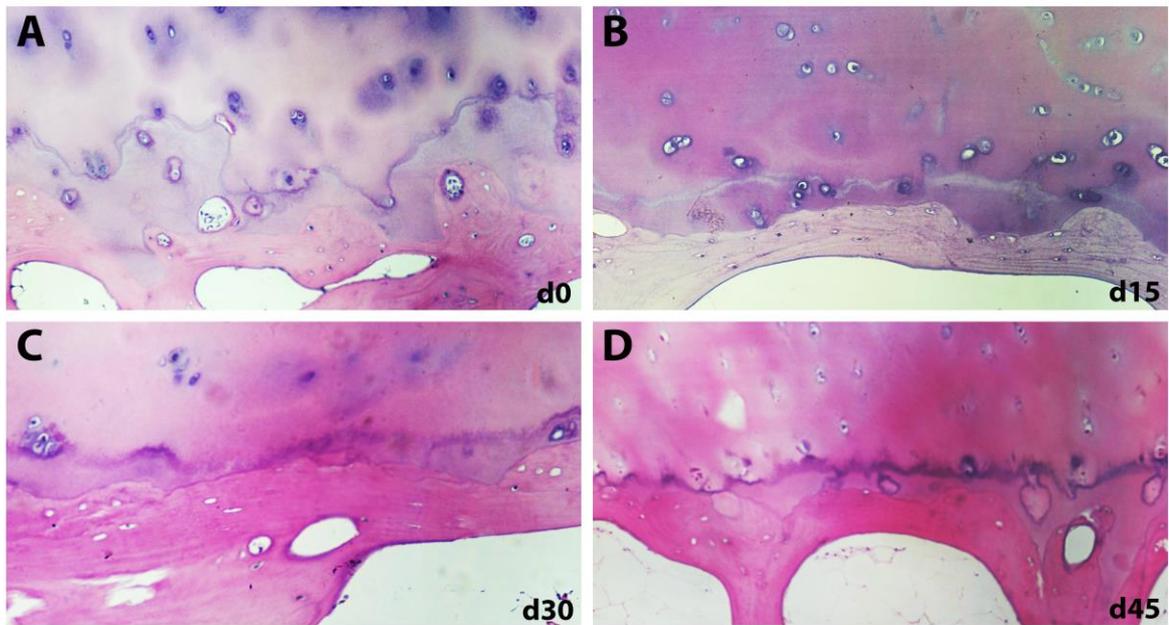


Figura 16. Fotomicrografia dos cortes histológicos da camada profunda dos fragmentos analisados. Corte histológico corados com H&E de fragmento osteocondral obtido no dia da captação do tecido (A), corte histológico de fragmento osteocondral após 15 dias de preservação, d15 (B), corte histológico de fragmento osteocondral após 30 dias de preservação, d30 (C) e corte histológico de fragmento osteocondral após 45 dias de preservação, d45 (D).

A análise dos cortes histológicos corados com SO após 15 dias de preservação (d15) mostraram uma diminuição na concentração de proteoglicanos na porção periférica da camada superficial, quando comparadas com as mostras em d0 (**Figura 17, B**). Com trinta dias de preservação (d30), houve diminuição na concentração de proteoglicanos da camada superficial da cartilagem dos FO analisados (**Figura 17, C**). Em d45 observou-se a diminuição na concentração de proteoglicanos na camada superficial do tecido (**Figura 17, D**).

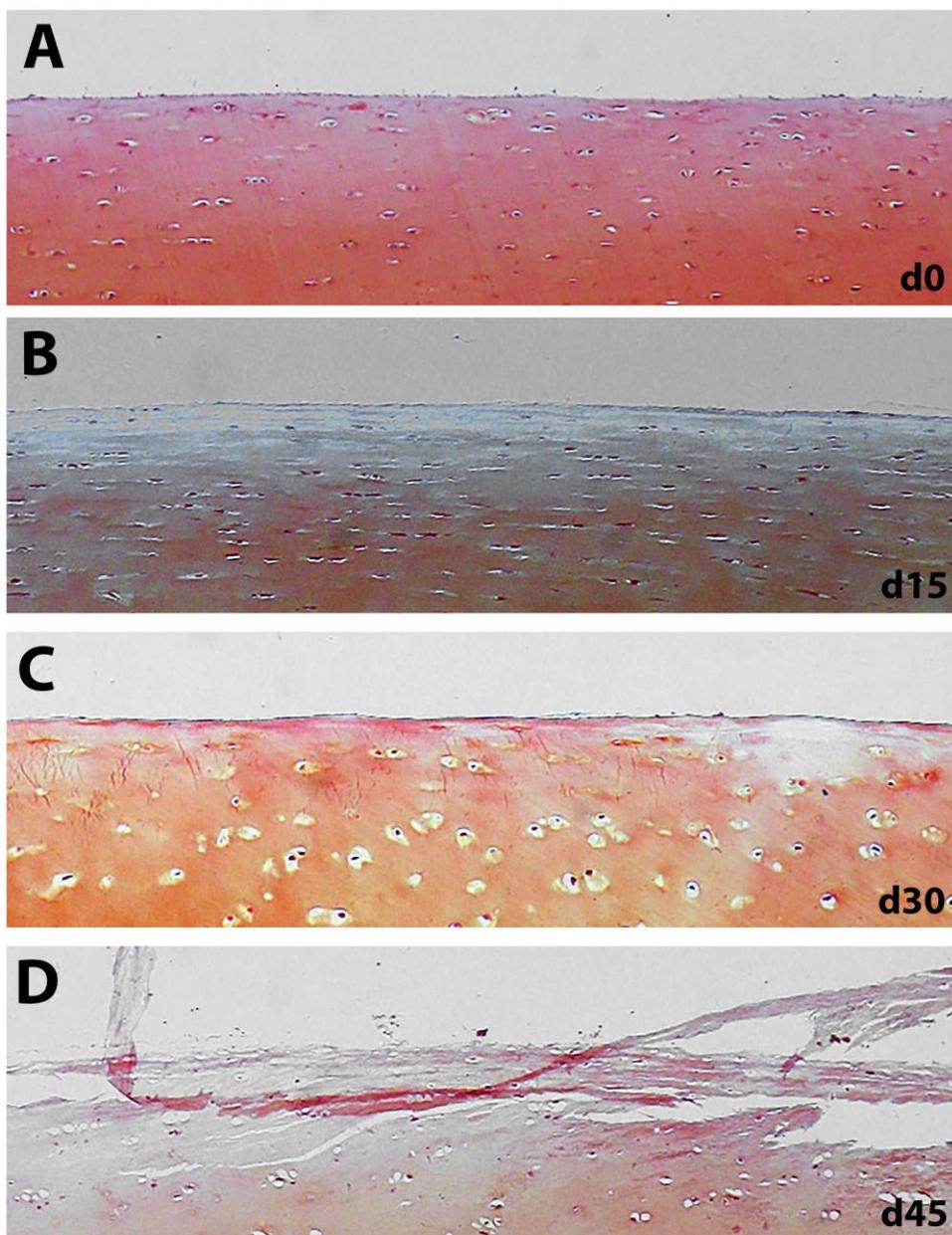


Figura 17. Fotomicrografia da camada de cartilagem superficial preservada a 4°C corada com SO. Corte histológico corados com SO de fragmento osteocondral obtido no dia da captação do tecido, d0 (A), corte histológico de fragmento osteocondral após 15 dias de preservação, d15 (B), corte histológico de fragmento osteocondral após 30 dias de preservação, d30 (C) e corte histológico de fragmento osteocondral após 45 dias de preservação, d45 (D).

A análise histológica após coloração com SO não identificou diminuição na concentração de proteoglicanos na camada de cartilagem intermediária nos quatro períodos de avaliação (**Figura 18, A-D**).

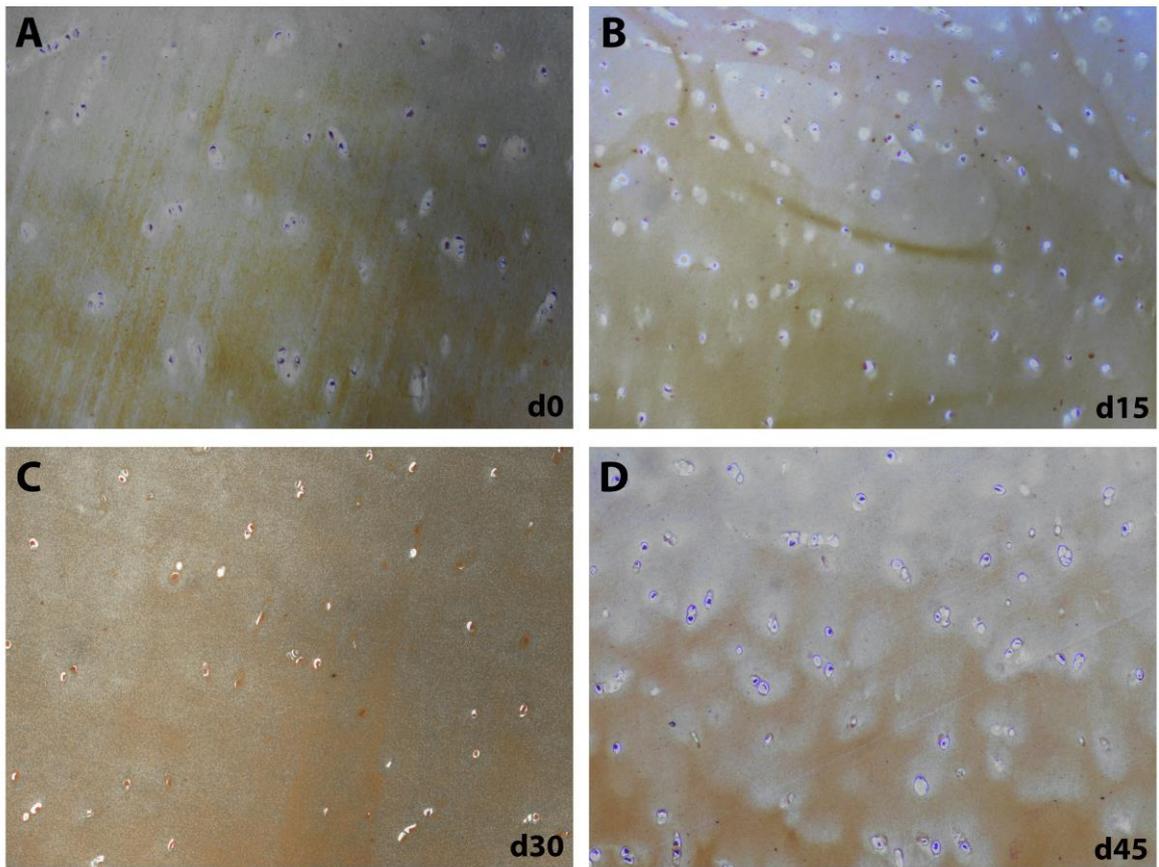


Figura 18. Fotomicrografia da camada de cartilagem intermediária preservada a 4°C e corada com SO. Corte histológico corados com SO de fragmento osteocondral obtido no dia da captação do tecido, d0 (A), corte histológico de fragmento osteocondral após 15 dias de preservação, d15 (B), corte histológico de fragmento osteocondral após 30 dias de preservação, d30 (C) e corte histológico de fragmento osteocondral após 45 dias de preservação, d45 (D).

A análise histológica da camada profunda da cartilagem corada com SO não identificou diminuição na concentração de proteoglicanos nos quatro períodos de avaliação dos FO estudados (**Figura 19, A-D**).

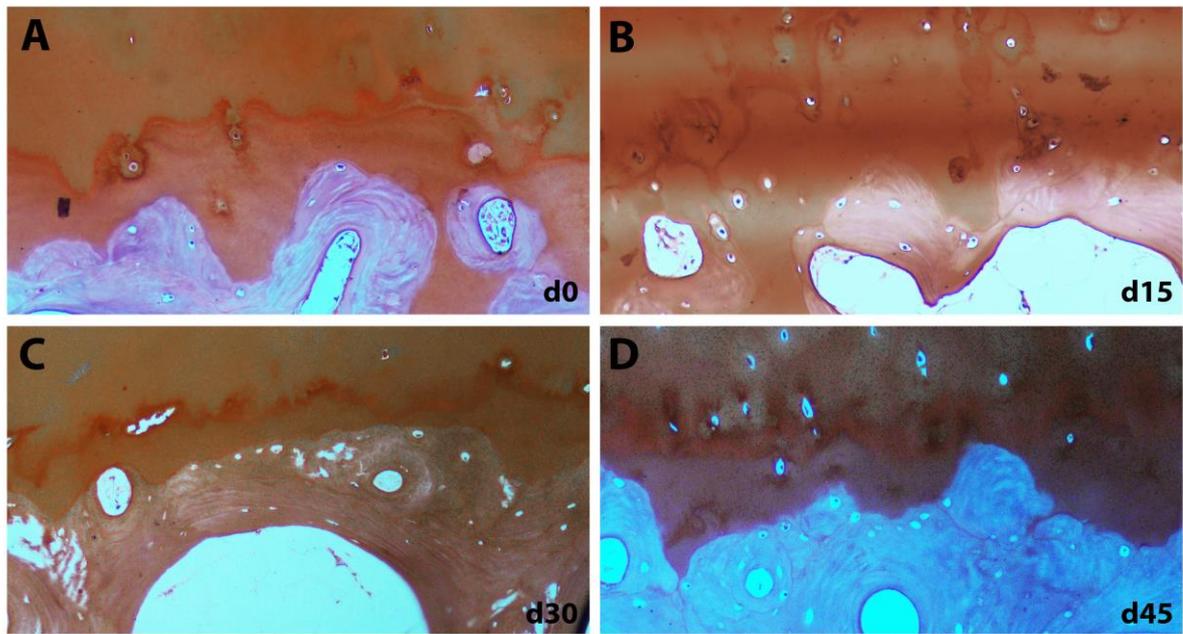


Figura 19. Fotomicrografia da camada de cartilagem da camada profunda preservada a 4°C corada com SO. Corte histológico corados com SO de fragmento osteocondral obtido no dia da captação do tecido (A), corte histológico de fragmento osteocondral após 15 dias de preservação, d15 (B), corte histológico de fragmento osteocondral após 30 dias de preservação, d30 (C) e corte histológico de fragmento osteocondral após 45 dias de preservação, d45 (D)

5.3 Resultado dos escores histológicos

Os resultados das avaliações realizadas pelos dois examinadores são apresentados na **tabela 9**.

Tabela 9. Resultado das avaliações realizadas pelos dois examinadores com os escores de Mankin e OARSI.

Doador cadáver	Dias de preservação	Escore Mankin ex 1	Escore Mankin ex 2	AORSI ex 1	AORSI ex 2
DC 331	0	1	1	0	0
	15	2	2	I	II
	30	2	2	II	0
	45	2	1	I	0
DC 373	0	3	2	0	0
	15	3	2	I	I
	30	4	2	II	II
	45	5	0	0	0
DC 273	0	0	1	0	II
	15	3	0	II	0
	30	5	2	III	II
	45	2	1	I	II
DC 386	0	1	0	0	0
	15	2	0	I	0
	30	3	0	II	0
	45	0	2	I	III
DC 388	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	15	2	0	0	0
	30	5	2	II	II
	45	3	0	I	0

DC (doador cadáver), N/A (não avaliado), ex (examinador).

A distribuição de frequências dos resultados obtidos segundo o escore de Mankin é apresentada na **figura 20**. A maior pontuação obtida foi de 5 pontos, independente do período analisado. Após 15 dias de preservação 100% das lâminas avaliadas obtiveram até 3 pontos entre os 14 pontos possíveis. Após 45 dias de preservação os resultados foram semelhantes com 90% das lâminas avaliadas somando a pontuação até 3.

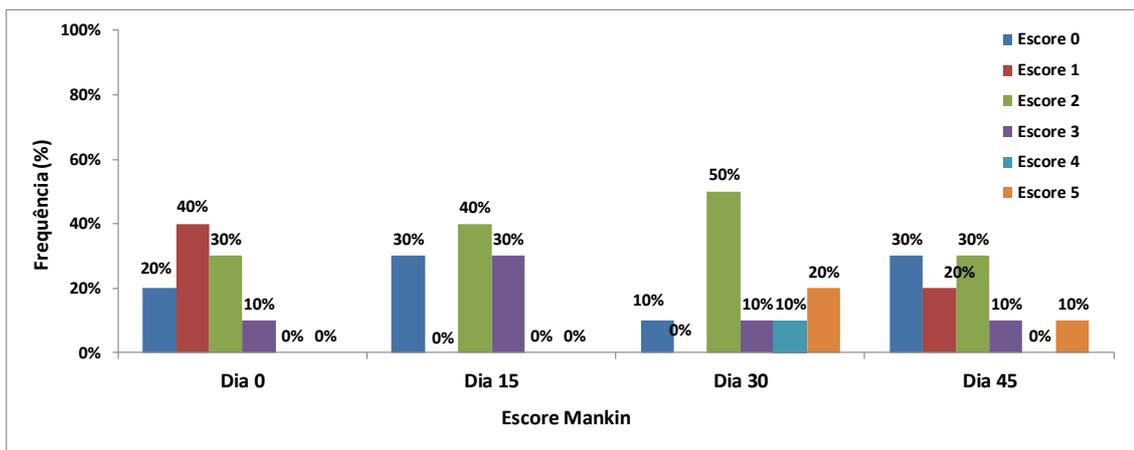


Figura 20. Frequências dos resultados segundo o escore histológico de Mankin. A pontuação máxima obtida no escore de Mankin foi de 5 pontos.

Os resultados dos valores máximos e mínimos obtidos na avaliação histológica segundo o escore de Mankin são apresentados na **tabela 10**. Com 30 dias de preservação, as amostras tiveram diferença com significância estatística em relação ao tecido preservado por 15 dias, evidenciando piora na qualidade do tecido osteocondral segundo os critérios utilizados pelo escore de Mankin.

Tabela 10. Resultados da pontuação obtida segundo escore de Mankin.

Escore Mankin	d0	d15	d30	d45
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	3	3	5	5
Mediana	1	2	2	1,5
p-valor do teste de Wilcoxon*	-	0,380	0,040	0,072

Segundo os critérios avaliados pelo escore de Mankin, houve diferença com significância estatística entre 15 e 30 dias de preservação dos fragmentos osteocondrais ($p < 0,05$).*

A distribuição de frequências obtidas segundo o escore da OARSI é apresentado na **figura 21**. No período definido como d0, 30% das amostras avaliadas apresentaram alterações histológicas mesmo antes das amostras serem submetidas a preservação a 4°C. As alterações descritas foram restritas a camada superficial da cartilagem articular, sobretudo a diminuição da concentração de proteoglicanos. Com

15 dias de preservação, 80% das amostras foram classificadas como tipo 0 ou 1, contendo apenas alterações superficiais no tecido. Com 30 dias de preservação, 70% das amostras foram classificadas como tipo 2, contendo alterações estruturais na camada superficial, assim como diminuição na concentração de proteoglicanos. Nenhuma amostra de tecido analisada apresentou alterações relacionadas à degeneração da cartilagem articular, classificadas como tipo 4, 5 ou 6 segundo o escore da OARSI.

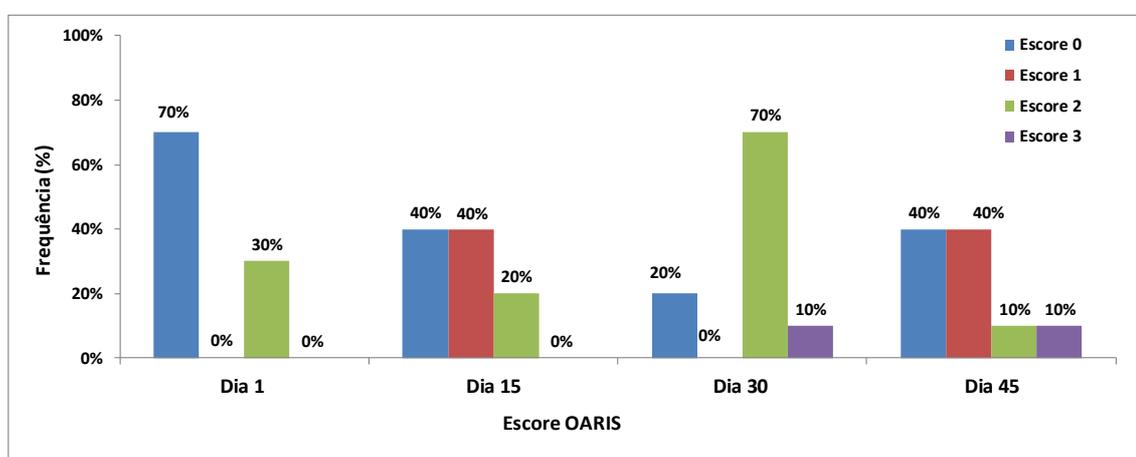


Figura 21. Frequência de resultados obtidos através do escore da OARSI. OARSI (*OsteoArthritis Research Society International*)

Segundo a avaliação histológica avaliada pelo escore da OARSI, não foram observadas variações com significância estatística entre os resultados obtidos nos diferentes períodos de avaliação do tecido osteocondral (**Tabela 11**).

Tabela 11. Resultado dos valores obtidos na avaliação histológica segundo o escore da OARSI.

Escore OARSI	d0	d15	d30	d45
Mínimo	0	0	0	0
Máximo	2	2	3	3
Mediana	0	1	2	1
p-valor do teste de Wilcoxon*	-	0,855	0,068	0,154

Não foi identificada diferença com significância estatística entre as mostras avaliadas pelo escore da OARSI ($p < 0,05$).*

O protocolo operacional padrão (POP) para a captação, transporte e preservação de tecido osteocondral humano foi elaborado ao final da pesquisa (**ANEXO F**). Após a definição do POP, foi realizado pelo grupo de cirurgia do joelho um caso de transplante osteocondral a fresco no INTO utilizando FO captado conforme o protocolo preconizado neste estudo (**Figura 22**).

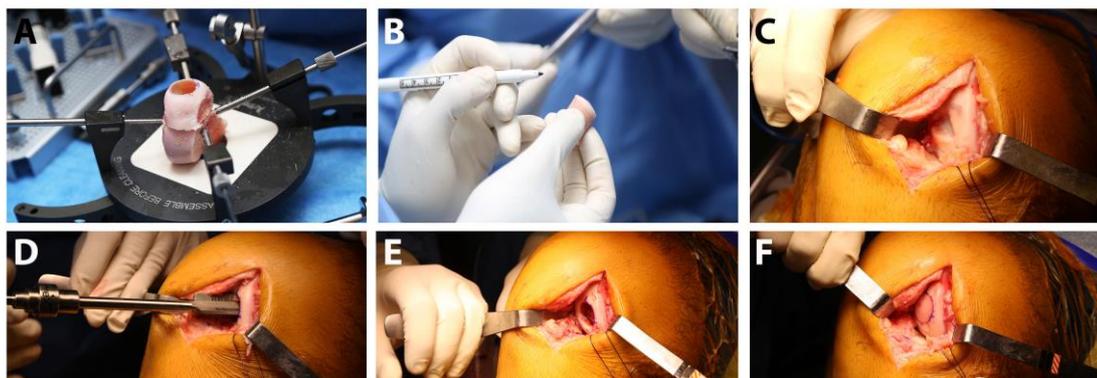


Figura 22. Etapas do primeiro transplante osteocondral a fresco realizado no INTO pelo grupo de cirurgia do joelho. Condilo femoral fixado com auxílio de equipamento cirúrgico para confecção de cilindro para transplante osteocondral (A). Cilindro de tecido osteocondral pronto para transplante (B). Lesão osteocondral em condilo lateral do joelho esquerdo (C). Trefina realizando a regularização da lesão em bordos circulares retirando todo tecido cartilaginoso danificado (D). Área receptora do transplante osteocondral (E). Aspecto final após o transplante osteocondral no joelho (F). (Arquivo pessoal)

6. Discussão

Nosso protocolo inicial de captação foi caracterizado pela retirada de tecido osteocondral de acordo com a solicitação prévia do cirurgião, embalando o tecido em meio Iscove's® logo após a captação. Entretanto essa metodologia foi associada a um alto custo, tornando o método inviável economicamente. Por fim, optamos pela utilização de RL por este estar disponível em todos os hospitais da rede pública, tendo também um baixo custo. O tempo médio entre o óbito do doador e o início do processamento do tecido foi considerado longo por nosso grupo, entretanto a logística relacionada à doação de tecido mustiesquelético torna essa variável de difícil controle.

O tratamento das lesões osteocondrais sintomáticas permanece um desafio ao cirurgião ortopédico (FARR *et al.* 2011). Entretanto a técnica de TOA representa um método capaz de restaurar lesões com cartilagem hialina típica mesmo na presença de perda óssea associada. O TOA está relacionado a melhora da dor articular após médio e longo seguimento (GROSS, SHASHA, AUBIN 2005; MCCULLOCH *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2007; RAZ *et al.*, 2014; DE CARO *et al.*, 2015). Recentemente a primeira série de casos referente ao TOA no Brasil foi realizada pelo grupo de cirurgia do joelho do Hospital das Clínicas da faculdade de medicina de São Paulo (TIRÍCO *et al.*, 2017). Os autores realizaram o procedimento em 8 pacientes mantendo o seguimento pelo período de 2 anos. O tecido foi preservado na temperatura de 4°C. O meio de preservação utilizado em meio DMEM modificado (Ham F-12 - GIBCO com glutamax®). Não foram apresentadas pelo grupo alterações histológicas relacionadas a metodologia de preservação do tecido osteocondral. Segundo o grupo, não houveram casos de falha por infecção ou colapso do enxerto e todos os pacientes apresentaram melhora funcional após o período de avaliação.

A preservação de tecido osteocondral a 37°C (temperatura corpórea) ou 25°C (temperatura de sala) mantém os condrócitos em temperatura próxima da fisiológica. Estudos comparativos demonstraram melhores resultados quanto à viabilidade celular quando estas temperaturas foram comparadas à temperatura de 4°C (PENNOCK *et al.*, 2006; PALLANTE *et al.*, 2009; COOK *et al.*, 2014; JIANHONG *et al.*, 2016). Entretanto a heterogeneidade dos meios de preservação e das metodologias de avaliação dificultam a padronização destas temperaturas para preservação de tecido osteocondral humano. A escassez de doadores de tecido multiesquelético no Brasil inviabiliza possíveis perdas relacionadas ao risco aumentado de contaminação bacteriana com a preservação de tecido osteocondral em temperatura corpórea. A preservação a 4°C é a mais utilizada na literatura, sendo considerada o padrão ouro para o armazenamento de tecido osteocondral humano (MALININ, 2006; BAE *et al.*, 2009; BIAN *et al.*, 2010; LINN *et al.*, 2011; ONUMA *et al.*, 2012; SCHMIDT *et al.*, 2017). Nosso grupo seguiu o padrão da literatura, utilizando a temperatura de 4°C para preservação dos FO analisados.

As primeiras pesquisas realizadas para avaliação da viabilidade de FO foram descritas utilizando SFB e MCCA como meios de preservação tecidual. Os melhores resultados foram descritos com o uso de MCCA quando comparado ao SFB (WILLIAMS *et al.*, 2003; PENNOCK *et al.*, 2006). O uso de SFB está associado ao risco de transmissão de doenças limitando seu uso na preservação de tecido osteocondral humano (MALININ *et al.*, 2006). O método de preservação de tecido osteocondral fica à critério de cada BTM. A não divulgação dos meios e suplementos utilizados por cada banco limita a avaliação comparativa dos métodos empregados quanto a preservação tecidual. Os MCCA podem ser suplementados ou não com: albumina humana, SFB, aminoácidos e antibióticos. Optamos pela utilização do meio

Iscove's® tendo em vista os resultados de um estudo prévio realizado pelo nosso grupo (SOUSA *et al.*, 2015) e sua semelhança com outros MCCS avaliados por outros pesquisadores. Agentes adjuvantes como insulina humana, inibidor do *Transforming growth factor beta* (TFG β), inibidores de proteínas caspases, glicocorticoide e ácido hialurônico foram avaliados experimentalmente por estudos isolados e estão associados ao aumento no custo da preservação do tecido osteocondral, sem comprovado benefício no aumento da viabilidade celular no momento do transplante (TENG *et al.*, 2008; LINN *et al.*, 2011; GARRITY *et al.*, 2012; ONUMA *et al.* 2012; YAMADA *et al.* 2015). Visando elaborar um protocolo reprodutível em outros BTM nacionais e baseado nos resultados descritos na literatura, nosso grupo manteve o tecido preservado em meio Iscove's® suplementado com albumina humana. A solução antibiótica para prevenção de contaminação bacteriana após o transplante osteocondral à fresco não é padronizada na literatura (RAZ *et al.*, 2014; GRACITELLI *et al.*, 2015 B; ZOUZIAS e BUGBEE 2016; TIRÍCO *et al.*, 2017). Nosso grupo optou pelo uso de vancomicina buscando a cobertura de bactérias gram positivas prevalentes no tecido cutâneo humano, cobrindo ainda possíveis bactérias resistentes à metilina.

A troca constante do meio de preservação celular foi avaliada em estudos prévios. Acredita-se que haja um consumo dos nutrientes presentes no meio durante a preservação do tecido, sendo sua troca associada à renovação dos mesmos favorecendo a sobrevivência celular durante o armazenamento (JIANHONG *et al.* 2016). Entretanto os resultados descritos são controversos e os gastos associados a troca constante do meio de preservação não são citados pelos autores (WILLIAMS *et al.* 2004; BALL *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2005; LINN *et al.*, 2011). Nosso grupo optou

por não realizar a troca do meio de preservação devido ao risco de contaminação do tecido e aumento no custo do procedimento.

A análise histológica da cartilagem articular foi primeiramente descrita por Henry Mankin em 1971 (Mankin *et al.* 1971) Os autores avaliaram FO da superfície articular de humanos, em sua maioria com doença degenerativa, utilizando quatro parâmetros de avaliação: estrutura da cartilagem, celularidade, integridade da linha de transição entre o osso subcondral e a concentração de proteoglicanos nas camadas da cartilagem articular. Utilizamos o escore de Mankin por ser este o mais utilizado em pesquisas de avaliação histológica do tecido osteocondral (WILLIAMS *et al.* 2005; MALININ *et al.*, 2006; PALLANTE *et al.*, 2012; PAULI *et al.*, 2012; YAMADA *et al.*, 2015). O escore histológico descrito pela OARSI foi selecionado por acreditarmos ser de fácil aplicabilidade e buscar alterações estruturais semelhantes as que foram encontradas nas amostras iniciais dos FO avaliados. A elaboração do escore foi baseada em cinco princípios definidos como ideais pela OARSI: simplicidade, utilidade, comparabilidade, escalonamento e capacidade de ser estendido a outros métodos de avaliação histológica (PRITZKER *et al.*, 2006).

A aplicabilidade e a reprodutibilidade dos escores de Mankin e da OARSI foi avaliada por estudos histológicos com FO de origem animal e humana, comprovando adequada variação inter e intraobservadores (CUSTERS *et al.*, 2007; PEARSON *et al.*, 2011; ROUT *et al.*, 2011; PAULI *et al.*, 2012; WALDSTEIN *et al.*, 2016). Lâminas de FO coradas em SO foram analisados por 3 examinadores, segundo o escore de Mankin e o escore da OARSI. As amostras foram revistas com intervalo de 1 semana para identificar as variações intra-observadores. A pesquisa concluiu que ambos os escores possuem boa aplicabilidade e reprodutibilidade para avaliação histológica da cartilagem articular (CUSTERS *et al.*, 2007). Fragmentos osteocondrais humanos

foram retirados no momento da realização do procedimento de ATJ para avaliar a correlação entre o escore descrito pela OARSI e alterações biomecânicas produzidas em laboratório. Foram aplicadas forças compressivas pontuais de 20g na frequência de 5 gramas / segundo durante 1 hora. Como grupo comparativo, o escore de Mankin foi utilizado na pesquisa. As variações intra-observadores foram de 0,955 para o escore de Mankin e 0,919 com o escore da OARSI. Os autores confirmaram a excelente associação entre ambos. Segundo os autores, os critérios de avaliação descritos pelo escore da OARSI possuem correlação com as alterações biomecânicas relacionadas ao processo de degeneração articular (WALDSTEIN *et al.*, 2016). A ausência de um escore descrito para a avaliação de tecido osteocondral humano representou uma dificuldade em nossa pesquisa, podendo ser um viés do estudo. Com isso, pretendemos elaborar uma metodologia própria para avaliação de tecido osteocondral humano preservado a 4°C.

A avaliação histológica utilizando lâminas coradas com H&E demonstrou a preservação das camadas da cartilagem articular retiradas no dia da captação do tecido (d 0), sendo estas definidas como grupo controle. Após 30 dias de preservação, houveram alterações na camada superficial do tecido, demonstrando que esta região está sujeita a alterações relacionadas ao tempo de preservação. A integridade da porção superficial do tecido cartilaginoso é de suma importância para absorção e distribuição de carga. Lesões na camada de cartilagem superficial estão relacionadas à alteração na permeabilidade do tecido, favorecendo a penetração de líquido sinovial e o início do processo de degeneração articular (MCCULLOCH *et al.*, 2017). As camadas de cartilagem intermediária, profunda e de cartilagem calcificada não se alteraram durante o período avaliado. Tal achado descreve um padrão típico de lesão relacionada à preservação de tecido osteocondral humano, onde apenas a camada

superficial da cartilagem apresentou alterações estruturais, como descontinuidades e delaminações. As alterações histológicas encontradas diferem das descritas em amostras de tecido cartilaginoso em pacientes com degeneração articular (PRITZKER *et al.*, 2006).

A avaliação visual das lâminas coradas com SO demonstrou diminuição gradual na concentração de proteoglicanos na MEC com o aumento no tempo de preservação nas amostras estudadas. Em 30% das amostras estudadas houve diminuição na concentração de proteoglicanos na camada superficial do tecido logo após a captação (d 0). Tal achado sugere que alterações no metabolismo dos condrócitos possam existir mesmo em pacientes fisiologicamente jovens, sem lesões descritas na cartilagem articular. Com 30 dias de preservação, todas as amostras analisadas apresentaram diminuição na concentração de proteoglicanos na camada superficial. As demais camadas da cartilagem articular tiveram sua concentração de proteoglicanos preservada após todo período de avaliação (45 dias). Sendo os componentes da MEC sintetizados pelos condrócitos, tal achado representa uma forma de avaliação indireta da atividade celular do tecido osteocondral humano por serem estes os responsáveis pela síntese dos componentes presentes na MEC. Nossos resultados confirmam a necessidade de transplante do tecido osteocondral com menor tempo possível de preservação.

Diversos métodos são descritos para avaliação da viabilidade celular dos condrócitos preservados *in vitro* ou *in vivo* (COOKE *et al.*, 2014; YAMADA *et al.*, 2015; JIANHONG *et al.*, 2016). Cada laboratório possui seu protocolo de avaliação dificultando a conclusão quanto aos resultados descritos na literatura. A morte celular relacionada à preservação tecidual parece ser predominantemente pela via de morte celular programada (KIM *et al.*, 2008). Não há consenso na literatura sobre o método

específico de morte celular dos condrócitos submetidos à preservação à fresco, sendo questionáveis as metodologias descritas para avaliação da viabilidade celular em fragmentos de tecido osteocondral.

Nosso trabalho apresentou algumas limitações. Primeiro, não foi realizada análise quantitativa de viabilidade celular do tecido estudado. Segundo a metodologia de avaliação histológica utilizada foi elaborada a partir de escores criados para estudo de tecido cartilaginoso com alterações degenerativas. Não há na literatura um escore histológico para avaliação de tecido osteocondral humano cadavérico. Nossa pesquisa não contou com médicos patologistas para a análise histológica do tecido. A ausência de políticas públicas que estimulem a doação de tecidos está relacionada ao baixo número de doadores de tecido musculoesquelético tendo como consequência o número baixo de doadores cadáver em nosso estudo. Por fim, os dados gerados são de natureza qualitativa, podendo estes estarem sujeitos a variações interobservadores.

Com a definição do protocolo de captação, transporte e preservação de tecido osteocondral humano, a perspectiva é que seja realizada uma série de casos de TOA em pacientes com lesões osteocondrais sintomáticas em nossa instituição.

7. Conclusões

- A preservação do tecido osteocondral a 4°C foi capaz de manter as características estruturais das camadas da cartilagem articular até 15 dias de armazenamento em meio de cultura celular sem suplementação com soro.

- Após 15 dias de preservação tecidual a 4°C evidenciam-se alterações estruturais na camada superficial da cartilagem articular hialina.
- A metodologia elaborada para captação do tecido osteocondral humano foi capaz de garantir a chegada do mesmo sem que houvesse contaminação do tecido.
- O método de transporte do tecido osteocondral manteve o mesmo em temperatura adequada (4/10°C) até o início do processo de processamento tecidual.

Referências

ALFORD, J. W., & COLE, B. J. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. **The American journal of sports medicine**, v. 33, n. 2, p. 295-306, fev. 2005.

ALFORD, J. W, COLE, B. J. Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions. **The American journal of sports medicine**, v. 33, n. 3, p. 443-460, mar. 2005.

ÅRØEN, A., LØKEN, S., HEIR, S., ALVIK, E., EKELAND, A., GRANLUND, O. G., & ENGBRETSSEN, Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. **The American journal of sports medicine**, v. 32, n. 1, p. 211-215, jan. 2004.

ASSENMACHER, A. T., PAREEK, A., REARDON, P. J., MACALENA, J. A., STUART, M. J., & KRYCH, A. J. Long-term Outcomes After Osteochondral Allograft: A Systematic Review at Long-term Follow-up of 12.3 Years. **Arthroscopy**, v. 32, n. 10, p. 2160-2168, out. 2016.

BAE JY, MATSUMURA K, WAKITANI S, KAWAGUCHI A, TSUTSUMI S, HYONSH JUNG Y. Beneficial storage effects of epigallocatechin-3-o-gallate on the articular cartilage of rabbit osteochondral allografts. **Cell transplantation**, v. 18, n. 5-6, p. 505-512, 2009.

BALL, S. T., AMIEL, D., WILLIAMS, S. K., TONTZ, W., CHEN, A. C., SAH, R. L., & BUGBEE, W. D. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 418, p. 246-252, jan. 2004.

BALTZER, A. W. A., OSTAPCZUK, M. S., TERHEIDEN, H. P., & MERK, H. R. Good short-to medium-term results after osteochondral autograft transplantation in middle-aged patients with focal, non-traumatic osteochondral lesions of the knee. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 102, n. 7, p. 879-884, nov. 2016.

BARTLETT, W., SKINNER, J. A., GOODING, C. R., CARRINGTON, R. W. J., FLANAGAN, A. M., BRIGGS, T. W. R., & BENTLEY, G. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee. **Bone & Joint Journal**, v. 87, n. 5, p. 640-645, mai. 2005.

BENTLEY G, BIANI L.C., CARRINGTON R.W. A prospective, randomized comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. **J Bone Joint Surg Br**, v. 85, n. 2, p. 223-230, mar. 2003.

BIAN L, STOKER AM, MARBERRY KM, ATESHIAN GA, COOK JL, HUNG CT. Effects of dexamethasone on the functional properties of cartilage explants during long-term culture. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 1, p. 78-85, jan. 2010.

BRITTBERG, M., LINDAHL, A., NILSSON, A., OHLSSON, C., ISAKSSON, O., & PETERSON, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 14, p. 889-895, out. 1994.

BRITTBERG M., WINALSKI C.S. Evaluation of cartilage injuries and repair. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, n. suppl_2, p. 58-69, 2003.

BRITTBERG, M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: a review of the matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 6, p. 1259-1271, jun. 2010.

CAMPBELL, A. B., PINEDA, M., HARRIS, J. D., & FLANIGAN, D. C. Return to sport after articular cartilage repair in athletes' knees: a systematic review. **The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 32, n. 4, p. 651-668, abr. 2016.

COOK, J. L., STOKER, A. M., STANNARD, J. P., KUROKI, K., COOK, C. R., PFEIFFER, F. M., & HUNG, C. T. A novel system improves preservation of osteochondral allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 472, n. 11, p. 3404-3414, nov. 2014.

COOK, J. L., STANNARD, J. P., STOKER, A. M., BOZYNSKI, C. C., KUROKI, K., COOK, C. R., & PFEIFFER, F. M. Importance of donor chondrocyte viability for osteochondral allografts. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 5, p. 1260-1268, mai. 2016.

CURL, W. W., KROME, J., GORDON, E. S., RUSHING, J., SMITH, B. P., & POEHLING, G. G. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. **The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 13, n. 4, p. 456-460, ago. 1997.

CUSTERS, R. J. H., CREEMERS, L. B., VERBOUT, A. J., VAN RIJEN, M. H. P., DHERT, W. J. A., & SARIS, D. B. F. Reliability, reproducibility and variability of the traditional histologic/histochemical grading system vs the new OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 11, p. 1241-1248, nov. 2007.

DE CARO, F., BISICCHIA, S., AMENDOLA, A., & DING, L. Large fresh osteochondral allografts of the knee: a systematic clinical and basic science review of the literature. **The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 31, n. 4, p. 757-765, abr. 2015.

DHOLLANDER, A., VERDONK, P., TIRICO, L. E. P., & GOMOLL, A. H. Treatment of failed cartilage repair: State of the Art. **Journal of ISAKOS: Joint Disorders & Orthopaedic Sports Medicine**, p. jisakos-2016-000057, out. 2016.

DONTCHOS, B. N., COYLE, C. H., IZZO, N. J., DIDIANO, D. M., KARPIE, J. C., LOGAR, A., & CHU, C. R. Optimizing CO2 normalizes pH and enhances chondrocyte viability during cold storage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 5, p. 643-650, mai. 2008.

EMMERSON, B. C., GÖRTZ, S., JAMALI, A. A., CHUNG, C., AMIEL, D., & BUGBEE, W. D. Fresh osteochondral allografting in the treatment of osteochondritis dissecans of the femoral condyle. **The American journal of sports medicine**, v. 35, n. 6, p. 907-914, jun. 2007.

FARR J. Autologous chondrocyte implantation improves patellofemoral cartilage treatment outcomes. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 463, p. 187-194, out. 2007.

FARR, J., COLE, B., DHAWAN, A., KERCHER, J., & SHERMAN, S. Clinical cartilage restoration: evolution and overview. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 10, p. 2696-2705, out. 2011.

GARRITY JT, STOKER AM, SIMS HJ, COOK JL. Improved osteochondral allograft preservation using serum-free media at body temperature. **Am J Sports Med**, v. 469, n. 10, p. 2696-2705, nov. 2011.

GRACITELLI, G. C., MERIC, G., PULIDO, P. A., GÖRTZ, S., DE YOUNG, A. J., BUGBEE, W. D. Fresh osteochondral allograft transplantation for isolated patellar cartilage injury. **The American journal of sports medicine**, v. 43, n. 4, p. 879-884, abr. 2015. A.

GRACITELLI G. C., MERIC G., PULIDO P. A., MCCAULEY J. C., BUGBEE, W. D. Osteochondral Allograft Transplantation for Knee Lesions after Failure of Cartilage Repair Surgery **Cartilage**, v. 6, n. 2, p. 98-105, abr. 2015. B.

GRACITELLI G.C., MORAES V.Y., FRANCIOZI C.E.S., LUZO M.V., BELLOTI J.C. Surgical interventions (microfracture, drilling, mosaicplasty, and allograft transplantation) for treating isolated cartilage defects of the knee in adults. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 9, set. 2013.

GROSS AE, SILVERSTEIN EA, FALK J, FALK R, LANGER F. The allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee. **Clin Orthop Relat Res**, n. 108, p. 7-14, jun. 1975.

GROSS, A. E. Cartilage resurfacing: filling defects. **The Journal of arthroplasty**, v. 18, n. 3, p. 14-17, abr. 2003.

GROSS, A. E., KIM, W., LAS HERAS, F., BACKSTEIN, D., SAFIR, O., & PRITZKER, K. P. H. Fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects: long-term followup. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 466, n. 8, p. 1863-1870,

ago. 2008.

HANGODY, LÁSZLÓ; FÜLES, PÉTER. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints. **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, p. 25-32, fev. 2003.

HARRYSSON, OLA LA; ROBERTSSON, OTTO; NAYFEH, JAMAL F. Higher cumulative revision rate of knee arthroplasties in younger patients with osteoarthritis. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 421, p. 162-168, abr. 2004.

HECKMANN, J. G., LANG, C. J. G., PETRUCH, F., DRUSCHKY, A., ERB, C., BROWN, P., & NEUNDÖRFER, B. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via a corneal transplant. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 63, n. 3, p. 388-390, set. 1997.

HIRSCHMANN, MICHAEL T.; MÜLLER, WERNER. Complex function of the knee joint: the current understanding of the knee. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 23, n. 10, p. 2780-2788, out. 2015.

JACKSON D. W., MARK J. SCH&EER, AND TIMOTHY M. SIMON, Cartilage Substitutes: Overview of Basic Science and Treatment Options. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 9, n. 1, p. 37-52, jan. 2001.

JARI, S.; SHELBOURNE, K. D.; TRAY, T. The outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: A 12-year Natural History Study. **Orthopaedic Proceedings**, V. 85, No. SUPP II, pp. 105-105, mar. 2003.

JIANHONG, QI., HU, Z., SONG, H., CHEN, B., XIE, D., ZHOU, L., & ZHANG, Y. Cartilage storage at 4° C with regular culture medium replacement benefits chondrocyte viability of osteochondral grafts in vitro. **Cell and tissue banking**, v. 17, n. 3, p. 473-479, set. 2016.

KEENEY, J. A., EUNICE, S., PASHO, G., WRIGHT, R. W., & CLOHISY, J. C. What is the evidence for total knee arthroplasty in young patients? : a systematic review of the literature. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 469, n. 2, p. 574-583, fev. 2011.

KELLGREN J.H., LAWRENCE J.S. Radiological assessment of osteoarthrosis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 16, n. 4, p. 494–502. dez. 1957

KIM, HUBERT T.; TENG, MARGIE S.; DANG, ALEXIS C. Chondrocyte apoptosis: implications for osteochondral allograft transplantation. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 466, n. 8, p. 1819-1825, ago. 2008.

KNUTSEN, G., DROGSET, J. O., ENGBRETSSEN, L., GRØNTVEDT, T., ISAKSEN, V., LUDVIGSEN, T. C., & JOHANSEN, O. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 89, n. 10, p. 2105-2112, out. 2007.

KRYCH, A. J., ROBERTSON, C. M., & WILLIAMS III, R. J. Return to athletic activity after osteochondral allograft transplantation in the knee. **The American journal of sports medicine**, v. 40 n. 5, p. 1053-1059, mai. 2012.

LAPRADE, R. F., BOTKER, J., HERZOG, M., & AGEL, J. Refrigerated osteoarticular allografts to treat articular cartilage defects of the femoral condyles. A prospective outcomes study. **The Journal of bone and joint surgery**, v. 91, n. 4, p. 805-811, abr. 2009.

LANG CJ, HECKMANN JG, NEUNDORFER B. Creutzfeldt-Jakob disease via dural and corneal transplants. **Journal of the neurological sciences**, v. 160, n. 2, p. 128-139, out. 1998.

LEWIS J.L., DELORIA L.B., OYEN-TIESMA M., THOMPSON R.C., ERICSON M., OEGEMA T.R. Jr. Cell death after cartilage impact occurs around matrix cracks. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 5, p. 881-887, set. 2003.

LINN MS, CHASE DC, HEALEY RM, HARWOOD FL, BUGBEE WD, AMIEL D. Etanercept enhances preservation of osteochondral allograft viability. **The American journal of sports medicine**, v. 39, n. 7, p. 1494-1499, jul. 2011.

LISIGNOLI, G., GRASSI, F., ZINI, N., TONEGUZZI, S., PIACENTINI, A., GUIDOLIN, D., & FACCHINI, A. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: Evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule) involvement. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1800-1807, ago. 2001.

MACCONAILL M.A. The movements of bones and joints: 4. The mechanical structure of articulating cartilage. **J Bone Joint Surg Br**, v. 33, p. 251-257, mai. 1951.

MAFFULLI N, BINFIELD P.M., KING J.B., GOOD C.J. Acute haemarthrosis of the knee in athletes: A prospective study of 106 cases. **J Bone Joint Surg Br**, v. 75, n. 6, p. 945-949, nov. 1993.

MAINIL-VARLET, P., AIGNER, T., BRITTEBERG, M., BULLOUGH, P., HOLLANDER, A., HUNZIKER, E., & STAUFFER, E. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). **J Bone Joint Surg Am**, v. 85, p. 45-57, jan. 2003.

MAINIL-VARLET, P. A validated histological score for human cartilage biopsies in clinical trial. Presentation. **In 7th World Congress of the International Cartilage Repair Society, Warsaw, Poland. 2007**

MALININ T, TEMPLE HT, BUCK BE. Transplantation of osteochondral allografts after cold storage. **J Bone Joint Surg Am**, v. 88, n. 4, p. 762-770, abr. 2006.

MANKIN H J, DORFMAN H, LIPPIELLO L, ZARINS A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **J Bone Joint Surg Am**, v. 5, p. 523-37, abr. 1971

MICHELI, L. J., BROWNE, J. E., ERGGELET, C., FU, F., MANDELBAUM, B., MOSELEY, J. B., & ZURAKOWSKI, D. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v. 11 n. 4, 223-228, out. 2001.

MILENTIJEVIC D., TORZILLI P.A. Influence of stress rate on water loss, matrix deformation and chondrocyte viability in impacted articular cartilage. **J Biomech**, v. 38, n. 3, p. 493-502, mar. 2005.

MINAS, T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 391, p. S349-S361, jun. 2001.

MITHOEFER, K., WILLIAMS, R. J., WARREN, R. F., POTTER, H. G., SPOCK, C. R., JONES, E. C., AND MARX, R. G. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. **J Bone Joint Surg Am**, v. 87, n. 9, p. 1911-1920, set. 2005.

NIEMEYER, P., PESTKA, J. M., KREUZ, P. C., ERGGELET, C., SCHMAL, H., SUEDEKAMP, N. P., & STEINWACHS, M. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. **The American journal of sports medicine**, v. 36, n. 11, p. 2091-2099, set. 2008.

O'DRISCOLL SW, KEELEY FW, SALTER RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. **J Bone Joint Surg Am**, v. 70, n. 4, p. 595-606, abr. 1988.

ONUMA, K., URABE, K., NARUSE, K., UCHIDA, K., & ITOMAN, M. Allogenic serum improves cold preservation of osteochondral allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. 2012, 470(10), 2905-2914.

ORTH P., MD, L. GOEBEL, U WOLFRAM, PHD, M. F. ONG, PHD, S. GRABER, PHD, D. KOHN, MD, M. CUCCHIARINI, PHD, A. IGNATIUS, DVM, D. PAPE, MD, H. MADRY, MD. Effect of Subchondral Drilling on the Microarchitecture of Subchondral **Bone Am J Sports Med**, v. 40, n. 4, p. 828-836, abr. 2012.

OUTERBRIDGE, R. E. The etiology of chondromalacia patellae. **J Bone Joint Surg Br**, v. 43, n. 4, p. 752-757, nov. 1961.

OZAWA, M., NISHIDA, K., YOSHIDA, A., SAITO, T., HARADA, R., MACHIDA, T., & OZAKI, T. Hyaluronan suppresses mechanical stress-induced expression of catabolic enzymes by human chondrocytes via inhibition of IL-1 β production and subsequent NF- κ B activation. **Inflammation Research**, v. 64, n. 3-4, p. 243-252, abr. 2015.

PALLANTE A.L.; BAE W.C.; CHEN A.C. Chondrocyte viability is higher after prolonged storage at 37°C than at 4°C for osteochondral grafts. **The American journal of sports medicine**, v. 37, n. 1_suppl, p. 24-32, nov. 2009.

PALLANTE A.L.; CHEN A.C.; BALL S.T.; AMIEL D.; MASUDA K.; SAH R.L.; BUGBEE W.D. The in vivo performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity. **The American journal of sports medicine**, v. 40, n. 8, p. 1814-1823, ago. 2012.

PAULI, C., WHITESIDE, R., HERAS, F. L., NESIC, D., KOZIOL, J., GROGAN, S. P., & LOTZ, M. K. Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 20, n. 6, p. 476-485, jun. 2012.

PEARSALL, A. W., TUCKER, J. A., HESTER, R. B., & HEITMAN, R. J. Chondrocyte viability in refrigerated osteochondral allografts used for transplantation within the knee. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 32, n. 1, p. 125-131, jan. 2004.

PEARSON RG, KURIEN T, SHU KS, SCAMMELL BE. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis: reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 19, n. 3, p. 324-331, mar. 2011.

PENNOCK AT, WAGNER F, ROBERTSON CM, HARWOOD FL, BUGBEE WD, AMIEL D. Prolonged storage of osteochondral allografts: does the addition of fetal bovine serum improve chondrocyte viability? **J Knee Surg**, v. 19, n. 04, p. 265-272, out. 2006.

PETERSON L., BRITTBERG M., KIVIRANTA I., AKERLUND E.L., LINDAHL A. Autologous chondrocyte transplantation: biomechanics and long-term durability. **Am J Sports Med**, v. 30, n. 1, p. 2-12, jan. 2002.

PETERSON, L., VASILADIS, H. S., BRITTBERG, M., & LINDAHL, A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. **The American journal of sports medicine**, v. 38, n. 6, p. 1117-1124, jun. 2010.

PRITZKER, K. P. H., GAY, S., JIMENEZ, S. A., OSTERGAARD, K., PELLETIER, J. P., REVELL, P. A., & VAN DEN BERG, W. B. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 14, n. 1, p. 13-29, jan. 2006.

RAZ G, SAFIR OA, BACKSTEIN DJ, LEE PT, GROSS AE. Distal femoral fresh osteochondral allografts: Follow-up at a mean of twenty-two years. **J Bone Joint Surg Am**, v. 96, n. 13, p. 1101-1107, jul. 2014.

RICHTER, D. L., SCHENCK JR, R. C., WASCHER, D. C., & TREME, G. Knee articular cartilage repair and restoration techniques: a review of the literature. **Sports Health**, v. 8, n. 2, p. 153-160, mar. 2016.

RODRÍGUES-MERCHÁN, E. C., & GÓMEZ-CARDERO, P. The outerbridge classification predicts the need for patellar resurfacing in TKA. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 468, n. 5, p. 1254-1257, out. 2010.

ROUT R, McDONNELL S, BENSON R, ATHANASOU N, CARR A, DOLL H. The histological features of anteromedial gonarthrosis: the comparison of two grading systems in a human phenotype of osteoarthritis. **The Knee**, v. 18, n. 3, p. 172-176, jun. 2011.

SADR, K. N., PULIDO, P. A., MCCAULEY, J. C., BUGBEE, W. D. Osteochondral Allograft Transplantation in Patients With Osteochondritis Dissecans of the Knee. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 11, p. 2870-2875, nov. 2016.

SAFRAN, MARC R.; SEIBER, KENNETH. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**. v. 18, n. 5, p. 259-266, mai. 2010.

SCHMIDT, K. J., TÍRICO, L. E., MCCAULEY, J. C., & BUGBEE, W. D. Fresh Osteochondral Allograft Transplantation: Is Graft Storage Time Associated With Clinical Outcomes and Graft Survivorship? **The American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 10, p. 2260-2266, ago. 2017.

SETH L. SHERMAN, MD JOSEPH GARRITY, MS KATHRYN BAUER JAMES COOK, DVM, PHD JAMES STANNARD, MD WILLIAM BUGBEE, MD. Fresh Osteochondral Allograft Transplantation for the Knee: Current Concepts. **J Am Acad Orthop Surg**. 2014;22: 121-133.

SHERMAN, S. L., GARRITY, J., BAUER, K., COOK, J., STANNARD, J., & BUGBEE, W. Fresh osteochondral allograft transplantation for the knee: current concepts. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 22, n. 2, p. 121-133, fev. 2014.

SOPHIA FOX, ALICE J.; BEDI, ASHEESH; RODEO, SCOTT A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. **Sports health**, v. 1, n. 6, p. 461-468, nov. 2009.

SOUSA, E. B., AGUIAR, D. P., BARCELOS, J. F. M., DUARTE, M. E. L., & OLEJ, B. Approaches to preserve human osteochondral allografts. **Cell and tissue banking**, v. 16, n. 3, p. 425-431, set. 2015.

STEADMAN, J. R., RODKEY, W. G., SINGLETON, S. B., & BRIGGS, K. K. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. **Operative techniques in orthopaedics**, v. 7, n. 4, p. 300-304, out. 1997.

TENG, M. S., YUEN, A. S., & KIM, H. T. Enhancing osteochondral allograft viability: effects of storage media composition. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 466, n. 8, p. 1804-1809, ago. 2008.

TIRÍCO, L. E. P., DEMANGE, M. K., SANTOS, L. A. U., PÉRCORA, J. R., CROCI, A. T., & CAMANHO, G. L. Transplante osteocondral a fresco no joelho no Brasil: mínimo de dois anos de seguimento. **Revista brasileira de ortopedia**, v. 52, n. 1, p. 75-81, jan. 2017.

TYJNI A., KARLSSON J. Biological treatment of joint cartilage damage. **Scand J Med Sci Sports**, v. 10, n. 5, p. 249-265, out. 2000.

Waldstein, W., Perino, G., Gilbert, S. L., Maher, S. A., Windhager, R., & Boettner, F. OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system: a biomechanical evaluation in the human knee. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 34 n.1, p. 135-140, jan. 2016.

WILLIAMS S.K., AMIEL D., BALL S.T., ALLENI R.T., WONG V.W., CHENAC, S.A.H. R.L., BUGBEE W.D. Prolonged storage effects on the articular cartilage of fresh human osteochondral allografts. **J Bone Joint Surg**, v. 85, n. 11, p. 2111-2120, nov. 2003.

WILLIAMS RJ III, DREESE JC, CHEN CH Chondrocyte survival and material properties of hypothermically stored cartilage: an evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation. **The American journal of sports medicine**, v. 32, n. 1, p. 132-139, jan. 2004.

WILLIAMS J.M., VIRDI A.S., PYLAWKA T.K., EDWARDS R.B, MARKEL M.D, COLE B.J. Prolonged-fresh preservation of intact whole canine femoral condyles for the potential use as osteochondral allografts. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 4, p. 831-837, jul. 2005.

YAMADA, T., UCHIDA, K., ONUMA, K., INOUE, G., AIKAWA, J., TAKANO, S., & TAKASO, M. Hyaluronic Acid (800 kDa) Supplementation of University of Wisconsin Solution Improves Viability of Osteochondral Grafts and Reduces Matrix Metalloproteinase Expression during Cold Preservation. **The Scientific World Journal**, jun. 2015.

ZEDDE, P., CUDONI, S., GIACHETTI, G., MANUNTA, M. L., MASALA, G., BRUNETTI, A., & MANUNTA, A. F. Subchondral bone remodeling: comparing nanofracture with microfracture. An ovine in vivo study. **Joints**, v. 4, n. 2, p. 87, abr. 2016.

ZOUZIAS, I. C., & BUGBEE, W. D. Osteochondral Allograft Transplantation in the Knee. **Sports medicine and arthroscopy review**, v. 24, n. 2, p. 79-84, jun. 2016.

ANEXOS

ANEXO A – Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 220, DE 27 DE Dezembro de 2006.

Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana.

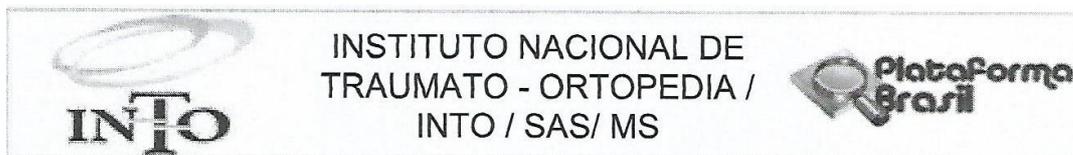
A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que IH&E confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 5 de dezembro de 2006, e considerando a competência atribuída a esta Agência, a teor do artigo 8º, § 1º, VII e VIII da lei nº. 9.782 de 26 de janeiro de 1999; considerando o disposto no § 4º do Art. 199 da Constituição Federal de 1988 que veda todo o tipo de comercialização de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento; considerando a necessidade de garantir que os tecidos Musculoesqueléticos e os tecidos cutâneos de procedência humana e seus derivados, a serem utilizados em procedimentos terapêuticos em humanos, sejam triados, retirados, avaliados, processados, armazenados, transportados e disponibilizados dentro de padrões técnicos e de qualidade que a complexidade do procedimento requer; considerando a necessidade de regulamentar o funcionamento de bancos de tecidos Musculoesqueléticos e de bancos de pele de origem humana, adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 4º Para fins de pesquisa e ensino, os BTME/BP poderão disponibilizar tecidos considerados impróprios para uso terapêutico bem como aqueles considerados próprios, desde que priorizadas as demandas com finalidade terapêutica.

§ 1º Os tecidos e seus derivados somente poderão ser disponibilizados para projetos de pesquisa previamente aprovados por comitê de ética em pesquisa, desde que respeitadas as legislações vigentes.

§ 2º Os tecidos considerados impróprios para uso terapêutico poderão ser disponibilizados para validação de processos.

ANEXO B – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de protocolos para a refrigeração e congelamento de fragmentos osteocondrais humanos.

Pesquisador: Thiago Alberto Vivacqua Ferreira da Costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45288015.7.0000.5273

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Traumatologia - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.114.004

Data da Relatoria: 27/05/2015

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto está adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão definidos adequadamente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos/benefícios são mínimos uma vez que os pacientes que fizeram todo o protocolo de doação de órgão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, pois os seus resultados poderão simplificar as formas de transporte e armazenamento de órgão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram definidos. Como forma de resguardar o autor seria interessante anexar ao projeto o protocolo de doação de órgão seguido para coleta dos tecidos.

Recomendações:

Anexar ao projeto o protocolo de doação de órgão.

Endereço: Avenida Brasil, nº 500

Bairro: São Cristóvão

CEP: 20.940-070

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2134-5000

Fax: (21)2134-5228

E-mail: cep.into@into.saude.gov.br

ANEXO C - PORTARIA Nº 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009

Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.

CAPÍTULO VI DA SELEÇÃO DE DOADORES FALECIDOS E POTENCIAIS RECEPTORES E DA DISTRIBUIÇÃO DE ÓRGÃOS, TECIDOS OU PARTES DO CORPO HUMANO

Art. 47. Todos os potenciais doadores falecidos de órgãos, tecidos, células ou partes do corpo deverão ser submetidos, antes da alocação dos enxertos, aos seguintes procedimentos, atendendo as normas de segurança para o receptor;

I - avaliação de situações de risco acrescida de informações do histórico de antecedentes pessoais e exame clínico.

II - avaliação de fatores de risco por meio de resultados positivos de exames sorológicos de triagem para:
a) doadores de córneas: HIV, HbsAg, AntiHBs, Anti-HBc total e Anti-HCV; e
b) doadores de órgãos, outros tecidos, células ou partes do corpo: HIV, HTLV I e II, HbsAg, AntiHBs, Anti-HBc total e Anti-HCV, sífilis, e doença de Chagas;

III - é facultativa a realização de exames sorológicos para toxoplasmose, citomegalovírus e Epstein-Barr, devendo ser sua realização, ou não, regulamentada pela respectiva CNCDO, e caso não sejam realizados, os órgãos e tecidos doados deverão ser acompanhados de amostra de sangue do doador que permita a pesquisa posterior, se necessária.

§ 1º serão critérios absolutos de exclusão de doador de órgãos, tecidos, células ou partes do corpo humano:

- a) soropositividade para HIV;
- b) soropositividade para HTLV I e II;
- c) tuberculose em atividade;
- d) neoplasias (exceto tumores primários do Sistema Nervoso Central e carcinoma in situ de útero e pele);
- e) sepse refratária; e
- f) infecções virais e fúngicas graves, ou potencialmente graves na presença de imunossupressão, exceto as H&Epatites B e C; e

§ 2º os critérios de exclusão e utilização de determinado órgão, tecido, célula ou parte do corpo estão descritos adiante, nos módulos específicos, e a expansão desses critérios, considerada caso a caso dentro dos ditames deste Regulamento, determinarão a oferta ou não destes enxertos.

Seção IX Módulo de Tecido Musculoesquelético

Art. 130. Serão aceitos para transplante de tecidos músculo esqueléticos pacientes com:

- I - alongamentos de membros/disparidade de membros;
- II - artrodese de coluna cervical torácica ou lombar;
- III - artrodese de pé;
- IV - artrodese de tornozelo;
- V - cirurgia corretiva de pé plano;
- VI - defeitos segmentares diafisários;
- VII - deformidades maxilar e/ou mandibular;
- VIII - focomelias;
- IX - fraturas articulares;
- X - fraturas complexas e cominutivas dos membros;
- XI - fraturas periprotéticas;
- XII - lesões ligamentares;
- XIII - osteotomias da pelve (displasias do desenvolvimento do quadril, sequelas PertH&Es legg calvet);
- XIV - pseudoartroses atróficas de ossos longos;
- XV - reconstruções ligamentares: talus fibulares manguito rotador reforço tendinoso do glúteo médio ligamento cruzado anterior de joelho, ligamento cruzado posterior de joelho;
- XVI - sequelas de artroplastias: de quadril que necessitem e revisão e/ou da reconstrução;
- XVII - sequelas de fraturas articulares;
- XVIII - sequelas de prótese de joelho que necessitem de revisão e/ou da reconstrução;
- XIX - sequelas de próteses de ombro que necessitem revisão e/ou reconstrução;
- XX - transplantes de meniscos;
- XXI - tumores ósseos benignos: enxertia simples; e tumores ósseos malignos: substituições segmentares ou osteoarticulares.

Art. 131. Os tecidos musculoesqueléticos somente serão disponibilizados para uso terapêutico se provenientes de Bancos autorizados pelo SNT/MS, com solicitação documentada do profissional transplantador autorizado pelo SNT, nos termos deste Regulamento, contendo:

- I. nome e demais informações sobre o receptor que permitam a rastreabilidade do tecido;
- II nome do profissional transplantador (nome completo, especialidade, endereço e telefone de contato),
- III características e quantidade de tecido;
- IV procedimento a ser realizado;
- V estabelecimento de saúde onde será realizado o procedimento; e
- VI data prevista para utilização do tecido.

Art. 132. A disponibilização do tecido deve ser acompanhada de instruções técnicas, com informações que complementem aquelas contidas no rótulo da unidade

de tecido disponibilizado, para a manutenção da qualidade e utilização do tecido, tais como:

I - utilização de cada unidade de tecido em apenas um receptor e uma única vez em um único procedimento;

II - informações de como o tecido deve ser armazenado e/ou manipulado antes da sua utilização;

III - instruções especiais sobre sua utilização;

IV - informações sobre os possíveis riscos biológicos presentes no material (por exemplo: contaminantes e contato com alérgenos);

V - alerta para a obrigatoriedade de informar o banco e os órgãos competentes sobre a ocorrência de reações adversas após seu uso; e

VI - informações sobre a necessidade do descarte do tecido de acordo com a legislação vigente, caso o tecido enviado não seja transplantado total ou parcialmente, ou utilizado total ou parcialmente no projeto de pesquisa ou ensino para o qual foi solicitado, devendo ser enviado ao Banco um relatório comunicando o fato, acompanhado de justificativa.

Art. 133. A responsabilidade por acondicionar os tecidos em recipientes térmicos, que assegurem o trânsito dos materiais em temperaturas adequadas, por um período de 24 (vinte e quatro) horas além do tempo estimado para a conservação do material até o local de destino, é do Banco de Tecido Músculo Esquelético que enviou o tecido.

Art. 134. É de responsabilidade do profissional transplantador utilizar o tecido de acordo com as orientações fornecidas pelo Banco de Tecidos, de forma a garantir a integridade e a segurança biológica do enxerto.

Art. 135. O profissional transplantador deve encaminhar ao Banco de Tecido Músculo Esquelético e à CNCDO as informações sobre os receptores no prazo máximo de 15 (quinze) dias após a realização do transplante, cabendo o não-encaminhamento das informações no prazo estabelecido poderá acarretar ao profissional transplantador o cancelamento da autorização para a realização de transplante de tecido osteocondrofascioligamentoso, emitida pelo Ministério da Saúde.

Art. 136. É vedada a utilização dos enxertos em qualquer outro receptor que não aquele para o qual foi destinado.

Art. 137. O material que não for utilizado deve ser retornado ao Banco, sob condições de preservação controladas e validadas pelo Banco, e a decisão sobre o reaproveitamento ou não deverá ser de responsabilidade do diretor do Banco.

ANEXO D Definição de sala limpa.

Tabela 1 - Classificação das Salas Limpas conforme NBR/ISO 14644-1						
CLASSE	Tamanho das Partículas					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1,0 µm	5,0 µm
CL. 1	10	2				
CL. 2	100	24	10	4		
CL. 3	1.000	237	102	35	8	
CL. 4	10.000	2.370	1.020	352	83	
CL. 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
CL. 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
CL. 7				352.000	83.200	2.930
CL. 8				3.520.000	832.000	29.300
CL. 9				35.200.000	8.320.000	293.000

PROJETO BÁSICO DE SALAS LIMPAS – PARTE 1
J. FERNANDO B. BRITTO

ANEXO E Composição do meio Iscove's (*Modified Dulbecco's Medium*)

Inorganic Salts (g/liter)

CaCl ₂ (anhydrous)	0.16500
MgSO ₄ (anhydrous)	0.09770
KCl	0.33000
KNO ₃	0.000076
NaHCO ₃	1.50000
NaCl	4.50500
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.12500
Na ₂ SeO ₃ (anhydrous)	0.0000173

Amino Acids (g/liter)

L-Alanine	0.02500
L-Arginine·HCl	0.08400
L-Asparagine·H ₂ O	0.02840
L-Aspartic Acid	0.03000
L-Cystine·2HCl	0.09124
L-Glutamic Acid	0.07500
L-Glutamine	0.58400
Glycine	0.03000
L-Histidine·HCl·H ₂ O	0.04200
L-Isoleucine	0.10500
L-Leucine	0.10500
L-Lysine·HCl	0.14600
L-Methionine	0.03000
L-Phenylalanine	0.06600
L-Proline	0.04000
L-Serine	0.04200
L-Threonine	0.09500
L-Tryptophan	0.01600
L-Tyrosine·2Na·2H ₂ O	0.10379
L-Valine	0.09400

Vitamins (g/liter)

D-Biotin	0.000013
Choline Chloride	0.00400
Folic Acid	0.00400
myo-Inositol	0.00720
Nicotinamide	0.00400
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00400
Pyridoxine·HCl	0.00400
Riboflavin	0.00040
Thiamine·HCl	0.00400
Vitamin B-12	0.000013

Other (g/liter)

D-Glucose	4.50000
HEPES	5.95800
Phenol Red, Sodium Salt	0.01500
Sodium Pyruvate	0.11000

ANEXO F Protocolo de preparo das lâminas coradas com SO



Safranin O Staining Kit (SafraninO) Catalog #8348

Product Description

Safranin O, an indicator of cell chondrogenesis, is a cationic dye that stains acidic proteoglycan present in cartilage tissues. The Safranin O Staining Kit contains 0.1g of Safranin O Stain in powder, which can easily be dissolved in deionized water to make the staining solution. Safranin O binds to glycosaminoglycan and shows an orange-red color [1].

Kit Components

Cat. No.	# of vials	Name	Quantity	Storage
8348a	5	Safranin O Stain	20 mg	Room temperature
8348b	5	Fast Green FCF	20 mg	Room temperature
8348c	1	1% Acetic Acid	100 mL	Room temperature
8348d	1	Xylene Substitute	100 mL	Room temperature

Materials Supplied by User

Formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue sections
Ethanol (100%, 95%, 70%, 50%)
Deionized H₂O (diH₂O)

Product use

SafraninO is for research use only. It is not approved for human or animal use, or for application in clinical or *in vitro* diagnostic procedures.

Shipping

Room temperature.

References

[1] Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O., & Pittenger, M. F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Engineer.* 4:415-428.

Procedures

A. Preparation of Safranin O and Fast Green staining solution

1. Transfer 20 mg of Safranin O Stain (Cat. #8348a) in one vial into a 100 mL beaker.
2. Add 20 mL of diH₂O into the beaker and dissolve the stain by stirring to make 0.1% Safranin O staining solution.
3. Transfer 20 mg of Fast Grene FCF (Cat. #8348b) in one vial into another 100 mL beaker.

4. Add 20 mL of diH₂O into the beaker and dissolve the stain by stirring to make 0.1% Fast Green solution.
5. Filter the Safranin O and Fast Green staining solution using a Nalgene PES 75mm filter.

Note: It is recommended that the Safranin O solution be used within a month.

B. Preparation of tissue section slides

1. Deparaffinize and hydrate slides:

- 1) Deparaffinize the tissue sections in Xylene Substitute (Cat. #8348d), 3 changes of 5 min per change.
- 2) Hydrate in 100% ethanol, 2 changes of 2 min per change.
- 3) Hydrate in 95% ethanol, 2 changes of 2 min per change.
- 4) Hydrate in 70% ethanol for 2 min.
- 5) Hydrate in 50% ethanol for 15 min.
- 6) Wash in running tap water for 10 min.

2. Stain in 0.1% Fast Green Solution for 5-10 minutes.

3. Rinse in 1% Acetic Acid (Cat. #8348e) for 10-15 seconds.

4. Stain in 0.1% Safranin O staining solution for 20-30 min.

5. Dehydrate and clear slides:

- 1) Dehydrate in 95% ethanol, 2 changes of 2 min per change.
- 2) Dehydrate in 100% ethanol, 2 changes of 2 min per change.
- 3) Clear the tissue sections in Xylene Substitute (Cat #8348d), 2 changes of 2 min per change.

6. Mount the tissue sections and observe under microscope.

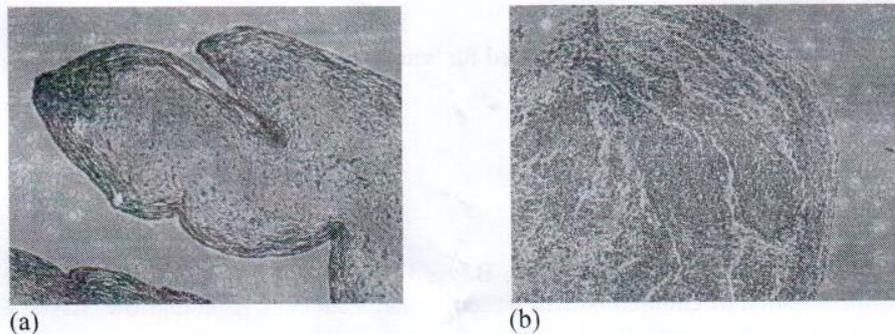


Figure 1. (a) Human Dermal Fibroblasts-fetal (HDF-f, Cat. #2300) were cultured as pellets in growth medium, complete Fibroblast Medium (FM, Cat. #2301) for 50 days. The pellets were fixed in 4% paraformaldehyde and sectioned. Safranin O staining was not detected (Magnification: 10X).

(b) HDF-f were cultured as pellets in complete MSC Chondrogenic Differentiation Medium (MCDM, Cat. #7551) for 50 days. The pellets were fixed in 4% paraformaldehyde and sectioned. Safranin O staining demonstrated the presence of cartilage in cells (Magnification: 10X).

ANEXO G CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DO TECIDO OSTEOCONDRAIS HUMANOS

Avaliador: _____

Código da Lâmina: _____

Escore de Mankin modificado

I Estrutura

A Normal 0
B Irregularidades na superfície 1
C Pannus e irregularidades na superfície 2
D Fissuras na zona de transição 3
E Fissuras na zona radial 4
F Fissuras na zona de calcificação 5
G Desorganização completa 6

II Células

A normal 0
B hipercelularidade difusa 1
C grupos de células 2
D Hipocelularidade 3

III Colocação por Safranina O

A Normal 0
B pequena redução 1
C moderada redução 2
D severa redução 3
E não visualizada 4

IV Integridade da linha de transição

A Intacta 0
B vasos sanguíneos atravessando 1

Marcar apenas uma opção por critério de avaliação

Total: _____

Avaliador: _____

Código da Lâmina: _____

Escore da Sociedade Internacional de Pesquisa para Osteoartrite modificado

Graduação	Critérios Associados
Grau 0 Superfície intacta Morfologia da cartilagem intacta	Intacta, sem envolvimento da cartilagem
Grau I Superfície intacta	Matriz: zona superficial intacta, edema e/ou fibrilações Células: proliferações (grupos), hipertrofia
Grau II Descontinuidades na superfície	As acima acrescentando: Descontinuidade na zona superficial Diminuição na concentração (Safranina ou Toluidina Azul) acima da zona intermediária Desorientação do padrão colunar
Grau III Fissuras verticais	As acima acrescentando: Diminuição na concentração (Safranina ou Toluidina Azul) atingindo a zona profunda da cartilagem Nova formação de colágeno
Grau IV Erosões	Perda da matriz cartilaginosa Presença de cistos na matriz cartilaginosa
Grau V Desnudação	Presença de tecido fibrocartilaginoso Osso esclerótico na superfície
Grau VI Deformação	Remodelamento ósseo Microfratura/ reparo Deformação dos contornos da superfície articular

Resultado (Graduação): _____

Avaliador: _____

Código da Lâmina: _____