Arlete Mazzini Miranda Giovani

**Estudo comparativo
entre o tecido ósseo criopreservado
e o conservado em glicerol a 98%**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Prof. Dr. Alberto Tesconi Croci

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

© reprodução autorizada pelo autor

Giovani, Arlete Mazzini Miranda

Estudo comparativo entre o tecido ósseo criopreservado e o conservado em glicerol a 98% / Arlete Mazzini Miranda Giovani.-- São Paulo, 2005.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Alberto Tesconi Croci.

Descritores: 1. TECIDO ÓSSEO 2. GLICERINA 3. TRANSPLANTE ÓSSEO
4. CRIOPRESERVAÇÃO

USP/FM/SBD-315/05

À minha família, em especial aos meus pais Alcides de Freitas Miranda e Edemi Santana Mazzini Miranda, por terem me proporcionado tantas oportunidades, com dedicação, amor e carinho.

Ao meu marido Luiz Giovani, pelo incentivo, apoio, carinho e bom humor dispensados durante a condução deste estudo, em meus momentos de concentração.

Aos meus também pais Luiz Giovani (*in memoriam*) e Maria Aparecida Nogueira Giovani, pelo acolhimento como filha, vibração e amor verdadeiro.

Agradecimentos

Aos Profs. Marco Martins Amatuzzi, Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho e Olavo Pires de Camargo, pela oportunidade oferecida aos demais profissionais da área da saúde de realização da Pós-Graduação no Departamento.

Ao Prof. Alberto Tesconi Croci, um especial agradecimento pela confiança depositada, apoio constante, e orientação precisa na execução deste trabalho.

À Dra. Vanda Jorgetti, Dr. Roberto Freire da Mota e Albuquerque e Dr. Reginaldo Perilo Oliveira, pela seriedade e serenidade demonstradas durante a qualificação e por suas opiniões e sugestões.

Aos meus amigos e companheiros nos desafios diários, Luiz Augusto Ubirajara Santos, Júlio César Shinzato, Graziela Guidoni Maragni, Fabiana Rovai Garpelli, Ana Maria Carlos, Sérgio Ricardo de Souza e Yara Maria Pereira de Oliveira, pelo apoio, incentivo, vibração e pelo maravilhoso convívio de todos estes anos.

Ao Grupo de Quadril e funcionários do Centro Cirúrgico do Instituto de Ortopedia e Traumatologia, pela colaboração e apoio na coleta das amostras.

A todos os colegas do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela amizade e pelo empenho em nos-

sa atividade científica, de ensino e assistencial.

A todos que atuam na pós-graduação pelo profissionalismo e carinho dispensados.

À Dra. Cláudia Regina Gomes C. M. de Oliveira, Dra. Renée Zon Filippi, Carlos Sato e equipe, pela realização e análise dos exames anátomo-patológicos.

À Dra. Flávia Rossi e equipe, pela realização dos exames microbiológicos.

À Dra. Carmen Diva Saldiva de André, pelo auxílio com a análise estatística.

À equipe da Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo profissionalismo, paciência e apoio demonstrados.

À Diva da Silva de Godoi, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.

Ao Plínio Augusto Coelho, pelo esmero na correção ortográfica e gramatical desta dissertação.

Aos pacientes que doaram parte de si, colaborando na elaboração deste trabalho.

“O mais belo sentimento é o sentido do mistério. É a origem de toda a ciência verdadeira. Quem jamais conheceu esta emoção, quem não possui o dom de admiração, é como se estivesse morto: seus olhos estão cerrados”

Albert Einstein

(2005 – centenário da Teoria da Relatividade)

“Você pode sonhar, criar e construir a idéia mais maravilhosa do mundo, mas são necessárias pessoas para fazer o sonho virar realidade.”

Walt Disney
(1901 – 1966)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com

List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
3. MÉTODOS	22
3.1. Material	23
3.1.1. Fatores de inclusão	24
3.1.2. Fatores de exclusão	24
3.2. Métodos	24
3.2.1. Retirada das cabeças femorais	24
3.2.2. Retirada de amostras de tecido ósseo trabecular	24
3.2.3. Encaminhamento de amostras para análise microbiológica	28
3.2.4. Encaminhamento de amostras para análise na Anatomia Patológica –	29
3.2.5. Tratamento estatístico	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Análise inferencial	34
4.2. Análise descritiva	35
4.2.1. Histomorfologia	35
4.2.2. Análise da viabilidade celular	43

5. DISCUSSÃO	48
5.1. Utilização dos aloenxertos e dos enxertos autólogos	50
5.2. Seleção dos doadores	51
5.3. Criopreservação	52
5.4. Conservação em glicerol	54
5.5. Estudo tecidual	55
5.6. Custos	56
6. CONCLUSÕES	58
7. ANEXOS	60
Anexo A	61
Anexo B	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Técnica de coleta e armazenamento das amostras em ambiente controlado por fluxo laminar.

Figura 2 - Radiografia demonstrando a área de coleta das amostras, baseada na classificação de DeLee e Charnley (zona da cabeça femoral correspondente à projeção da área 2).

Figura 3 - Seleção das amostras de tecido ósseo do fragmento obtido da zona da cabeça femoral correspondente à projeção da área 2, conforme a classificação de DeLee e Charnley.

Figura 4 - Corte histológico de aloenxerto do Gc - matriz óssea preservada.

Figura 5 - Corte histológico do aloenxerto do Gcrio 12 - matriz óssea preservada.

Figura 6 - Corte histológico do aloenxerto do Gpg 12 - matriz óssea preservada.

Figura 7 - Corte histológico do Gcrio 12, mostrando população de células viáveis (osteoblastos e osteócitos).

Figura 8 - Corte histológico do Gpg 12, mostrando população de células viáveis (osteoblastos e osteócitos).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATQ	Artroplastia Total do Quadril.
CO₂	Gás carbônico.
et al	e outros (et alii).
Gc	Grupo controle.
Gcrio 12	Grupo criopreservado por 12 meses.
Gpg 12	Grupo preservado no glicerol a 98%, em temperatura ambiente, por 12 meses.
HCV	Vírus da hepatite C.
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
HE	Hematoxilina - eosina.
HEPA	Filtros absolutos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana.
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia.
°C	Graus Celcius
n°	Número
OI	Osso imaturo
OM	Osso maduro ou lamelar
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - P-valores obtidos no teste de McNemar na comparação das distribuições de probabilidades das variáveis da histomorfologia das três condições experimentais.

Tabela 2 - P-valores obtidos no teste de McNemar na comparação das distribuições de probabilidades das variáveis da viabilidade celular das três condições experimentais.

Tabela 3 - Frequências absolutas e relativas dos escores de osso maduro ou lamelar

Tabela 4 - Distribuição de frequências conjuntas de osso maduro ou lamelar nas condições de grupo controle e criopreservado

Tabela 5 - Distribuição de frequências conjuntas de osso maduro ou lamelar nas condições de grupo controle e conservado no glicerol a 98%

Tabela 6 - Distribuição de frequências conjuntas de osso maduro ou lamelar nas condições de grupo criopreservado e o conservado no glicerol a 98%

Tabela 7 - Frequências absolutas e relativas dos escores de osteóide não mineralizado.

Tabela 8 - Frequências absolutas e relativas dos escores de osso imaturo

Tabela 9 - Distribuição de frequências conjuntas de osso imaturo nas condições de grupo controle e criopreservado

Tabela 10 - Distribuição de frequências conjuntas de osso imaturo nas condições de grupo controle e conservado em glicerol a 98%

Tabela 11 - Distribuição de freqüências conjuntas de osso imaturo nas condições de grupo criopreservado e conservado em glicerol a 98%

Tabela 12 - Freqüências absolutas e relativas dos escores de necrose

Tabela 13 - Distribuição de freqüências conjuntas de necrose nas condições de grupo controle e criopreservado

Tabela 14 - Distribuição de freqüências conjuntas de necrose nas condições de grupo controle e conservado em glicerol a 98%

Tabela 15 - Distribuição de freqüências conjuntas de necrose nas condições de grupo criopreservado e conservado em glicerol a 98%

Tabela 16 - Freqüências absolutas e relativas dos escores de osteoblastos

Tabela 17 - Distribuição de freqüências conjuntas de osteoblastos nas condições de grupo criopreservado e conservado em glicerol a 98%

Tabela 18 - Freqüências absolutas e relativas dos escores de osteoclastos

Tabela 19 - Distribuição de freqüências conjuntas de osteoclastos nas condições de grupo criopreservado e conservado em glicerol a 98%

Tabela 20 - Freqüências absolutas e relativas dos escores de osteócitos

Tabela 21 - Freqüências absolutas e relativas dos escores de fibroblastos

RESUMO

Giovani A M M. *Estudo Comparativo Entre o Tecido Ósseo Criopreservado e o Conservado em Glicerol a 98%* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 75p.

O Banco de Tecidos do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo está desenvolvendo uma linha de estudos experimentais com o intuito de apresentar novos métodos de armazenamento de aloenxertos. Este estudo tem como objetivo comparar o método da criopreservação (- 80° C) com o da conservação em glicerol a 98% em temperatura ambiente. Foram analisadas tanto a capacidade de inibição de crescimento bacteriano e fúngico quanto às eventuais alterações histológicas. Para isso, foram estudadas 30 amostras de tecido ósseo trabecular coletadas de 10 pacientes submetidos à artroplastia total do quadril. Estas amostras foram divididas em três grupos de 10 espécimes, a saber: grupo controle, grupo criopreservado e grupo conservado em glicerol a 98% à temperatura ambiente. O período de armazenamento das amostras foi de um ano. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo método de McNemar, com índice de significância de 0,10. No que diz respeito à preservação da matriz óssea, não houve variações significativas nos dois grupos estudados em relação ao grupo controle. Não ocorreu crescimento bacteriano ou de fungos nas amostras armazenadas durante um ano em glicerol a 98%. Por ser extremamente reduzido em relação à criopreservação, o custo do método da conservação em glicerol a 98% o indica para uso em Bancos de Tecidos de pequena monta. Contudo, são

ainda necessários posteriores estudos sobre as propriedades biomecânicas, remoção do glicerol do tecido ósseo e o processo de integração biológica dos mesmos com o receptor.

Descritores: tecido ósseo, glicerina, transplante ósseo e criopreservação.

SUMMARY

Giovani A M M. *Comparative analysis between bone tissue cryopreservation and glycerol 98% preservation methods* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 75p.

The Tissue Bank of *Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo* is developing a line of experimental studies with the intention to present new methods of allografts storage. This study has the objective to compare the method of cryopreservation (-80 °C) with glycerol 98% preservation at room temperature. It even analyses, in such way, the inhibition capacity of bacterial and fungal growth and any eventual histological changes. For this, 30 samples of trabecular bone tissue have been collected from 10 patients submitted to total hip arthroplasty. These samples were separated in three groups of 10 specimens, as following: a control group, a cryopreserved group and a glycerol 98% preserved group at room temperature. They were stored during a period of one year. The results were analysed by the McNemar statistic method, with a significance of 0,10. Concerning to bone matrix, no significant changes occurred to the two studied groups compared to the control group. Bacterial and fungal growth do not occurred in the stored samples for one year in glycerol 98%. For being extremely reduced when compared with cryopreservation method, the preservation cost in glycerol 98% indicates its use on small sum tissue banks. However, posterior studies about biomechanical properties, glycerol removal of bone tissue and their biological process of integration with the receiver are necessary.

Descriptors: bone tissue, glycerol, bone transplant and cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de enxertos ósseos nas cirurgias ortopédicas é cada vez mais freqüente. Os chamados enxertos autógenos (tecidos obtidos do próprio paciente) têm sua aplicação limitada, considerando-se a pequena quantidade de osso possível de ser retirado, além do aumento da morbidade cirúrgica e possibilidade de ocorrer complicações pós-operatórias tais como defeitos na área doadora e dores residuais indesejáveis neste local.

Com o intuito de substituir este tipo de enxerto, novas opções se mostraram bastante promissoras, especialmente com a introdução da técnica dos aloenxertos, ou seja, a retirada de tecidos de doador cadáver para posterior utilização nas falhas ósseas. Estes aloenxertos, sejam eles utilizados após criopreservação (- 80 °C) ou liofilização e esterilização por irradiação gama, têm tido uma aplicação viável. Hoje, os mesmos vêm sendo empregados com bastante freqüência, principalmente nas revisões de artroplastias do quadril e nas ressecções amplas de tumores ósseos, podendo-se ressaltar como vantagens a diminuição do tempo cirúrgico e a disponibilização da quantidade necessária de enxertos ósseos. A criopreservação mantém a propriedade osteoindutiva dos tecidos e, juntamente com a liofilização, procura reduzir a carga antigênica do enxerto e eliminar o potencial de transmissão de doenças infecciosas.

Todavia, estes métodos são complexos e dispendiosos, pois além de exigirem equipamentos de custo elevado, necessitam de equipes qualificadas que atuem 24 horas, captando, processando e armazenando os tecidos conforme a disponibilidade de doadores.

Em decorrência dessas necessidades, criaram-se bancos de tecidos do sistema musculoesquelético, que utilizam condutas padronizadas e que estão preparados para fornecer aloenxertos com o máximo rigor técnico.

A manutenção de um banco de tecidos não é uma tarefa simples. Além da metodologia envolvida no preparo dos tecidos, deve-se cumprir diretrizes legais referentes aos doadores e aos procedimentos técnicos estabelecidos.

No Brasil, a normatização dos bancos de tecidos e retirada de órgãos teve início com a Lei Federal nº 9434, regulamentada pelo Decreto nº 2268, a qual disciplina “a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano e sua aplicação em transplantes, enxertos ou outra finalidade terapêutica”.

Direcionada à abertura e manutenção de bancos de tecidos ósteo-fáscio-condroligamentosos, a Portaria nº 1686 de 20 de setembro de 2002 regulamenta desde o processo de cadastramento das equipes, até as normas técnicas específicas para o funcionamento dos bancos. Esta Portaria define Banco de Tecidos Musculoesqueléticos como sendo:

Um serviço que, com instalações físicas, equipamentos, recursos humanos e técnicas adequadas, seja destinado à captação, triagem clínica, laboratorial e sorológica, coleta, identificação, processamento, estocagem e distribuição de tecido musculoesquelético de procedência humana para fins terapêuticos ou de pesquisa.

Também foram estabelecidas normas e rotinas que devem ser seguidas durante a captação (triagem do doador), ablação (retirada), acondicionamento dos tecidos, reconstrução do corpo do doador, transporte, processamento, estocagem, disponibilização e controle de qualidade de tecidos musculoesqueléticos, especificando inclusive a composição da equipe técnica e instalações físicas. A proposta atual da legislação é padronizar e facilitar a auditoria e o controle de todos os bancos de tecidos, determinando pontos relevantes para cada fase do processo, da doação ao transplante do enxerto ósseo.

Amatuzzi et al (2004) apresentam sua experiência em banco de tecidos utilizando a criopreservação e enfatizam o controle de qualidade dos aloenxertos a partir de critérios rigorosos de inclusão ou exclusão dos doadores, evitando-se assim a transmissão de doenças infecto-contagiosas.

Diante da importância da conservação e armazenamento dos aloenxertos, meios alternativos mais eficientes e menos custosos vêm merecendo estudos.

Sabe-se que o glicerol, quando em altas concentrações, possui ação antibacteriana, antifúngica e antiviral. Diversos trabalhos demonstram que, na concentração de 98% em temperatura ambiente, é eficaz na conservação de tecidos biológicos. **(Pigossi, 1964, Lex e Raia, 1970, Pigossi et al, 1971, Puig, 1972, Puig et al, 1974, Puig, 1976, Puig et al, 1977, Basile, 1982, Backere, 1994, Hettich et al, 1994, Van Baare et al, 1998 e Ravishanker et al, 2003)**

Por outro lado, em Ortopedia, não há referências na literatura sobre a conservação de tecidos ósteo-fáscio-condroligamentosos com este agente. Apenas **Pigossi (1964)** e **Backere (1994)** sugerem o emprego deste método na conservação de ossos.

Rey (2003) define o glicerol como:

Um poli-álcool derivado da molécula do propano, onde um H de cada carbono foi substituído por - OH, pelo que sua fórmula é $\text{CH}_2(\text{OH})\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2(\text{OH})$. A importância biológica do glicerol está em que, se esses radicais - OH forem substituídos por ácidos carboxílicos (ácidos graxos) de cadeia longa, como os ácidos palmítico, esteárico e oléico, formam-se triglicerídeos, isto é, lipídios fundamentais para a constituição das membranas celulares e para servirem de reserva energética dos seres vivos.

No ano de 1776, o químico sueco **Scheele** o isolou *in vitro* e em 1823, **Cheurevil** obteve a primeira patente para a sua fabricação industrial (glicerol a 85%). (**Hoekstra et al, 1994**)

O glicerol, propanotriol ou glicerina se apresenta como um líquido incolor, viscoso, não tóxico, higroscópico e solúvel em água. É muito utilizado nas formulações farmacêuticas como veículo e solvente na composição de cremes, supositórios, elixires, xaropes e colírios. Também é conhecido na prática laboratorial como crioprotetor, quando empregado em baixas concentrações (5% a 20%), sendo que, em altas concentrações, possui ação preservativa. (**Gangolli, 1999, Gennaro, 2000, Sweetman, 2002 e Rey, 2003**)

Este triálcool também possui acentuada hidrofília devido à sua polaridade, com efeito desidratante sobre as células teciduais, muitas vezes desejável como nos transplantes de pele e de dura-máter, além de não provocar grandes alterações na estrutura celular. Em centros especializados na preservação de

tecidos através do emprego de baixas temperaturas (nitrogênio líquido e neve carbônica), a glicerina é utilizada como protetor celular por manter a vitalidade das células que são rapidamente congeladas. A desidratação do tecido pelo glicerol substitui a água intracelular sem alterar a sua concentração iônica, agindo portanto como protetor eficiente da integridade celular. Além do seu poder antienzimático, a glicerina promove alterações na textura da dura-máter as quais são consideradas benéficas, pois reduzem a sua antigenicidade. Quando utilizado em concentrações superiores a 48%, o glicerol apresenta propriedades bactericidas com amplo espectro de ação por atuar como poderoso anti-séptico. **(Pigossi et al, 1971, Basile, 1982 e Hettich et al, 1994)**

O objetivo deste estudo é testar os efeitos antibacteriano e antifúngico do glicerol a 98%, quando os tecidos ósseos são mantidos à temperatura ambiente, como também analisar comparativamente as alterações histológicas verificadas e decorrentes do emprego do método da criopreservação e o da conservação em glicerol a 98%.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A obtenção de tecidos ósseos para transplantes vem sendo pesquisada e estudada ao longo de mais de um século. As primeiras referências aparecem em 1867 através de estudos experimentais e observações clínicas de **Ollier** que comprovam a viabilidade dos enxertos homólogos e autólogos, bem como a possibilidade de sobrevivência dos fragmentos ósseos quando transplantados. Porém, o enfoque de seus estudos não está dirigido aos meios de conservação dos enxertos, os quais não são descritos em detalhes (**apud Groves, 1917**).

William MacEwen realiza com sucesso em 1878 o primeiro enxerto homólogo, reconstruindo o úmero de uma criança de quatro anos, acometida de osteomielite e utilizando a tíbia de um doador cadáver. Entretanto, não há referência ao método de coleta e conservação do enxerto (**apud Bush, 1947, Bush e Garber, 1948, Hult, 1950 e Boer, 1987**).

Albee (1912), Carrel (1912) e Groves (1917) descrevem a necessidade da retirada precoce dos enxertos ósseos provenientes de doadores cadáveres ou membros amputados, bem como o emprego do frio (2 °C a 5 °C) como meio de conservação de tecidos humanos, evitando-se assim o crescimento de microrganismos e conseqüentemente a deterioração dos mesmos. Também citam a realização de culturas com o objetivo de certificar os aloenxertos destinados aos transplantes. Diferentemente de **Groves (1917)**, que conservava os enxertos ósseos em tubos secos estéreis, **Albee (1912) e Carrel (1912)**, além da utilização de temperaturas baixas, optam também pelo uso do petrolato e da solução isotônica de Ringer como meios de preservação.

Entre 1918 e 1937, aparecem relatos na literatura divulgando a utilização de substâncias químicas como o álcool, o éter e o xilol, além da ebulição como meios de conservação de tecidos ósseos. Entretanto, os resultados não são muito animadores pois, em alguns casos, os enxertos se comportam como corpos estranhos. **(apud Fazzi, 1966)**

Bush (1947), Wilson (1947), Bush e Garber (1948) são os primeiros autores a desenvolver protocolo próprio para a instalação de um banco de osso, utilizando o método de congelamento para a conservação e o armazenamento de enxertos homólogos. Sugerem o controle rigoroso das informações referentes aos aloenxertos, tais como o nome do doador, o número de registro, o tipo do tecido ósseo, a história de infecção aguda recente, os testes laboratoriais realizados (detecção da malária, hepatite e sífilis), as culturas para identificação de infecções, a data do armazenamento, o peso do tecido, o que facilitaria o rastreamento de complicações. Descrevem o método utilizando temperaturas que variaram entre -20° C e -30° C e recipientes estéreis para a sua estocagem. Recomendaram a seleção e o controle rigorosos do provável doador e também pesquisam a influência do grupo sanguíneo e do fator Rh, concluindo que os mesmos não interferem no comportamento dos aloenxertos. Demonstram a utilização de aloenxertos ósseos homólogos congelados com resultados satisfatórios e enfatizam que o comportamento destes enxertos é similar ao dos autólogos frescos com relação à consolidação. O sucesso dos resultados leva à conclusão de que os bancos de ossos, utilizando o congelamento como método

de conservação dos aloenxertos, são os reservatórios ideais para estocagem e fornecimento de material para posterior utilização em cirurgias ortopédicas.

Em 1950, o Banco de Osso da Clínica Ortopédica e Traumatológica – Serviço do Professor Doutor F. E. Godoy Moreira da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo passa a funcionar seguindo o processo físico de congelamento, utilizando uma temperatura entre -25 °C e -30 °C. Toda a estruturação é baseada nos princípios preconizados por **Bush e Wilson (1947)**, **(Carvalho et al, 1952 e apud Fazzi, 1966)**.

Durante toda a década de 50, quase todos os estudos estão voltados para a utilização dos enxertos homólogos conservados pelo método de congelamento. **Sicard e Binet (1950)**, apoiando a observação de outros autores, concordam que as baixas temperaturas mantêm a integridade celular dos tecidos e impedem a ativação de ações catalíticas.

A partir destes conhecimentos, muitos bancos de ossos são estruturados em vários países, adotando o processo de congelamento dos enxertos ósseos como método de conservação e armazenamento. **Hult (1950)**, **Wilson (1951a)**, **Wilson (1951b) e Carvalho et al (1952)**, utilizam enxertos homólogos congelados, alcançando uma média de 90% de bons resultados e reforçam a importância da existência de um banco de osso. Consideram o congelamento um método seguro para a conservação do enxerto.

Herbert (1951) faz referência ao congelamento dos enxertos ósseos, comprovando sua ação bacteriostática sobre os microrganismos. Observa que:

O *Staphylococcus sp* sobrevive à temperatura de -30°C , o *Pyocianus* a -75°C , o *Micobacterium tuberculosis* sobrevive a -200°C em ar líquido, e o *Treponema pallidum* a -78°C . O *Bacillus coli*, o *typhus* e o *prodigious* são inibidos pelo frio intenso. Os vírus mantêm-se a -180°C de temperatura.

Conclui que, apesar da baixa temperatura inibir o crescimento de microrganismos, ela não torna os enxertos ósseos livres dos mesmos. Recomenda cuidados de assepsia rígidos durante a captação e armazenamento dos aloenxertos, bem como um rigoroso controle bacteriológico.

Kreuz et al (1951) e Dubau et al (1952) são os precursores da liofilização. Ocorre que segundo os autores, com o emprego desta técnica, os enxertos ósseos tornam-se frágeis, facilmente trituráveis e adquirem o aspecto de osso fresco após a sua reidratação. Portanto, o método teria a grande vantagem de permitir a conservação dos mesmos à temperatura ambiente, facilitando o transporte e o armazenamento.

Roberts (1952) utiliza a ebulição como meio alternativo ao congelamento. O método de preparo consiste na fervura dos aloenxertos por meia hora logo após a sua obtenção, sendo este processo físico de fervura repetido por 20 minutos antes da sua utilização. A estocagem é feita em recipientes secos e os

enxertos ósseos homólogos são mantidos em refrigerador doméstico. Apresenta bons resultados em 112 casos e admite a praticidade do método, concluindo que o comportamento dos enxertos ósseos preparados é semelhante aos dos autógenos frescos.

Carr e Hyatt (1955) apresentam bons resultados (em torno de 90%) na utilização dos aloenxertos congelados e reiteram as vantagens deste método, tais como a diminuição do tempo cirúrgico, a disponibilidade do tecido ósseo necessário, como também a possibilidade de se evitar incisões adicionais ao paciente. Contudo, alertam da necessidade de um investimento alto em equipamento e equipe bem treinada.

A partir da década de 60, aparecem novos estudos utilizando substâncias químicas como meios conservantes de enxertos ósseos como o álcool, o éter e o fenol, mantidos à temperatura ambiente. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que estas substâncias destroem a arquitetura celular do enxerto. **(apud Fazzi, 1966)**

Em 1964, **Pigossi** propõe o uso do glicerol em altas concentrações (98%), como agente conservante de dura-máter homóloga, armazenada à temperatura ambiente. O estudo experimental foi realizado em cães e a dura-máter retirada sem cuidados especiais de assepsia. Após um tempo de conservação que variou de 19 a 105 dias, a dura-máter foi implantada em cães receptores. Conclui que o método não altera as características fundamentais do tecido, mantendo a

arquitetura do enxerto pelo menos durante um ano. Além do mais, o glicerol tem ação anti-séptica e inibe o aparecimento de reação do tipo corpo estranho ou mesmo inflamatória aguda. Há uma aparente incorporação do tecido neoformado. Recomenda ainda estudos em outros setores da Medicina sobre a utilização do glicerol como meio de conservação e cita a possibilidade de experimentos com o tecido ósseo.

Em 1970, **Lex e Raia** utilizam o método proposto por **Pigossi (1964)** para a conservação da dura-máter homóloga no tratamento das hérnias incisionais recidivadas e difíceis de serem solucionadas, obtendo resultados satisfatórios nos casos apresentados. Recomendam o método desde que haja indicação precisa.

O glicerol, como meio conservante e utilizado em alta concentração (98%), volta a ser estudado por **Pigossi et al (1971)**. Buscam, nestes estudos, um método de conservação a longo prazo de tecidos biológicos e que seja de execução simples, com esterilização viável, facilidade de emprego, mínima reação histológica e baixo custo. Observam a eficácia do glicerol na concentração acima não apenas como agente de conservação, mas também como substância bactericida, salientando que aparentemente este método reduz a antigenicidade do tecido. Neste estudo procuram comprovar também a propriedade virucida do glicerol, porém sem sucesso. Recomendam então a seleção rigorosa dos doadores.

Puig (1972), estimulado pelos estudos de **Pigossi et al (1971)**, realiza um estudo propondo a substituição de valvas aórticas por valvas de dura-máter homóloga, conservadas em glicerol a 98% e mantidas à temperatura ambiente. Estas valvas são retiradas de doadores cadáveres em um tempo máximo de 12 horas após o óbito, sendo estas consideradas estéreis após ficarem imersas no glicerol por, no mínimo, 12 dias. Comprova que o método é simples e permite o uso do tecido para a confecção de valvas cardíacas. Também conclui que a valva de dura-máter, utilizada na posição aórtica, constitui um substituto ideal.

Em 1974, este novo recurso terapêutico passa a ser empregado em substituições valvares. **Puig et al (1974)** apresentam um estudo envolvendo 338 trocas valvares em pacientes portadores de valvopatia mitral, alteração da valva aórtica, da tricúspide e da pulmonar. Durante o período de evolução, os autores não constatarem nenhum caso de degeneração da dura-máter, sendo que apenas dois pacientes apresentam endocardite fúngica. Não há referência sobre o emprego de drogas imunossupressoras.

Subseqüentemente, o emprego da dura-máter homóloga conservada em glicerol a 98% é tema de outras publicações (**Dias et al, 1976, Puig, 1976 e Puig et al, 1977**).

Basile (1982), baseado no método proposto por **Pigossi et al (1971)**, conserva xenoenxertos de pele porcina e obtém resultados satisfatórios ao utilizá-los como curativos provisórios no tratamento de queimaduras de 3º grau, confirma

a simplicidade do método e suas propriedades bactericidas já citadas por estes autores. Os xenoenxertos foram conservados em glicerol a 98%, por um período que variou entre 20 a 300 dias e conclui que o método utilizado para a preservação não altera a arquitetura fundamental da pele. Observa também que o tecido não apresenta sinais de lise ou de deterioração celular e, quando implantado em um receptor, claramente tem sua ação antigênica diminuída. Compara o método utilizado com a pele porcina liofilizada e não encontra diferença significativa na implantação de ambas.

Ainda na década de 80, estimulados pela simplicidade deste método de conservação e pelos efeitos antimicrobianos, vários centros europeus passam a utilizá-lo como processo de preservação de aloenxertos de pele a serem empregados em pacientes acometidos de queimaduras. Apesar da possibilidade de transmissão de infecção por citomegalovírus, pelo vírus da hepatite e pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vários trabalhos referentes ao tema são publicados entre o final da década de 80 e 1994. **(Kreis et al, 1989, Hoekstra et al, 1994, Mckay et al, 1994 e Wai, 1994)**

Preocupados com a transmissão do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) através dos aloenxertos ósseos crioconservados, **Buck et al (1988)** recomendam uma seleção rigorosa dos doadores cadáveres, além de exames anatomopatológicos, pesquisa aprimorada de linfonodos no doador e pesquisa de antígeno-anticorpo para o HIV.

Kreis et al (1989) descrevem sua experiência utilizando enxertos de pele retirados de doadores cadáveres e conservados em glicerol a 98%. Tais enxertos são armazenados durante um mínimo de dois anos para posterior utilização no tratamento de 39 pacientes portadores de feridas extensas provocadas por queimaduras de 3º grau. Recomendam que os aloenxertos, antes de serem empregados, sejam enxaguados em solução fisiológica a 0,9% morna. Concluem que a conservação de pele de doadores cadáveres em glicerol a 98% constitui um método pouco oneroso e que não requer equipamentos sofisticados. Recomendam o método particularmente para uso em centros pequenos que utilizam este tipo de aloenxerto em pequena escala.

Backere (1994), Hettich et al (1994), Hoekstra et al (1994), Hussmann et al (1994), Mckay et al (1994) e Schiozer et al (1994) reafirmam a efetividade do método de conservação da pele através da utilização do glicerol em altas concentrações (entre 85% e 98%), ressaltando como pontos positivos as ações bactericida e virucida do glicerol e a manutenção de características importantes da pele como a integridade do colágeno e a sua arquitetura elástica. Exaltam a simplicidade do método, indicando o uso clínico dos aloenxertos assim preservados.

Em 1994, **Okamoto et al**, considerando as propriedades do glicerol como agente de preservação de tecidos, avaliam o efeito da substância sobre reimplantes dentais imediatos. Realizam uma pesquisa experimental em ratos e concluem que os dentes conservados no glicerol a 98% apresentam reabsorção

cimento-dentária mais discreta após 60 dias, como também uma melhor organização do ligamento periodontal remanescente, quando comparados aos conservados em soro fisiológico.

Van Baare et al (1994) realizam um experimento utilizando o vírus do herpes simples (por ser similar em estrutura ao vírus causador da imunodeficiência humana) e amostras do poliovírus tipo I, ambos bastante difíceis de serem inativados por métodos físico-químicos. Esta capacidade de inativação é testada em várias concentrações do glicerol e em três diferentes temperaturas (4° C, 20° C e 37° C). Concluem que o glicerol, em alta concentração, possui um potente efeito virucida. Porém, afirmam que a ação virucida também é dependente da temperatura. A 4° C apenas o vírus do herpes simples é inativado após 50 dias de incubação. Ambos os vírus são inativados quando incubados a 20° C e se utilizando o glicerol na concentração de 98%. Este efeito é precocemente ativado quando a temperatura é igual a 37° C.

Wai (1994) apresenta um relato de quatro casos utilizando aloenxertos provenientes do Banco de Pele, conservados em glicerol a 98%, mostrando como novidade o emprego do enxerto como curativo biológico em pacientes portadores de feridas profundas decorrentes de traumas, complicações cirúrgicas e também queimaduras. Obtém bons resultados, sendo que em dois pacientes o aloenxerto teve como função essencial a proteção do leito cruento contra colonização por microrganismos.

Marshall et al (1995) investigam e comprovam o efeito virucida do glicerol em viroses intracelulares. Comparativamente ao estudo de **Van Baare et al (1994)**, que avaliam esta ação em viroses extracelulares, também utilizam o herpes simples tipo I e amostras de poliovírus cultivados em fibroblastos de pele humana. As células infectadas são expostas ao glicerol em concentrações, temperaturas e períodos de tempo distintos. Concluem que, para uma maior inativação viral, a concentração recomendada é de 98% e a temperatura de pelo menos 20° C. Para o uso clínico de enxertos de pele homólogos, acrescentam ainda que estes devam permanecer no glicerol a 98% durante pelo menos quatro semanas antes de sua utilização.

Okamoto et al (1995), em estudo com cartilagens costais autógenas implantadas nas arcadas de 60 ratos albinos após a retirada do incisivo superior direito, relatam o uso do glicerol a 98% em temperatura ambiente como meio alternativo de conservação de enxertos autógenos. Concluem que as cartilagens mantêm sua vitalidade e se integram ao tecido conectivo formado e que o glicerol contribui para uma reabsorção mais rápida e integração do novo tecido.

Riskalla et al (1995), utilizando tecido cório-amniótico conservado em glicerol na reconstrução da membrana timpânica, observam que o glicerol mantém a esterilização dos tecidos, além de conferir-lhes prováveis qualidades imunológicas desejáveis em materiais destinados a transplantes.

Oliveira (1998) realiza estudo experimental para avaliar o uso de membrana amniótica homóloga eqüina preservada em glicerol a 98% à temperatura ambiente, em feridas com cura por segunda intenção nos membros locomotores de eqüinos. Observou que, em todas as feridas tratadas, o tempo de cicatrização foi menor assim como o foi a incidência de bactérias patológicas. Conclui que a glicerina a 98% é um agente de conservação satisfatório.

Van Baare et al (1998) apresentam o resultado de testes microbiológicos realizados em aloenxertos de pele retirados de 1929 doadores, selecionados após obedecerem critérios estabelecidos pelo Banco de Pele Europeu e conservados em glicerol a 85%. Para evitar contaminação durante a coleta de amostra para investigação microbiológica, o procedimento é realizado utilizando-se uma cabine de fluxo laminar e técnica asséptica rigorosa. Demonstram que, do total de enxertos de pele retirados, ocorre uma contaminação inicial por bactérias entre 4,1% e 10,1%. Porém, após três semanas de conservação no glicerol a 85%, armazenados à temperatura ambiente, não apresentam mais nenhum crescimento bacteriano. Concluem que o glicerol a 85% à temperatura ambiente possui uma ação bactericida eficiente, porém lenta, sendo necessário um tempo mínimo de três semanas.

As técnicas de conservação, voltadas especificamente para enxertos ósseos homólogos, começam a ser aprimoradas a partir da década de 80 até 2000. Acompanhando a evolução tecnológica verificada no âmbito das Ciências Médicas e Biológicas, buscam um método que mantenha a capacidade de

osteoidução e que tenha menor capacidade imunogênica. **(Almeida, 1997, Tomford, 2000)**

Em todo o mundo, os bancos de ossos são estabelecidos com regras rígidas relacionadas ao doador e à infra-estrutura. Preferencialmente, os aloenxertos passam a ser conservados liofilizados ou a uma temperatura mínima de -80° C, métodos de alto custo e que exigem equipes especializadas. Os processos de esterilização são associados aos de conservação dos aloenxertos, com o intuito de manter a esterilidade dos mesmos, encarecendo ainda mais o procedimento. **(Rondinelli et al, 1994, Feofiloff e Garcia, 1996, Almeida, 1997, AmatuZZi et al, 2000 e Tomford, 2000)**

Continuando as pesquisas com o glicerol em alta concentração como conservante de tecidos, **Okamoto et al (2000)** realizam um estudo experimental histomorfológico com ratos, comparando o comportamento da implantação da matriz óssea homóloga conservada no glicerol a 98% com outra matriz óssea onde não havia sido utilizado nenhum outro método de conservação. Concluem que as matrizes conservadas no glicerol são mais precocemente substituídas por tecido ósseo neoformado.

No Brasil, portarias são sancionadas normatizando o funcionamento integral de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos, contemplando desde a instalação física mínima necessária até o procedimento de transplante. A mais recente delas é a Portaria nº 1686, de 20 de setembro de 2002: determina uma triagem rigorosa

do doador detalhando a anamnese, o exame físico e a rotina laboratorial. Especifica o método de ablação dos tecidos, o empacotamento dos enxertos, o processamento, o armazenamento e o método de conservação. Cita o glicerol (mínimo a 85%) e o ar ambiente como condições possíveis de manutenção dos enxertos ósseos. Ainda estabelece que:

Os métodos utilizados pelo Banco para o processamento dos vários tecidos ósteo-condro-fáscio-ligamentares devem estar baseados em experiência nacional ou internacional documentada. Novos métodos devem ter sua eficácia devidamente comprovada {in vitro} no sentido de manter a integridade biológica dos materiais e {in vivo} quanto às características desejadas como transplante ou implante.

Ravishanker et al (2003) publicam um estudo sobre a utilização de membranas amnióticas conservadas em glicerol a 85%, por mais de dois anos e meio, em pacientes vítimas de queimaduras, em local com escassos recursos médicos (Nova Delhi - Índia), obtendo excelentes resultados. Ressaltam a eficácia do glicerol como meio de preservação.

3. MÉTODO

3.1. Material

O material deste trabalho é constituído por 30 amostras de tecido ósseo trabecular, obtidas da cabeça femoral de 10 pacientes submetidos à Artroplastia Total do Quadril (ATQ), realizadas pelo Grupo de Quadril do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP). As cabeças femorais só foram encaminhadas para a pesquisa após autorização prévia do paciente através do consentimento livre e esclarecido. As amostras foram identificadas por números em ordem crescente de acordo com a data da cirurgia e distribuídas conforme exposto no Quadro I.

QUADRO 1 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR DATA DE CIRURGIA				
nº de ordem	data da cirurgia	ESTUDO		
		Gc	Gcrio12	Gpg12
01	01/03/04	1 Gc	1 Gcrio	1 Gpg
02	08/03/04	2 Gc	2 Gcrio	2 Gpg
03	15/03/04	3 Gc	3 Gcrio	3 Gpg
04	17/03/04	4 Gc	4 Gcrio	4 Gpg
05	24/03/04	5 Gc	5 Gcrio	5 Gpg
06	05/04/04	6 Gc	6 Gcrio	6 Gpg
07	07/04/04	7 Gc	7 Gcrio	7 Gpg
08	08/04/04	8 Gc	8 Gcrio	8 Gpg
09	12/04/04	9 Gc	9 Gcrio	9 Gpg
10	19/04/04	10 Gc	10 Gcrio	10 Gpg

Gc = Grupo controle

Gcrio12 = Grupo criopreservado por 12 meses

Gpg12 = Grupo preservado no glicerol a 98%, em temperatura ambiente por 12 meses

3.1.1. Fatores de inclusão

Foram utilizadas cabeças femorais de pacientes submetidos à ATQ, com a obrigatoriedade de terem sido coletadas para este estudo utilizando-se técnica asséptica rigorosa e embaladas em três invólucros estéreis.

3.1.2. Fatores de exclusão

Foram consideradas como fatores de exclusão as seguintes eventualidades:

- ✓ todas as cabeças femorais não encaminhadas imediatamente após o ato cirúrgico.
- ✓ as cabeças femorais dos pacientes que não concederam autorização prévia para a sua utilização em pesquisa.
- ✓ as amostras de tecido ósseo que apresentaram crescimento bacteriano nas culturas realizadas no processamento.

3.2. Método

3.2.1. Retirada das cabeças femorais

Logo após a sua retirada, cada cabeça femoral foi acondicionada em três embalagens de polietileno superpostas e esterilizadas em óxido de etileno, seladas uma a uma e transportadas imediatamente em recipiente fechado até o Banco de Tecidos do IOT-HC-FMUSP.

3.2.2. Retirada das amostras de tecido ósseo trabecular

O procedimento de coleta das amostras foi realizado em sala cirúrgica do Banco de Tecidos do IOT-HC-FMUSP, provida de fluxo laminar vertical com filtros

absolutos HEPA (*High Efficiency Particular Air*), classe 100, utilizando-se técnica asséptica rigorosa e paramentação cirúrgica (**figura 1**).

Após o posicionamento da cabeça femoral, com auxílio de instrumental cirúrgico e de uma serra elétrica, foram retirados três segmentos em forma de cunha. A fim de padronizar o local de coleta, foi escolhida a área da cabeça femoral correspondente à projeção da zona 2 acetabular de **DeLee e Charnley (apud Aristide e Viriato, 2003)**, por ser uma região de menor carga e portanto menos suscetível a alterações degenerativas (**figuras 2 e 3**). Em seguida, estas amostras foram lavadas exaustivamente com solução fisiológica a 0,9%. Do fragmento reservado para ser preservado em glicerol a 98%, uma amostra de tecido ósseo foi encaminhada para pesquisa microbiológica, com culturas para germes aeróbios, anaeróbios e fungos.

O primeiro fragmento foi acondicionado em tubo plástico com rosca, fixado em formol a 10% e enviado ao laboratório de Anatomia Patológica do IOT-HC-FMUSP para análise histomorfológica. Esta amostra foi considerada como grupo controle (**numeradas de 1 Gc a 10 Gc**).

O segundo fragmento foi acondicionado em embalagens triplas esterilizadas e seladas, sendo a primeira delas de plástico rígido com rosca e as duas subseqüentes, de polietileno com 0,5 mm de espessura, segundo normas internacionais padronizadas pela *European Association of Tissue Bank* (EATB). A seguir foram mantidas sob criopreservação por um ano a -80° C, em freezer vertical elétrico marca Sanyo, modelo MDF U 30865 S, provido de *backup* de CO₂ e acoplado a um sistema de alarme Thermoforma[®], modelo 1535 e também válvula de alarme interior conectado a sistema de alarme externo para temperaturas inferiores a -60° C.

Figura 1. Técnica de coleta e armazenamento das amostras em ambiente controlado por fluxo laminar.

Figura 2. Radiografia onde se vê a área de coleta das amostras, baseada na classificação de DeLee e Charnley (zona da cabeça femoral correspondente à projeção da área 2).

Figura 3. Seleção das amostras de tecido ósseo do fragmento obtido da zona da cabeça femoral correspondente à projeção da área 2, conforme a classificação de DeLee e Charnley.

A sala de criopreservação também era provida de gerador, como medida de segurança no caso da eventual falta de energia elétrica. As amostras, assim preservadas por um ano, foram consideradas do grupo Gcrio 12 (numeradas de 1 Gcrio a 10 Gcrio).

O terceiro fragmento foi também acondicionado em frasco de plástico rígido estéril, porém imerso em 60 ml de glicerol a 98% estéril e depois embalado em mais dois invólucros de polietileno com 0,5 mm de espessura, selados e esterilizados e mantidos à temperatura ambiente por um período de um ano. As amostras assim preservadas foram consideradas do grupo Gpg12 (numeradas de 1 Gpg a 10 Gpg).

3.2.3. Encaminhamento de amostras para análise microbiológica

Após um ano de preservação em glicerol a 98%, foram coletadas amostras do tecido ósseo trabecular de cada fragmento e da solução do próprio glicerol para investigação microbiológica, realizando-se culturas para aeróbios, anaeróbios e fungos, da mesma forma como efetuado previamente ao acondicionamento da amostra. Esta análise foi realizada no laboratório de microbiologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Para fungos foram utilizados o meio MYCOSEL e o SABOURAUD, para bactérias aeróbias, cultura geral e, para as anaeróbias, TIOGLICOLATO sem indicador. Devido à metodologia já estar estabelecida e ser utilizada em muitos centros, optou-se por não realizar a análise microbiológica das amostras mantidas na criopreservação.

3.2.4. Encaminhamento de amostras para análise na Anatomia Patológica

As amostras de tecido ósseo trabecular do Gcrio12 e do Gpg12, mantidas por um ano em seus específicos métodos de preservação, foram enviadas para a Anatomia Patológica para a histomorfologia e análise da viabilidade celular. A preparação de cada um dos fragmentos ósseos obedeceu à seguinte metodologia:

- √ Fixação em formol a 10% por 24h - 48h.
- √ Descalcificação com ácido nítrico 7,5% por 24h - 48h.
- √ Realização de banho de 2h em solução aquosa de sulfato de sódio 5%.
- √ Desidratação com álcool a 96° (uma vez) e álcool absoluto (por três vezes) durante uma hora de banhos sucessivos.
- √ Diafanização com xilol.
- √ Utilização de parafina a 37° C em duas fases consecutivas de uma hora e duas horas.
- √ Confecção do bloco de parafina.
- √ Realização de cortes histotécnicos de 10 micra com micrótomo modelo Leica RM 2165.
- √ Coloração pelo método de hematoxilina-eosina (HE).

A microscopia analisou a quantidade de osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, fibroblastos, presença de osso imaturo e lamelar, osteóide não mineralizado e necrose. Esta análise permitiu avaliar os seguintes critérios: viabilidade celular e manutenção da matriz óssea. Para isso foram estipulados escores ausente (#), diminuído (+), normal (++) e aumentado (+++) para a análise do tecido (**anexo A**) e ausente (#) e normal (+) para o estudo da viabilidade celular (**anexo B**).

3.2.5. Tratamento estatístico

Foram observadas variáveis da histomorfologia e da viabilidade celular em três condições experimentais: grupos controle, criopreservado e glicerol. As unidades experimentais foram de 10 indivíduos, sendo de cada um deles extraídas 3 fatias de osso (unidades de observação), cada uma delas submetida a uma condição experimental. Assim, o estudo seguiu um planejamento no qual as fatias de osso de um mesmo indivíduo foram observadas em três condições experimentais, gerando três amostras que não são independentes. Dada uma fatia de osso de um indivíduo observada no controle, existem as correspondentes fatias nas condições de criopreservado e de glicerol, ocorrendo desta forma uma condição em pares.

Na análise estatística foram inicialmente construídas tabelas com as distribuições de frequências e percentagens das variáveis da histomorfologia e da viabilidade celular em cada condição experimental.

Na análise da inferência, que visa extrapolar os resultados obtidos no estudo para a população, as três condições experimentais foram comparadas segundo as probabilidades de ocorrência das categorias de cada uma das variáveis. As comparações foram feitas considerando as condições duas a duas (Controle x Criopreservado, Controle x Glicerol, Criopreservado x Glicerol). A técnica adotada foi o teste de McNemar. Devido ao pequeno tamanho da amostra, foi considerada a distribuição exata da estatística de teste. O nível de significância global das comparações foi fixado em 0,10.

4. RESULTADOS

A análise microbiológica da solução de glicerol a 98% e dos fragmentos ósseos das amostras armazenadas durante um ano, em temperatura ambiente, não apresentou crescimento bacteriano ou de fungos.

Os p-valores, obtidos segundo a metodologia descrita em **Métodos**, são apresentados nas **Tabelas 1 e 2**. Para a variável osteóide não mineralizado não foram realizados os testes porque não houve variabilidade dos valores assumidos por essa variável (foi observada a categoria ausente em todas as fatias). Na variável osso imaturo, as categorias diminuído, normal e aumentado foram agrupadas em uma única categoria de forma que o teste pudesse ser aplicado. Os níveis descritivos indicam não haver diferença entre as distribuições das variáveis osso maduro, osso imaturo e necrose nas três condições experimentais.

Não foram realizados testes de hipótese para as variáveis osteócitos e fibroblastos da viabilidade celular, uma vez que estas não apresentaram variabilidade de resultados: ocorreu a categoria normal em todas as fatias. Também não foram feitas as comparações das condições controle com criopreservado e glicerol quanto às distribuições de osteoblastos, pois o grupo controle apresentou resultado normal em todas as amostras.

Outras tabelas com distribuições conjuntas em duas condições são apresentadas nas **tabelas 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17 e 19**.

A comparação das três condições experimentais quanto às variáveis para as quais não foram realizados testes de hipótese foi feita de forma descritiva (sem ser fixado um nível de significância, como no caso dos testes de hipótese), com a distribuição das frequências e percentagens apresentadas nas **tabelas 3, 7, 8, 12, 16, 18, 20 e 21**.

4.1. Análise inferencial

Tabela 1. P-valores obtidos no teste de McNemar na comparação das distribuições de probabilidades das variáveis da histomorfologia nas três condições experimentais.

Variável	Gc x Gcrio	Gc x Gpg	Gcrio x Gpg
OM	1,000	1,000	1,000
OI	1,000	1,000	1,000
NEC	0,125	0,125	1,000

OM = osso maduro ou lamelar

OI = osso imaturo

NEC = necrose

Tabela 2. P-valores obtidos no teste de McNemar na comparação das distribuições de probabilidades das variáveis da viabilidade celular nas três condições experimentais.

Variável	Gcrio x Gpg
OB	1,000
OC	0,500

OB = osteoblastos

OC = osteoclastos

4.2. Análise descritiva

4.2.1. Histomorfologia

Tabela 3. Frequências absolutas e relativas dos escores de osso maduro ou lamelar

Escore	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
	n	%	n	%	n	%
Normal	8	80,0	7	70,0	8	80,0
Aumentado	2	20,0	3	30,0	2	20,0

Tabela 4. Distribuição de frequências conjuntas de osso maduro ou lamelar nas condições grupo controle e grupo criopreservado

Controle	Criopreservado			Total
		normal	aumentado	
normal	Frequência	7	1	8
	%	70%	10%	80%
aumentado	Frequência	—	2	2
	%	—	20%	20%
Total	Frequência	7	3	10
	%	70%	30%	100%

p = 1,000

Tabela 5. Distribuição de freqüências conjuntas de osso maduro ou lamelar nas condições grupo controle e grupo preservado em glicerol 98%

Controle	Glicerol 98%			Total
		normal	aumentado	
normal	Freqüência	8	—	8
	%	80%	—	80%
aumentado	Freqüência	—	2	2
	%	—	20%	20%
Total	Freqüência	8	2	10
	%	80%	20%	100%

$p = 1,000$

Tabela 6. Distribuição de freqüências conjuntas de osso maduro ou lamelar nas condições grupo criopreservado e grupo preservado em glicerol 98%

Criopreservado	Glicerol 98%			Total
		normal	aumentado	
normal	Freqüência	7	—	7
	%	70%	—	70%
aumentado	Freqüência	1	2	3
	%	10%	20%	30%
Total	Freqüência	8	2	10
	%	80%	20%	100%

$p = 1,000$

Tabela 7. Frequências absolutas e relativas dos escores de osteóide não mineralizado.

Escore	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
	n	%	n	%	n	%
Ausente	10	100,0	10	100,0	10	100,0
Diminuído	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Normal	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Aumentado	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Tabela 8. Frequências absolutas e relativas dos escores de osso imaturo

Escore	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
	n	%	n	%	n	%
Ausente	5	50,0	5	50,0	5	50,0
Diminuído	1	10,0	0	0,0	0	0,0
Normal	0	0,0	0	0,0	1	10,0
Aumentado	4	40,0	5	50,0	4	40,0

Tabela 9. Distribuição de freqüências conjuntas de osso imaturo nas condições grupo controle e grupo criopreservado

Controle	Criopreservado				Total
		ausente	diminuído	aumentado	
ausente	Freqüência	4	—	1	5
	%	40%	—	10%	50%
diminuído	Freqüência	1	—	—	1
	%	10%	—	—	10%
aumentado	Freqüência	—	—	4	4
	%	—	—	40%	40%
Total	Freqüência	5	—	5	10
	%	50%	—	100%	100%

p = 1,000

Tabela 10. Distribuição de freqüências conjuntas de osso imaturo nas condições grupo controle e grupo preservado em glicerol a 98%.

Controle	Glicerol 98%					Total
		ausente	diminuído	normal	aumentado	
ausente	Freqüência	4	—	—	1	5
	%	40%	—	—	10%	50%
diminuído	Freqüência	1	—	—	—	1
	%	10%	—	—	—	10%
normal	Freqüência	—	—	—	—	—
	%	—	—	—	—	—
aumentado	Freqüência	—	—	1	3	4
	%	—	—	10%	30%	40%
Total	Freqüência	5	—	1	4	10
	%	50%	—	10%	40%	100%

p = 1,000

Tabela 11. Distribuição de frequências conjuntas de osso imaturo nas condições grupo criopreservado e grupo preservado em glicerol 98%

Criopreservado	Glicerol 98%					Total
	ausente	diminuído	normal	aumentado		
ausente	Frequência	5	—	—	—	5
	%	50%	—	—	—	50%
diminuído	Frequência	—	—	1	—	1
	%	—	—	10%	—	10%
normal	Frequência	—	—	—	—	—
	%	—	—	—	—	—
aumentado	Frequência	—	—	—	4	4
	%	—	—	—	40%	40%
Total	Frequência	5	—	1	4	10
	%	50%	—	10%	40%	100%

p = 1,000

Tabela 12. Frequências absolutas e relativas dos escores de necrose

Escore	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
	n	%	n	%	n	%
Ausente	6	60,0	2	20,0	2	20,0
Aumentado	4	40,0	8	80,0	8	80,0

Tabela 13. Distribuição de freqüências conjuntas de necrose nas condições grupo controle e grupo criopreservado

Controle	criopreservado			Total
		ausente	aumentado	
ausente	Freqüência	2	4	6
	%	20%	40%	60%
aumentado	Freqüência	—	4	4
	%	—	40%	40%
Total	Freqüência	2	8	10
	%	20%	80%	100%

$p = 0,125$

Tabela 14. Distribuição de freqüências conjuntas de necrose nas condições grupo controle e grupo preservado em glicerol 98%

Controle	Glicerol 98%			Total
		ausente	aumentado	
ausente	Freqüência	2	4	6
	%	20%	40%	60%
aumentado	Freqüência	—	4	4
	%	—	40%	40%
Total	Freqüência	2	8	10
	%	20%	80%	100%

$p = 0,125$

Tabela 15. Distribuição de freqüências conjuntas de necrose nas condições grupo criopreservado e grupo preservado em glicerol 98%

criopreservado	Glicerol 98%			Total
		ausente	aumentado	
ausente	Freqüência	2	—	2
	%	20%	—	20%
aumentado	Freqüência	—	8	8
	%	—	80%	80%
Total	Freqüência	2	8	10
	%	20%	80%	100%

p = 1,000

4.2.2. Análise da Viabilidade Celular

Tabela 16. Frequências absolutas e relativas dos escores de osteoblastos

Escore	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0	1	10,0	1	10,0
Normal	10	100,0	9	90,0	9	90,0

Tabela 17. Distribuição de frequências conjuntas de osteoblastos nas condições grupo criopreservado e grupo preservado em glicerol 98%

Criopreservado	Glicerol 98%			Total
		normal	ausente	
normal	Frequência	9	—	9
	%	90%	—	90%
ausente	Frequência	—	1	1
	%	—	10%	10%
Total	Frequência	9	1	10
	%	90%	10%	100%

p = 1,000

Tabela 18. Frequências absolutas e relativas dos escores de osteoclastos

Escore	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0	4	40,0	6	60,0
Normal	10	100,0	6	60,0	4	40,0

Tabela 19. Distribuição de frequências conjuntas de osteoclastos nas condições grupo criopreservado e grupo preservado em glicerol 98%

Criopreservado		Glicerol 98%		Total
		normal	ausente	
normal	Frequência	4	2	6
	%	40%	20%	60%
ausente	Frequência	—	4	4
	%	—	40%	40%
Total	Frequência	4	6	10
	%	40%	60%	100%

p = 0,500

Tabela 20. Frequências absolutas e relativas dos escores de osteócitos

	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
Escore	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Normal	10	100,0	10	100,0	10	100,0

Tabela 21. Frequências absolutas e relativas dos escores de fibroblastos

	Grupo					
	Controle		Criopreservado		Glicerol 98%	
Escore	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Normal	10	100,0	10	100,0	10	100,0

As **figuras 4 a 6** demonstram a matriz óssea dos aloenxertos após um ano de criopreservação e imersos em solução de glicerol a 98%, comparadas com o grupo controle.

Figura 4. Corte histológico de aloenxerto do Gc - matriz óssea preservada

(HE - aumento de 5x)

Figura 5. Corte histológico de aloenxerto do Gc12 - matriz óssea preservada

(HE - aumento de 5x)

Figura 6. Corte histológico de aloenxerto do Gpg12 - matriz óssea preservada

(HE - aumento de 5x)

As **figuras 7 e 8** demonstram a viabilidade celular dos aloenxertos ósseos criopreservados e mantidos no glicerol a 98% após um ano.

Figura 7. Corte histológico do Gcrio12, mostrando população de células viáveis (osteoblastos e osteócitos) - HE - aumento de 10x.

Figura 8. Corte histológico do Gpg12, mostrando população de células viáveis (osteoblastos e osteócitos) - HE - aumento de 10x.

5. DISCUSSÃO

A necessidade de se empregar os aloenxertos com a intenção de preencher cirurgicamente perdas ósseas é bastante antiga. Para a reparação das estruturas lesadas, muitas vezes são utilizados os enxertos autólogos que, no entanto, nem sempre podem ser obtidos na quantidade e na qualidade desejadas. Assim, os enxertos homólogos vieram como alternativa para enriquecer o arsenal terapêutico, substituindo os autólogos no tratamento de muitas afecções ortopédicas que necessitam da reposição de grandes quantidades de tecido ósseo. **(Friedlander et al, 1981, Boer, 1987, Almeida, 1997 e Tomford, 2000)**

Atualmente, nos Estados Unidos, o osso ocupa o segundo lugar dentre os tecidos mais usados em transplantes. Anualmente, uma média de 200.000 aloenxertos são empregados nos Estados Unidos em procedimentos cirúrgicos do sistema locomotor **(Myerson et al, 2005)**.

Já no Brasil, apesar da existência de subnotificações, a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), publicou em 2004 um total de 723 transplantes realizados e também um comparativo dos últimos cinco anos, com uma curva de tendência positiva de crescimento.

Para garantir segurança na utilização dos aloenxertos, os Bancos de Tecidos desenvolvem e adotam padrões rigorosos, desde a busca do doador até o fornecimento do produto final, minimizando assim os riscos de transmissão de doenças infecciosas aos receptores.

O armazenamento dos aloenxertos é apenas uma etapa a ser controlada dentro de todo o processo que culmina com o fornecimento do enxerto para a realização do transplante. Cada fase possui critérios de técnica e de qualidade estabelecidas dentro da metodologia atualmente exigida para o funcionamento

do Banco de Tecidos do sistema musculoesquelético, as quais devem ser obedecidas com rigor.

5.1. Utilização dos aloenxertos e dos enxertos autólogos

No campo da Ortopedia e da Odontologia, o crescente interesse no desenvolvimento de técnicas para suprir as perdas ósseas, vem aumentando dia a dia. Assim, os aloenxertos foram eleitos como principal fonte fornecedora de tecido ósseo e se tornaram uma alternativa em relação ao emprego dos enxertos autólogos, uma vez que possuem inúmeras vantagens relacionadas ao seu uso.

Dentre elas, podemos enumerar:

- ✓ diminuição do tempo operatório, pois o enxerto já está preparado para uso imediato. **(Bauer e Muscher, 2000)**
- ✓ menor morbidade, uma vez que representa menor agressão cirúrgica. **(Brown e Cruess, 1982)**
- ✓ não tem como inconveniente a necessidade de se retirar tecidos normais do paciente (enxertos autólogos) para utilizá-los posteriormente como enxerto. **(Almeida, 1997)**
- ✓ proporciona um número ilimitado de enxertos de tamanhos e tipos variados.
- ✓ podem ser armazenados por tempo prolongado. **(Friedlander, 1987 e Buck e Malinin, 1994)**

Apesar dos benefícios dos enxertos homólogos, a utilização destes tecidos também está relacionada a algumas desvantagens, tais como:

- √o alto custo relacionado ao processo de captação, processamento, qualificação e armazenamento dos tecidos alógenos, uma vez que necessitaria para tal procedimento da existência de um banco de tecidos com equipamentos e profissionais treinados **(Almeida, 1997)**
- √a possibilidade de transmissão de doenças do doador para o receptor **(Myerson et al, 2005)**
- √a resposta imunológica do receptor ao aloenxerto **(Stevenson, 1999)**

5.2. Seleção dos doadores

O primeiro passo para a obtenção dos aloenxertos consiste na seleção rigorosa do doador. Talvez seja esta etapa a mais importante de todas, pois o objetivo desta escolha é eliminar doadores com possíveis doenças transmissíveis e ao mesmo tempo fornecer tecidos biológica e mecanicamente apropriados para o transplante. Durante este processo, a história médica do doador deverá ser sempre valorizada, com critérios rígidos relacionados especialmente com a presença ou não de infecção sistêmica ativa, de tumores, doenças ósseas, doenças metabólicas, substâncias tóxicas e doenças transmissíveis. **(Friedlaender, 1987, Buck e Malinin, 1994, Boyce e Scarborough, 1999, Stevenson, 1999, Aho et al, 2000, Nather, 2004)**

Através de uma avaliação criteriosa somente da história, baseados em dados procedentes de bancos de sangue, 90% dos doadores são considerados inaptos para a doação, reforçando a necessidade de se valorizar esta etapa tão importante. **(Tomford e Mankin, 1999)**

No Brasil, a seleção de doadores está bem estabelecida através de um roteiro de anamnese, descrito na Portaria nº 1686 do Ministério da Saúde, diretrizes estas baseadas na metodologia da “American Association of Tissue Banks” (AATB) e da “European Association of Tissue Banks” (EATB).

Estas normas, além do roteiro exigido na redação da história, também estabelecem a triagem do doador através do cumprimento de uma rotina de exames laboratoriais para a pesquisa de possíveis doenças transmissíveis.

Entre os exames realizados estão: sorologias para sífilis, doença de Chagas, toxoplasmose, citomegalovírus, hepatite B e hepatite C.

Também dentro desta seleção do doador, são exigidos os testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos para HIV e HCV. Por sua acurada sensibilidade, aumentam a possibilidade de detecção dos vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e da Hepatite C.

5.3. Criopreservação

Após a realização da triagem do doador, o passo seguinte consiste na retirada dos tecidos empregando-se técnica cirúrgica adequada. Logo em seguida, após um processamento utilizando-se técnica asséptica, em um ambiente controlado e identificado como classe 100, procede-se à conservação dos aloenxertos obtidos. Esta etapa, também de grande relevância, visa manter a esterilidade dos mesmos, demonstrada através da investigação microbiológica realizada durante a fase do processamento.

Este método de conservação de enxertos ósseos, chamado criopreservação e objeto de nosso estudo comparativo, consiste na utilização de baixas temperaturas através dos “ultrafreezers”.

Os dados da literatura demonstram que o congelamento é, atualmente, o método de escolha para a preservação dos aloenxertos, pois diminui o potencial imunogênico, preservando as propriedades biomecânicas e osteoindutivas. Outrossim, além de inibir o crescimento bacteriano, mantém o tecido em condições para posteriores transplantes. **(Friedlander e Mankin, 1981, Friedlander et al, 1998, Stevenson, 1999, Boyce e Scarborough, 1999, Yim e Carlson, 2000, Mankin et al, 2005)**

Alguns bancos de tecidos, para garantir a completa esterilidade dos aloenxertos, utilizam métodos complementares de esterilização, como a irradiação gama dos tecidos (25 Kilograys), antes do armazenamento a - 80° C, aumentando assim o custo dos mesmos, bem como provocando alterações importantes nas propriedades biomecânicas e osteoindutoras dos tecidos. **(Friedlander, 1987, Almeida, 1997 e Nather, 2004)**

Vários autores conseguem demonstrar bons resultados através da utilização de aloenxertos congelados para suprir perdas ósseas, sejam estas provocadas após a ressecção de tumores ou em revisões de próteses do quadril. Reafirmam a necessidade de uma criteriosa seleção do doador e uma equipe treinada para a realização da captação, processamento e armazenamento, utilizando técnica asséptica rigorosa e prevenindo assim a contaminação dos enxertos. **(Convery et al, 1990, Allan et al, 1991, Enneking e Mindell, 1991, Rudelli et al, 1992, Brigman et al, 2004, Musculo et al, 2004)**

5.4. Conservação em glicerol

A opção de se realizar um estudo envolvendo um método alternativo de conservação de enxerto ósseo teve como objetivo disponibilizar para tal um método tão eficiente quanto a criopreservação e muito menos custoso, por manter os aloenxertos em temperatura ambiente e facilitar o seu transporte até o local onde está sendo realizada a cirurgia.

Todos os passos empregados na captação são mantidos, utilizando-se cabeças femorais provenientes de ATQ, ou seja, com sua retirada ocorrendo em centro cirúrgico. O processamento das mesmas foi feito em ambiente controlado e classificado e o seu empacotamento utilizando-se três embalagens estéreis, seguindo o recomendado pela técnica asséptica.

O principal aspecto relacionado ao armazenamento diz respeito à manutenção da esterilidade dos aloenxertos, papel este fundamental e, se não obedecido, culminará no fracasso do procedimento e em complicações severas ao paciente. Em nosso estudo, realizamos a análise microbiológica para bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos, não ocorrendo crescimento de nenhuma destas espécies armazenadas à temperatura ambiente, sugerindo a manutenção da esterilidade, após um ano de imersão no glicerol a 98%, demonstrando um desempenho semelhante ao armazenamento dos enxertos em baixas temperaturas (- 80° C).

5.5. Estudo tecidual

Em complementação às propriedades biomecânicas, os aloenxertos mineralizados precisam conservar também algumas funções importantes: osteoindução e osteocondução, substituição e remodelagem pelo tecido do hospedeiro, além de sua total incorporação e aceitação biológica. **(Boyce e Scarborough, 1999, Stevenson, 1999)**

A viabilidade celular não é um requisito fundamental para se obter resultados favoráveis em transplantes de aloenxertos. A presença de células vivas não se faz necessária, pois os osteócitos do receptor preenchem o arcabouço ósseo durante o processo de revascularização e incorporação do enxerto. **(Burchardt, 1987, Friedlander, 1987, Tomford e Mankin, 1999, Bauer e Muschler, 2000, Baptista et al, 2003)**

Em nosso estudo, as amostras de tecido ósseo são analisadas levando-se em conta o aspecto dos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e fibroblastos. Quanto a viabilidade celular, apenas nos osteoclastos ocorrem alterações, com queda após a conservação em glicerol a 98% e a criopreservação, o que comprova a continuidade de eventos em nível celular, porém estatisticamente sem significado.

No entanto, para que ocorra o processo de integração óssea, é imprescindível o estado de preservação da matriz óssea. Nos dois métodos de conservação estudados, esta matriz se manteve conservada, sendo que não foram encontradas alterações com significância estatística. Este é um importante aspecto relacionado ao método de conservação, uma vez que a integridade da matriz óssea e não a viabilidade celular é um ponto desejável no transplante. **(Myerson et al, 2005)**

Nos dados obtidos em nosso estudo, a necrose óssea foi observada também no grupo controle, provavelmente relacionada ao diagnóstico de osteoartrose dos pacientes submetidos à ATQ.

Tanto no processo de criopreservação quanto no glicerol a 98%, foi observado o aumento da necrose tecidual, porém não significativo do ponto de vista estatístico. O mesmo foi descrito por **Baptista et al (2003)**, ao realizarem estudo comparativo entre enxertos de cadáver coletados do côndilo femoral a fresco e os criopreservados a - 80° C.

5.6. Custos

O processo de armazenamento de tecidos implica a utilização de equipamentos que promovem o congelamento (no mínimo a - 80° C), os quais nada mais são do que “freezers” especiais. Sua instalação envolve custos elevados, pois além do valor intrínseco destes congeladores, ainda existem os chamados custos indiretos, tais como manutenção preventiva, manutenção da sala com refrigeração adequada, sistemas de alarme atuando 24 horas por dia, geradores para o caso de interrupção de energia elétrica.

Em contrapartida, o método de preservação em glicerol a 98% envolve baixíssimos custos pela sua simplicidade, dispensando equipamentos caros e de manutenção conseqüentemente também dispendiosa. Além disso, pode-se ressaltar a sua facilidade no transporte dos bancos de tecidos até os locais onde deverão ser utilizados.

Consideramos o método de conservação do tecido ósseo imerso no glicerol a 98%, após um ano, adequado para o armazenamento de aloenxertos destinados a transplantes, pois mantém a esterilidade dos mesmos e a estrutura do tecido.

Os resultados são semelhantes aos obtidos com o método da criopreservação a - 80° C. Porém, novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de se avaliar outros pontos, tais como:

- √ a manutenção da capacidade osteoindutiva da matriz óssea.
- √ a resposta imunológica mediada por células do aloenxerto, conservado por este meio e o processo de integração dos mesmos com o receptor.
- √ as propriedades biomecânicas, uma vez que desempenham um papel importante no sucesso terapêutico dos transplantes. É essencial que o método de preservação utilizado não comprometa a rigidez dos aloenxertos e a atuação das forças sobre ele.
- √ a remoção do glicerol do tecido ósseo e mensuração da quantidade retida no enxerto e, assim, determinar os níveis de tolerância deste triálcool.

6. CONCLUSÕES

- 1) Não há crescimento bacteriano ou de fungos nas amostras armazenadas durante um ano em glicerol a 98%.
- 2) Os dois métodos de conservação são semelhantes quanto à preservação da matriz óssea.

7. ANEXOS

Anexo A

Quadro demonstrando a descrição histomorfológica das amostras.

HISTOMORFOLOGIA												
AMOSTRAS	CONTROLE (Gc)				CRIOPRESERVADO (Gcrio12)				GLICEROL 98% (Gg12)			
	OM	OI	OST	NEC	OM	OI	OST	NEC	OM	OI	OST	NEC
1	++	#	#	+++	++	#	#	+++	++	#	#	+++
2	++	+	#	#	++	#	#	+++	++	#	#	+++
3	++	#	#	#	++	#	#	+++	++	#	#	+++
4	++	#	#	#	++	+++	#	+++	++	+++	#	+++
5	++	+++	#	+++	++	+++	#	+++	++	+++	#	+++
6	+++	+++	#	#	+++	+++	#	#	+++	+++	#	#
7	+++	#	#	#	+++	#	#	#	+++	#	#	#
8	++	+++	#	+++	++	+++	#	+++	++	+++	#	+++
9	++	#	#	#	++	#	#	+++	++	#	#	+++
10	++	+++	#	+++	+++	+++	#	+++	++	++	#	+++

ESCORE: # = ausente; + = diminuído; ++ = normal; +++ = aumentado

OM = osso maduro ou lamelar

OI = osso imaturo

OST = osteóide não mineralizado

NEC = necrose

Anexo B

Quadro demonstrando a descrição da viabilidade celular das amostras.

VIABILIDADE CELULAR												
AMOSTRAS	CONTROLE (Gc)				CRIOPRESERVADO (Gcrio12)				GLICEROL 98% (Gg12)			
	OB	OC	OST	FB	OB	OC	OST	FB	OB	OC	OST	FB
1	+	+	+	+	#	#	+	+	#	#	+	+
2	+	+	+	+	+	#	+	+	+	#	+	+
3	+	+	+	+	+	#	+	+	+	#	+	+
4	+	+	+	+	+	#	+	+	+	#	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	#	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	#	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

EScore: # = ausente; + = normal

OB = osteoblastos

OC = osteoclastos

OST = osteócitos

FB = fibroblastos

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbee FH. The preservation of tissues and its applications in surgery [letter]. *Am J Med Sci.* 1912; 149: 523-27.
2. Aho AJ, Heikkila JT, Hirn MYJ. Bone banking and clinical use of allograft bone in Finland. In: Phillips GO, Strong DM, Versen R von, Nather A, Heikkila JT. *Advances in Tissue Banking*. London: World Scientific; 2000. p. 40-2. 4v.
3. Allan DG, Lavoie GJ, McDonald S, Oakeshott R, Gross AE. Proximal femoral allografts in revision hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br.* 1991; 73(2): 235-40.
4. Almeida OM. *Análise histomorfométrica e estudo comparativo empregando-se aloenxertos ósseos liofilizados e esterilizados por autoclave, irradiação gama e óxido de etileno* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 1997.
5. AmatuZZi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU. Banco de tecidos: estruturação e normatização. *Rev Bras Ortop.* 2000; 35(5): 165-172.
6. AmatuZZi MM, Croci AT, Giovani AMM, Santos LAU, Maragni GG, Shinzato JC. Banco de tecidos: estruturação e normatização. In: AmatuZZi MM, *Joelho: articulação dos membros inferiores*. São Paulo: Roca; 2004. p.687-99.

7. Aristide RSA, Viriato SP. Revisão de próteses do quadril. In: Hebert S, Xavier R, Pardim Junior AG, Barros Filho TEP. *Ortopedia e traumatologia-princípios e prática*. São Paulo: Artmed; 2003. p.393-404.
8. Backere ACJ. Euro skin bank: large scale skin-banking in Europe based on glycerol-preservation of donor skin. *Burns*. 1994; 20(Suppl 1): 4-9.
9. Baptista AD, Sorrilha A, Tormes TAM, Abdoune YA, Croci AT, Camargo OP, Oliveira CRGCM. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. *Acta Ortop Bras*. 2003; 11(4): 220-4.
10. Basile ARD. A comparative study of glycerinized and lyophilized porcine skin in dressings for third-degree burns. *Plast Reconst Surg*. 1982; 69(6): 969-72.
11. Bauer TW, Muschler G F. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clin Orthop*. 2000; 371: 10-27.
12. Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop*. 1987; 226: 292-8.
13. Boyce T, Scarborough N. Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am*. 1999; 30(4): 571-81.

14. Brasil, Leis etc. Lei n.9434 de 5 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplantes e tratamento. *Diário Oficial da União, Brasília* (DF). 1997 5 fev; seção 1:25.
15. Brasil, Leis etc. Decreto n.2268 de 30 de junho de 1997. Regulamenta a Lei n.9434 de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplantes e tratamento. *Diário Oficial da União, Brasília* (DF). 1997 30 jun; seção 1:1.
16. Brasil, Leis etc. Portaria n.1686 de 20 de setembro de 2002. Dispõe sobre a regulamentação para o funcionamento de banco de tecidos músculo esqueléticos. *Diário Oficial da União, Brasília* (DF). 2002 24 jul; seção 1:1.
17. Brigman BE, Hornicek FJ, Gebhardt MC, Mankin HJ. Allografts about the knee in young patients with high-grade sarcoma. *Clin Orthop*. 2004; 421: 232 - 9.
18. Brown KLB, Cruess RI. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am*. 1982; 64:270-76.
19. Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. *Clin Orthop*. 1988; 240:129-36.

20. Buck BE, Malinin TI. Human bone and tissue allografts: preparation and safety. *Clin Orthop*. 1994; 303: 8-17.
21. Burchardt H. Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am*. 1987; 18(2):187-96.
22. Bush LF. The use of homogenous bone grafts: a preliminary report on the bone bank. *J Bone Joint Surg*. 1947; 29(3): 620-8.
23. Bush LF, Garber CZ. The bone bank. *JAMA*. 1948; 137(7):588-94.
24. Carr CR, Hyatt GW. Clinical evaluation of freeze-dried bone grafts. *J. Bone Joint Surg Am*. 1955; 37(3):549-66.
25. Carrel A. The preservation of tissues and applications in surgery. *Am J Med Sci*. 1912; 149:523-7.
26. Carvalho ET, Batalha ESC, Andreucci M. Emprego de osso conservado em cirurgia ortopédica: banco de osso. *Rev Hosp Clin USP*. 1952; 7(2): 121-34.
27. Convery FR, Convery MM, Devine SD, Meyers MH. Acetabular augmentation in primary and revision total hip arthroplasty with cementless prostheses. *Clin Orthop*. 1990; 252: 167-75.

28. Dias AR, Mazzei FM, Kolbe W, Castilho EA. Avaliação do comportamento da dura-máter humana quando submetida a diferentes agentes conservadores. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1976; 22(5):175-8.
29. Dubau R, Meunier JP, Demarty R, Henaff F. Une nouvelle méthode de conservation des greffons osseux par dessiccation sous vide à partir de l'état congelé (lyophilisation). *Presse Med*. 1952; 60(66):1402.
30. Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg*. 1991; 73(8):1123 - 42.
31. Fazzi A. *Banco de osso: da obtenção, preparo, conservação e utilização do enxerto ósseo homólogo congelado: resultados de 239 casos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1966.
32. Feofiloff ET, Garcia RJ. Técnicas de obtenção, processamento, armazenamento e utilização de homoenxertos ósseos. *Rev Bras Ortop*. 1996; 31(11): 895-903.
33. Friedlander GE, Mankin HJ. Bone banking: current methods and suggested guidelines. In: Murray DG, editors. *American Academy of Orthopaedic Surgeons Instructional Course. Lectures*. St Louis: Mosby; 1981; p. 36-55.

34. Friedlaender GE. Bone banking: in support of reconstructive surgery of the hip. *Clin Orthop*. 1987;225:17-21.
35. Friedlander GE, Strong DM, Mankin HJ. Immunology of bone allografts: current knowledge. In: Phillips GO, Strong DM, Versen R von, Nather A. *Advances in Tissue Banking*. London: World Scientific; 1998. p. 135-6. 2v.
36. Gangolli S. *The dictionary of substances and their effects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1999. p. 499-500.
37. Gennaro AR. *Remington: the science and practice of pharmacy*. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000. p.218.
38. Groves EWH. Methods and results of transplantation of bone in the repair of defects caused by injury or disease. *Br J Surg*. 1917; 5(18): 185-242.
39. Herbert JJ. Homografts and the bone bank. *J Bone Joint Surg Br*. 1951; 33(3): 316-22.
40. Hettich R, Ghofrani A, Hafemann B. The immunogenicity of glycerol-preserved donor skin. *Burns*. 1994; 20(Suppl 1): 71-6.
41. Hoekstra MJ, Kreis RW, Pont JS. History of the euro skin bank: the innovation of preservation technologies. *Burns*. 1994; 20(Suppl 1): 43-7.

42. Hult L. Some experiences with a bone bank. *Acta Orthop Scand*. 1950; 19: 476-80.
43. Hussmann J, Russell RC, Kucan JO, Hebebrand D, Bradley T, Steinau HU. Use of glycerolized human allografts as temporary (and permanent) cover in adults and children. *Burns*. 1994; 20(Suppl 1): 61-6.
44. Kreis RW, Vloemans AFPM, Hoekstra MJ, Mackie DP, Hermans RP. The use of non-viable glycerol-preserved cadaver skin combined with widely expanded autografts in the treatment of extensive third-degree burns. *J Trauma*. 1989; 29(1): 51-4.
45. Kreuz FP, Hyatt GW, Turner TC, Bassett AL. The preservation and clinical use of freeze – dried bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1951; 33(1): 863-72.
46. Lex A, Raia A. O uso de dura-máter homóloga, conservada em glicerina, no tratamento das hérnias incisionais. *Rev Paul Med* . 1970; 77(4): 123-8.
47. Mankin HJ, Hornicek FJ, Raskin KA. Infection in massive bone allografts. *Clin Orthop*. 2005; 432: 210-6.
48. Marshall L, Ghosh MM, Boyce SG, MacNeil S, Freedlander E, Kudesia G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: implications for the clinical use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns*. 1995; 21(5): 356-61.

49. Mckay I, Woodward B, Wood K, Navsaria HA, Hoekstra H, Green C. Reconstruction of human skin from glycerol-preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets. *Burns*. 1994; 20(Suppl 1): 19-22.
50. Musculo L, Ayerza MA, Tinao LA, Ranalletta MR, Abalo E. Intercalary femur and tibia segmental allografts provide an acceptable alternative in reconstructing tumor resections. *Clin Orthop*. 2004; 426: 97-102.
51. Myerson MS, Neufeld SK, Uribe J. Fresh-frozen structural allografts in the foot and ankle. *J. Bone Joint Surg Am*. 2005; 87(1): 113-20.
52. Nather A. Musculoskeletal tissue banking in Singapore: 15 years of experience (1988 - 2003). *J Orthop Surg*. 2004; 12(2): 184-90.
53. Okamoto T, Souza CMR, Gabrielli MFR, Sonoda CK. Estudo histomorfológico sobre reimplante mediato de incisivo superior de rato – efeitos da conservação do dente em glicerina a 98%. *Rev Fac Odontol Bauru*. 1994; 2(4): 103-8.
54. Okamoto T, Gabrielli MFR, Gabrielli MAC, Vieira EH. Autogenous grafts of costal cartilage preserved in 98% glycerol to dental sockets: histological study in rats. *Rev Odontol Unesp São Paulo*. 1995; 24(1): 9-17.

55. Okamoto T, Kira ME, Okamoto R, Garcia Junior IR, Niccoli Filho WD.
Homogeneous implant in rat tibias of matrix preserved in 98% glicerín:
histomorphologic study. *Braz Dent J.* 2000; 11(2): 79-87.
56. Oliveira VA. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de
feridas cutâneas de membros locomotores de equinos. *Cienc Rural.* 1998;
28(4): 623-8.
57. Pigossi N. *Implantação de dura-máter homogéna conservada em glicerina:
estudo experimental em cães* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo; 1964.
58. Pigossi N, Raia A, Lex A, Gama AH, Simonsen O, Haddad J, Stolf NAG,
Zerbini EJ, Miniti A, Tenuto R. Estudo experimental e clínico sobre o emprego,
como implante, da dura-máter homogéna conservada em glicerina à
temperatura ambiente. *Rev Ass Med Bras.* 1971; 17(8): 263-78.
59. Puig LB. *Substituição da valva aórtica por valva de dura-máter homóloga*
[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: 1972.
60. Puig LB, Verginelli G, Kawabe L, Zerbini EJ. Valva cardíaca de dura-máter
homóloga: método de preparação da valva. *Rev Hosp Clin Fac Med São
Paulo.* 1974; 29(2): 85-9.

61. Puig LB. *Substituição de valva mitral por valva de dura-máter homóloga: resultados tardios* [tese de livre docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1976.
62. Puig LB, Verginelli G, Kawabe L, Melo R, Conceição A, Bittencourt D, Zerbini EJ. Four years experience with dura mater cardiac valves. *J Cardiovasc Surg* (Torino). 1977; 18(3): 247-55.
63. Ravishanker R, Bath A S, Roy R. Amnion bank: the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns*. 2003; 29(4): 369-74.
64. Registro Brasileiro de Transplantes. 2004; 10(2): 25.
65. Rey L. *Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. p. 413.
66. Riskalla PE, Testa PRG, Suzuki FA, Aguiar JRM, Albernaz PLM. Tecido cório-amniótico e reconstrução da membrana timpânica. *R B M Otorrino*. 1995; 2(1): 35-9.
67. Roberts GCL. Experiences with boiled cadaveric bone. *J. Bone Joint Surg Br*. 1952; 34(3): 428-32.

68. Rondinelli PC, Cabral FP, Freitas EH, Penedo JL, Leite JER, Silveira SLC. Rotina do banco de ossos do hospital de traúmato-ortopedia (HTO – RJ). *Rev Bras Ortop.* 1994; 29(6): 385-8.
69. Rudelli S, Ronda E, Angeli JA. Uso de enxerto ósseo nas revisões com prótese total do quadril não cimentada e híbrida. *Rev Bras Ortop.* 1992; 27(5): 281-8.
70. Schiozer WA, Hartinger A, Henckel G, Donnersmarck V, Mühlbauer W. Composite grafts of autogenic cultured epidermis and glycerol-preserved allogenic dermis for definitive coverage of full thickness burn wounds: case reports. *Burns.* 1994; 20(6): 503-07.
71. Sicard A, Binet JP. La conservation des transplants osseux et leur emploi en chirurgie. *Presse Med.* 1950; 58(23): 433-4.
72. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30(4): 543-52.
73. Sweetman SC. *Martindale - the complete drug reference.* London: Pharmaceutical Produ; 2002. p. 1616-17.
74. Tomford W W, Mankin H J. Bone banking: update on methods and materials. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30(4): 565-70.

75. Tomford W W. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank*. 2000; 1(2): 105-9.
76. Van Baare J, Buitenwerf J, Hoekstra MJ, du Pont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns*. 1994; 20(Suppl 1): 77-80.
77. Van Baare J, Ligtoet EEJ, Middelkoop E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. *Transplantation*. 1998; 65(7): 966-70.
78. Wai RTJ. Use of glycerol-preserved skin in plastic surgery. *Burns*. 1994; 20(Suppl 1): 27-31.
79. Wilson PD. Experiences with a bone bank. *Ann Surg*. 1947; 126(6): 932-46.
80. Wilson PD. Follow-up study of the use of refrigerated homogenous bone transplants in orthopaedic operations. *J Bone Joint Surg*. 1951a; 33(2): 307-23.
81. Wilson PD. Experience with the use of refrigerated homogenous bone. *J Bone Joint Surg*. 1951b; 33(3): 301-15.
82. Yim C J, Carlson ER. Mandibular reconstruction using bone allografts. In: Phillips GO, Strong DM, Versen R von, Nather A, Heikkila JT. *Advances in Tissue Banking*. London: World Scientific; 2000. p. 109-13. 4v.