



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

FACULDADE
DE
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

RUI DUARTE TEIXEIRA CUNHA

***Estado da Arte na Utilização e Preservação dos Aloenxertos
Osteocartilagíneos em Ortopedia***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE ORTOPEDIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSOR DOUTOR FERNANDO JOÃO MONTEIRO JUDAS

MESTRE JOÃO PEDRO MOREIRA DE OLIVEIRA

ABRIL/2019

Estado da Arte na Utilização e Preservação dos Aloenxertos Osteocartilagíneos em Ortopedia

Rui Duarte Teixeira Cunha¹

Sob a orientação de:

Prof. Doutor Fernando João Monteiro Judas^{1,2}

Mestre João Pedro Moreira de Oliveira^{1,2}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (FMUC), Portugal;

² Serviço de Ortopedia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal;

Rui Duarte Teixeira Cunha
Rua da Irlanda nº60, 4820-192, Fafe
ruidtcunha@me.com

Índice

ABREVIATURAS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
MATERIAIS E MÉTODOS	12
DISCUSSÃO	13
FRESCOS	13
<i>Missouri Osteochondral Allograft Preservation System (MOPS)</i>	13
FRESCOS REFRIGERADOS	17
<i>Standard of Care (SOC)</i>	17
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)</i>	18
CONGELADOS	19
<i>Protocolo de utilização e preservação de aloenxertos osteocartilagíneos nos Hospitais da Universidade de Coimbra</i>	19
<i>Cryopreserved Viable Osteochondral Allograft (CVOCA)</i>	21
MÉTODOS PARA OTIMIZAR A CONSERVAÇÃO	25
<i>Pré-tratamento com bifosfonatos</i>	25
<i>Ácido Hialurónico</i>	27
<i>Arbutina</i>	29
RESUMO DAS PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE OS TIPOS DE ALOENXERTOS ESTUDADOS	31
CONCLUSÕES	33
AGRADECIMENTOS	34
BIBLIOGRAFIA	35

Abreviaturas

AATB - Associação Americana de Bancos de Tecidos

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CVOCA - Cryopreserved Viable Osteochondral Allograft

DAPI's - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

EUA – Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug Administration

Ha - Agregado à compressão

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HTLV - Vírus Linfotrópico das Células T I e II

ICRS - International Cartilage Repair Society

IMDM - Iscove's Modified Dulbecco's Medium

MOPS - Missouri Osteochondral Allograft Preservation System

MTF - Musculoskeletal Transplant Foundation

OARSI - Osteoarthritis Research Society International

PI - Propidium Iodide

SFB - Soro Fetal Bovino

SOC - Standard Of Care

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

UW - University of Wisconsin

WST - Water Soluble Tetrazolium

Resumo

As lesões osteocartilagueas representam um dos maiores grupos de lesões a nível mundial sendo por artrose, trauma, cirurgia oncológica ou infeção articular.

O dano cartilágneo é responsável pela morbilidade associada a estas lesões e o potencial regenerativo da cartilagem articular é insuficiente. Principalmente pela formação de fibrocartilagem e pela sua incapacidade de restituir uma função articular normal, havendo progressão da lesão e recorrendo-se muitas vezes a artroplastias totais ou parciais como tratamento definitivo.

Quanto maior a área da lesão, menor a indicação das terapêuticas autólogas por iatrogenia no local da colheita. Como alternativa eficaz, surgem os transplantes alógenos que apresentam cartilagem hialina viável e restituem a funcionalidade articular.

Esta cartilagem hialina tem de ser madura, com condrócitos viáveis, que mantenham a atividade metabólica e a sua matriz extracelular para terem sucesso a médio/longo prazo.

Foram desenvolvidos e testados vários métodos que se diferenciam pelo protocolo de conservação dos mesmos, no qual a temperatura, o meio e a duração da conservação com contagem condrocitária viável acima dos 70%, são pontos chave.

Após uma avaliação crítica da literatura disponível conclui-se que *Missouri Osteochondral Allograft Preservation System* (MOPS) apresenta resultados superiores quando comparado ao método padrão utilizado pelos bancos de ossos a nível mundial e a outros protocolos estudados neste trabalho.

Palavras-Chave: Aloenxertos Osteocartilágneos, Preservação de Aloenxertos, Reparação Cartilágnea e Banco de Tecidos Ósseos.

Abstract

Osteochondral lesions represent one of the largest groups of injuries worldwide due to arthrosis, trauma, oncological surgery or joint infection.

Cartilage damage is responsible for the morbidity associated with these lesions and the regenerative potential of articular cartilage is insufficient. Mainly because of the formation of fibrocartilage and its inability to restore normal joint function, with the lesion progressing and often the necessity of a total or partial arthroplasty as definitive treatment.

The larger the area of the lesion, the lower the indication for autologous therapies by iatrogeny at the place of harvest. As an effective alternative, allogeneic transplants that preserve viable hyaline cartilage can restore the joint function.

This hyaline cartilage must be mature, with viable chondrocytes, which can maintain metabolic activity and its extracellular matrix to be successful in the medium/long term.

Several methods have been developed and tested which differences are based on the conservation protocol, temperature, medium and the duration of conservation that can ensure counts above 70% of viable chondrocytes.

After a critical evaluation of the available literature it can be concluded that Missouri Osteochondral Allograft Preservation System (MOPS) has superior results when compared to the standard of care that is used worldwide by tissue banks and other protocols studied in this work.

Keywords: Osteochondral Allografts, Preservation; Cartilage Repair, Tissue bank

Introdução

A cartilagem articular é um tecido único no organismo humano dotada de características mecânicas que se caracterizam por superfícies com baixa fricção, boa lubrificação, capacidade para absorver impactos e tudo isto com uma resistência que pode durar toda a vida. A mesma é constituída por várias zonas, organizadas em camadas horizontais, sendo denominadas, desde a superfície articular até ao osso subcondral de: zona superficial (10-20%); zona intermédia (40-60%) e zona profunda (30%). Estas vão alterando a sua composição no que toca a proteoglicanos e água, sendo que a maior quantidade de água e a menor de proteoglicanos se encontra na zona superficial e o inverso se observa na zona profunda, ficando a zona intermédia com uma quantidade semelhante destes componentes.

A cartilagem articular é avascular, alinfática e aneural, mas mantém a sua função com um baixo nível metabólico devido à difusão de nutrientes através do líquido sinovial. É então de se esperar que qualquer lesão ocorrida neste tecido, com características únicas, tenha elevado grau de morbidade.

As lesões osteocartilagíneas representam um dos maiores grupos de lesões a nível mundial sendo maioritariamente associadas ao envelhecimento e posterior artrose^{5;15;16}, mas também a lesões traumáticas, após cirurgias de carácter oncológico e infeções articulares.^{4;35;38}

Todas estas etiologias têm em comum a disfunção articular devido, maioritariamente, ao dano cartilagíneo, sendo este responsável por dor e perda de mobilidade articular.⁴

Está descrito na literatura que cerca de 60% das artroscopias realizadas revelam lesão osteocartilagínea, onde 95% destas são consideradas pela *International Cartilage Repair Society* (ICRS) como sendo grau I (Fissuração e amolecimento superficial) ou grau II (atinge menos de metade da espessura da cartilagem) e os outros 5%, onde existe lesão significativa, são classificados como sendo grau III (atinge mais de metade da espessura da cartilagem, mas sem atingir o osso sub-condral) ou grau IV (exposição do osso subcondral).^{4;34;36}

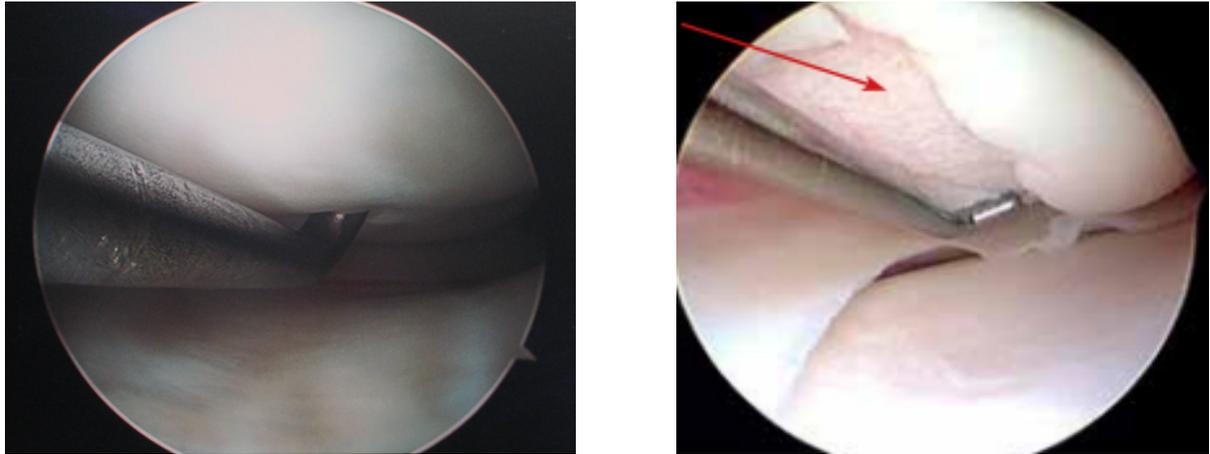


Figura 1. Lesões osteocartilagueas vistas por artroscopia. À esquerda lesão grau I e à direita lesão de grau IV. A seta vermelha corresponde ao osso subcondral. *Imagem cedida pelo Dr. João Pedro Oliveira*

Este dano cartilágneo pode ser definido pela sua profundidade (superficial ou completo, isto é, se atinge ou não o osso subcondral) e pela sua extensão em milímetros (mm).

O potencial regenerativo da cartilagem hialina nas superfícies articulares é muito limitado, não só devido à fisiologia da própria cartilagem como ao local e às forças a que estão envolvidas as superfícies articulares.^{4:34}

Estas limitações estão relacionadas com vários fatores, entre os quais está a incapacidade para regenerar nova cartilagem hialina (colagénio tipo II). No entanto, quando o osso subcondral é lesado forma-se uma fibrocartilagem (maioritariamente constituída por colagénio tipo I) que além de não ser suficiente para cobrir toda a profundidade da lesão é menos resistente às forças a que a articulação está sujeita (torção e compressivas) tendo assim um tempo de vida mais curto sem nunca corrigir eficazmente a lesão inicial.³⁴

Tendo em conta estas limitações e a necessidade de, principalmente em doentes jovens, reconstituir uma articulação biologicamente funcionante, ou seja, sem recorrer a artroplastias totais ou parciais, foram desenvolvidas algumas técnicas que visam esta reconstituição biológica:

- Desbridamento, Abrasão, Microfraturas e Fatores de Crescimento apenas têm indicação para lesões com pequeno diâmetro (<4cm²) e que não atinjam o osso subcondral. O objetivo é estimular a formação de novo tecido através de desbridamento ou abrasão do osso subcondral, que formará canais vasculares para a lesão, facilitando o recrutamento de células estaminais mesenquimatosas provenientes da medula óssea, assim como fibrina e plaquetas, formando então um coagulo que ocupará a lesão. Apesar de as células recrutadas serem multipotentes não se forma nova cartilagem hialina mas sim fibrocartilagem que não se integra na restante cartilagem nativa e fica então mais sujeita a posterior degradação e sem nunca restituir a função previa à lesão.³⁸

- Implantação de condrócitos autógenos tem indicação para lesões únicas de grau III ou IV, superiores a 2-4cm² e assenta na utilização de condrócitos autólogos que produzirão uma cartilagem semelhante à hialina. Colhe-se cartilagem articular de uma zona que não suporte carga e posteriormente por meios enzimáticos é removida a matriz extracelular, ficando apenas os condrócitos. Estes são cultivados *in vitro* por quatro a seis semanas até se obter um número suficiente de condrócitos que cubram a lesão. Por artrotomia e recorrendo a técnicas de desbridamento, abrasão e microfraturas estimula-se o osso subcondral a sangrar para posteriormente aplicar os condrócitos no local da lesão, sendo estes cobertos por uma camada de perióstio. Apesar de ser um tecido autólogo e de se formar cartilagem semelhante à hialina esta é inferior em termos biomecânicos e de duração a médio-longo prazo comparativamente com a cartilagem hialina normal. Está associado a altas taxas de re-operação quando usado o perióstio, a um programa de reabilitação extenso e moroso e a alguma morbidade no local da extração do enxerto.

- Transplante Autólogo é uma técnica de reparação cartilágnea com o intuito de corrigir a lesão articular com cartilagem hialina e em certos casos restituir a integridade do osso subcondral. Consiste em retirar-se pequenos cilindros de zonas que não suportem carga e transplanta-los para a zona lesada. Usando-se vários cilindros consegue-se manter a curvatura da superfície articular mantendo-a o mais congruente possível com a outra superfície articular.

Além de ser teoricamente uma excelente opção, ou até mesmo o *gold standard*, devido à biocompatibilidade enxerto-dador, sendo verdadeiramente osteogénico, e por este estar facilmente disponível sem necessidade de técnicas de conservação ou de rastreio microbiológico, pode falhar se a lesão for muito grande, ou seja, superior a 4cm² (articulação(ões) dadora(s) ficaria(m) com uma lesão cartilágnea iatrogénica de grandes dimensões, mesmo que o local de extração fosse fora da maior superfície de contacto ou que se retirem vários cilindros osteocartilágneos de menores dimensões).³⁷

- Transplante Alógeno é constituído por enxertos que possuem uma parte de cartilagem hialina viável e uma parte de osso subcondral, restituindo assim a unidade funcional osteocartilágnea da articulação. Estes enxertos são colhidos de doadores de órgãos e têm também excelentes indicações sendo elas a ausência de dano de outra superfície articular do doente, possibilidade de enxertos desde pequenas a grandes dimensões e/ou múltiplos.³⁷ Sendo a cartilagem um tecido avascular, a possibilidade de rejeição do enxerto estará apenas relacionada com o osso subcondral, incluído no enxerto, que tem de ser inferior a 1cm para evitar reações imunológicas. Mesmo esta porção óssea estará constantemente em remodelação até se tornar exclusivamente osso do doente, ou seja, sem imunogenicidade.³⁸ A exceção estará nos enxertos maciços (>10cm²), uma vez que ao serem transplantadas mais estruturas como osso, ligamentos e capsula articular, além da cartilagem e da pequena porção óssea, existirá a possibilidade de reação imunológica.^{28;38} Outra preocupação assenta na transmissão de doenças virais entre as quais o vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B, hepatite C e vírus linfotrópico das células T I e II (HTLV).^{28;37}

A questão essencial consiste em transplantar cartilagem hialina madura, com condrócitos viáveis, que mantenham a sua atividade metabólica e a sua matriz extracelular (constituída em grande parte por colagénio), sendo este o principal fator, dependente do enxerto, preditor de sucesso a médio-longo prazo.²⁸

Tendo em conta a necessidade de garantir a esterilidade do enxerto é necessário realizar culturas bacterianas e serologias virais que no mínimo adiam a transplantação em pelo menos 14 dias. A irradiação e a quarentena podem ser métodos uteis para diminuir a probabilidade de transmissão de doenças, mas sob pena de aumentarem a destruição condrocitária, seja por dano direto na irradiação ou por aumento do tempo desde a colheita até à implantação na quarentena.

Este tempo é deletério para a viabilidade condrocitária, ou seja, quanto maior o tempo decorrido menor é a contagem de condrócitos metabolicamente ativos. Métodos de conservação dos enxertos foram então desenvolvidos na tentativa de manter a viabilidade condrocitária o mais alta possível (mínimo de 70% para ter eficácia a médio-longo prazo).²⁸ Estes métodos vão variar no que toca à solução/meios de conservação, ao processamento (quanto maior for o tamanho do enxerto menor será a penetração dos meios de conservação) e à temperatura a que são preservados.

Existem então duas modalidades de aloenxertos: os Frescos, que podem ser conservados a 37°C/temperatura ambiente (25°C) ou refrigerados a 4°C e os Congelados/Criopreservados que podem ser conservados a -80°C (arcas de ultra congelação) ou -196°C (vapor de azoto líquido).

- Frescos, são assim denominados, todos os enxertos que não passam por processos de congelamento ou criopreservação, sendo que há autores que defendem temperaturas de conservação diferentes. Existem enxertos frescos que são conservados sempre a uma temperatura ambiente superior a 15°C (média 25°C) ou mesmo à temperatura fisiológica (37°C). Há referência à utilização de meios de conservação como *Iscoe's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) ou um método patenteado denominado de *Missouri Osteochondral Allograft Preservation System* (MOPS). Já os enxertos frescos refrigerados são conservados a temperaturas médias de 4°C e onde podem ser utilizados meios de conservação como: Lactato de Ringer, soluções com soro fetal bovino (SFB), soluções sem SFB (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e/ou *NCTC-135 medium*), IMDM, Dimetilsulfóxido (DMSO), Albumina 10%. Atualmente, os enxertos frescos congelados são ainda o método mais utilizado pelos bancos de tecidos ósseos.

- Congelados/Criopreservados, enxertos que são congelados com temperaturas entre -70°C e -80°C, em arcas de ultra congelação, ou a -196°C em vapor de azoto líquido, onde são utilizados agentes crioprotetores como glicerol, DMSO, Arbutina. Há também referência a um método patenteado: *cryopreserved viable osteochondral allograft* (CVOCA). Devido à congelação/criopreservação suprimir as reações químicas e fenómenos de desintegração cadavérica é possível que estes aloenxertos sejam conservados por largos períodos de tempo, tendo sido estabelecido internacionalmente que os

enxertos conservados a -80°C têm uma validade de 5 anos. Sabe-se que a criopreservação a -196°C com o vapor de azoto líquido é teoricamente um método de conservação *ad aeternum*, mas também existe o consenso que tanto a demanda, ou seja, o número de doentes que beneficiariam destes enxertos, como os custos são pontos contra a conservação em vapor de azoto líquido, e esta quando feita não ultrapassa o tempo estabelecido para os congelados de 5 anos.

- Irradiados, é uma técnica que pode ser utilizada em exclusivo ou como complementar em qualquer um dos tipos anteriormente referidos, mas tem melhores indicações para enxertos frescos maciços visto a sua utilidade ser eliminar ADN viral e com isso diminuir a probabilidade de transmissão de doenças.⁴³

O objetivo desta revisão é realizar uma análise crítica da literatura relativamente aos métodos de conservação dos aloenxertos em ortopedia, comparando com os métodos utilizados no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Como objetivo secundário, a criação de uma proposta de novos métodos a implementar.

Materiais e Métodos

Este artigo de revisão foi realizado com base numa pesquisa bibliográfica online recorrendo às seguintes bases de dados: PubMed e MEDLINE utilizado como palavras-chave: aloenxertos osteocondrais, preservação de aloenxertos, reparação cartilaginosa e banco de ossos.

A pesquisa foi limitada a artigos escritos em Português e Inglês, tendo sido limitada no tempo entre janeiro de 2007 e janeiro de 2019, tendo-se encontrado 2771 artigos. Estes foram analisados de acordo com critérios de inclusão e exclusão previamente definidos, tendo restado 220 artigos.

Após a aplicação destes critérios foi lido o título, e dos títulos relevantes leu-se também o respetivo resumo. Sempre que o resumo se mostrou relevante foi lido e estudado o artigo na íntegra.

Além disso, foram ainda obtidos e utilizados artigos por referência cruzada cujo título e resumo se mostrassem igualmente importantes.

No total, para a realização deste trabalho, foi realizada uma análise crítica e detalhada de 45 artigos.

Discussão

Frescos

Missouri Osteochondral Allograft Preservation System (MOPS)

O protocolo denominado por MOPS, proveniente da Universidade de Missouri, Columbia, Missouri, EUA, utiliza aloenxertos frescos que são obtidos através da *Musculoskeletal Transplant Foundation* (MTF), são colhidos de modo asséptico, no máximo até três dias após a morte, e em apenas um joelho dos doadores considerados aptos. Após serem colhidos, os côndilos femorais são divididos em dois, o que resulta em quatro porções. Cada uma destas porções é então colocada em 500ml da solução MOPS (meio de conservação).

Durante o desenvolvimento do método foram testadas várias temperaturas de conservação e a extensão máxima, em dias, de conservação do enxertos.

Na validação do método para uso nos humanos, e após validação do mesmo pela *Food and Drug Administration* (FDA), EUA; foram testadas duas temperaturas (4°C e 25°C) e outra variável foi a troca diária ou não do meio de conservação.

Foram garantidas todas as condições de assepsia quer na colheita e quer na manipulação dos enxertos em que era trocado o meio de conservação. Tendo sido feitas colheitas do líquido de conservação e de pequenas partes do enxerto para culturas de todos os grupos testados. Foi utilizado o protocolo USP 71, que é o protocolo padrão da Associação Americana de Bancos de Tecidos (AATB). Os resultados foram negativos para crescimento bacteriano em todas as amostras.

A viabilidade condrocitária foi averiguada utilizando três partes distintas de cada enxerto, onde estas foram coradas com fluoresceína (para detetar as células vivas/células com membrana celular capaz de transportar a fluoresceína para interior da mesma), e com *SYTOX Blue* (um corante dos ácidos nucleicos, ou seja, para detetar a quantidade de células mortas/com membrana celular destruída). Tendo sido depois observadas à microscopia de fluorescência onde foi avaliado o padrão de distribuição por toda a espessura do enxerto de células coradas com fluoresceína e quantificadas por um software que dividia o número de células coradas pela área do enxerto, chegando assim a um valor de densidade de condrócitos viáveis. Posteriormente duas porções de cada enxerto selecionado, foram analisadas histologicamente para determinação da composição da matriz extracelular, sendo corados com Hematoxilina-Eosina e Azul de Toluidina (cora os proteoglicanos e glicosaminoglicanos). Foram classificados segundo a *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) *histological scoring*, que avalia os enxertos tendo em conta a estrutura cartilágnea, a aparência condrocitária, a distribuição de proteoglicanos, a distribuição de colagénio, as camadas de tecido cartilágneo e o osso subcondral. Os resultados da viabilidade condrocitária mostraram que, aos 28 dias de conservação, nos enxertos

conservados a 4°C existiam áreas de tecido morto, demonstrado pela escassez de células coradas. Já quando conservadas a 25°C mantinham, desde a camada superficial à camada profunda condrócitos viáveis. Aos 56 dias de conservação o padrão de resultados manteve-se, sendo que os enxertos conservados a 4°C perdiam cada vez mais condrócitos viáveis e a 25°C mantinham o número de condrócitos viáveis por toda a espessura cartilágnea. Aos 70 dias de conservação os enxertos conservados a 4°C tinham poucas ou nenhuma células condrocitárias viáveis, enquanto que os enxertos conservados a 25°C tinham uma contagem de células viáveis superior mas com uma aparência que não obtinha a qualidade necessária para implantação.

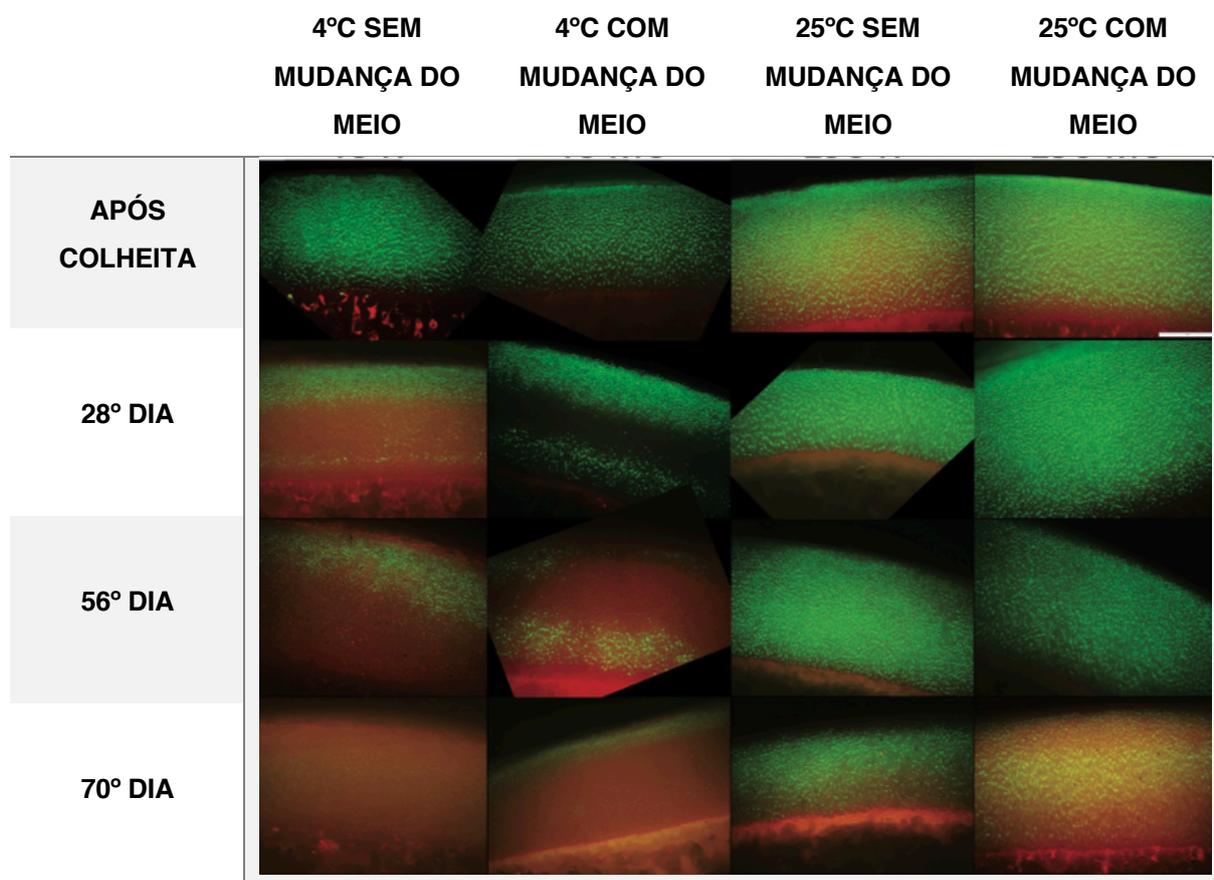


Figura 2. Viabilidade condrocitária avaliada de forma subjetiva (ampliação 4 vezes), demonstrando que os enxertos conservados a 25°C, excetuando o 70° dia do grupo com mudança de meio, apresentam uma distribuição condrocitária homogênea por toda a espessura da cartilagem ao contrario dos grupos conservados a 4°C. *Adaptado de Aaron M. Stoker et al*⁹

Já relativamente à distribuição de proteoglicanos pesquisada com o Azul de Toluidina mostrou que não houve alterações estatisticamente significativas durante os 70 dias de conservação em qualquer um dos grupos.

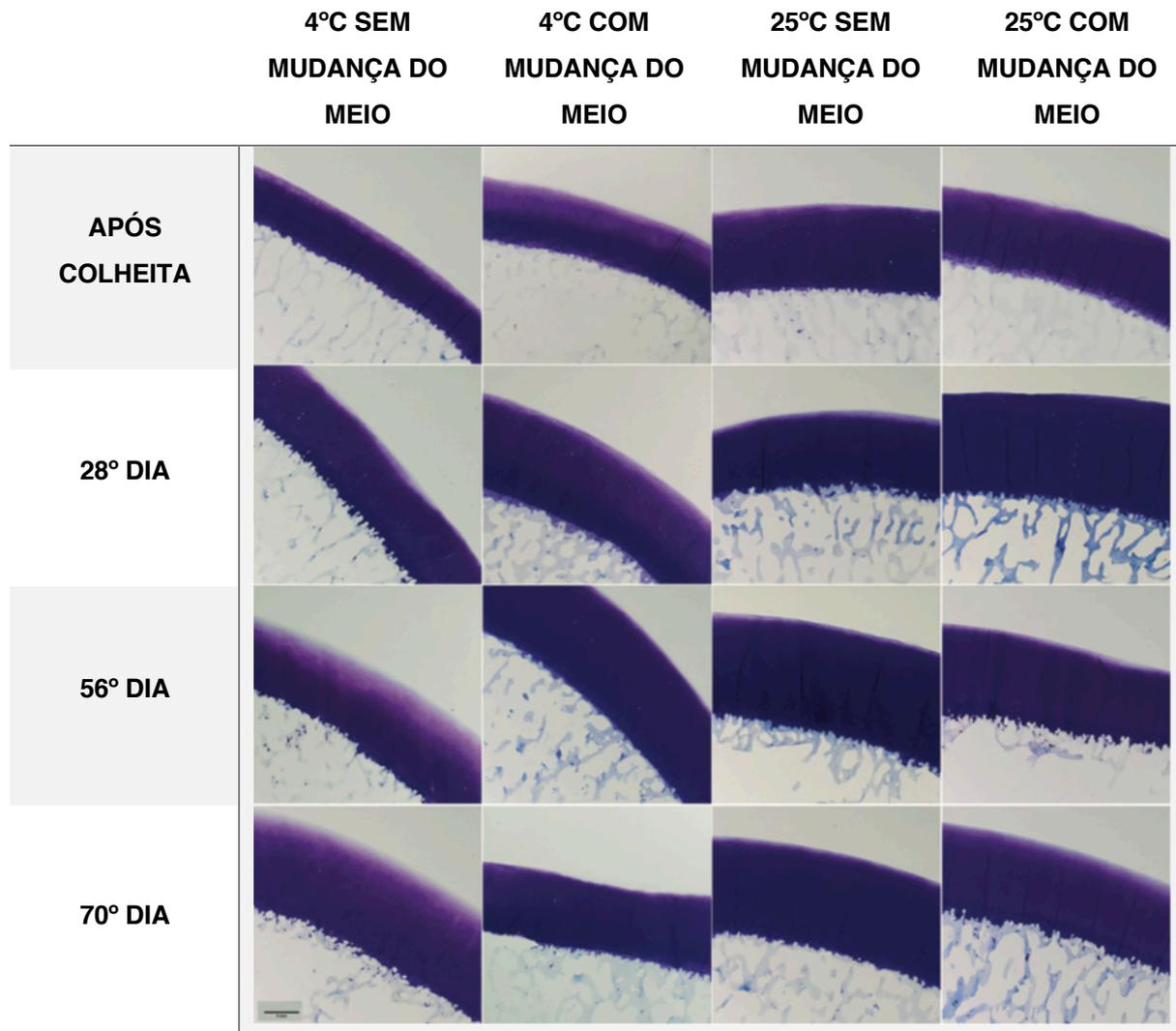


Figura 3. Avaliação histológica da cartilagem com Azul de Toluidina (ampliação 2 vezes), demonstrando através das zonas coradas a roxo que a distribuição de proteoglicanos se manteve semelhante ao controlo em todos os grupos, não tendo sofrido alterações durante a conservação até aos 70 dias. *Adaptado de Aaron M. Stoker et al⁹*

Relativamente à densidade de condrócitos viáveis a média de todos os enxertos após colheita era de 438,3 células viáveis/mm² (variando entre 344.7 e 489.1 células viáveis/mm²) e onde não existia diferença estatisticamente significativa.

Nos grupos em que a temperatura de conservação foi de 4°C, a densidade de condrócitos viáveis era significativamente inferior comparativamente ao dia 0: Sem mudança do meio de conservação ao 28° dia – 50,7%; 56° dia – 25,8%; 70° dia – 15,4% e com mudança do meio de conservação ao 28° dia – 52,4%; 56° dia – 25,3%; 70° dia – 8,8%. Quando a temperatura de conservação era de 25°C não houve

diferença estatisticamente significativa comparativamente ao dia 0: Sem mudança do meio de conservação ao 28º dia – 102,9%; 56º dia – 89,2%; 70º dia – 73,9%, e com mudança do meio de conservação só existiu diferença estatisticamente significativa no dia 70, logo ao 28º dia – 95,4%; 56º dia – 98,6%; 70º dia – 46,8%. Ficando então comprovado que os condrócitos preservados a 25°C sem troca do meio de conservação foram superiores em todos os momentos de avaliação aos conservados a 4°C com ou sem troca do meio de conservação. Ficando também comprovado que quando conservados a 25°C sem troca do meio de conservação eram superiores aos conservados a 25°C em que se trocava o meio de conservação devido à diferença estatisticamente significativa que existia no dia 70, apesar de nos outros dias não haver diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos.

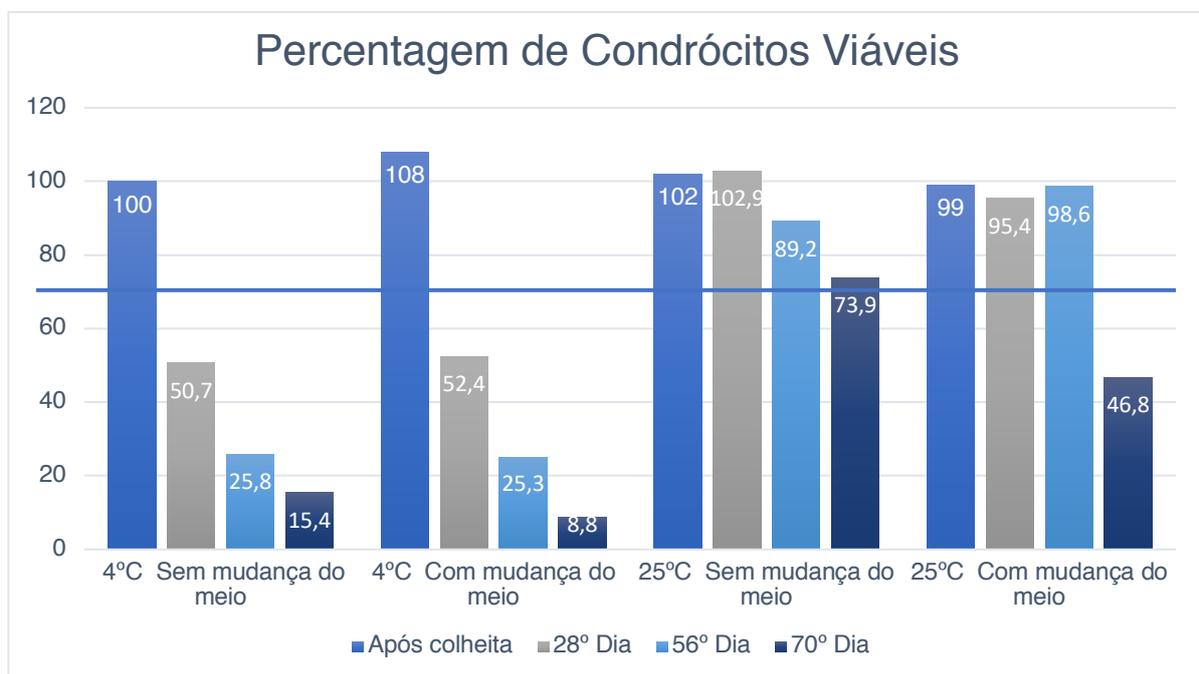


Gráfico 1. Percentagem de condrócitos viáveis em comparação com o dia da colheita. A linha representa o valor de 70% de condrócitos viáveis, o qual se considera necessário para o sucesso da implantação a médio-longo prazo. *Adaptado de Aaron M. Stoker et al*⁹

Foram realizados também testes biomecânicos em que partes dos enxertos eram comprimidas (80% da espessura da cartilagem) e descomprimidas, onde as variáveis avaliadas eram o módulo agregado à compressão (*Ha*) e a permeabilidade. Comparando os valores em cada um dos pontos de avaliação com o dia 0, não houve diferença estatisticamente significativa em qualquer um dos grupos, o que comprova que não há alteração das propriedades biomecânicas durante a conservação.⁹

Frescos Refrigerados

Standard of Care (SOC)

SOC é a denominação dada ao protocolo mais utilizado atualmente, na sua maioria pelos bancos de tecidos ósseos nos EUA, não sendo um protocolo estanque e que pode variar em certos componentes dos meios de conservação. Estes enxertos são refrigerados a 4°C.

Os enxertos são colhidos em doadores de órgãos e são processados em pequenas peças, tendo em conta a área de lesão que necessita de correção.

Os enxertos são colocados em soluções de soro fisiológico a 0,85% com antibióticos como a penicilina G e o sulfato de estreptomicina e antifúngicos como a anfotericina B.

Posteriormente são imersos numa solução de conservação. Aqui é onde a variabilidade existe podendo ser utilizado: o lactato de ringer, se o enxerto for usado dentro de 48h (mas onde não é possível fazer as culturas microbiológicas e serológicas, que demoram 14 dias); soluções sem soro fetal bovino mas com glicose, eletrólitos e aminoácidos (DMEM e/ou NCTC-135 medium); e soluções com soro fetal bovino com nutrientes e fatores de crescimento, que apesar de demonstrar vantagens como uma percentagem superior de viabilidade condrocitária (67% aos 28 dias comparada com 27,3% dos meios sem soro fetal bovino) não é globalmente aceite por muitos devido ao aumento do potencial risco de infeções e à variabilidade do meio em si.

São garantidas todas as condições de assepsia quer na colheita e quer na manipulação dos enxertos e são realizadas culturas e serologias a quando da colheita dos mesmos.

Após estes resultados a implantação do enxerto deve ser feita o mais rápido possível para minimizar a morte celular. Os enxertos são em média implantados aos 24 dias (variando entre 15-43 dias).

A viabilidade condrocitária média neste tipo de enxertos é 45% na zona superficial , 20% na zona intermédia e 35% na zona profunda, quando comparadas com o enxerto no dia 0, que seria de 100% em todas as zonas.⁴⁵

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

IMDM é um meio de conservação de tecidos, comercializado por várias empresas, utilizado com melhores resultados para a aloenxertos conservados a 4°C, associado à albumina humana a 10%.

Enxertos com 0,6cm de diâmetro (0,28cm²) com pelo menos 2mm de profundidade foram colhidos, segundo uma técnica de mosaicoplastia e divididos em grupos onde foram conservados a diferentes temperaturas (37°C, 4°C, -70°C). Nos congelados (-70°C), que foram conservados durante um ano, foram criados mais dois grupos, adicionando DMSO a 10% e no outro DMSO 10% + Glicose a 10%. Todos os fragmentos receberam 40ml de meio de cultura que era trocado a cada 3 dias.

A análise histológica foi feita com Hematoxilina-Eosina e Safranina O (para detetar a distribuição de proteoglicanos) e concluiu-se que não houve hipocelularidade nem alterações na zona superficial. Concluiu-se também que não houve alterações da matriz extracelular em nenhuma das temperaturas ou meios utilizados.

A análise da viabilidade celular foi realizada, separando a cartilagem do osso subcondral, sendo que então alguns enxertos foram triturados e posteriormente incubados a 37°C por 18 horas, num meio contendo 0,5% de colagenase. Após a incubação foram transferidos centrifugados a 4°C num meio contendo 50ml de IMDM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Para quantificar as células vivas utilizou-se “LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, Invitrogen—Brazil”, onde inicialmente são quantificadas as células vivas através de DAPI's (4',6-diamidino-2-phenylindole, um corante de ADN azul fluorescente) e as células mortas/danificadas através de brometo de etídio (que as cora de vermelho). Os enxertos de controlo (logo após colheita) apresentavam uma viabilidade celular de 87% (95,6 – 78,4%). Os resultados médios a quando da conservação a 4°C foram: ao 1º dia de 97,4% (100 – 92,4%); ao 3º dia de 94,7% (97,3 - 92,1%) e ao 14º dia de 92,9 (96,2 – 89,6%), Estes foram superiores quando comparados à mesma conservação a 37°C: ao 1º dia de 95,8% (98,6 – 93%); ao 3º dia de 94,3% (98 - 90,6%) e ao 14º dia de 85,9 (98 – 74%). E a -70°C nas mesmas condições de conservação o resultado foi de 76,8% (84,4 – 69,2%); com a adição de DMSO a 10% foi de 79,4% (83,3 – 75,5%); e por fim com a adição de DMSO a 10% mais albumina humana a 10% foi de 72% (79,4 - 64,6%).¹⁵

Congelados

Protocolo de utilização e preservação de aloenxertos osteocartilagíneos nos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Nos Hospitais da Universidade de Coimbra é utilizado o método de congelação dos aloenxertos a -80°C .

Os enxertos são colhidos em doadores de órgãos que não se tenham inscrito no Registo Nacional de Não Dadores, num cenário de colheita multiorgânica, sendo recolhidos após os outros órgãos vascularizados.

Estes são processados em pequenas peças, tendo em conta a área de lesão que necessita de correção, e são colhidas amostras para as culturas e serologias. São depois imersos num banho de antibiótico, durante 1 hora (Rifampicina 1200mg em 1000ml de soro fisiológico ou Vancomicina 1000mg em 500ml soro fisiológico) sendo posteriormente imersos na solução de conservação com DMSO a 10% durante 10-15 minutos.

Os enxertos são então congelados a -80°C em arcas de ultracongelação que são monitorizadas de forma contínua e em tempo real com sondas de temperatura ligadas a um computador com um software de gestão das mesmas, com supervisão da enfermeira responsável.

A aplicação destes aloenxertos segue também um protocolo, onde é garantida a assepsia de bloco operatório e a enfermeira instrumentista sem tocar no enxerto ou em qualquer objeto coloca o enxerto numa solução de soro fisiológico a 37°C , procedendo à lavagem mecânica do mesmo com soro fisiológico à mesma temperatura. O enxerto é então talhado ou fragmentado tendo em conta a forma da lesão do doente e novamente sujeito a uma lavagem mecânica com soro fisiológico. Posteriormente é colocado numa solução de antibiótico (Rifampicina 1200mg/1000ml de soro fisiológico ou de Vancomicina 1000mg/500ml de soro fisiológico), durante 1 hora. Após este tempo são colhidas amostras tanto do enxerto como do local de implantação do mesmo para controlo microbiológico. Decorridos todos estes passos o enxerto está pronto para ser implantado no doente.

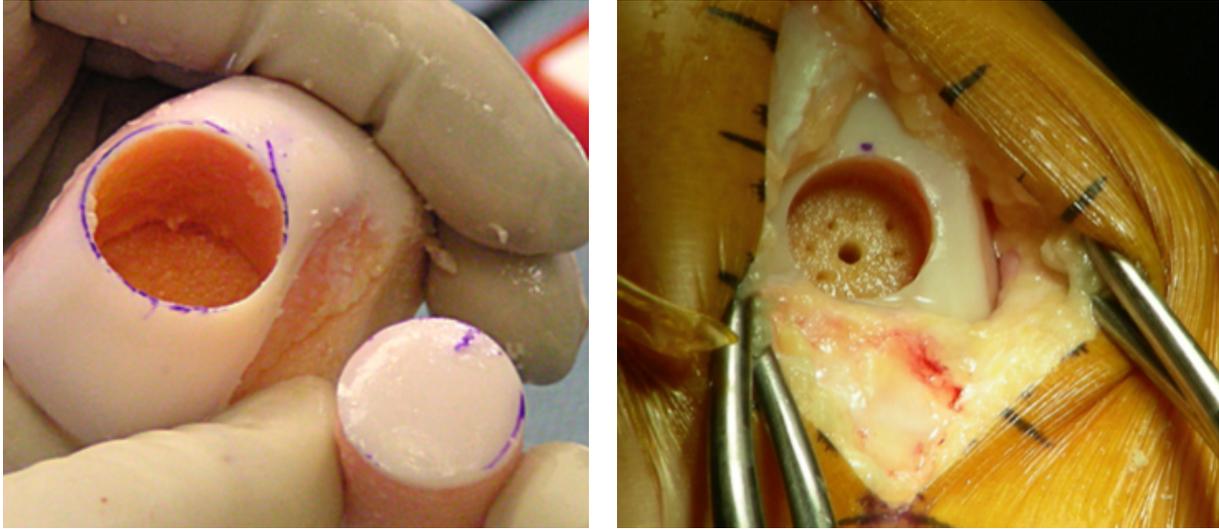


Figura 4. À esquerda colheita de aloenxerto tendo em conta a lesão do recetor, sendo garantida a orientação do mesmo pela marca a azul. À direita local de implantação, com marcação da região anterior do côndilo femoral para garantir o máximo de congruência entre o aloenxerto e o recetor. *Imagem cedida pelo Dr. João Pedro Oliveira*

Cryopreserved Viable Osteochondral Allograft (CVOCA)

É um método que conjuga a utilização de enxertos congelados flexíveis com abrasão do osso subcondral.

São utilizados enxertos de cartilagem hialina dos côndilos femorais, com um mínimo de osso subcondral onde são realizados vários furos/poros, que para além de os tornar flexíveis, possibilitando assim a sua implantação por artroscopia, melhora a penetração dos meios de conservação e cria um microambiente onde é possível a migração e replicação das células estaminais mesenquimatosas libertadas pela abrasão/microfraturas do osso subcondral. A presença de cartilagem hialina no enxerto favorecerá a diferenciação das células mesenquimatosas em nova cartilagem hialina, que preencherá os furos do enxerto e ajudará na integração do mesmo. São posteriormente colocados em soluções com DMSO e conservados até dois anos a -80°C.

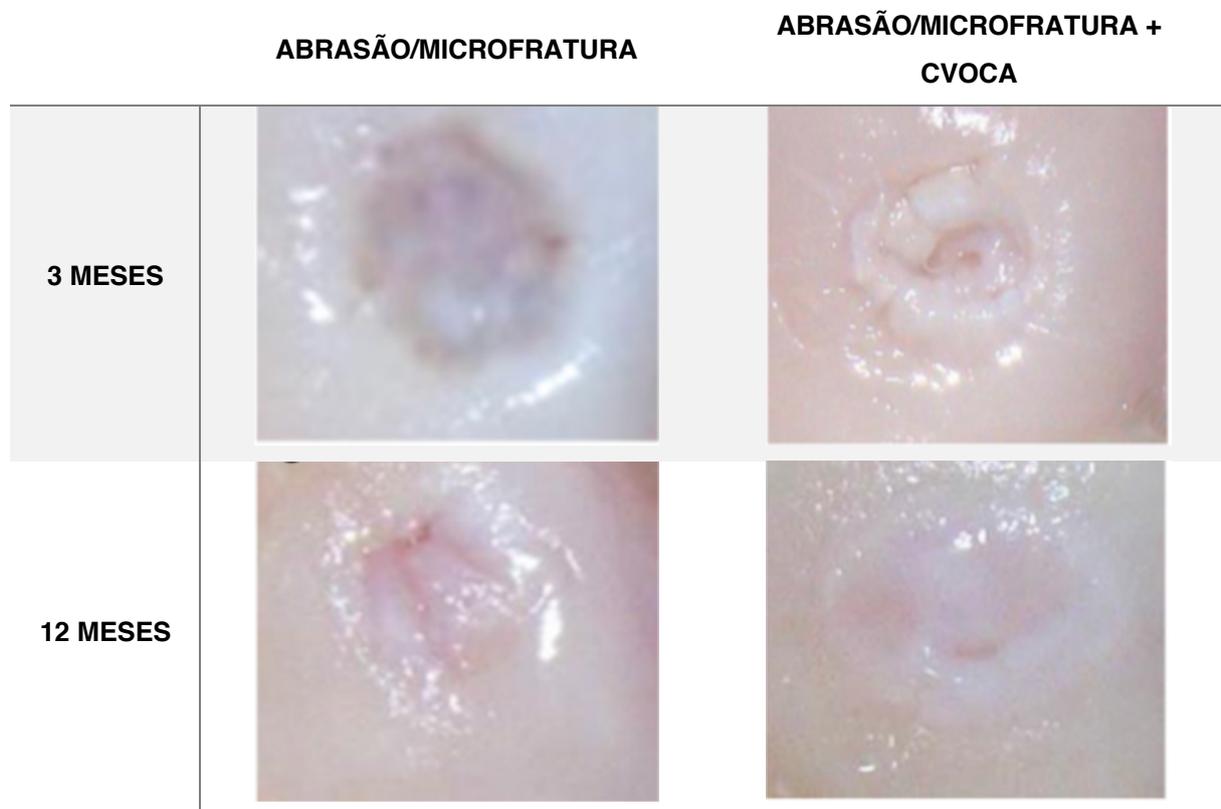


Figura 5. Comparação *in vivo* de abrasão/microfratura com ou sem CVOCA ao 3º mês e ao 12º mês. *Adaptado de Sandra Geraghty et al*¹⁴

No desenvolvimento destes enxertos foram testados dois diâmetros de furos (0,6mm e 0,9mm) e três densidades de distribuição dos mesmos (12; 25 e 50 furos/cm²). Os que obtiveram um melhor resultado de flexibilidade foram os de 0,9mm de diâmetro com uma densidade de 50 furos/cm², e os que obtiveram o pior resultado em termos de flexibilidade foram os de 0,6mm de diâmetro com uma densidade de 12 furos/cm². Para aplicabilidade dos CVOCA foi selecionado um enxerto com 20mm de diâmetro, de flexibilidade intermédia com furos de 1mm de diâmetro e densidade de 36 furos/cm².

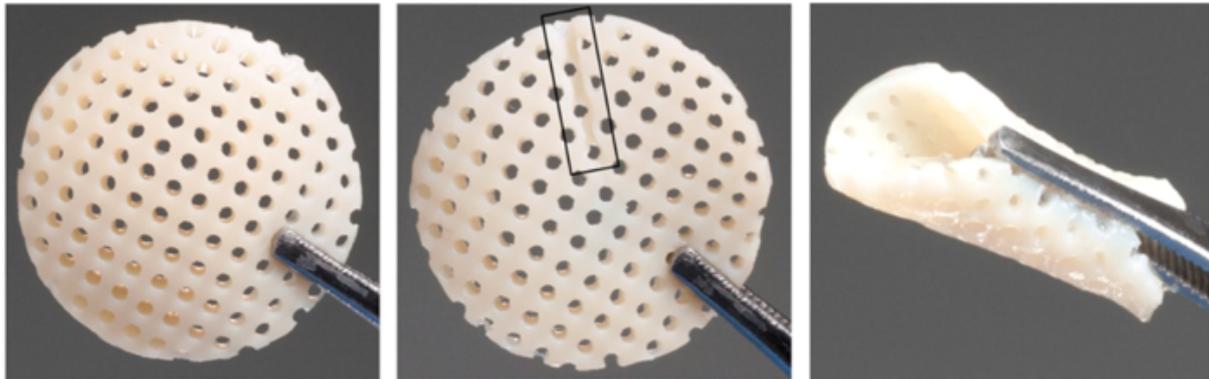


Figura 6. Aspeto do CVOCA, com 20mm de diâmetro, visto de topo, por baixo e dobrado (sendo possível ver a espessura), respetivamente. A parte óssea do enxerto é marcada com um entalhe (demarcado pela caixa preta). *Adaptado de Sandra Geraghty et al*¹⁴

A análise histológica foi feita com Hematoxilina-Eosina, Safranina O e anticorpos contra colagénio tipo 1 e tipo 2 (sendo o controlo cartilagem hialina humana normal que foi positiva para colagénio tipo 2). Os resultados com Hematoxilina-Eosina mostraram que os CVOCA mantinham cartilagem hialina normal, mantendo todas as zonas da cartilagem e a mínima camada de osso subcondral. A matriz extracelular foi preservada, tendo sido demonstrado pela grande intensidade de coloração vermelha com Safranina O. Foram também positivos maioritariamente para colagénio tipo 2 havendo uma quantidade mínima de colagénio tipo 1 associada à presença de osso subcondral.

Os CVOCA são aloenxertos com tamanhos predefinidos e formas que podem ser circulares ou retangulares, mas em lesões que excedam o tamanho de um único enxerto podem ser utilizados vários enxertos justapostos.

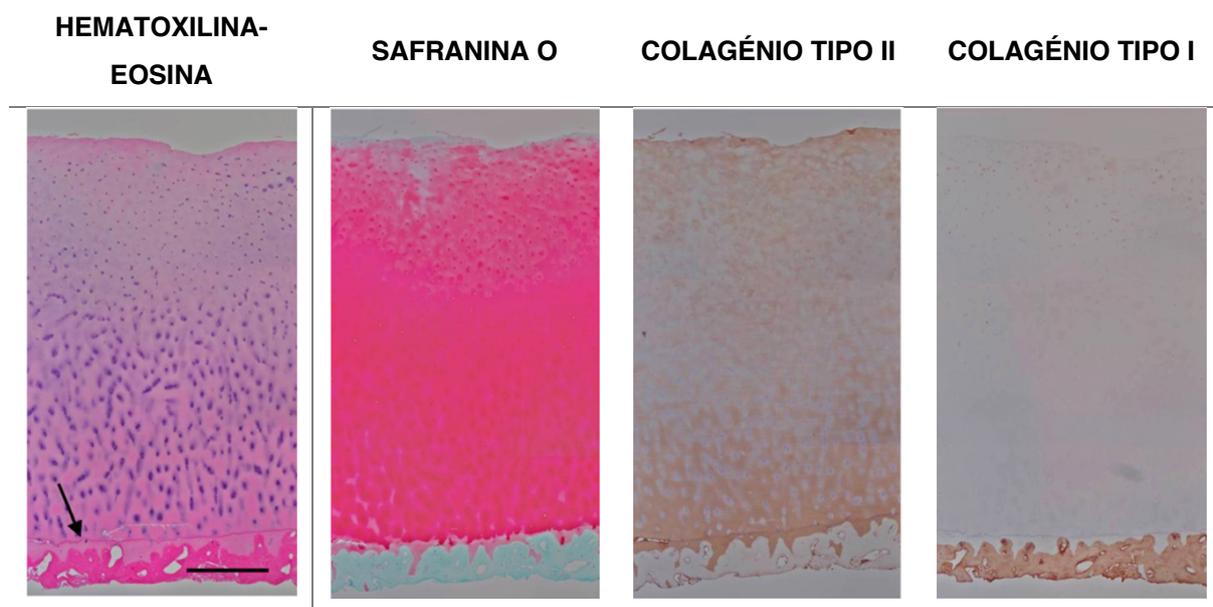


Figura 7. Os CVOCA mantêm a estrutura cartilágnea (demostrando todas as zonas) e a respetiva matriz extracelular. Constituído quase exclusivamente por cartilagem hialina, marcada pelo colagénio tipo II, apresentando apenas fibrocartilagem na zona do osso subcondral. A seta preta representa a transição entre a cartilagem e a fina camada de osso subcondral. *Adaptado de Sandra Geraghty et al*¹⁴

A análise da viabilidade celular foi testada através de um teste com um corante (*Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, USA*) que diferencia células vivas (verde) e células mortas (vermelho). Foram realizadas colheitas em todas as zonas da cartilagem de forma aleatória, sendo depois feita uma média. Os resultados foram de uma viabilidade celular de 70,5% (54,5-88,5%).^{14,33}

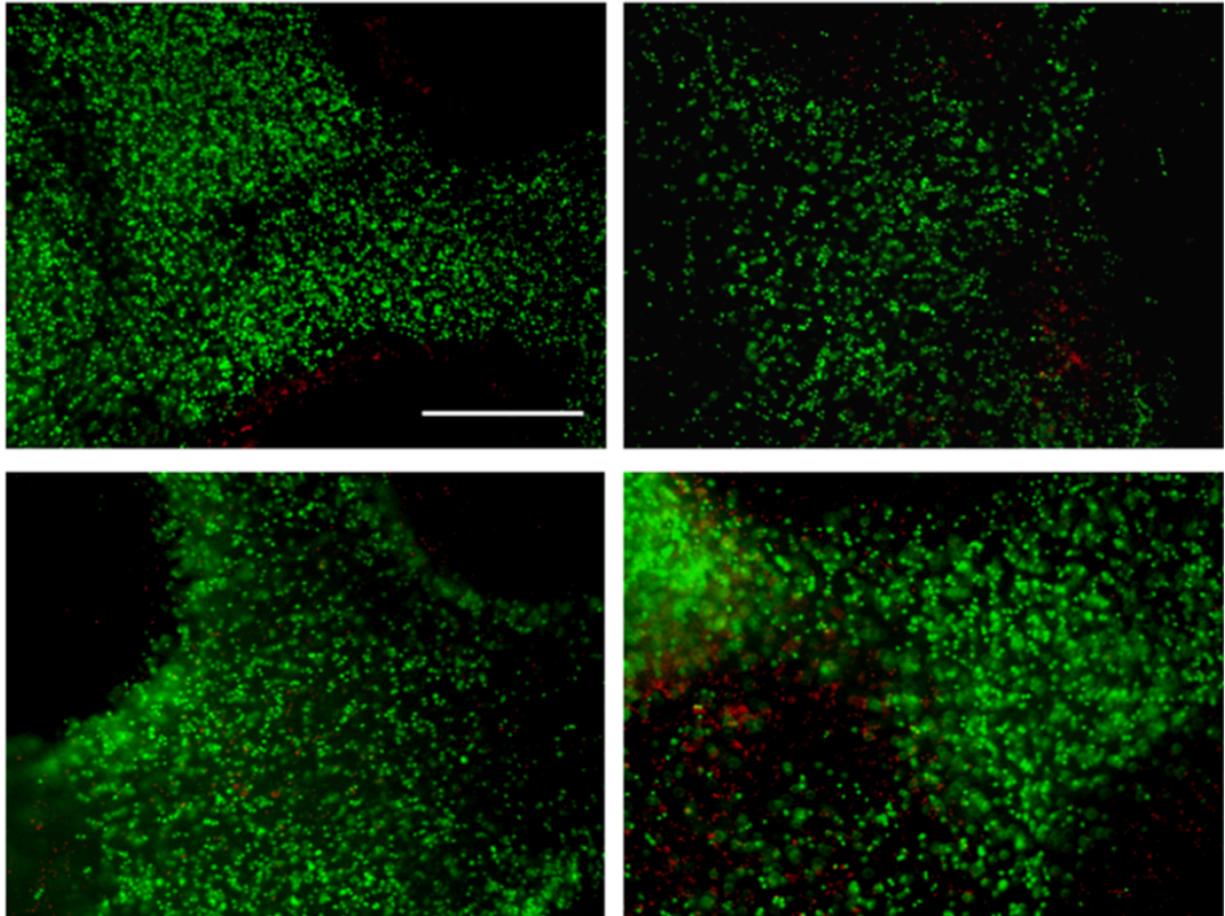


Figura 8. Viabilidade condrocitária, representativa da zona superficial, avaliada em enxertos de quatro dadores diferentes. Demonstrando alta viabilidade celular na zona considerada de maior importância para o sucesso da implantação a longo prazo. *Adaptado de Sandra Geraghty et al*¹⁴



Figura 9. Fotografias intraoperatórias demonstrando o processamento do enxerto (à esquerda) e a sua aplicação (meio e à direita). *Adaptado de C. Thomas Vangsness Jr. et al*³³

Métodos para otimizar a conservação

Pré-tratamento com bifosfonatos

Pré-tratamento com bifosfonatos é uma adaptação ao SOC, utilizando bifosfonatos em conjunto com o meio de cultura e sendo conservados a 4°C.

Enxertos com 0,79cm² e profundidade até ao osso subcondral foram conservados usando o meio de conservação SOC, com a adição imediata de um bifosfonato em quatro de cinco grupos. Dos cinco grupos criados, um serviu como controlo (SOC), dois com etidronato sendo um com alta dose (0,1M) e outro com baixa dose (0,01M) e nos últimos dois grupos foi adicionado risedronato, um com alta (0,1M) e outro com baixa dose (0,01M). Todos os grupos foram conservados à temperatura de 4°C, tendo sido definidos os dias 16,35 ou 43 como os três pontos de controlo.

A análise histológica foi feita após a colheita e nos três pontos de controlo, sendo fixados em formaldeído para avaliação histológica descalcificada da amostra, com Safranina O (para detetar a distribuição de proteoglicanos) e TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) que deteta fragmentação do ADN em células em apoptose, servindo assim para determinar a viabilidade condrocitária. Estas análises foram classificadas segundo o sistema de classificação OARSI modificado (*Mankin classification system*). Aos 16 dias e aos 35 dias o grupo que melhor corou com Safranina O foi o risedronato em baixa dose, seguido pelo risedronato em alta dose. Aos 43 dias o grupo risedronato em alta dose corou ligeiramente mais que o grupo risedronato em baixa dose e o controlo. A análise TUNEL aos 43 dias mostrou que a viabilidade condrocitária era maior no grupo risedronato baixa dose, mas sem diferença estatisticamente significativa para os outros grupos. Os dois grupos com etidronato não coraram com Safranina O, revelando má conservação da matriz extracelular. Ficou também demonstrado em todos os grupos que a zona superficial era a menos corada. Nos três pontos de controlo e segundo o sistema de classificação *Makin*, o grupo risedronato em baixa dose era o que apresentava cartilagem com menores alterações, logo um *score* baixo na classificação.¹⁹

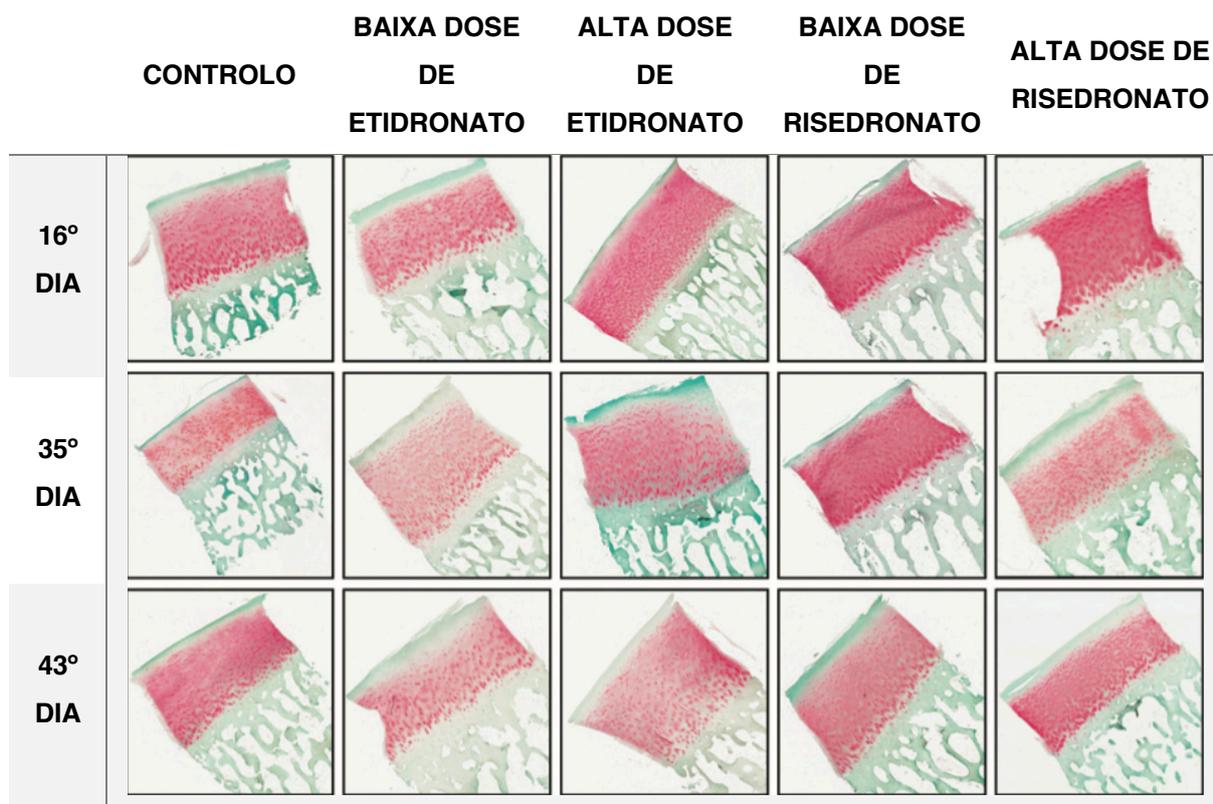


Figura 10. Avaliação histológica da cartilagem com Safranina O, sendo a intensidade com que corou proporcional à quantidade de proteoglicanos. *Adaptado de Drew D. Moore et al*¹⁹

Ácido Hialurónico

Há um método proposto pela *University of Wisconsin (UW)* que conjuga a utilização de um meio de conservação em conjugação com ácido hialurónico, sendo conservados à temperatura de 4°C. Este método ainda não teve avaliação em humanos.

Os autores partem do pressuposto, por testes realizados pelos mesmos, que o meio UW é superior ao SOC (apesar da viabilidade condrocitária do SOC ser 34% e no controlo com meio de UW realizado pelos autores a viabilidade condrocitária ser de aproximadamente 21%).

Foram criados então quatro grupos, um de controlo só com meio de UW e três com meio de UW suplementados com ácido hialurónico a 0,1% a diferentes concentrações (800kDa, 1900kDa, 6000kDa). Tendo sido conservados por 14 dias a 4°C.

A análise histológica foi feita com Hematoxilina-Eosina e Safranina O e classificados tendo em conta o sistema de *Mankin's histological-histochemical grading system*, que classifica as amostras em normalmente coradas, ligeira redução, redução moderada, redução grave ou não coradas. Os resultados mostraram maior quantidade de condrócitos normais e menor quantidade de condrócitos deteriorados nos grupos suplementados com ácido hialurónico. Sendo que o grupo que melhores resultados apresentou foi o conservado no meio de UW com ácido hialurónico a 800kDa.

A viabilidade celular foi averiguada através do ensaio *water soluble tetrazolium (WST)* apenas ao 14º dia, após se colocar o enxertos conservados numa solução de 3ml DMEM contendo 10% de WST a 37°C durante 2 horas. Os resultados foram de ~21% para o grupo conservado só em meio de UW, para os grupos suplementados com ácido hialurónico a 800, 1900 e 6000kDa os resultados foram respetivamente de ~41%, ~37% e ~34%. (31)

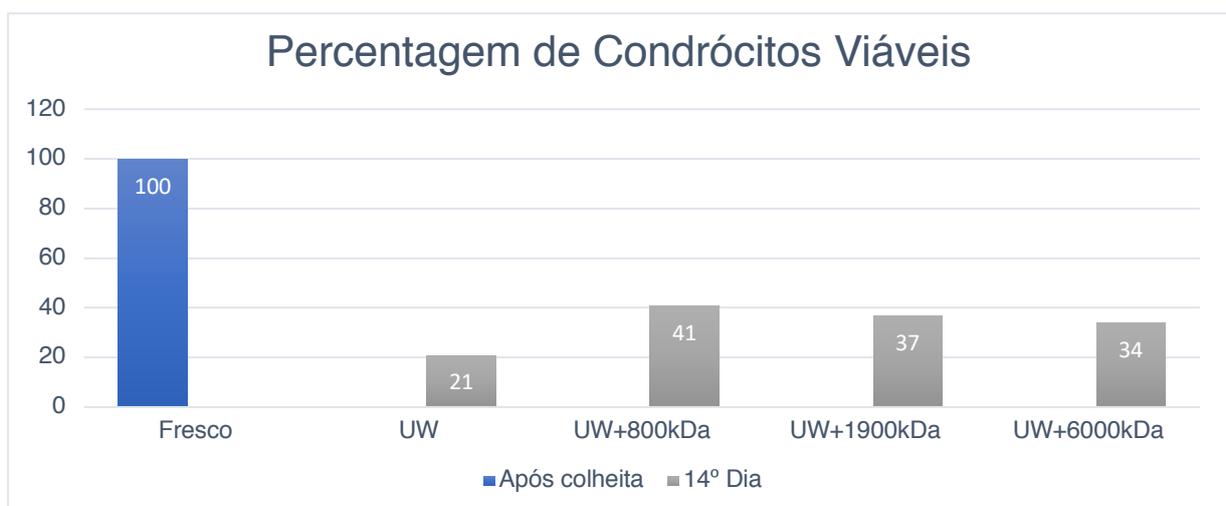


Gráfico 2. Percentagem de condrocitos viáveis em enxertos preservados em apenas UW ou UW + Ácido Hialurónico em comparação com um enxerto fresco após colheita. *Adaptado de Takuya Yamada et al*³¹

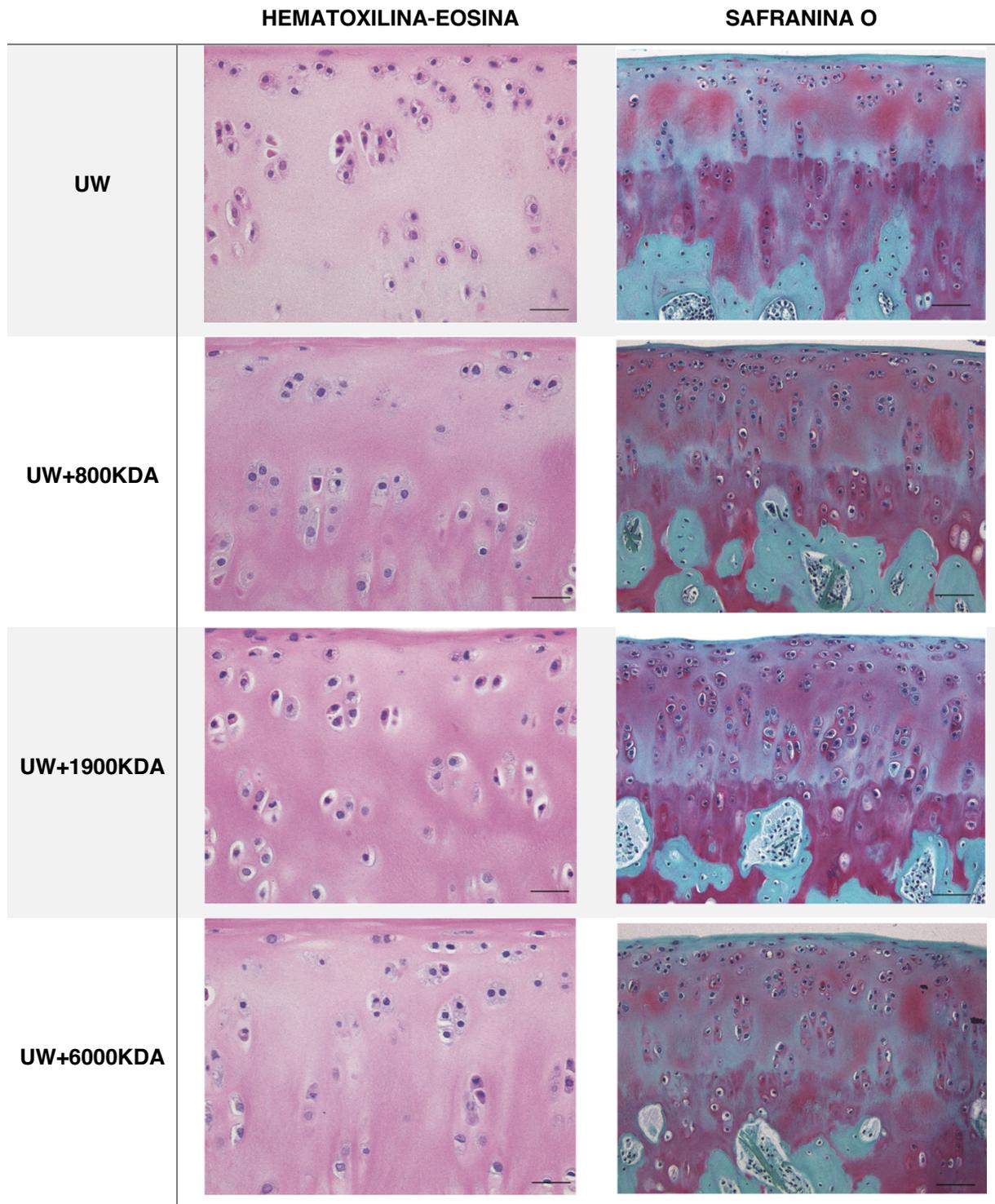


Figura 11. Avaliação histológica da cartilagem ao 14º dia. Que demonstra através da Hematoxilina-Eosina que os grupos UW+800kDa e UW+6000kDa têm o maior número de condrócitos normais e através da Safranina O que os grupos suplementados com ácido hialurônico preservaram melhor a distribuição de proteoglicanos que o grupo conservado apenas com UW. *Adaptado de Takuya Yamada et al*³¹

Arbutina

Arbutina é utilizada como um agente com propriedade crioprotetores, de forma isolada ou em conjugação com DMSO ou glicerol em aloenxertos congelados (-80°C).

Ambos os cõndilos tibiais foram colhidos em contexto de colheita multiorgânica e tratados no máximo 24h após a morte do dador.

Para a sua validação, foi realizado um estudo por *S.C.Rosa et al.* em que foram criados 6 grupos: dois exclusivamente com Arbutina, um com 50mM e outro com 100mM; outros dois com arbutina a 50mM e adicionando 5% de agentes crioprotetores (2,5% de glicerol + 2,5% DMSO) ou 10% de agentes crioprotetores (5% de glicerol + 5% DMSO); e por fim mais dois com arbutina a 100mM e adicionando 5% de agentes crioprotetores (2,5% de glicerol + 2,5% DMSO) ou 10% de agentes crioprotetores (5% de glicerol + 5% DMSO). Os cõndilos foram colocados a 37°C durante 30 minutos a 90 minutos numa solução nutritiva sem soro fetal bovino (Ham F-12) e depois colocados no respetivo grupo. Após esta conservação foram retirados dos meios nutritivos e conservados a -20°C durante 24 horas e posteriormente congelados a -80°C durante 2 a 3 meses. O descongelamento foi realizado colocando os mesmos numa solução de Ham F-12 a 37°C durante 1 hora. Após o descongelamento foram processados em enxertos de menores dimensões.

A viabilidade condrocitária foi avaliada antes e após o processo de congelação, utilizando dois métodos: ensaio MTT (método quantitativo que avalia a viabilidade celular através da redução do sal do MTT pelas mitocôndrias das células vivas) e um método utilizando corantes fluorescentes *Cal and Propidium Iodide* (PI). Sendo que o Cal imite uma cor verde se for hidrolisado pelas esterases celulares mostrando assim células com membrana celular viável, logo vivas; e o PI cora de vermelho o núcleo celular das células com membrana celular permeável, logo inviáveis/mortas. Segundo os autores não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas concentrações de Arbutina e o melhor resultado foi obtido foi de 34,2% (36,3 – 31,1%) no grupo preservado a 50mM durante 1 hora. Nos grupos onde foram adicionados agentes crioprotetores os resultados foram ligeiramente piores que utilizando a Arbutina isolada.

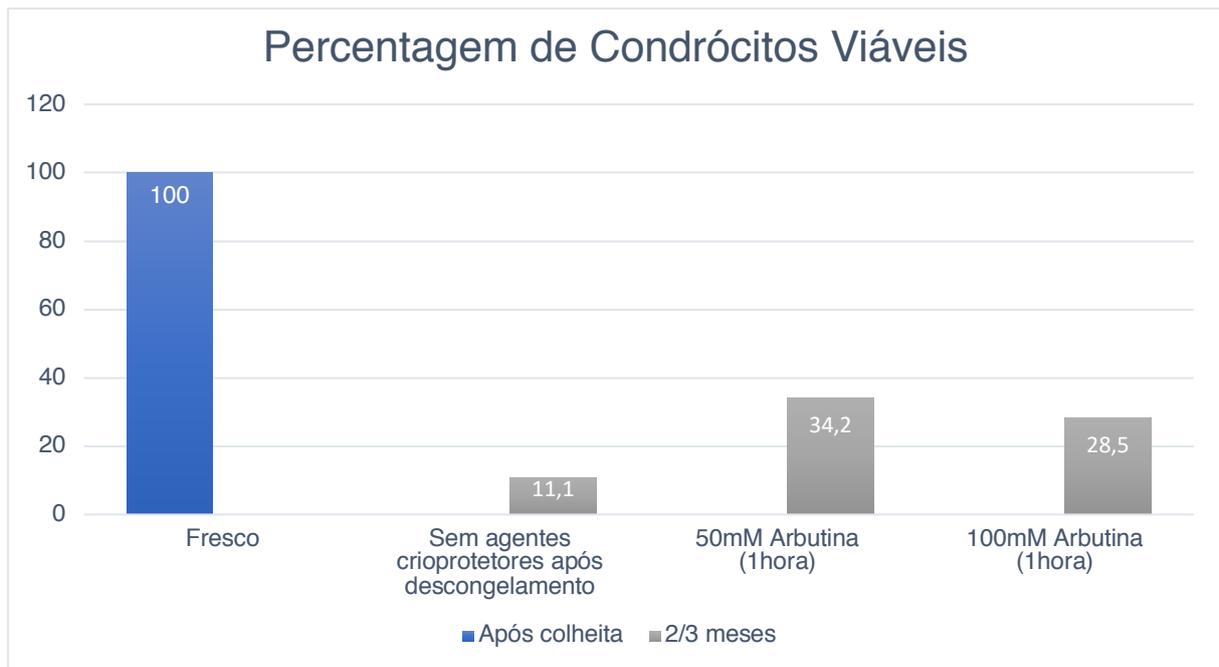


Gráfico 3. Percentagem de condrocitos viáveis em enxertos onde foi utilizada a Arbutina como agente crioprotetor, em comparação com um enxerto fresco após colheita e outro congelado sem agentes crioprotetores. *Adaptado de S. C. Rosa et al*³⁵

Nos métodos utilizando os corantes, os resultados foram semelhantes mostrando que no controlo pós descongelamento não eram detetadas quase nenhuma células vivas (Figura 11-A), e que não existia diferença estatisticamente significativa entre os grupos que usavam Arbutina, sendo que o que apresentou melhores resultados ainda assim foi no grupo preservado a 50mM durante 1 hora (Figura 11-B).³⁵

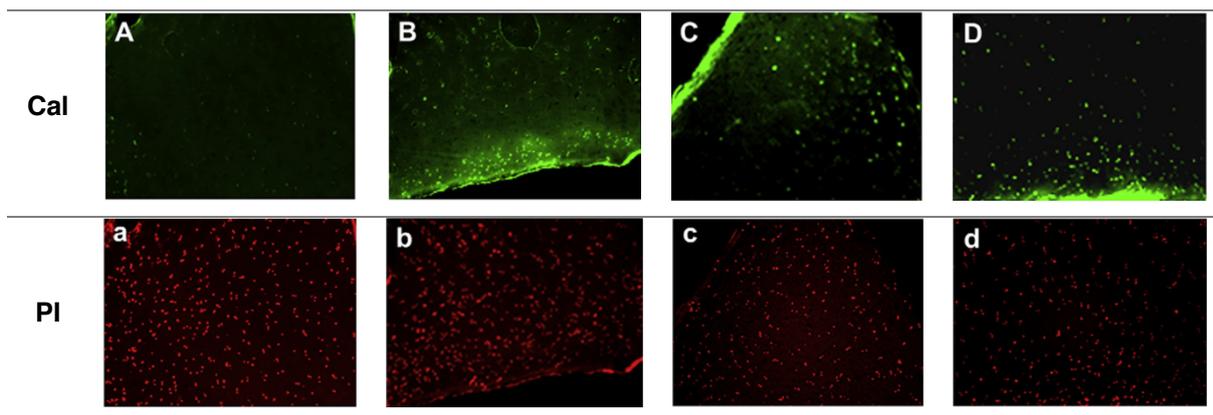


Figura 12. Viabilidade condrocitária, demonstrando a ausência de células viáveis na ausência de agentes de criopreservação (A). Arbutina 50mM apresentando o melhor resultado (B). Arbutina 50mM + 5% de agentes crioprotetores (C) e Arbutina 100mM + 10% de agentes crioprotetores (D), demonstrando não existir vantagens relativamente à Arbutina isolada. *Adaptado de S. C. Rosa et al*³⁵

Resumo das principais diferenças entre os tipos de aloenxertos estudados

As principais diferenças entre os enxertos assentam sobretudo no tipo, na temperatura a que são conservados, no meio de conservação e no tempo de conservação, tudo isto com o objetivo de se obter uma viabilidade condrocitária igual ou superior a 70%, que é o principal fator preditor de sucesso clínico a médio/longo prazo.

Para este efeito foi elaborada uma tabela que permite uma mais fácil interpretação dos dados e uma melhor comparação entre os vários métodos analisados.

Tabela I: Resumo das principais diferenças entre os tipos de aloenxertos estudados

	Tipo de enxerto	Temperatura	Meio de Conservação	Tempo de conservação	Viabilidade Condrocitária	Área do enxerto
MOPS	Fresco	25°C	Solução MOPS	28 dias	102,9%	½ Côndilo femoral
				56 dias	94,1%	
				70 dias	73,9%	
IMDM	Fresco	37°C	IMDM	1 dia	95,8%	0,28cm ²
				3 dias	94,3%	
				14 dias	85,9%	
SOC (sem SFB)	Fresco Refrigerado	4°C	DMEM e/ou NCTC-135 medium)	24 dias	34%	-
SOC (com SFB)	Fresco Refrigerado	4°C	SFB com nutrientes e fatores de crescimento	28 dias	67%	-
IMDM	Fresco Refrigerado	4°C	IMDM	1 dia	97,4%	0,28cm ²
				3 dias	94,7%	
				14 dias	92,9%	

Bifosfonatos	Fresco Refrigerado	4°C	DMEM e/ou NCTC-135 medium + risedronato (0,01M)	16 dias 35 dias 43 dias	Averiguada qualitativamente, com o melhor resultado ao 35° dia.	0,79cm ²
UW + ácido hialurónico	Fresco Refrigerado	4°C	UW + ácido hialurónico 800kDa	14	41%	-
CHUC	Congelado	-80°C	DMSO (10%)	5 anos	15%	-
CVOCA	Congelado	-80°C	DMSO	2 anos	70,5%	3,14cm ²
Arbutina	Congelado	-80°C	Arbutina (50mM)	2/3 meses	34,2%	Côndilos tibiais

Legenda: MOPS - *Missouri Osteochondral Allograft Preservation System*; IMDM - *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*; DAPI's - *4',6-diamidino-2-phenylindole*; SOC – *Standard of care*; SFB – *Soro Fetal Bovino*; DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*; UW - *University of Wisconsin*; WST - *water soluble tetrazolium*; CHUC – *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*; DMSO – *Dimetilsulfóxido*; Cal e PI - *Cal and Propidium Iodide*.

Conclusões

Perante a análise feita é perceptível que tanto o método utilizado no CHUC como o SOC estão desatualizados e não atingem o valor necessário de viabilidade condrocitária, ou seja 70%, para os enxertos terem bons resultados clínicos a médio/longo prazo.

A esterilidade do enxerto e a não contaminação do recetor são de extrema importância, e visto serem necessários no mínimo 14 dias para se obter o resultado de culturas, os enxertos em que a viabilidade condrocitária diminua para valores inferiores a 70% após estes 14 dias não devem ser considerados como aceitáveis.

Sendo a área do enxerto preditora do sucesso de conservação do mesmo e garantindo a homogeneização de processos num banco de ossos, quanto maior for a viabilidade condrocitária em enxertos de maior área, maior vai ser o numero de casos a que os mesmos podem responder. Assim sendo os aloenxertos frescos demonstram ser superiores ao congelados.

Conclui-se então, com base nas variáveis e nos possíveis vieses analisados que o MOPS apresenta os melhores resultados de todos os tipos estudados nesta revisão.

Tendo em conta que o método utilizado no CHUC é atualmente inferior ao método padrão usado mundialmente (SOC) e a alguns métodos descritos neste trabalho, é de extrema importância a sua atualização pois permitirá uma melhor qualidade de vida aos doentes sujeitos a esta técnica e minimizará/adiará o número de artroplastias totais realizadas. Estas poderão até deixar de ser necessárias se estes enxertos com uma viabilidade condrocitária de aproximadamente 100% restituírem a função previa à lesão, passando o doente a ter o mesmo risco que a população em geral para desenvolver uma nova doença que exija um tratamento com tanta morbidade como a artroplastia.

De salientar que a principal limitação dos enxertos frescos é a criação de um canal (dador – banco de ossos e tecidos – recetor) que permita a sua utilização em tempo útil, sob risco da inutilização de recursos e bens económicos.

Realizando uma análise critica aos resultados deste trabalho, existem alguns dados que podem enviesar os resultados obtidos e comparados. São eles primariamente o método de deteção da viabilidade condrocitária, que apesar de todos os autores terem comparado os resultados das suas amostras a um enxerto fresco com viabilidade condrocitária de 100%, os métodos que aferiam a quantidade de células vivas foi diferentes em todos os estudos. Outro é o tamanho do enxerto estudado, onde mais uma vez existe uma grande discrepância entre estudos.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Doutor Fernando Judas que como meu orientador me marcou pelo seu profissionalismo, conhecimentos, acessibilidade, opiniões e críticas ao longo deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Dr. João Pedro Oliveira que como meu coorientador, mostrou uma enorme disponibilidade, apoio e total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas no decorrer deste trabalho.

À Helena, meus pais, meus irmãos e restante família, um eterno obrigado por todo o suporte e por caminharem ao meu lado neste percurso.

Aos meus amigos e colegas por todo o apoio e carinho.

Bibliografia

1. Pallante AL, Chen AC, Ball ST, Amiel D. The In Vivo Performance of Osteochondral Allografts in the Goat is Diminished with Extended Storage and Decreased Cartilage Cellularity. *Am J Sport Med.* 2012;40(6):1301–15.
2. Allen RT, Robertson CM, Pennock AT, Bugbee WD, Harwood FL, Wong VW, et al. Analysis of stored osteochondral allografts at the time of surgical implantation. *Am J Sports Med.* 2005;33(10):1479–84.
3. Cook JL, Stoker AM, Stannard JP, Dvm KK, Dvm CRC, Pfeiffer FM, et al. A Novel System Improves Preservation of Osteochondral Allografts. *Clin Relat Res.* 2014;472(11):3404–14.
4. Judas F, Rosa S, Teixeira L, Lopes C, Mendes AF, Al TET. Chondrocyte Viability in Fresh and Frozen Large Human Osteochondral Allografts: Effect of Cryoprotective Agents. *Transplant Proc.* 2007;39(8):2531–4.
5. Cinque ME, Kennedy NI, Moatshe G, Vinagre G, Chahla J, Hussain ZB, et al. Osteochondral Allograft Transplants for Large Trochlear Defects. *Arthrosc Tech.* 2017;6(5):e1703–7.
6. Cao F, Qi J, Song H, Xie D, Zhou L, Han Y, et al. Tsmu solution improves rabbit osteochondral allograft preservation and transplantation outcome. *Cell Tissue Bank.* 2018;19(4):549–58.
7. Mei XY, Alshaygy IS, Sa OA, Gross AE, Kuzyk PR. Fresh Osteochondral Allograft Transplantation for Treatment of Large Cartilage Defects of the Femoral Head: A Minimum Two-Year Follow-Up Study of Twenty-Two Patients. *J Arthroplast J.* 2018;33(7):2050–6.
8. Mandelbaum BR, Chahla J. The Acellular Osteochondral Allograft, the Emperor Has New Clothes. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2018;33(12):2228–30.
9. Stoker AM, Stannard JP, Kuroki K, Bozynski CC, Pfeiffer FM, Cook JL. Validation of the Missouri Osteochondral Allograft Preservation System for the Maintenance of Osteochondral Allograft Quality During Prolonged Storage. *Am J Sports Med.* 2018;46(1):58–65.
10. Harb A, Horn A Von, Gocalek K, Schäck LM, Clausen J, Krettek C, et al. Lactated Ringer-based storage solutions are equally well suited for the storage of fresh osteochondral allografts as cell culture medium-based storage solutions. *Inj Int.* 2017;48(7):1302–8.
11. Lin Y, Lawallen EA, Dudakovic A, Galeano-garces C, Wang W, Karperien MJ, et al. RNA-seq Analysis of Clinical-Grade Osteochondral Allografts Reveals Activation of Early Response Genes Yang. *J Orthop Res.* 2016;34(11):1950–9.
12. Nover AB, Stefani RM, Lee SL, Ateshian GA. Long-Term Storage and Preservation of Tissue Engineered Articular Cartilage Adam. *J Orthop Res.* 2017;34(1):141–8.

13. Bugbee WD, Pallante AL, Gortz S, Amiel D. Osteochondral Allograft Transplantation in Cartilage Repair: Graft Storage Paradigm, Translational Models, and Clinical Applications. *J Orthop Res Orthop Res*. 2016;34(1):31–8.
14. Geraghty S, Kuang J, Yoo D, Leroux-williams M, Jr CTV. A novel , cryopreserved , viable osteochondral allograft designed to augment marrow stimulation for articular cartilage repair. *J of Orthopaedic Surg Res*. 2015;10(66):1–13.
15. Branco E, Diego DS, Aguiar P, Barcelos FM, Euge M. Approaches to preserve human osteochondral allografts. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(3):425–31.
16. Chubinskaya S, Haudenschild D, Gasser S, Stannard J, Krettek C, Borrelli J. Articular Cartilage Injury and Potential Remedies. *J Orthop Trauma*. 2015;29(12):47–52.
17. Temple HT. Allograft Reconstruction of the Knee — Methods and Outcomes. *J Knee Surg*. 2019;32(4):315–21.
18. Kuroki K, Stoker AM, Stannard JP, Bozynski CC, Cook CR, Pfeiffer FM, et al. Biologic Joint Repair Strategies : The Mizzou BioJoint Story. *Toxicol Pathol*. 2017;45(7):931–8.
19. Moore DD, Baker KC, Baker EA, Newton MD. Effect of Bisphosphonate Pretreatment on Fresh Osteochondral Allografts : Analysis of In Vitro Graft Structure and In Vivo Osseous Incorporation. *Orthopedics*. 2018;41(3):e376–82.
20. Mickevicius T, Pockevicius A, Kucinskas A, Gudas R, Maciulaitis J. Impact of storage conditions on electromechanical , histological and histochemical properties of osteochondral allografts. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16(314):1–12.
21. Caro F De, Bisicchia S, Amendola A, Ding L, Ph D. Large Fresh Osteochondral Allografts of the Knee : A Systematic Clinical and Basic Science Review of the Literature. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg*. 2018;31(4):757–65.
22. Jamali AA, Hatcher SL, You Z. Donor Cell Survival in a Fresh Osteochondral Allograft at Twenty-nine Years. *J Bone Jt Surgery, Inc*. 2007;89(1):166–9.
23. Richter DL, Jr RCS, Wascher DC. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques : A Review of the Literature. *Sports Health*. 2015;8(2):153–60.
24. Mcallister DR, Joyce MJ, Mann BJ. The Current Status of Tissue Regulation, Procurement, Processing, and Sterilization. *Am J Sports Med*. 2005;35(12):2148–58.
25. Eduardo L, Tírico P, Demange MK, Augusto L, Santos U, Rezende MU De, et al. Development of a Fresh Osteochondral Allograft Program Outside North America. *Cartilage*. 2016;7(3):222–8.
26. Garrity JT, Stoker AM, Sims HJ, Cook JL. Improved Osteochondral Allograft Preservation Using

- Serum-Free Media at Body Temperature. *Am J Sports Med.* 2012;40(11):2542–8.
27. Stoker A, Ph D, Garrity JT, Stannard JP, Cook MDJ, Ph D. Improved Preservation of Fresh Osteochondral Allografts for Clinical Use. *J Knee Surg.* 2012;25(2):117–26.
 28. Sherman SL, Garrity J, Cook J, Stannard J, Bugbee W. Fresh Osteochondral Allograft Transplantation for the Knee : Current Concepts. *J Am Acad Orthop Surg.* 2014;22(2):121–33.
 29. Ding L, Zampogna B, Vasta S, Jang KW, Caro F De, Martin JA, et al. Why Do Osteochondral Allografts Survive?: Comparative Analysis of Cartilage Biochemical Properties Unveils a Molecular Basis for Durability. *Am J Sport Med.* 2016;43(10):2459–68.
 30. Qi J, Hu Z, Song H, Chen B, Xie D, Zhou L, et al. Cartilage storage at 4 ° C with regular culture medium replacement benefits chondrocyte viability of osteochondral grafts in vitro. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(3):473–9.
 31. Yamada T, Uchida K, Onuma K, Inoue G, Aikawa J, Takano S, et al. Hyaluronic Acid (800 kDa) Supplementation of University of Wisconsin Solution Improves Viability of Osteochondral Grafts and Reduces Matrix Metalloproteinase Expression during Cold Preservation. *Sci World J.* 2015;2015:7.
 32. Stoker AM, Stannard JP, Cook JL. Chondrocyte Viability at Time of Transplantation for Osteochondral Allografts Preserved by the Missouri Osteochondral Preservation System versus Standard Tissue Bank Protocol. *J Knee Surg.* 2017;31(8):772–80.
 33. Jr CTV, Higgs G, Hoffman JK, Farr J, Davidson PA, Milstein F, et al. Implantation of a Novel Cryopreserved Viable Osteochondral Allograft for Articular Cartilage Repair in the Knee. *J Knee Surg.* 2018;31(6):528–35.
 34. Patil S, Tapasvi SR. Osteochondral autografts. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015;8(4):423–8.
 35. Judas F, Lopes C, Mendes AF. Brief report Assessment of strategies to increase chondrocyte viability in cryopreserved human osteochondral allografts: evaluation of the glycosylated hydroquinone , arbutin. *Osteoarthr Cartil.* 2009;17(12):1657–61.
 36. Surgeon O, D SNDJM, Fellow A, Bellemans JMD, Ph D, Surgeon O, et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15(12):1397–402.
 37. Judas F, Saavedra MJ, Mendes AF, Dias R. Cortical Strut Allografting In Reconstructive Oethopaedic Surgery. *Acta Reum Port.* 2011;36(5):24–8.
 38. Judas F, Mendes AF. Aloenxertos Criopreservados no Tratamento de Defeitos Osteocartilagíneos. 2009;1–31.

39. Carbone A, Rodeo S. Review of current understanding of post-traumatic osteoarthritis resulting from sports injuries. *J Orthop Res.* 2016;35(3):397–405.
40. Jacquet C, Erivan R, Argenson J-N, Parratte S. Effect of 3 Preservation Methods (Freezing , Cryopreservation , and Freezing + Irradiation) on Human Menisci Ultrastructure - An Ex Vivo Comparative Study With Fresh Tissue as a Gold Standard. *Am J Sports Med.* 2018;46(12):1–6.
41. Schmidt KJ, Tírico LE, McCauley JC, Bugbee WD. Fresh Osteochondral Allograft Transplantation - Is Graft Storage Time Associated With Clinical Outcomes and Graft Survivorship? Kenneth. *Am J Sports Med.* 2017;45(10):1–7.
42. Atabek M. The effects of low-dose radiotherapy on fresh osteochondral allografts: An experimental study in rabbits. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2016;50(5):572–7.
43. Hohmann E, Tetsworth K. Large osteochondral lesions of the femoral condyles: Treatment with fresh frozen and irradiated allograft using the Mega OATS technique. *Knee.* 2016;23:436–41.
44. Karataglis D, Learmonth DJAT. Management of big osteochondral defects of the knee using osteochondral allografts with the MEGA-OATS technique. *Knee.* 2005;12(5):389–93.
45. Torrie AM, Kesler WW, Elkin J, Gallo RA. Osteochondral allograft. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015;8(4):413–22.