

LEANDRO JOSÉ RECKERS

**A RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES TEMPERATURAS E PERÍODOS
DE PRESERVAÇÃO SOBRE A CELULARIDADE DE MENISCOS DE
COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

**SÃO PAULO
2004**

LEANDRO JOSÉ RECKERS

**A RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES TEMPERATURAS E PERÍODOS
DE PRESERVAÇÃO SOBRE A CELULARIDADE DE MENISCOS DE
COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

**SÃO PAULO
2004**

Reckers, Leandro José

A relação entre diferentes temperaturas e períodos de preservação sobre a celularidade de meniscos de coelhos/Leandro José Reckers – São Paulo, 2004.
xxi, 69f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação.

Cellular viability on preservation of rabbit menisci: the role of different temperatures and time observations periods.

1. Menisco. 2. Congelamento. 3. Transplante. 4. Coelho.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
UNIFESP-EPM**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA E EXPERIMENTAÇÃO
COORDENADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes**

TESE DE MESTRADO

AUTOR: Leandro José Reckers

ORIENTADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

TÍTULO: A relação entre diferentes temperaturas e períodos de preservação sobre a celularidade de meniscos de coelhos.

BANCA EXAMINADORA:

1- Presidente: Prof. Dr. Djalma José Fagundes
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM.

MEMBROS EFETIVOS:

2 – Prof. Dr. Moisés Cohen
Professor Livre-Docente e Chefe do Centro de Traumatologia do Esporte do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo. UNIFESP-EPM

3 – Prof. Dr. José Luiz Pozo Raymundo
Professor Adjunto e Regente da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Católica de Pelotas - RS.

4 – Prof. Dr. Nilson Roberto Severino
Professor Doutor do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

MEMBRO SUPLENTE

1- Prof. Dr. Hélio Plapler
Professor Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina.

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar
no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou
que você nunca vai ser alguém....

....Quem acredita sempre alcança.

Renato Russo(*In memoriam*).
(Cantor e compositor)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José Bernardo** e **Elory** por serem meu grande exemplo de espírito de luta, de honestidade, de fé e de amor ao próximo. Agradeço a Deus por ter me dado vocês como o bem mais valioso que a vida poderia me proporcionar.

À **Josiene**, minha companheira diária, não saberia falar neste momento a grande admiração que sinto por ti. A tua ajuda nesta batalha foi o suporte que qualquer pesquisador necessita para concluir seu trabalho. Sem a tua presença ao meu lado, não saberia dizer se hoje eu estaria escrevendo estas simples palavras, tentando agradecer tudo o que tu fizeste por mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Djalma José Fagundes**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, orientador deste trabalho, por ter sido a pessoa que acreditou em mim, em um dos momentos difíceis de minha vida e por ter sido a mão que me conduziu, orientou e ensinou, ao longo de todo este caminho. Sua confiança em mim promoveu o surgimento de uma nova pessoa, hoje mais experiente, equilibrada e apaixonada pela vida acadêmica e pela pesquisa científica. Não tenho palavras para agradecer tanta credibilidade, mas sei que lhe serei eternamente grato.

AGRADECIMENTOS

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA – UNIFESP-EPM**, por ter me recebido como aluno do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação, possibilitando minha titulação.

Ao **Prof. Dr. Luiz Francisco Poli de Figueiredo**, Livre-Docente, Titular da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM, pelo apoio, pela confiança e pela acolhida na Disciplina.

Ao **Prof. Dr. Ivan Hong Jun Koh**, Livre-Docente da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM, pelo grande conhecimento transmitido.

Ao **Prof. Dr. Paulo de Oliveira Gomes**, Professor Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM, pela vasta cultura geral a nós transmitida, e que em muito enriqueceu meu aprendizado.

Ao **Prof. Dr. José Luiz Martins**, Professor Adjunto, Livre-Docente da Disciplina de Cirurgia Pediátrica da UNIFESP-EPM, pela atenção e pela transmissão de experientes ensinamentos, enfatizando entre tantos, a importância da programação do projeto de pesquisa.

À **Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero**, Professora Afiliada ao Departamento de Cirurgia da UNIFESP-EPM, pela contribuição ao delineamento desta tese e pela experiência pessoal, tão proveitosamente transmitida.

Ao **Prof. Dr. João Luiz Moreira Coutinho de Azevedo**, Prof. Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM, pelos ensinamentos dirigidos principalmente à língua portuguesa e à metodologia científica.

Ao **Prof. Dr. Murched Omar Taha**, Professor Afiliado ao Departamento de Cirurgia da UNIFESP–EPM, pelos competentes ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Tomaz Schettini**, Professor Adjunto, Livre-Docente da Disciplina de Cirurgia Pediátrica da UNIFESP-EPM, pela sua experiência transmitida nos debates do clube de revista.

Ao **Prof. Dr. João Francisco Junior**, Prof. Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia da UNIFESP-EPM, pela sua experiência transmitida durante os cursos da pós-graduação.

À médica veterinária e amiga **Márcia Bento Moreira**, Mestre e pós-graduanda, à nível de doutorado, do Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, pelo grande estímulo na execução deste trabalho, mesmo nos momentos em que o cansaço e o desânimo tentavam ser mais fortes. Sua competência em medicina veterinária foi em grande parte, responsável pela execução desta pesquisa. Muito obrigado pela compressão de sua família.

À médica veterinária e amiga **Vanessa Carla Paiva**, pós-graduanda, à nível de mestrado, do Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, pelo entusiasmo, amizade e alegria transmitida no decorrer deste longo trabalho. Sua habilidade cirúrgica foi fundamental no auxílio de todos os procedimentos operatórios, colaborando de forma valiosa para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo e ortopedista **Hilário Boatto**, Doutor em Medicina pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP. A tua amizade foi muito especial nestes dois últimos anos. Espero um dia poder contribuir de qualquer forma a maneira com a qual tu me acolheste.

À médica veterinária e amiga **Aline De Lorenzo**, pela colaboração nos procedimentos operatórios deste estudo.

À amiga e funcionária da UNIFESP-EPM, **Elaine Maria Alvez Bazzi Dantas**, não só pela colaboração neste trabalho, mas também pela amizade e pela sinceridade com a qual você vive diariamente, conseguindo sem que perceba, transmitir este caráter para as pessoas ao seu lado.

Aos meus amigos de infância, **Renato Teixeira e Ricardo Sperb**. Já se passaram muitos anos e a nossa amizade não mudou, bem pelo contrário, só aumentou, e mesmo distantes há muito tempo, sinto muita falta de vocês.

Aos meus amigos **Anuar e Dib Umar**, amigos de muitos anos, desde a graduação. Cada um de nós tomou um caminho diferente, mas a nossa amizade persiste.

Ao amigo e ortopedista **Hamilton Hidalgo**, Mestre em Medicina pelo Departamento de Ortopedia da UNIFESP, pela sua amizade verdadeira e pela sua grande coragem.

Aos amigos e ortopedistas **Emerson Garms e Alberto Pochini**, pós-graduandos à nível de Mestrado Profissionalizante pelo Departamento de Ortopedia da UNIFESP-EPM, pela amizade e companheirismo que vocês me passaram neste curto espaço de tempo. Mesmo longe, não esquecerei.

Ao amigo e ortopedista **Antônio Altenor Bessa de Queiroz**, Mestre em Medicina e pós-graduando a nível de Doutorado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da UNIFESP, pela sua mais sincera amizade e pelos seus preciosos conselhos e ensinamentos.

À estatística **Sandra Malagutti**, pelo talentoso desempenho estatístico na realização deste trabalho.

Ao amigo **Carlos Eduardo Benetti Ramalho**, Mestre pelo Programa de pós-graduação em Morfologia da UNIFESP-EPM. Agradeço pela colaboração inicial na confecção das lâminas para exame histológico.

Ao médico veterinário **Paulo Sérgio Venerando da Silva Ferreira**, pós-graduando à nível de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM, pela colaboração e disponibilidade sempre que precisei na execução deste trabalho.

À **Adriana Sayury Takamory**, acadêmica de Medicina Veterinária da UNIBAN e PIBIC – Programa de Iniciação Científica da UNIFESP, pela colaboração preciosa no cuidado com os animais em seu pré-operatório.

Ao funcionário **João Custódio de Brito (Fernando)**, pela sua amizade, colaboração e paciência, principalmente nos vários finais de semanas em que passamos envolvidos com esta pesquisa.

À **Valdelice Justiniano Soares**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP, pela sua ajuda e disponibilidade nos momentos em que precisei durante a execução deste trabalho.

À **Benedita Salete Costa Lima Valverde e Rita de Cássia Almeida Bonfim** funcionárias da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP, pela colaboração durante a realização do presente trabalho.

Aos **colegas** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP, pela convivência, amizade e ajuda na formação do espírito crítico.

À **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP** – Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e Laboratório de Oncologia Experimental, pela confecção das lâminas.

Ao **CAPES**, pela concessão de bolsa de mestrado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de distribuição da amostra nos diferentes grupos e tempos de estudo.....	6
Figura 2 -	(A) Foto da área tricotomizada em ambos os joelhos, coxas e região antero-inferior da parede abdominal do coelho. (B) Área com anti-sepsia	8
Figura 3 -	Foto da área restrita para o ato operatório com panos esterilizados.....	8
Figura 4 -	(A) Foto da região anterior do joelho marcada com seis centímetros de extensão previamente a incisão. (B) Foto da incisão na pele e tela subcutânea (seta 1) e identificação do ligamento da patela (seta 2). (C) Foto da identificação da cápsula articular (seta).....	10
Figura 5 -	(A) Manobra em valgo e flexão do joelho para melhor exposição do menisco medial. (B) Foto do joelho com a patela luxada lateral para exposição do menisco medial (MM-menisco medial, PLL- patela luxada lateral, e LP- ligamento da patela).....	11
Figura 6 -	(A) Foto da tesoura de 10cm e o bisturi fêmea 15. (B) Foto da retirada do menisco medial (seta).....	11
Figura 7 -	Foto representativa do ligamento colateral fibular (LCF), tendão extensor do hálux (TEH) e ligamento da patela (LP).....	12
Figura 8 -	Foto representativa do momento da desinserção do ligamento colateral fibular na sua porção tibial (LCF).....	12
Figura 9 -	Foto da flexão do joelho associada ao esforço em varo com liberação tibial do ligamento colateral fibular (LCF), retirada do tendão extensor do hálux (TEH) e luxação medial da patela (LMP), para liberação do menisco lateral (ML).....	13
Figura 10 -	Foto representativa do menisco medial e lateral imediatamente após ressecção operatória.....	13

Figura 11 -	Medição do maior eixo do menisco com o uso de paquímetro digital.....	14
Figura 12 -	Pote e primeiro invólucro plástico para acondicionamento asséptico de um menisco.....	14
Figura 13 -	Foto representativa do menisco acondicionado no pote plástico...	15
Figura 14 -	Menisco armazenado no congelador durante o período de preservação.....	16
Figura 15 -	Menisco retirado do invólucro e submetido a descongelamento em solução salina à temperatura ambiente.....	17
Figura 16 -	Foto dos potes com formalina a 10% previamente à realização das lâminas.....	17
Figura 17 -	Sistema computadorizado de análise de imagens para leitura e contagem celular. Monitor de vídeo, vídeo-câmera, CPU e microscópio.....	19
Figura 18 -	Foto de um quadrante sendo quantificado pelo programa Image-Pro-Plus.....	19
Figura 19 -	Foto representativa de um campo microscópico identificando: Fibroblastos (HE 40X).....	20
Figura 20 -	Foto representativa de um campo microscópico identificando: Fibrócitos (HE 40X).....	20
Figura 21 -	Foto representativa de um campo microscópico identificando: Condrócitos (HE 40X).....	21
Figura 22 -	Foto representativa de um campo microscópico identificando: Picnoses (HE 40X).....	21
Figura 23 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no segundo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).....	44
Figura 24 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no quarto dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).....	44

Figura 25 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no sexto dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X).....	44
Figura 26 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no oitavo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X).....	45
Figura 27 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X).....	45
Figura 28 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo segundo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X).....	45
Figura 29 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo quarto dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X).....	46
Figura 30 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo sexto dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X).....	46
Figura 31 -	Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo oitavo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X).....	46

- Figura 32 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X)..... 47
- Figura 33 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo segundo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X)..... 47
- Figura 34 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo quarto dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X)..... 47
- Figura 35 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo sexto dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X)..... 48
- Figura 36 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo oitavo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X)..... 48
- Figura 37 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no trigésimo dia de observação às temperaturas de -7,2°Celsius (A), -21,4°Celsius (B) e -73°Celsius (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE – 40X)..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$	24
Tabela 2 -	Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ou $-73^{\circ}\text{Celsius}$	29
Tabela 3 -	Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ou $-73^{\circ}\text{Celsius}$, quando consideradas como um grupo único, uma vez que não houve diferenças significantes entre ambos os grupos.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição das médias e da variabilidade (desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$	25
Gráfico 2 -	Distribuição das médias e da variabilidade (desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ou $-73^{\circ}\text{Celsius}$	30
Gráfico 3 -	Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ou $-73^{\circ}\text{Celsius}$, quando consideradas como um grupo único, uma vez que não houve diferenças significantes entre ambos os grupos.....	32
Gráfico 4 -	Distribuição das médias e da variabilidade (desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ou $-73^{\circ}\text{Celsius}$	40
Gráfico 5 -	Gráfico de dispersão mostrando a porcentagem de células viáveis em função do congelamento a $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$	41
Gráfico 6 -	Gráfico de dispersão mostrando a porcentagem de células viáveis em função do congelamento a $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$	42
Gráfico 7 -	Gráfico de dispersão mostrando a porcentagem de células viáveis em função do congelamento a $-73^{\circ}\text{Celsius}$	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre os diferentes dias de preservação à temperatura de $-7,2^{\circ}$ Celsius.....	26
Quadro 2 -	Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre o 2° e o 16° dia de preservação à temperatura de $-21,4^{\circ}$ Celsius ou -73° Celsius.....	34
Quadro 3 -	Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre o 16° e o 30° dia de preservação à temperatura de $-21,4^{\circ}$ Celsius.....	36
Quadro 4 -	Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre o 16° e o 30° dia de preservação à temperatura de -73° Celsius.....	38
Quadro 5 -	Valores encontrados para o ajuste de curvas para as médias de celularidade na temperatura de $-7,2^{\circ}$ Celsius.....	41
Quadro 6 -	Valores encontrados para o ajuste de curvas para as médias de celularidade na temperatura de $-21,4^{\circ}$ Celsius.....	42
Quadro 7 -	Valores encontrados para o ajuste de curvas para as médias de celularidade na temperatura de -73° Celsius.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

? : variação

C: Celsius

Co: condrócitos

CPU: central processing unit / unidade central de processamento

dp: desvio padrão

Fb: fibroblastos

Fc: fibrocondrócitos (fibrócitos)

g: gramas

GI: grupo I

GII: grupo II

GIII: grupo III

HE: hematoxilina e eosina

Kg: quilograma

L: litro

LCF: ligamento colateral fibular

LMP: luxação medial da patela

LP: ligamento da patela

mL: mililitros

MM: menisco medial

ML: menisco lateral

Pc: picnose celular

PLL: patela luxada lateral

RAM: random access memory / memória de acesso aleatório

TEH: tendão extensor do hálux

UNIFESP – EPM: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

USP: Universidade de São Paulo

RESUMO

Objetivo: Estudo da relação entre diferentes temperaturas e períodos de preservação sobre a celularidade de meniscos de coelhos. **Métodos:** Retirou-se assepticamente 180 meniscos (mediais e laterais) de 45 coelhos (Nova Zelândia), machos, idade entre 6/8 meses, peso médio de 3250g. Os meniscos foram congelados, de dois até trinta dias, a $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ ($n=60$), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ($n=60$) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ ($n=60$). A cada dois dias, de cada temperatura, foram descongelados quatro meniscos e quantificou-se, em quinhentos campos por lâmina, o número de fibroblastos, fibrocondrócitos, condrócitos e picnoses. **Resultados:** No 14° dia de congelamento a $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$, a média de células viáveis foi de 92,38%. Entretanto, a partir do 16° dia observou-se uma redução significativa de 12% ($p=0,001$), comparando-se com a média no 14° dia. A média da viabilidade celular, nas temperaturas $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ e $-73^{\circ}\text{Celsius}$, até 16° dia apresentou comportamento estatisticamente semelhante. A partir do 18° dia na temperatura de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ a redução do número de células foi significativa ($p<0,001$), especialmente do 28° (54,5%) para o 30° dia (30%) de congelamento. O número de células viáveis a $-73^{\circ}\text{Celsius}$ mostrou uma redução não significativa ($p=1,000$) de 2,3% no número de células viáveis do 28° (40,2%) ao 30° dia (37,9%). **Conclusão:** A viabilidade celular dos meniscos congelados diminuiu discretamente até o 14° dia independente da temperatura, caindo rápida e progressivamente a partir de então, sendo mais acentuada nas temperaturas mais baixas de preservação.

ABSTRACT

Objective: Study of the relationship between different temperatures and rabbits menisci cellularity periods of preservation. **Methods:** It was removed aseptically 180 medial and lateral menisci of 45 rabbits (New Zeland), male, age between 6/8 months, average weight 3250g. The menisci were frozen, during two until thirty days, at a temperature of $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (n=60), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (n=60) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (n=60). Four menisci were thawed every two days for histological analysis until completing 30 freezing days, and it was quantified in 500 sield for blade, the number of fibroblasts, fibrochondrocytes and pyknosis. **Results:** on the 14th defrost day, at the temperature of $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ the average of viable cells was 92,38%. However, after the 16th, it was observed a significant reduction of 12% ($p=0,001$), comparing with the average of the 14th day. The cells average viability at the temperatures of negative $21,4^{\circ}\text{Celsius}$ and negative 73°Celsius until the 16th day showed a statistically similar behavior. From the 18th day on at the temperature of $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ the cells number reduction was significant ($p<0,001$), especially from the 28th (54,5%) to the 30th day (30%) of freezing. The number of viable cells on the temperature $-73^{\circ}\text{Celsius}$ showed no significant reduction ($p=1,000$) of 2,3% in the from 28th (40,2%) to the 30th day (37,9%). **Conclusion:** The frozen menisci cells viability was reduced discreetly until the 14th day, independently of the temperature and dropped quickly and progressively and from this day on, being more stressed at lower temperatures.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. MÉTODOS.....	5
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59
8. NORMAS ADOTADAS.....	64
APÊNDICE.....	65

1. INTRODUÇÃO

As lesões dos meniscos, independente do tipo, tempo de duração, tipo de atividade física e idade dos pacientes, vêm sendo tratadas ao longo dos anos pela retirada total ou parcial^{1,2}.

A meniscectomia total ou parcial no joelho humano, a médio e longo prazo, apresenta importantes efeitos deletérios sobre a articulação, especialmente no que diz respeito à distribuição de forças na superfície articular. A área de contato articular após a retirada deste menisco decresce em até 50%, produzindo um aumento de até 350% na concentração das forças de contato nesta área menor. Este fato acelera a degeneração da cartilagem articular, resultando em osteoartrose precoce, principalmente ocasionada pelas lesões dos meniscos mediais^{3,4,5,6,7}.

A meniscectomia parcial apresenta uma menor morbidade que a total por manter, pelo menos em parte, a função original do menisco. A sutura meniscal é uma solução mais adequada para o tratamento destas lesões, desde que possa ser reconstituída a integridade anatômica do menisco. Entretanto, somente 30 a 50% das lesões são reparadas por este método^{1,8,9,10,11}.

Na impossibilidade de reparar o menisco lesado e/ou quando se impõe a necessidade de sua remoção, surgem como opções o transplante de menisco e a utilização de próteses meniscais, ainda em fase de experimentação^{2,12,13}.

Há 20 anos realizou-se o primeiro transplante de meniscos em humanos¹⁴. Ao longo deste período, cerca de 4.500 cirurgias já foram relatadas em todo o mundo, mostrando ser um procedimento potencialmente eficaz na prevenção da osteoartrose após meniscectomia^{1,5,6,15,16}.

Uma revisão recente da literatura mostrou índices de 86% a 91% de resultados satisfatórios, em pacientes submetidos à transplante meniscal após meniscectomia¹⁷. Apesar deste fato não há na literatura um consenso sobre a influência da celularidade do menisco transplantado, consequência direta da técnica de preservação, sobre o resultado final. Autores preconizam que a viabilidade celular é fator de melhor integração, enquanto outros dão preferência ao transplante de uma matriz de colágeno desvitalizada.

Diferentes técnicas de preservação e o tempo de armazenamento exercem efeitos diversos sobre a integridade biológica e bioquímica dos tecidos^{8,15,18,19}. As técnicas correntes de armazenamento e preservação do menisco são semelhantes à de outros tecidos conectivos e incluem: método à fresco, congelamento à fresco, congelamento à seco (liofilizado) e criopreservação^{8,15,20,21,22,23,24,25}.

A forma de armazenamento à fresco (refrigeração à 4°Celsius positivos) objetiva a preservação da viabilidade celular, sem alteração da arquitetura do menisco. O obstáculo a este procedimento diz respeito à coordenar o período em que as células mantêm-se viáveis nos enxertos, desde a retirada do doador, até o momento do transplante³. A literatura refere períodos variáveis de viabilidade entre dois a cinco dias^{26,27,28,29}. Os autores não fazem referências à proporção de células viáveis no menisco, e tomam como base os dados de preservação de células do osso.

O congelamento à fresco (temperaturas inferiores a zero graus Celsius) mantém também a viabilidade celular por um período de até cinco dias. Alguns autores substituem o termo congelamento à fresco por congelamento profundo quando se referem ao menisco armazenado em temperaturas a partir de 70°Celsius negativos^{8,14,19,20}. Também os autores não fazem referências a proporção de células viáveis no menisco, e tomam como base os dados de preservação de células do osso. O congelamento à seco (liofilizado) leva à morte de todas as células existentes por um processo à vácuo^{3,14,15}. Os autores partidários de que somente a matriz desvitalizada do menisco já seja suficiente para o sucesso do transplante, preconizam seu uso. No entanto, o obstáculo a este procedimento está na redução de cerca de 2/3 do comprimento meniscal inicial, o que limita o resultado final³.

Autores partidários da criopreservação, por outro lado, referem manter entre 10 a 40% de integridade celular. No entanto, o procedimento apresenta como desvantagem um alto custo^{24,30,31}.

Atualmente, preservação meniscal é preferencialmente realizada por técnicas que submetem os meniscos à preservação em temperaturas negativas.

Alguns autores citam o congelamento a temperaturas ao redor de 4°Celsius negativos, argumentando que isto manteria a integridade das células e facilitaria a repopularização celular do menisco após o transplante. Entretanto, identificam como fator limitante o curto período de viabilidade das células retiradas do doador, que é, aproximadamente, de dois a cinco dias^{32,33,34}.

Outros autores preferem o armazenamento a temperaturas muito baixas, como 70°Celsius negativos, o que ocasionaria a morte de todas as células, mantendo a arquitetura do menisco, sem riscos de reação imunológica enxerto-hospedeiro. Ainda não há consenso na literatura sobre o momento em que ocorreria a morte de todas as células, mas expressiva maioria dos autores armazena estes meniscos por um período mínimo de 30 a 50 dias após a retirada do doador^{3,4,8,9,14,15,17,18,20,35}.

Há referências na literatura sobre a viabilidade celular em preservação por resfriamento em ossos, ligamentos e tendões^{36,37}. A revisão bibliográfica sobre o assunto não logrou encontrar relatos sobre a preservação por congelamento do menisco propriamente dito.

Um estudo da viabilidade celular permitiria uma orientação mais adequada do momento ideal para a realização do transplante meniscal, tanto para aqueles que preconizam a necessidade de células viáveis para os meniscos (congelados a 4°Celsius negativos), como para os que preconizam a morte celular (congelados a partir de 70°Celsius negativos).

Portanto, propôs-se nesta pesquisa avaliar os efeitos de três temperaturas diferentes de congelamento sobre a celularidade de meniscos de coelhos.

2. OBJETIVOS

Geral:

Estudo da preservação de menisco para enxerto homólogo.

Específico:

Estudo da relação entre diferentes temperaturas e períodos de preservação sobre a celularidade de meniscos do coelho.

3. MÉTODOS

Amostra

O experimento foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP – EPM, protocolo nº 0787/04.

Foram utilizados 45 coelhos[?], *Oryctolagus cuniculus*, da linhagem Nova Zelândia, albinos, machos, com idade entre seis e oito meses e peso médio de 3250 gramas.

Os coelhos permaneceram por um período adaptativo pré-operatório de sete dias no Biotério da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM, alojados em gaiolas individuais, em condições de temperatura controlada por sistema de ar condicionado, ciclo de luz-escurecimento de doze horas e alimentação com ração própria para a espécie e com água a vontade.

Após a retirada asséptica, os meniscos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos:

G I = Armazenados à temperatura de 7,2°Celsius negativos (n=60)

G II = Armazenados à temperatura de 21,4°Celsius negativos (n=60)

G III = Armazenados à temperatura de 73°Celsius negativos (n=60)

A cada dois dias, a partir do segundo até o trigésimo dia, foram encaminhados para o estudo histológico quatro espécimes de cada grupo de estudo.

A distribuição da amostra está esquematizada na figura 1.

[?]Granja RG Comércio de Produtos Agropecuários Ltda ME – São Paulo - SP

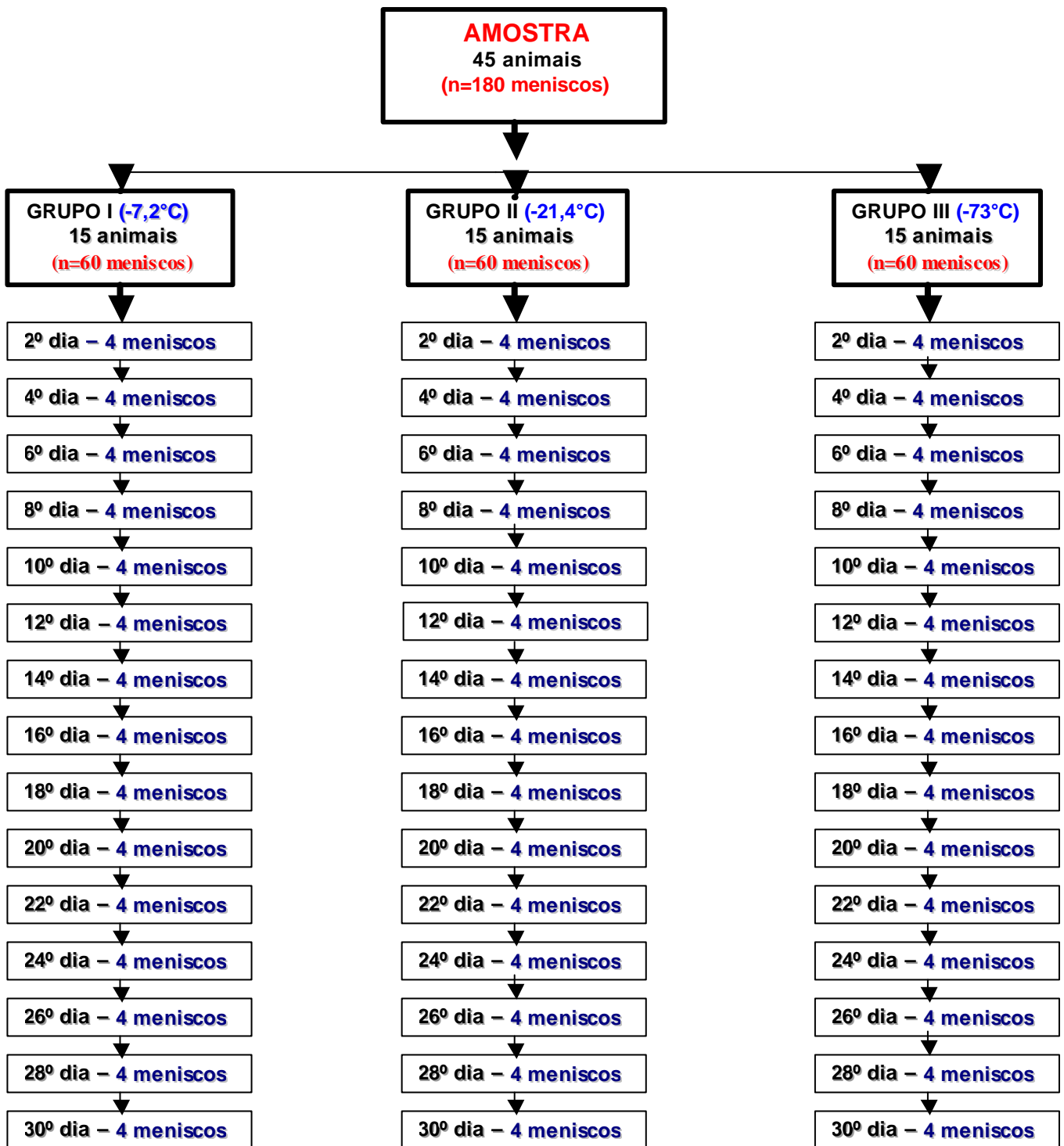


Figura 1 – Esquema de distribuição da amostra nos diferentes grupos e tempos de estudo.

Procedimento Anestésico

Os animais privados de ração por seis horas antes do ato operatório foram pesados em balança de precisão, imediatamente antes da medicação pré-anestésica.

Na sala pré-operatória os coelhos receberam como medicação pré-anestésica 2,4mg.Kg⁻¹ de acepromazina* a 1% e 4mg.Kg⁻¹ de cloridrato de xilazina** adicionados na mesma seringa e administrados pela via intramuscular (região posterior da coxa - ventre dos músculos semitendíneo e semimembranáceo).

Viabilizou-se um acesso venoso por meio da punção da veia auricular marginal, para infusão de solução salina a 0,9% e das drogas necessárias para a indução anestésica (cloridrato de cetamina*** e cloridrato de xilazina**, na proporção de 1:1), administrando-se 0,5 mL desta solução.

Na sala cirúrgica, os animais foram mantidos em decúbito dorsal na calha operatória e intubados com sonda orotraqueal 2,5 sem balão. A manutenção anestésica se fez com isoflurano a 1,5% em fluxo constante de 2L por minuto e com uma frequência respiratória de 10 movimentos respiratórios por minuto, ciclados pelo aparelho Takaoka****.

Procedimento operatório

Cada animal foi tricotomizado na região anterior, posterior, lateral e medial dos joelhos direito e esquerdo, incluindo toda a coxa e a região anterior e inferior da parede abdominal (Figura 2A).

* Acepran?

** Anasedan?

*** Ketamin?

**** Modelo: KT12 Sansei

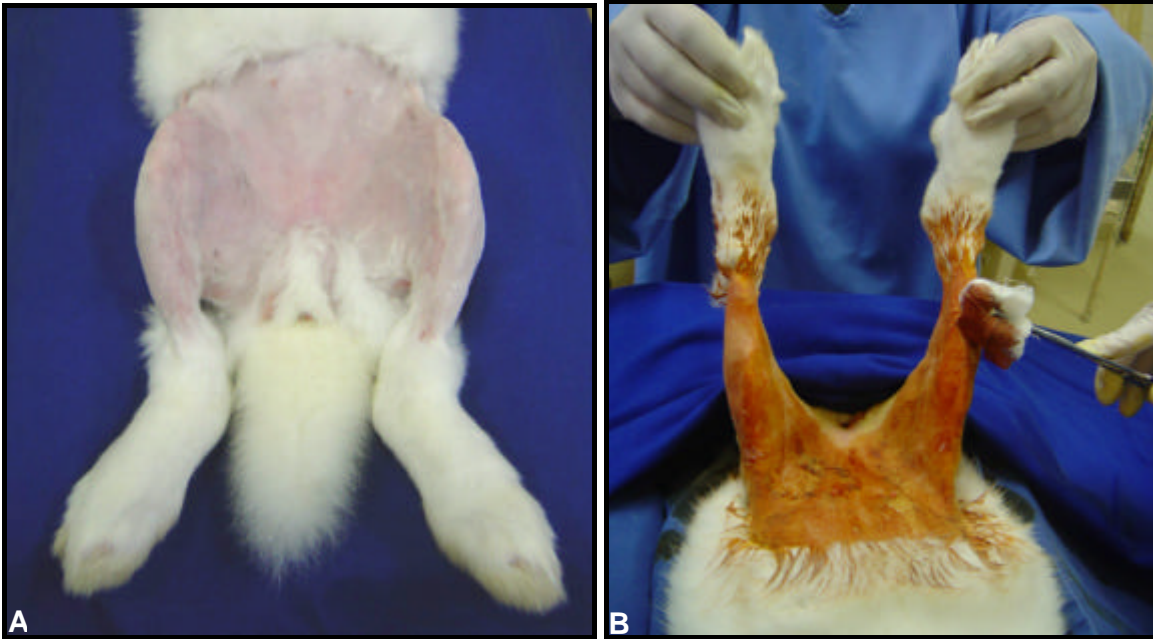


Figura 2 – (A) Foto da área tricotomizada em ambos os joelhos, coxas e região antero-inferior da parede abdominal do coelho. (B) Área com anti-sepsia.



Figura 3 – Foto da área restrita para o ato operatório com panos esterilizados.

A anti-sepsia da área tricotomizada foi realizada com polivinilpirrolidona* (Figura 2B) e isolada com panos esterilizados, delimitando uma área restrita para o ato operatório (Figura 3).

Iniciou-se o procedimento por meio de uma incisão longitudinal anterior do joelho com cerca de seis centímetros de extensão (Figura 4A). Foi divulsionada a tela subcutânea, identificando-se o ligamento da patela (Figura 4B), até a exposição da cápsula articular medial (Figura 4C). Um esforço em valgo, flexão do joelho e luxação lateral da patela foram o suficiente para acessar o menisco medial (Figura 5A e 5B). A meniscectomia total foi realizada com bisturi lâmina número 15 e tesoura curva de dez centímetros (Figura 6A e 6B). Para a retirada do menisco lateral, o ligamento colateral fibular e/ou tendão extensor do hálux foram desinseridos da tíbia (Figuras 7 e 8). Flexão do joelho, luxação medial da patela e um esforço em varo foram necessários para a retirada do menisco lateral (Figura 9). Os meniscos medial e lateral de cada joelho, retirados (Figura 10) foram medidos com paquímetro digital** registrando a medida de seu eixo maior (Figura 11).

* Povidini?

** Mitutoyo?

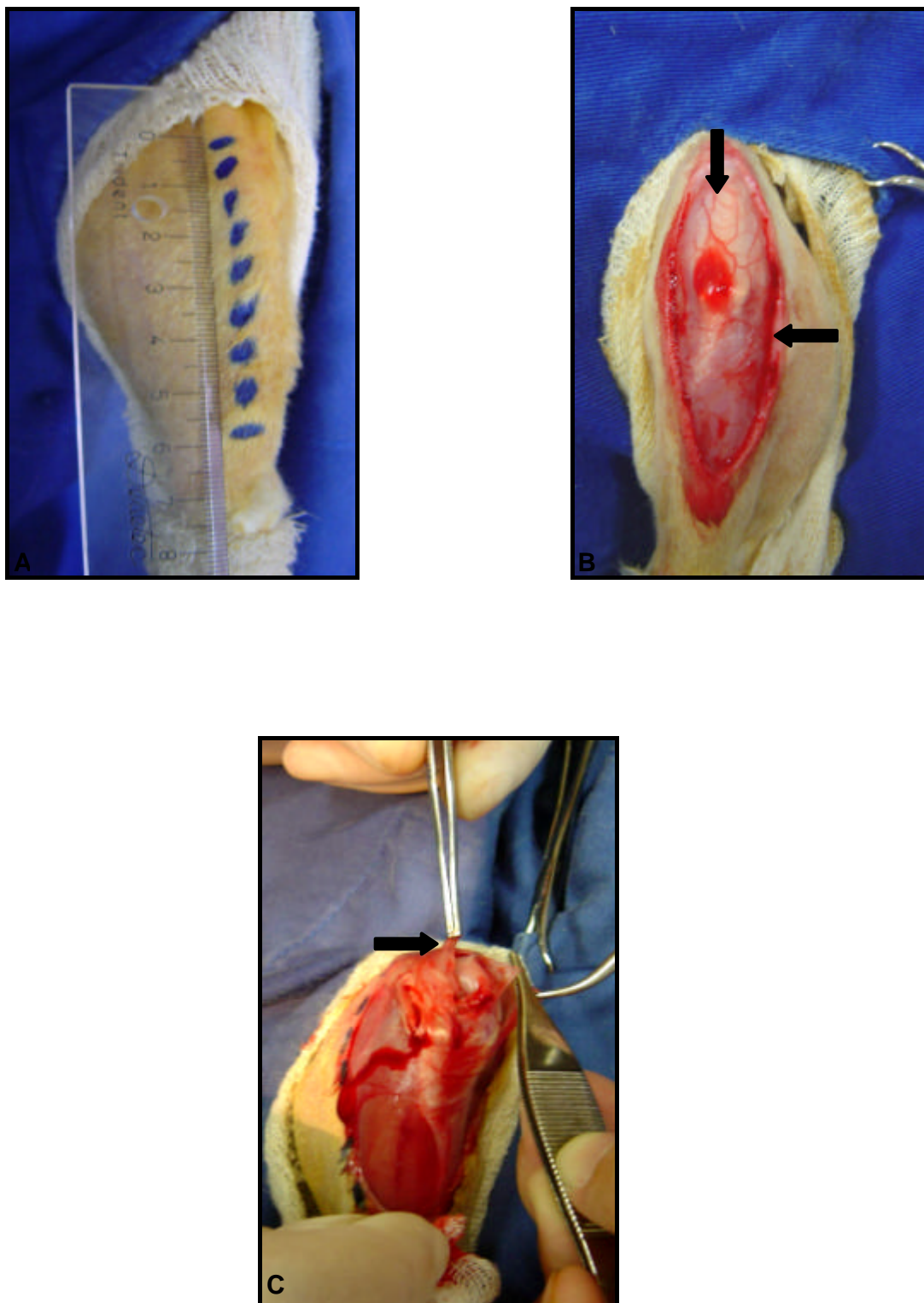


Figura 4 – (A) Foto da região anterior do joelho marcada com seis centímetros de extensão previamente à incisão. (B) Foto da incisão na pele e tela subcutânea (seta 1) e identificação do ligamento da patela (seta 2). (C) Foto da identificação da cápsula articular (seta).

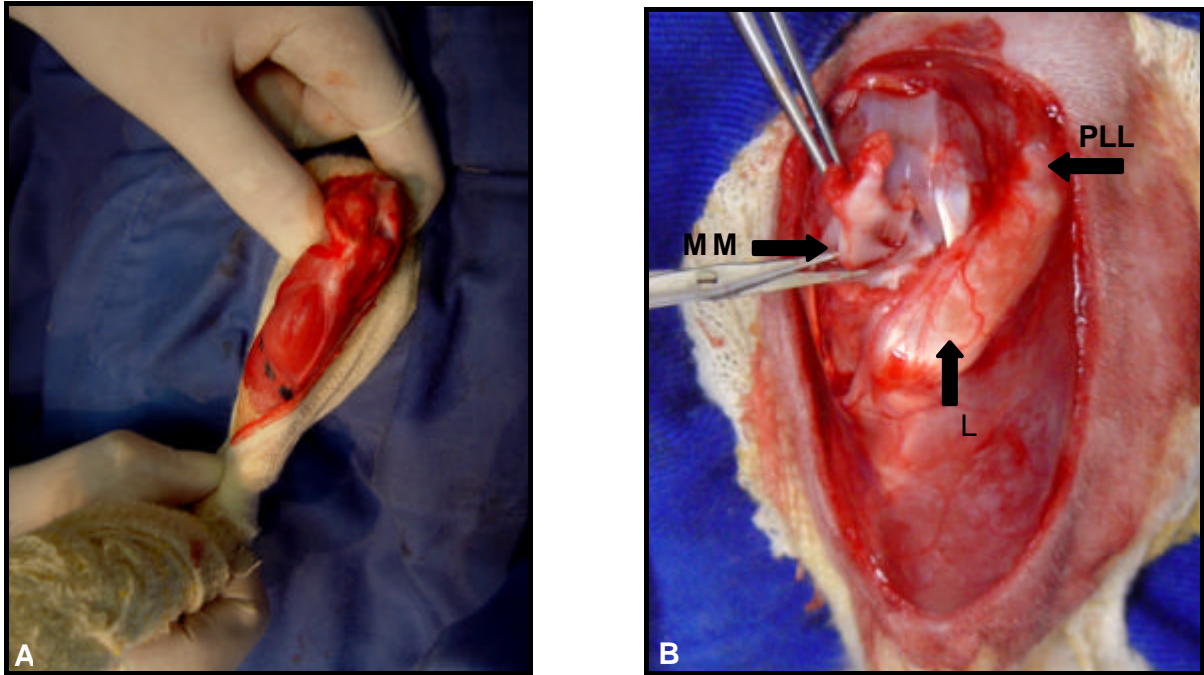


Figura 5 – (A) Manobra em valgo e flexão do joelho para melhor exposição do menisco medial. (B) Foto do joelho com a patela luxada lateral para exposição do menisco medial (MM-menisco medial, PLL-patela luxada lateral e LP- ligamento da patela).

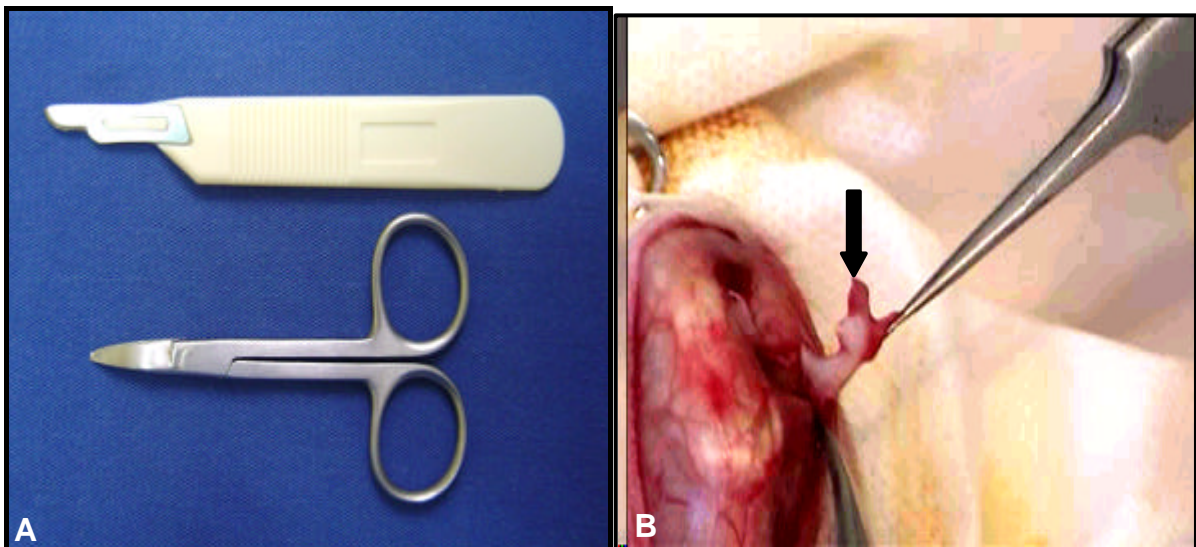


Figura 6 – (A) Foto da tesoura de 10cm e o bisturi lâmina 15. (B) Foto da retirada do menisco medial (seta).

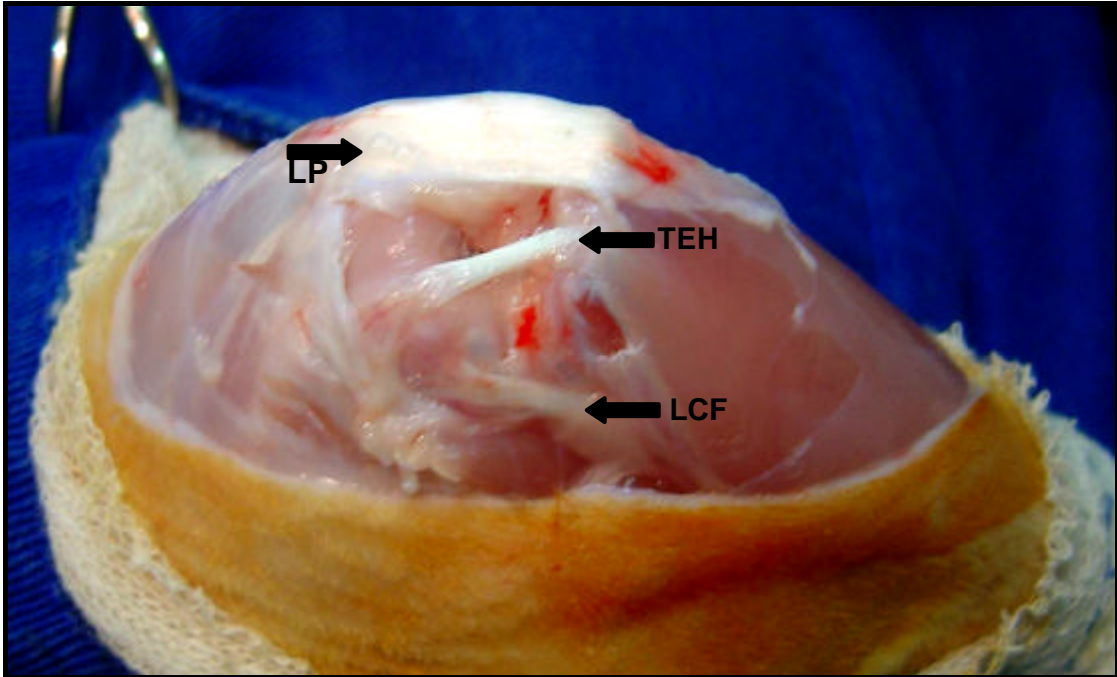


Figura 7 – Foto representativa do ligamento colateral fibular (LCF), tendão extensor do hálux (TEH) e ligamento da patela (LP).

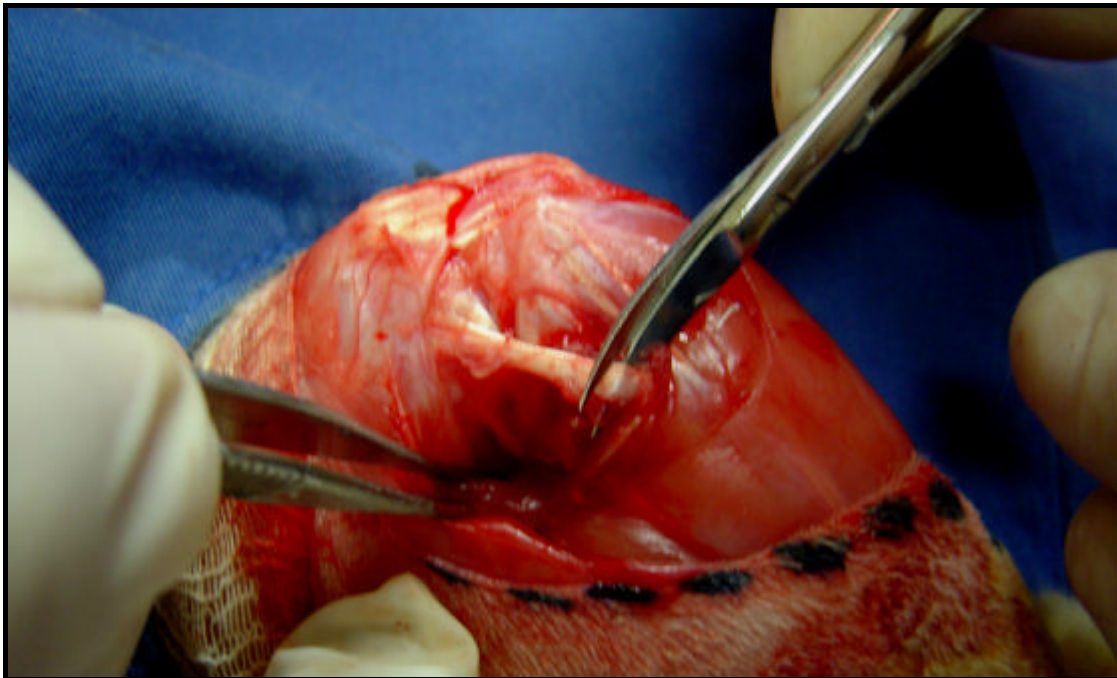


Figura 8 – Foto representativa do momento da desinserção do ligamento colateral fibular na sua porção tibial (LCF).

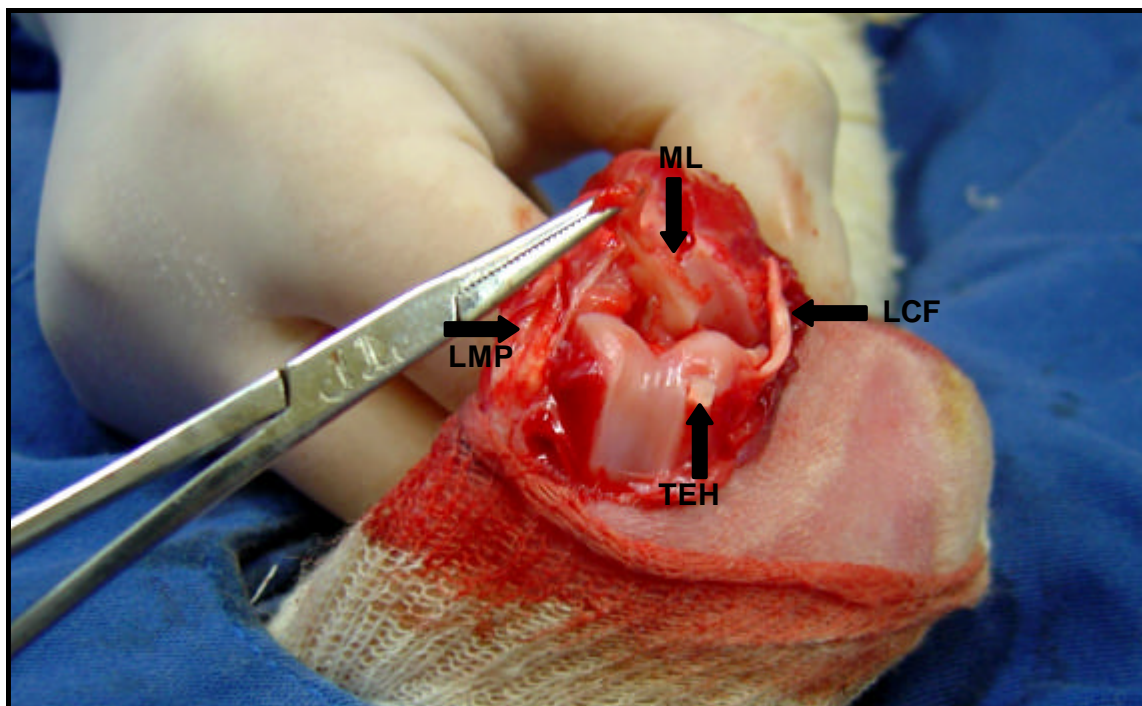


Figura 9 – Foto da flexão do joelho associada ao esforço em varo com liberação tibial do ligamento colateral fibular (LCF), retirada do tendão extensor do hálux (TEH) e luxação medial da patela (LMP), para liberação do menisco lateral (ML).

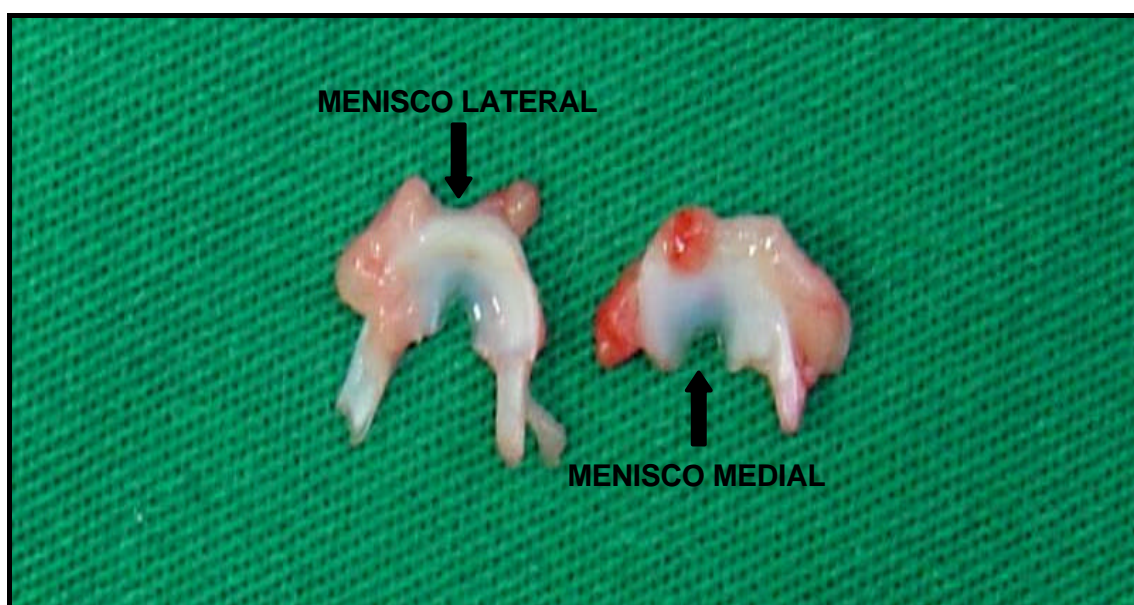


Figura 10 – Foto representativa dos meniscos medial e lateral imediatamente após ressecção operatória.



Figura 11 – Medição do maior eixo do menisco com o uso de paquímetro digital.

Os meniscos foram colocados em pequenos sacos plásticos individuais, esterilizados em óxido de etileno, que por sua vez foram acondicionados em potes plásticos de 6 X 9cm, também esterilizados pelo mesmo método (Figuras 12 e 13).



Figura 12 – Pote e primeiro invólucro plástico para acondicionamento asséptico de um menisco.



Figura 13 – Foto representativa do menisco acondicionado no pote plástico.

Cada conjunto foi imediatamente levado para armazenamento em três temperaturas diferentes: 73°Celsius negativos (congelador do Departamento de Patologia da UNIFESP), 21,4°Celsius negativos (congelador da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP) e 7,2°Celsius negativos (congelador doméstico da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP) (Figura 14).

O ato operatório foi finalizado com a redução da luxação da patela e a sutura da cápsula articular, tela subcutânea e pele, com fio de poliamida* 4.0.

Com o animal ainda anestesiado, procedeu-se a eutanásia com a injeção intravenosa da associação** de Embutramida, Mebezônio e Tetracaína.

* Mononylon? - Ethicon

** T-61? - Interval International



Figura 14 – Meniscos armazenados no congelador durante o período de preservação.

Estudo microscópico

Decorrido o intervalo de congelamento determinado para cada grupo, quatro meniscos foram retirados de seus respectivos congeladores, mergulhados em solução salina de cloreto de sódio 0,9% em temperatura ambiente, por vinte minutos, até o total descongelamento (Figura 15). Foram retirados assepticamente de seus invólucros e imersos em frascos individuais, com formalina a 10% onde permaneceram por quarenta e oito horas (Figura 16).



Figura 15 – Menisco retirado do invólucro e submetido a descongelamento em solução salina à temperatura ambiente.

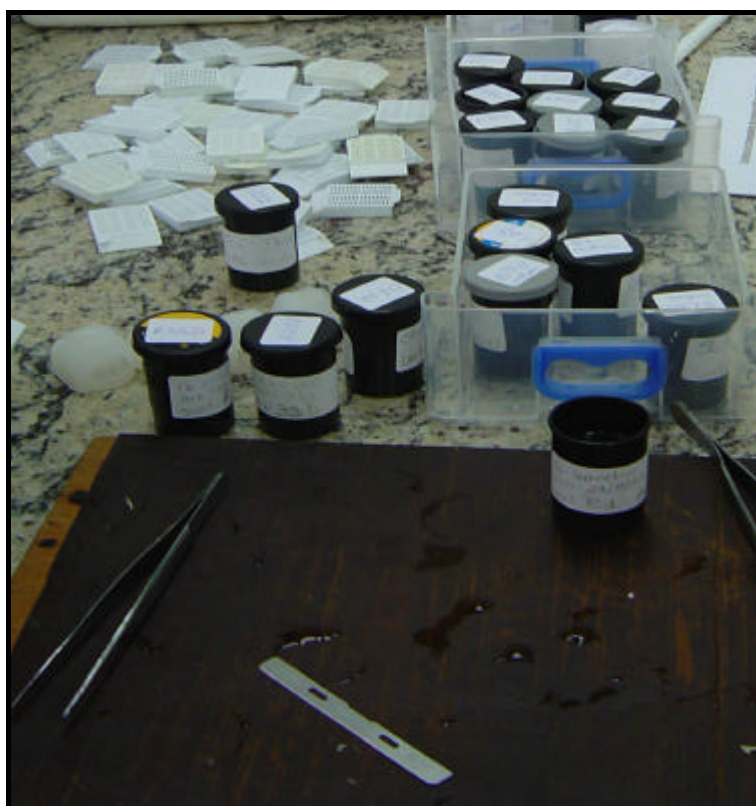


Figura 16 – Foto dos pots com formalina a 10% previamente à realização das lâminas.

O processamento histológico incluiu: corte no sentido longitudinal do maior eixo do menisco, emblocamento das peças em parafina, secção com micrótomo rotativo, ajustado para 5µm de espessura, preparação das lâminas e coloração pelo método de hematoxilina-eosina (HE) que foi realizado no Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade de São Paulo – USP.

As lâminas foram analisadas pelo sistema computadorizado de análise de imagens, que consistiu de uma vídeo-câmara Nikon FDX – 35, acoplada a um microscópio óptico Nikon (Eclipse 800), com objetivas pancromáticas, que transmitiram as imagens a um microcomputador Pentium 4, com 502 megabytes de memória RAM, trabalhando em ambiente Windows XP Professional e equipado com placa digitalizadora e o software Image-Pro-Plus (Figura 17).

A leitura e descrição das 180 lâminas foram realizadas por patologista que desconhecia a origem dos grupos estudados. Para cada lâmina foram identificados e contados os diferentes tipos celulares determinados em quinhentos quadrantes tomados aleatoriamente (Figura 18).

Foram avaliados os seguintes tipos celulares:

- a- Fibroblastos: células que apresentaram prolongamentos citoplasmáticos irregulares, núcleos grandes e ovóides, com cromatina fina e nucléolos evidentes (Figura 19).
- b- Fibrocondrócitos (Fibrócitos): células que se apresentaram menores que os fibroblastos, fusiformes, com o núcleo menor e alongado (Figura 20).
- c- Condrócitos: células que se apresentaram com formato alongado e arredondado na periferia do tecido, com saliências na superfície (Figura 21).
- d- Picnoses (morte celular): células que apresentaram núcleos hipercondensados, arredondados, diminuídos de tamanho e com presença de cariorrexe (distribuições irregulares da cromatina, que podem se acumular em grumos na membrana nuclear) (Figura 22).

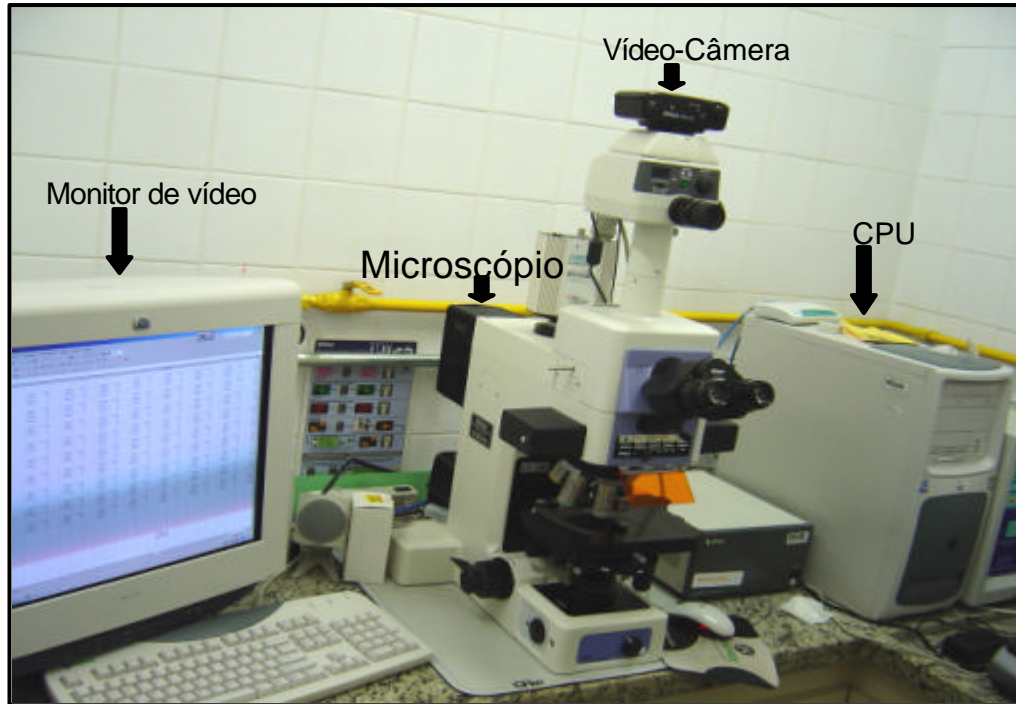


Figura 17 – Sistema computadorizado de análise de imagens para leitura e contagem celular: Monitor de vídeo, vídeo-câmera, CPU e microscópio.

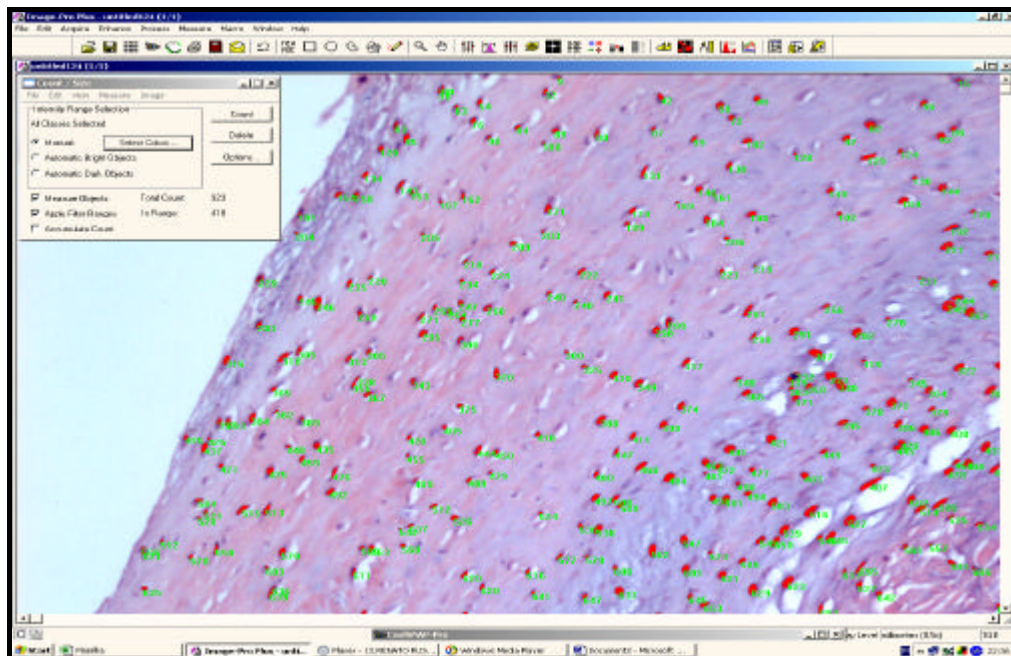


Figura 18 – Foto de um quadrante sendo quantificado pelo programa Image-Pro-Plus.

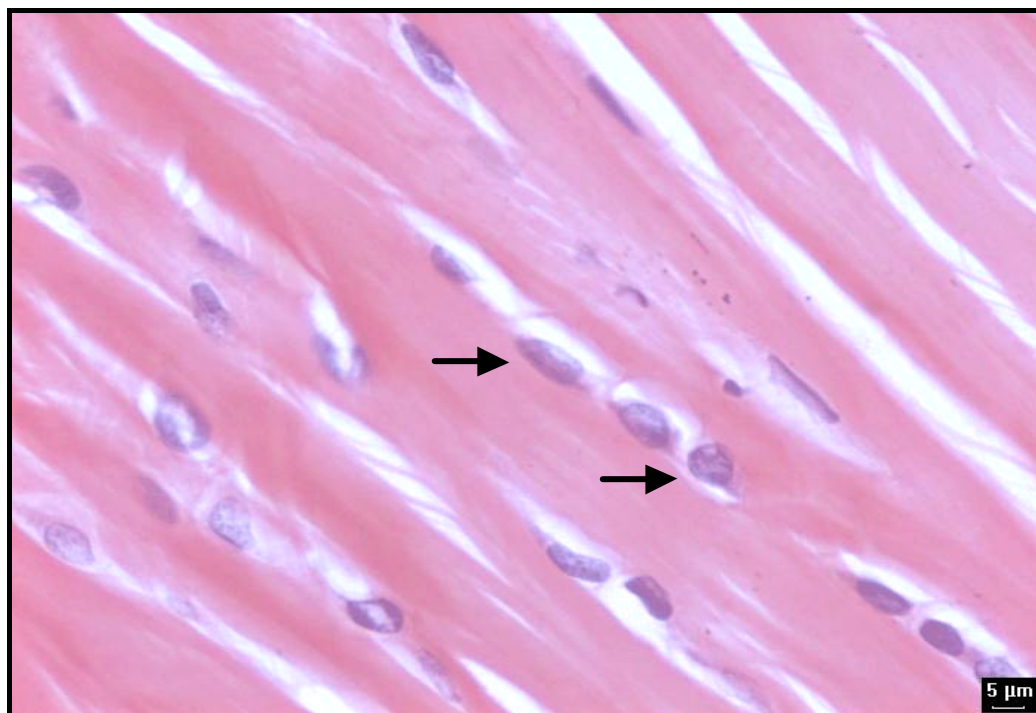


Figura 19 – Foto representativa de um campo microscópico identificando: Fibroblastos (HE 40X).

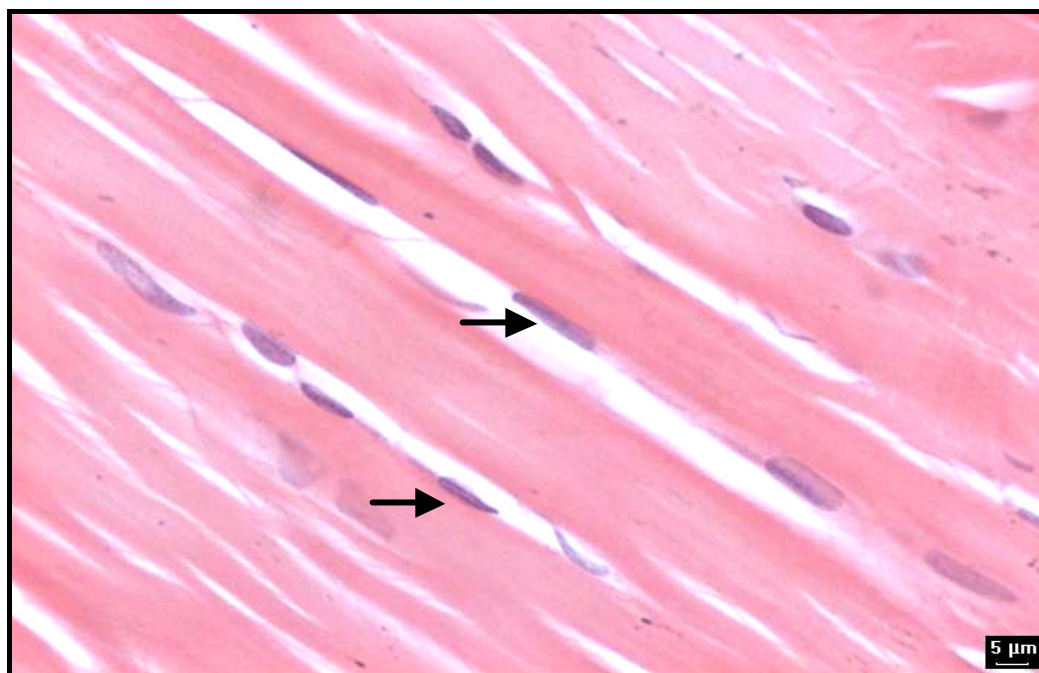


Figura 20 – Foto representativa de um campo microscópico identificando: Fibrócitos (HE 40X).

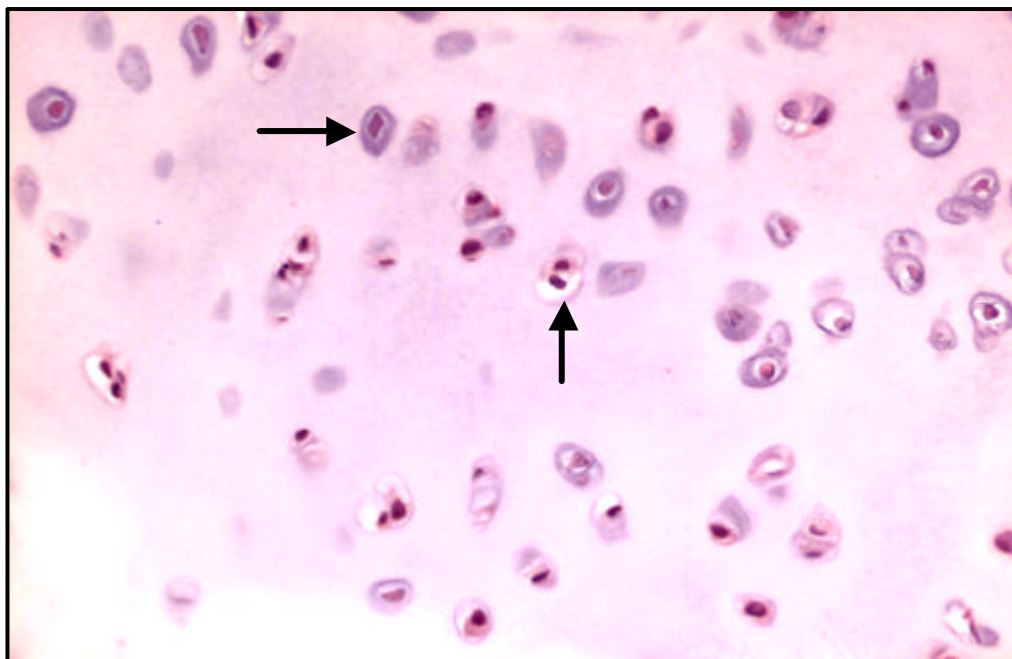


Figura 21– Foto representativa de um campo microscópico identificando: Condrócitos (HE 40X).

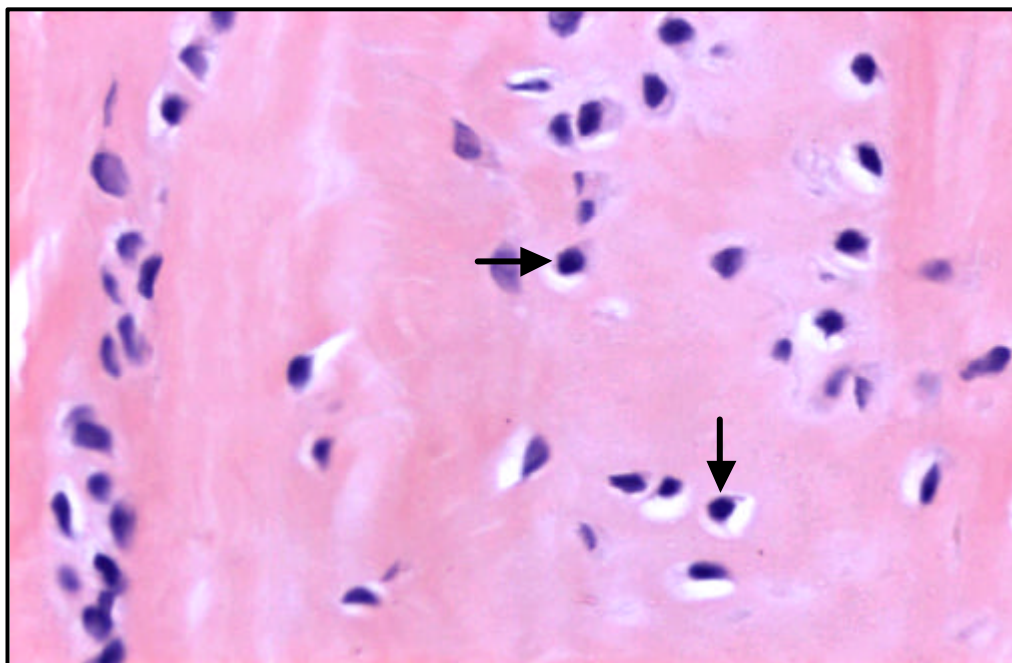


Figura 22 – Foto representativa de um campo microscópico identificando: Picnoses (HE 40X).

Estudo Estatístico

O estudo estatístico foi elaborado pela PGS Medical Statistics utilizando software SPSS 10, e de acordo com a natureza das variáveis foram aplicados os seguintes testes³⁸:

As variáveis foram representadas por média e desvio padrão (dp).

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$) em todos os testes estatísticos aplicados e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

No experimento com temperatura de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ foi aplicada a técnica de Análise de Variância (ANOVA) com um fator fixo para verificar diferenças entre os tempos de congelamento (em dias) em relação à porcentagem de células viáveis. As diferenças foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Nos experimentos com temperatura de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ foi aplicada a técnica de Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores fixos, com os objetivos de: comparar as duas temperaturas e verificar diferenças entre os tempos de congelamento (em dias) ambos em relação à porcentagem de células viáveis.

Diante da presença de interação entre os fatores temperatura e tempo de congelamento a análise foi dividida em duas partes e avaliada entre 2 e 16 dias (parte 1) e entre 16 e 30 dias (parte 2).

Na parte 1 foi aplicada a técnica de Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores fixos: temperatura e tempo de congelamento (em dias). As diferenças entre os tempos foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Na parte 2 foi aplicada análise similar à aplicada na parte 1, entretanto foi encontrada interação entre os fatores testados. Dessa forma os dados foram analisados da seguinte forma:

- ?? para cada temperatura foi aplicada a técnica de Análise de Variância (ANOVA) com um fator fixo para verificar diferenças entre os tempos de congelamento (em dias) em relação à porcentagem de células viáveis. As diferenças foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni;
- ?? em cada tempo de congelamento foi aplicado o teste t de Student para comparar as duas temperaturas avaliadas. Foi aplicada a correção de Bonferroni ao nível de significância em função do grande número de testes aplicados com o mesmo objetivo ($\alpha \div 7$).

Para as temperaturas de $-27,4^{\circ}\text{Celsius}$ e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ foi aplicada a técnica de Análise de Regressão Polinomial com o ajuste da melhor curva para a porcentagem de células viáveis em função do tempo de congelamento, nos tempos a partir de 16 dias.

4.6 Resultados do estudo histológico

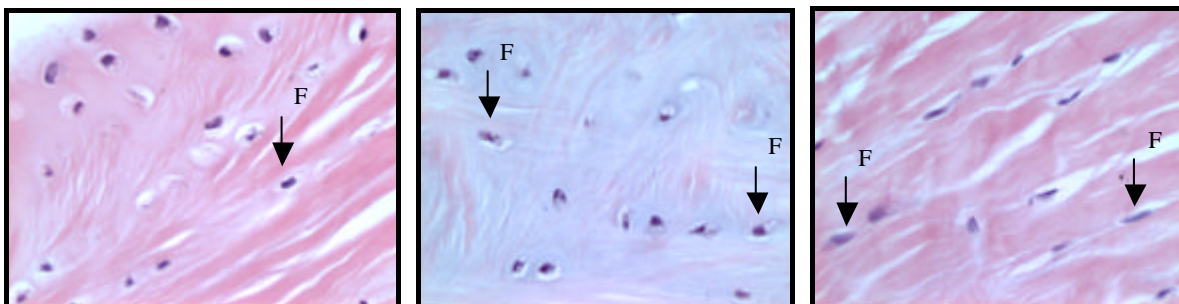


Figura 23 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no segundo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

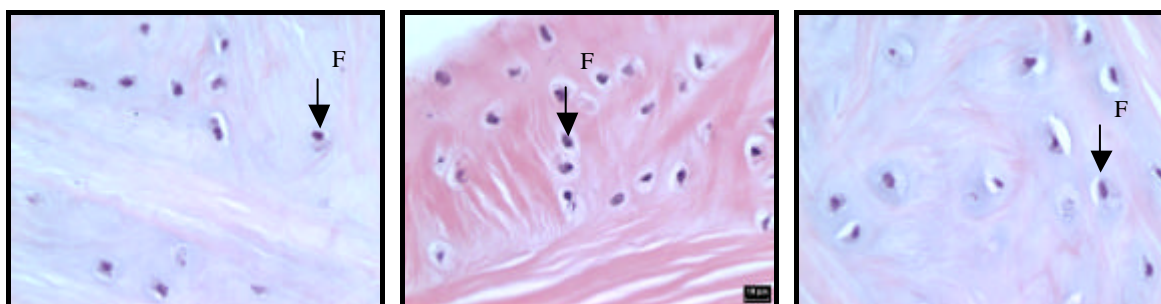


Figura 24 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no quarto dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

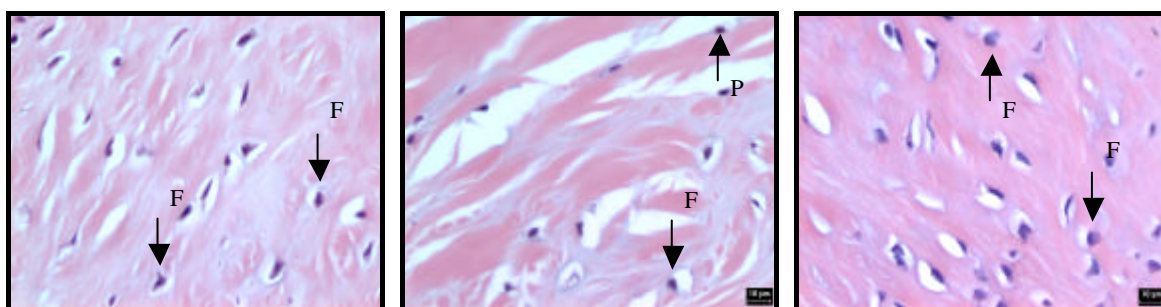


Figura 25 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no sexto dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

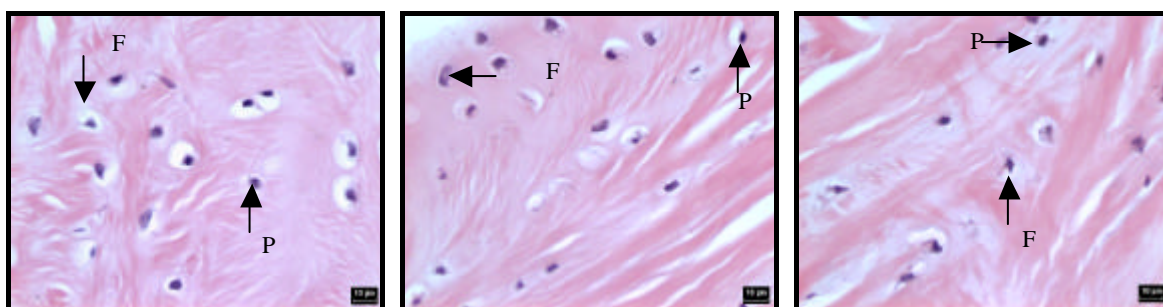


Figura 26 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no oitavo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

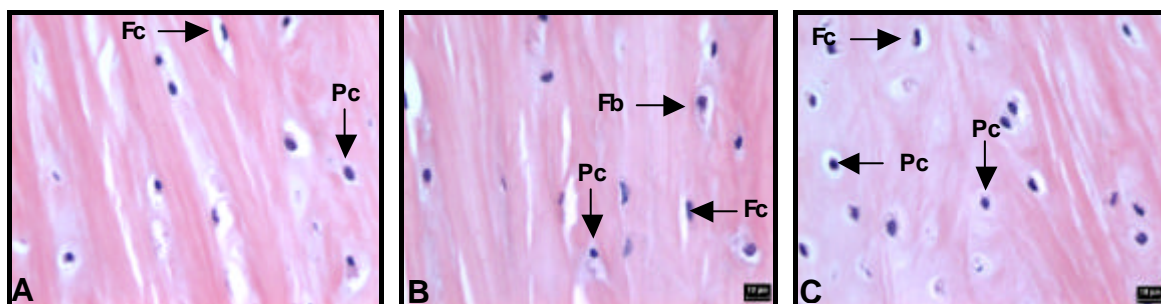


Figura 27 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

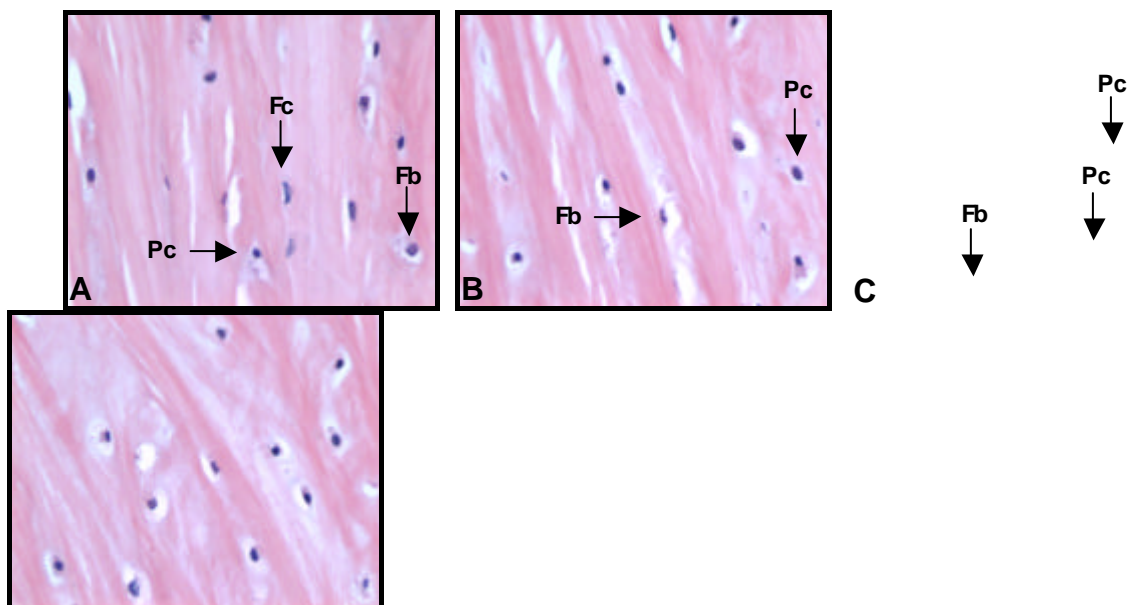


Figura 28 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo segundo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

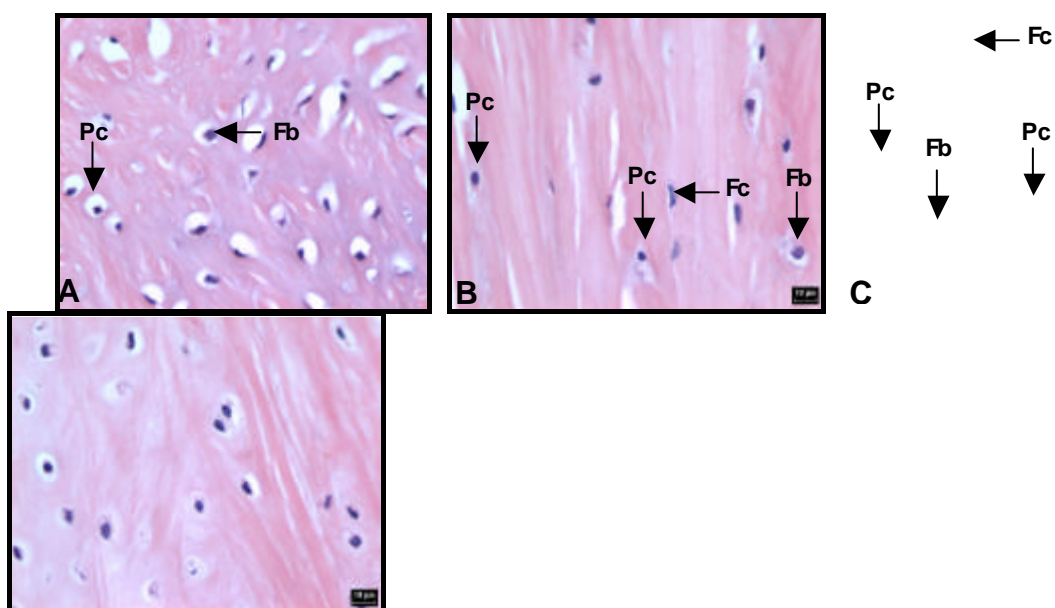


Figura 29 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo quarto dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

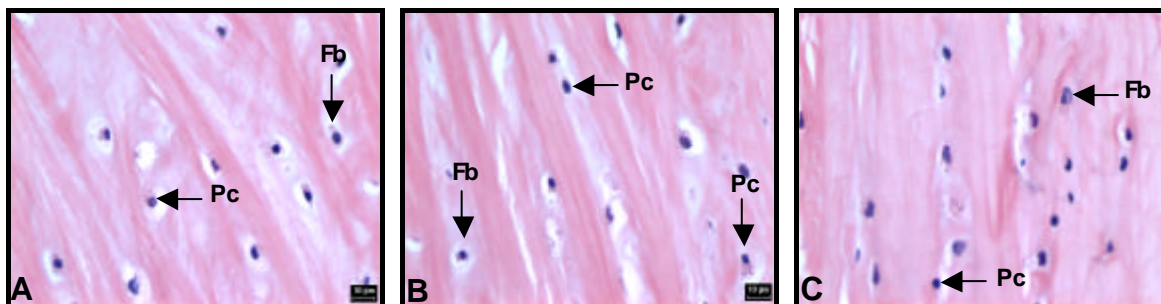


Figura 30 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo sexto dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

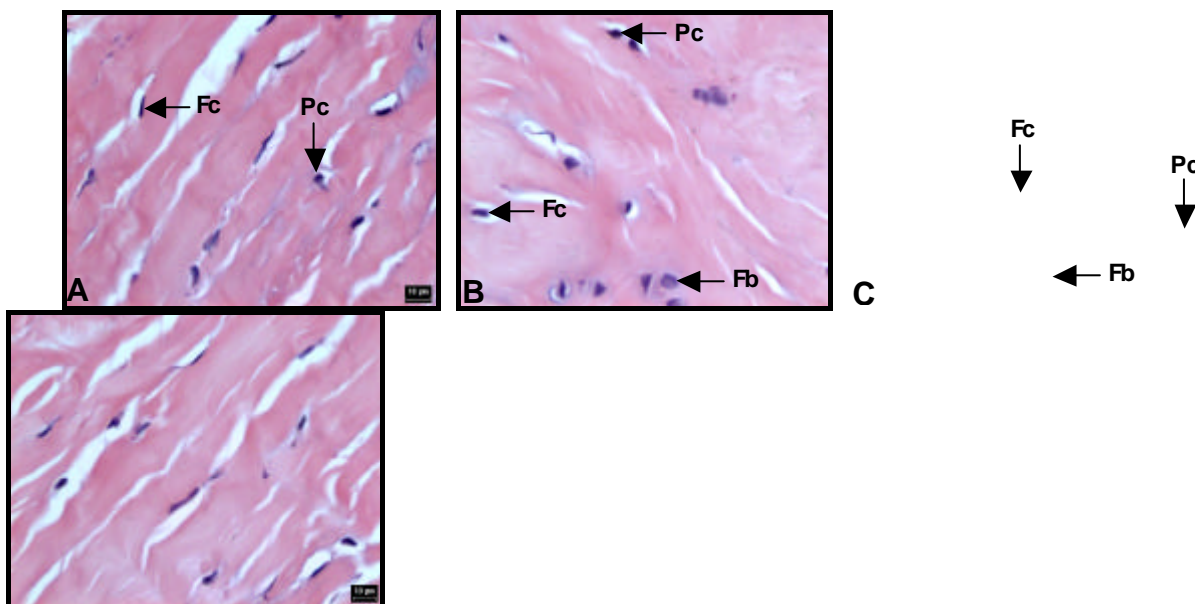


Figura 31 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no décimo oitavo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

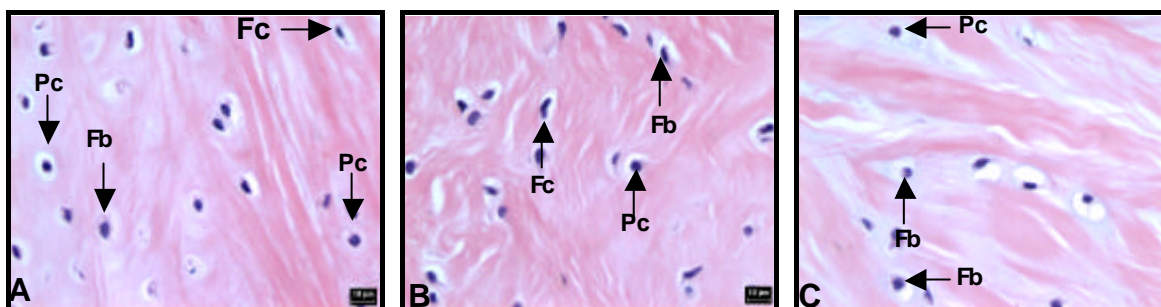


Figura 32 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

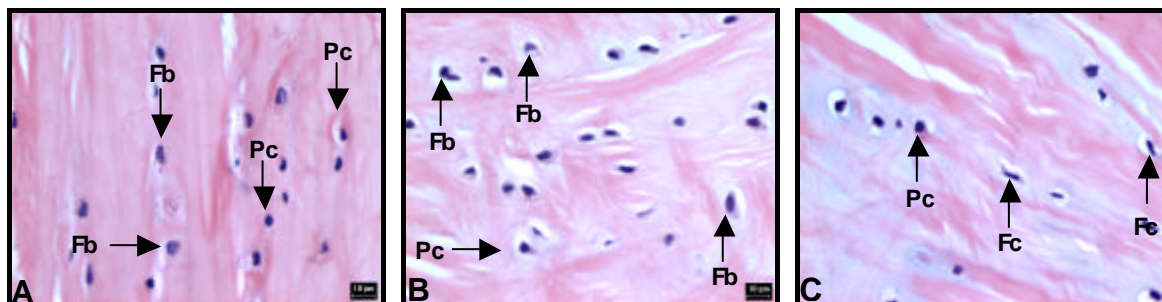


Figura 33 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo segundo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

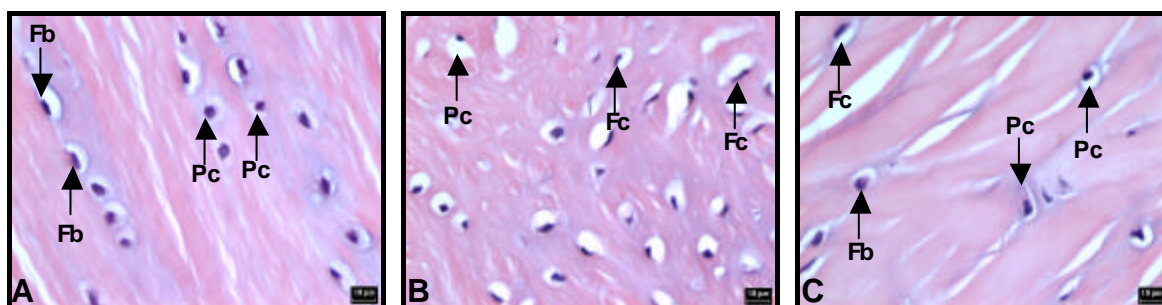


Figura 34 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo quarto dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).



Figura 35 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo sexto dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

Fb

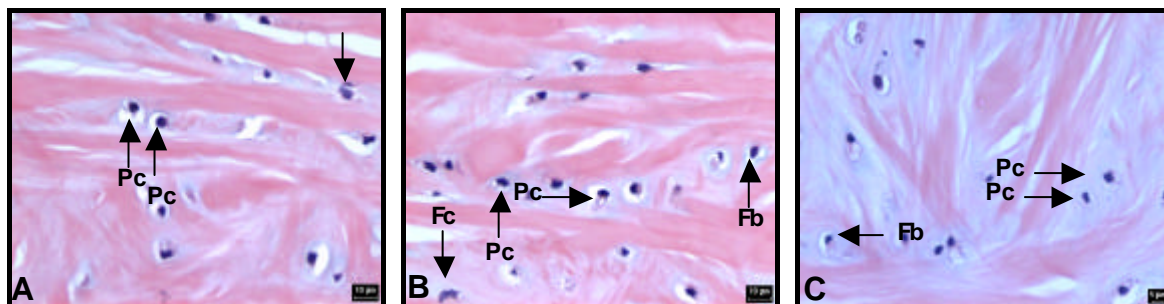


Figura 36 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no vigésimo oitavo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

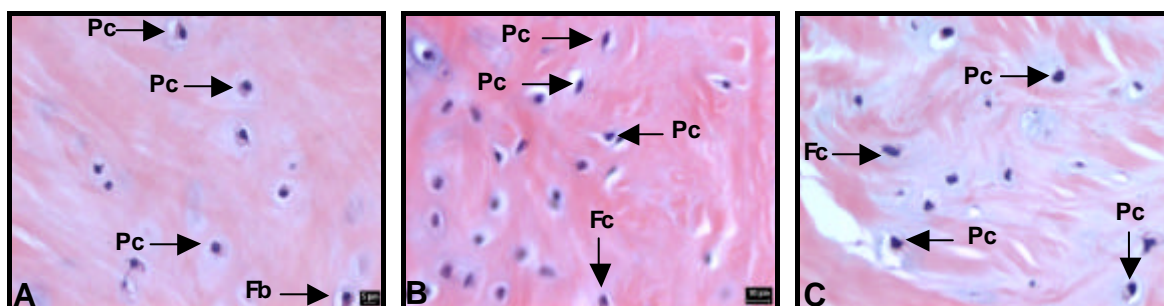


Figura 37 - Fotomicrografia representativa da viabilidade celular no trigésimo dia de observação às temperaturas de $-7,2^{\circ}\text{Celsius}$ (A), $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ (B) e $-73^{\circ}\text{Celsius}$ (C). Co=condrócitos, Fb=fibroblastos, Fc=fibrocondrócitos, Pc=picnose celular (HE - 40X).

4. RESULTADOS

Uma vez que não se constatou predominância de morte celular entre os diferentes tipos celulares estudados, os resultados da viabilidade celular foram agrupados e apresentados de forma global. Para cada temperatura de preservação são apresentados os dados para cada período de observação e comparados dentro do próprio grupo e entre os grupos distintos.

4.1 - Resultados da preservação a -7,2°Celsius.

Tabela 1 – Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de -7,2°Celsius.

Tempo de congelamento (dias) à 7,2°Celsius	Células viáveis Média (dp)
2	99,83 (0,24)
4	98,50 (0,58)
6	96,60 (0,59)
8	95,25 (1,71)
10	93,95 (1,79)
12	93,93 (0,25)
14	92,38 (1,70)
16	80,38 (4,41)
18	63,18 (5,08)
20	55,40 (2,55)
22	55,33 (0,68)
24	51,00 (1,04)
26	45,33 (2,46)
28	41,65 (1,71)
30	34,85 (4,91)

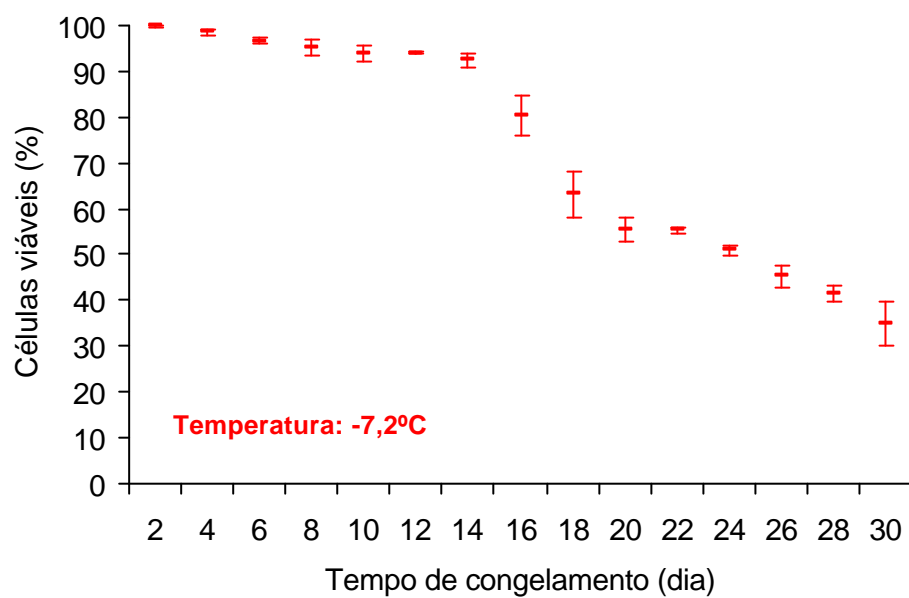


Gráfico 1 – Distribuição das médias e da variabilidade (desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de -7,2°Celsius.

Tempo de congelamento (dias)															
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
2		ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
4			ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
6				ns	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
8					ns	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
10						ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*
12							ns	*	*	*	*	*	*	*	*
14								*	*	*	*	*	*	*	*
16									*	*	*	*	*	*	*
18										*	*	*	*	*	*
20											ns	ns	*	*	*
22												ns	*	*	*
24													ns	*	*
26														ns	*
28															ns
30															

Quadro 1 – Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre os diferentes dias de preservação à temperatura de -7,2° Celsius.

Os dados apresentados na tabela 1, gráfico 1 e quadro 1 permitem a seguinte análise:

- o grupo com tempo de congelamento 2 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 4 dias ($p=1,000$), 6 dias ($p=1,000$), 8 dias ($p=1,000$), 10 dias ($p=0,210$), 12 dias ($p=0,202$) e 14 dias ($p=0,150$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 16 dias, o dia 2 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 4 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 6 dias ($p=1,000$), 8 dias ($p=1,000$), 10 dias ($p=1,000$), 12 dias ($p=1,000$) e 14 dias ($p=0,140$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 16 dias, o

dia 4 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 6 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 8 dias ($p=1,000$), 10 dias ($p=1,000$), 12 dias ($p=1,000$) e 14 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 16 dias, o dia 6 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 8 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 10 dias ($p=1,000$), 12 dias ($p=1,000$) e 14 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 16 dias, o dia 8 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 10 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 12 dias ($p=1,000$) e 14 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 16 dias, o dia 10 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 12 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 14 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 16 dias, o dia 12 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 14 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 16 dias ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 16 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 18 dias ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 18 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 20 dias ($p < 0,01$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 20 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 22 dias ($p=1,000$) e 24 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 26 dias, o dia 20 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p < 0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 22 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 24 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 26 dias, o dia 22 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 24 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 26 dias ($p=0,288$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 28 dias, o dia 24 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 26 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 28 dias ($p=1,000$) e significativamente diferente da média do grupo 30 dias ($p<0,001$);

- o grupo com tempo de congelamento 28 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 30 dias ($p=0,146$).

4.2 Resultados da preservação a $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ou $-73^{\circ}\text{Celsius}$.

A tabela 2 e o gráfico 2 representam os resultados da viabilidade celular agrupados para as temperaturas de preservação de $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$ ou $-73^{\circ}\text{Celsius}$.

Tabela 2 – Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de -21,4°Celsius ou -73°Celsius.

Tempo de congelamento (dias)	Células viáveis	
	-21,4°Celsius	-73°Celsius
	média (dp)	média (dp)
2	97,25 (1,19)	98,00 (0,91)
4	95,20 (0,99)	96,08 (0,65)
6	91,90 (1,09)	92,20 (1,64)
8	91,35 (1,36)	90,25 (0,76)
10	90,00 (2,43)	90,00 (0,82)
12	85,13 (0,57)	84,20 (1,64)
14	84,63 (1,70)	85,15 (1,72)
16	83,55 (1,33)	83,80 (2,21)
18	82,60 (2,57)	75,97 (1,51)
20	79,35 (0,59)	71,75 (1,18)
22	78,60 (0,95)	67,40 (0,88)
24	73,80 (1,05)	56,05 (1,48)
26	70,33 (1,65)	45,50 (1,78)
28	54,50 (2,90)	40,25 (1,15)
30	30,00 (1,83)	37,92 (1,76)

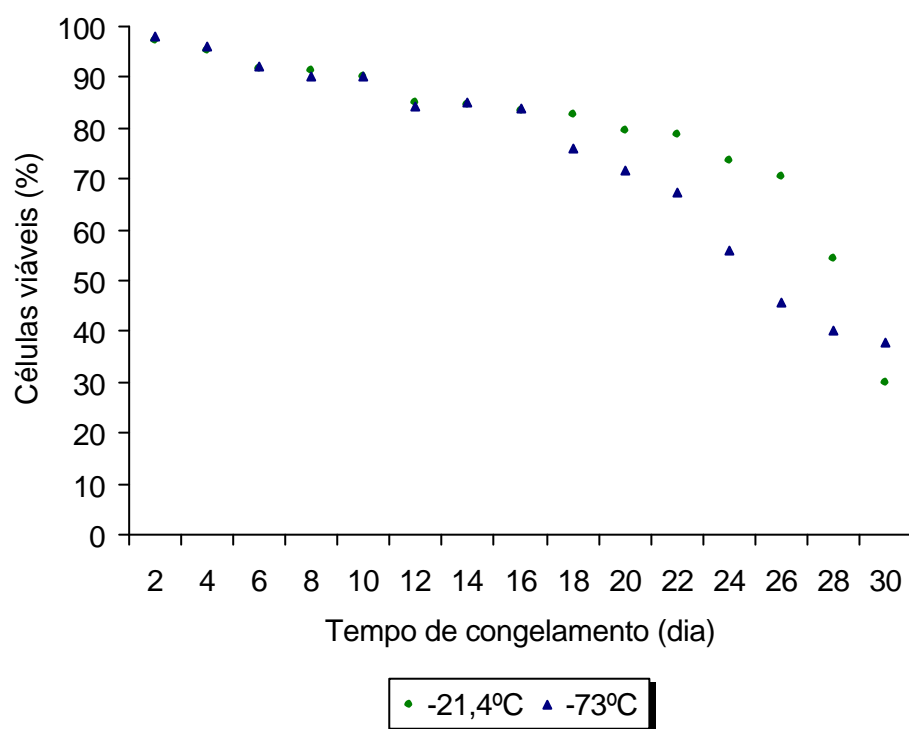


Gráfico 2 – Distribuição das médias e da variabilidade (desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de -21,4°C ou -73°C.

Foi aplicada a técnica de análise de variância (ANOVA) com dois fatores fixos e foi encontrada interação estatisticamente significativa entre os dois fatores ($p < 0,001$). Na presença de interação não temos como avaliar o efeitos dos fatores temperatura e tempo de congelamento diretamente.

Os grupos de tempo de congelamento foram divididos em 2 conjuntos e analisados em separado.

4.2.1 Temperaturas de -21,4°Celsius e -73°Celsius – tempos de congelamento entre 2 e 16 dias

Foi aplicada a técnica de análise de variância (ANOVA) com dois fatores fixos e não foi encontrada interação estatisticamente significativa entre os dois fatores ($p = 0,802$). Não foi encontrado efeito estatisticamente significativo do fator temperatura, indicando igualdade entre as duas temperaturas e foi encontrado efeito estatisticamente significativo do fator tempo de congelamento.

Para localizar as diferenças entre os tempos de congelamento, as temperaturas diferentes foram agrupadas, devido à ausência de diferença entre elas.

Tabela 3 - Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de -21,4°Celsius ou -73°Celsius, quando consideradas como um grupo único, uma vez que não houve diferenças significantes entre ambos os grupos.

Tempo de congelamento (dias) a -21,4°Celsius ou -73°Celsius	Células viáveis média (dp)
2	97,63 (1,06)
4	95,64 (0,91)
6	92,05 (1,30)
8	90,80 (1,18)
10	90,00 (1,68)
12	84,66 (1,24)
14	84,89 (1,61)
16	83,68 (1,69)

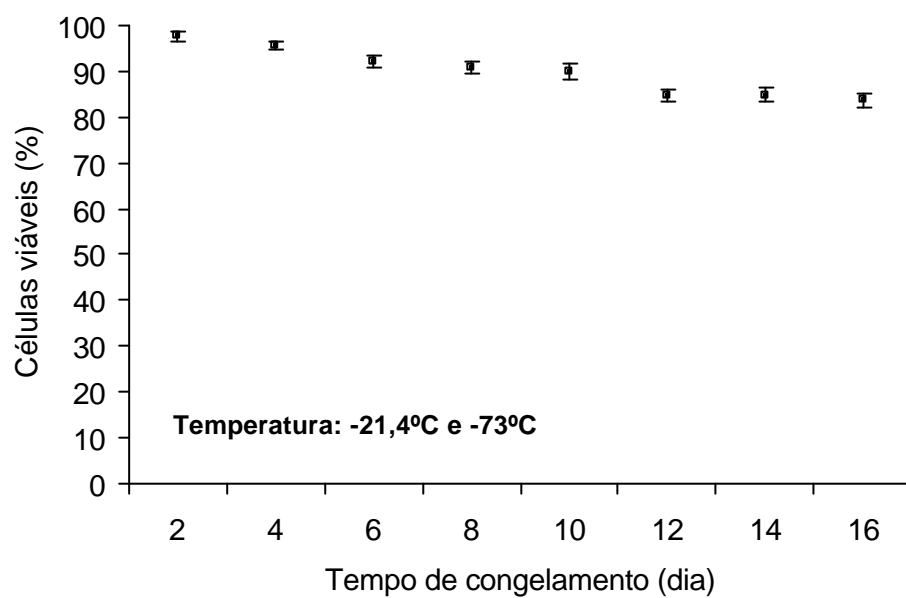


Gráfico 3 - Distribuição das médias e da variabilidade da porcentagem (desvio padrão) de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento à temperatura fixa de -21,4°Celsius ou -73°Celsius, quando consideradas como um grupo único, uma vez que não houve diferenças significantes entre ambos os grupos.

Foram aplicados os testes de comparações múltiplas de Bonferroni para localizar as diferenças entre os tempos de congelamento e os resultados se encontram abaixo:

- o grupo com tempo de congelamento 2 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 4 dias ($p=0,201$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 6 dias, o dia 2 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 4 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 6 dias ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 6 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 8 dias ($p=1,000$) e 10 dias ($p=0,159$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 12 dias, o dia 6 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 8 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 10 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 12 dias, o dia 8 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 10 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 12 dias ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 12 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 14 dias ($p=1,000$) e 16 dias ($p=1,000$);
- o grupo com tempo de congelamento 14 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 16 dias ($p=1,000$).

Tempo de congelamento (dias)								
	2	4	6	8	10	12	14	16
2		ns	*	*	*	*	*	*
4			*	*	*	*	*	*
6				ns	ns	*	*	*
8					ns	*	*	*
10						*	*	*
12							ns	ns
14								ns
16								

Quadro 2 - Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre o 2° e o 16° dia de preservação à temperatura de -21,4°Celsius ou -73°Celsius.

4.2.2 Temperaturas de -21,4°Celsius e -73°Celsius – tempos de congelamento entre 16 e 30 dias

Foi aplicada a técnica de análise de variância (ANOVA) com dois fatores fixos e foi encontrada interação estatisticamente significativa entre os dois fatores ($p < 0,001$). Na presença de interação não temos como avaliar o efeitos dos fatores temperatura e tempo de congelamento diretamente.

A diferença entre os tempos de congelamento foi avaliada dentro de cada temperatura e a diferença entre as temperaturas foi avaliada em cada tempo de congelamento.

4.2.3 Temperatura de -21,4°Celsius – tempos de congelamento entre 16 e 30 dias

Foi aplicada a técnica de análise de variância (ANOVA) com um fator fixo e foi encontrado efeito estatisticamente significativo do fator tempo de congelamento ($p < 0,001$). Foram aplicados os testes de comparações múltiplas de Bonferroni e os resultados se encontram abaixo:

- o grupo com tempo de congelamento 16 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 18 dias ($p=1,000$) e 20 dias ($p=0,075$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 22 dias, o dia 16 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,01$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 18 dias mostrou média de percentagem de células semelhante aos grupos 20 dias ($p=0,448$) e 22 dias ($p=0,110$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 24 dias, o dia 18 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 20 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 22 dias ($p=1,000$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 24 dias, o dia 20 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 22 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 24 dias ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 24 dias mostrou média de percentagem de células semelhante ao grupo 26 dias ($p=0,297$); nas comparações com grupos de tempo a partir de 28 dias, o dia 24 mostrou média de percentagem de células significativamente diferente ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 26 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 28 dias ($p<0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 28 dias mostrou média de percentagem de células significativamente diferente do grupo 30 dias ($p<0,001$).

Tempo de congelamento (dias)								
	16	18	20	22	24	26	28	30
16		ns	ns	*	*	*	*	*
18			ns	ns	*	*	*	*
20				ns	*	*	*	*
22					*	*	*	*
24						ns	*	*
26							*	*
28								*
30								

Quadro 3 - Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre o 16º e o 30º dia de preservação à temperatura de -21,4°Celsius.

4.3 Temperatura de -73°Celsius – tempos de congelamento entre 16 e 30 dias

Foi aplicada a técnica de análise de variância (ANOVA) com um fator fixo e foi encontrado efeito estatisticamente significativo do tempo de congelamento ($p < 0,001$). Foram aplicados os testes de comparações múltiplas de Bonferroni e os resultados se encontram abaixo:

- o grupo com tempo de congelamento 16 dias mostrou média de porcentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 18 dias ($p < 0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 18 dias mostrou média de porcentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 20 dias ($p < 0,01$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 20 dias mostrou média de porcentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 22 dias ($p < 0,01$ em todas as comparações);

- o grupo com tempo de congelamento 22 dias mostrou média de porcentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 24 dias ($p < 0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 24 dias mostrou média de porcentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 26 dias ($p < 0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 26 dias mostrou média de porcentagem de células significativamente diferente dos grupos a partir de 28 dias ($p < 0,001$ em todas as comparações);
- o grupo com tempo de congelamento 28 dias mostrou média de porcentagem de células semelhante significativamente ao grupo 30 dias ($p = 1,000$).

	16	18	20	22	24	26	28	30
16		*	*	*	*	*	*	*
18			*	*	*	*	*	*
20				*	*	*	*	*
22					*	*	*	*
24						*	*	*
26							*	*
28								ns
30								

Quadro 4 - Correlação da significância estatística da viabilidade celular entre o 16º e o 30º dia de preservação à temperatura de -73°Celsius.

4.4 Temperaturas de -21,4°Celsius e -73°Celsius – tempos de congelamento entre 18 e 30 dias

Foram aplicados testes t de Student, com a correção de Bonferroni para o nível de significância, para comparar as temperaturas -21,4°Celsius e -73°Celsius em cada tempo de congelamento e os resultados se encontram abaixo:

- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas em relação à média de porcentagem de células com 18 dias ($p=0,004$);
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas em relação à média de porcentagem de células com 20 dias ($p<0,001$);
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas em relação à média de porcentagem de células com 22 dias ($p<0,001$);
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas em relação à média de porcentagem de células com 24 dias ($p<0,001$);
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas em relação à média de porcentagem de células com 26 dias ($p<0,001$);
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas em relação à média de porcentagem de células com 28 dias ($p=0,001$);

- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas em relação à média de porcentagem de células com 30 dias ($p=0,001$).

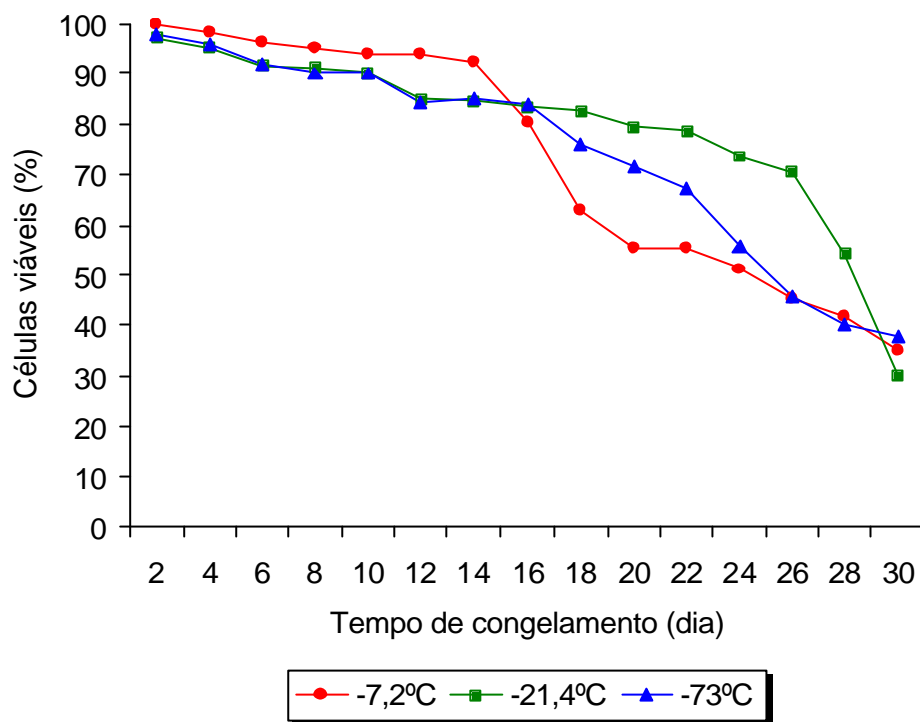


Gráfico 4 - Distribuição das médias e da variabilidade (desvio padrão) da porcentagem de células viáveis nos diferentes tempos de congelamento nas temperaturas fixas de -7,2°Celsius, -21,4°Celsius e -73°Celsius.

4.5. Análise de Regressão Polinomial:

4.5.1 Análise de Regressão para tempos após 16 dias para a Temperatura de -7,2°Celsius

No experimento com temperatura -7,2°Celsius o melhor ajuste de curva foi um polinômio de 2º grau e os resultados estão apresentados abaixo:

Variável	Coeficiente	ep	p valor
constante	175,142	22,567	< 0,001
dia	-8,055	2,017	< 0,001
dia ²	0,115	0,044	0,013

Quadro 5 - Valores encontrados para o ajuste de curvas para as médias de celularidade na temperatura de -7,2°Celsius.

O modelo de regressão acima mostrou-se estatisticamente significativo ($p < 0,001$) e com um coeficiente de explicação de 89,7% ($R^2 = 0,897$), mostrando um bom ajuste.

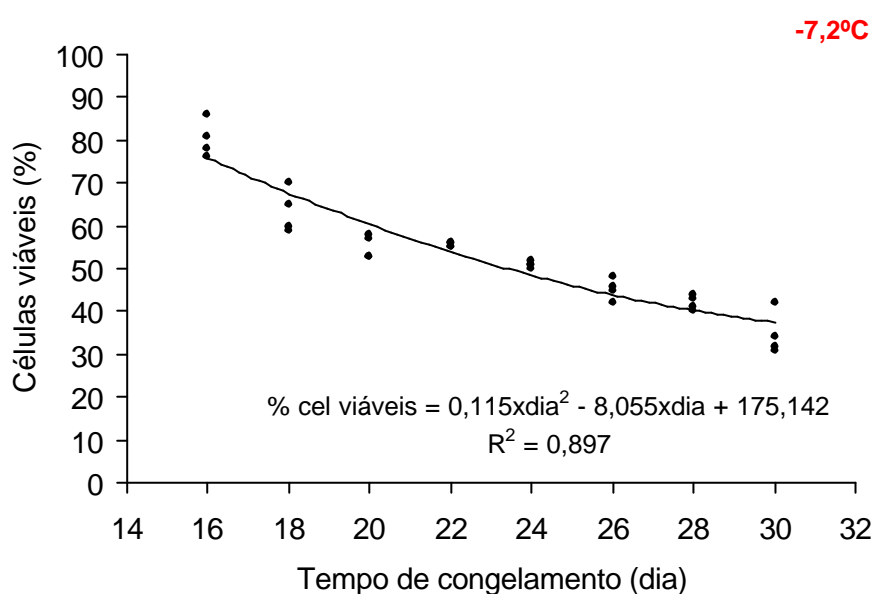


Gráfico 5 – Gráfico de dispersão mostrando a porcentagem de células viáveis em função do congelamento a -7,2°Celsius.

4.5.2. Análise de Regressão para tempos após 16 dias para as Temperaturas de -21,4°Celsius e -73°Celsius

No experimento com temperatura -21,4°Celsius o melhor ajuste de curva foi um polinômio de 2º grau e os resultados estão apresentados abaixo:

Variável	Coeficiente	ep	p valor
constante	-66,959	20,664	0,003
dia	15,846	1,847	< 0,001
dia ²	-0,415	0,040	< 0,001

Quadro 6 -Valores encontrados para o ajuste de curvas para as médias de celularidade na temperatura de -21,4°Celsius

O modelo de regressão acima mostrou-se estatisticamente significativo ($p < 0,001$) e com um coeficiente de explicação de 94,7% ($R^2 = 0,947$), mostrando um ótimo ajuste.

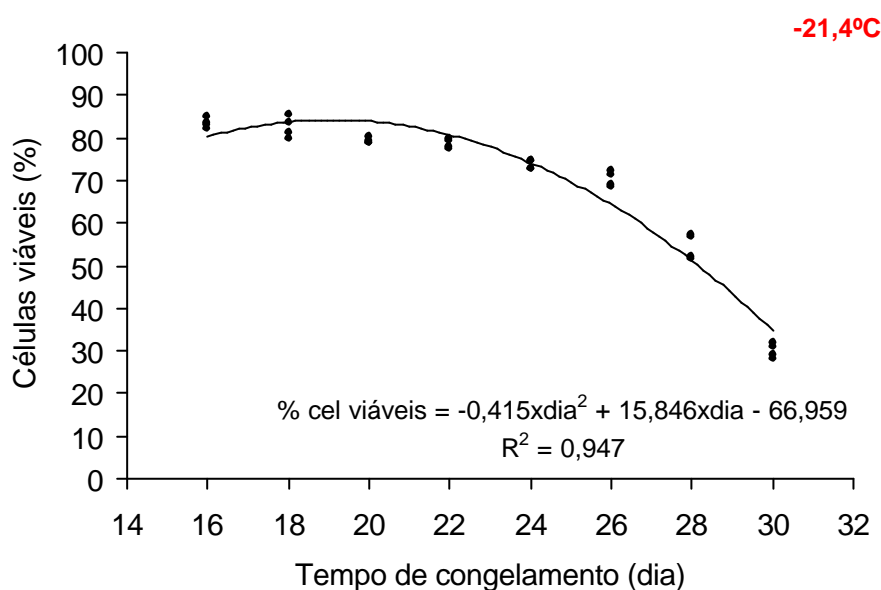


Gráfico 6 – Gráfico de dispersão mostrando a porcentagem de células viáveis em função do congelamento a -21,4°Celsius.

No experimento com temperatura -73°C o melhor ajuste de curva foi uma reta e os resultados estão apresentados abaixo:

Variável	Coefficiente	ep	p valor
constante	140,580	2,576	< 0,001
dia	-3,511	0,110	< 0,001

Quadro 7 - Valores encontrados para o ajuste de curvas para as médias de celularidade na temperatura de -73°Celsius

O modelo de regressão acima mostrou-se estatisticamente significativo ($p < 0,001$) e com um coeficiente de explicação de 97,1% ($R^2 = 0,971$), mostrando um ótimo ajuste.

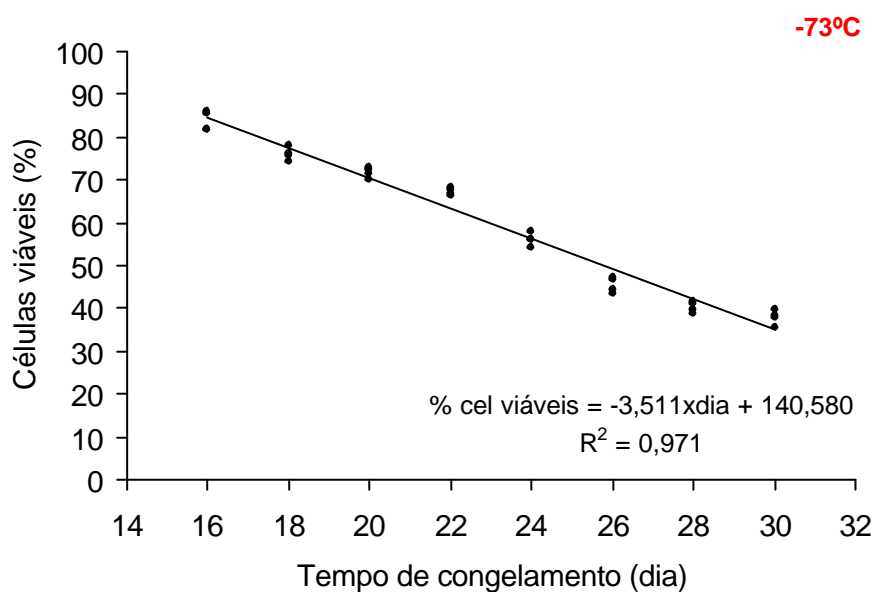


Gráfico 7 – Gráfico de dispersão mostrando a porcentagem de células viáveis em função do congelamento a -73°Celsius.

5. DISCUSSÃO

Os meniscos são estruturas fibrocartilagosas que desempenham capital importância na biomecânica do joelho. Colaboram decisivamente na estabilidade da articulação do joelho, na absorção de impactos e na manutenção e lubrificação da superfície articular^{3,5,9,15,12,17,20,39,40,41,42,43,44,45,46}.

Através dos anos, vêm se acumulando evidências que as lesões dos meniscos acarretam alterações morfológicas e funcionais que caracterizam as lesões de osteoartrose^{18,25,40,41,42,47,48,49,50,51,52}.

As lesões dos meniscos independentes de sua origem, de seu mecanismo de produção e de sua extensão, são preferencialmente tratadas procurando-se restabelecer sua integridade anatômica e funcional. A sua retirada parcial ou total, nos casos em que se torna inviável a sua restauração, está associada a processos degenerativos da articulação, que fatalmente resultarão em graus variáveis de comprometimento articular^{18,25,40,41,42,47,48,49,50,51,52}.

Assim, a procura de um substituto para este tecido fibrocartilaginoso permanece como um desafio para a cirurgia ortopédica.

Dentre os substitutos tentados estão os derivados de outros tecidos fibrocartilagosos retirados do próprio indivíduo. É relatada na literatura pertinente a utilização de segmentos de tecidos obtidos da gordura pré-patelar, do ligamento da patela, do tendão do músculo quadríceps da coxa, entre outros. Os resultados, devido a variedade de situações empregadas, não são uniformes e por vezes são conflitantes. A necessidade de intervenções associadas para obtenção do tecido doador e a dificuldade em obter-se tecido suficiente e resistente para uma substituição adequada são fatores limitantes para o uso corrente destes substitutos autólogos^{53,54,55}.

Uma opção oferecida pela tecnologia seria a utilização de materiais sintéticos para a substituição do menisco lesado⁵⁶. Dentre os materiais sintéticos as próteses de dracon e de teflon são as mais comumente citadas na literatura⁵⁷. Também se tem testado a utilização de moldes de colágeno reabsorvível em coelhos² e seres humanos⁵⁸. Os resultados a médio e longo prazo não se mostram favoráveis e o fenômeno de osteoartrose acompanha com frequência estas substituições protéticas.

A substituição por tecido homólogo, no caso a fibrocartilagem de menisco obtido de doador morto ('no beating donor') ou de doador múltiplo não-morto ('beating donor'), apresenta como vantagem a possibilidade de utilizar um tecido semelhante em sua morfologia ao tecido que está sendo substituído. As desvantagens estão na possibilidade do enxerto ser vetor de doenças infecto-contagiosas e nos eventuais processos de imuno-rejeição tecidual^{3,8,57,58}.

A importância clínica da resposta imune ao enxerto homólogo não está esclarecido, mas no geral, não há evidências de rejeição⁵⁹. A experiência clínica mostra que a rejeição é realmente um fato extremamente raro, ocorrendo somente um relato na literatura³⁰. A baixa taxa de rejeição, estudada em animais de experimentação^{60,61,62,63} é atribuída à matriz densa na qual estão envolvidas as células do menisco, não permitindo o acesso de células imuno-reativas⁵⁹.

A criopreservação e a liofilização foram processos idealizados na tentativa de contornar os óbices da transmissão de doenças.

Criopreservação é um processo de congelamento controlado com extração da água celular pelo dimetilsulfóxido e glicerol. É um processo trabalhoso e de custo muito elevado, e não há evidências de superioridade em relação a outros métodos de preservação. A vantagem teórica da criopreservação é a manutenção da integridade e viabilidade da membrana celular, estimando que permaneçam entre 30 a 40% de células viáveis^{8,15,24,30,45,59}.

A liofilização ou congelamento à seco implica em um processo padronizado no qual o congelamento ocorre em uma câmara de vácuo com retirada de até 95% do conteúdo de água do tecido⁶⁴. Embora permita a estocagem por um período de três a cinco anos e a rehidratação possa ser conseguida em trinta minutos antes do uso, ocorrem alterações de cor, aparência, assim como de estrutura, propriedade e integridade do colágeno, resultando num enfraquecimento do enxerto. Há referência de que ocorre um encurtamento de até 2/3 na extensão do menisco após o transplante³. À estas alterações acrescenta-se o fato que ocorre a completa inviabilidade celular no enxerto^{3,5,9,20,64}. Embora consiga obter uma matriz fibrocartilaginosa praticamente isenta de microrganismos patogênicos, o processo de liofilização acaba por alterar a constituição físico-química do futuro enxerto, que ressecado e retraído não cumpre satisfatoriamente as funções de um substituto adequado⁶⁴.

O ideal seria utilizar um tecido que mantivesse suas características físico-químicas e fosse isento de agentes patogênicos.

Concomitantemente, seria necessário que este material pudesse ser preparado e estocado por um tempo razoável até o momento de sua aplicação. Um banco de tecidos poderia ser organizado para tratar da retirada, preparação, estocagem e distribuição dos enxertos.

Atualmente já estão disponíveis bancos que disponibilizam com sucesso enxertos homólogos de ligamento de patela (osso-tendão-osso), tendão de calcâneo, fásia lata e que são comumente usados para a reconstrução de tendões e ligamentos, em especial o ligamento cruzado anterior do joelho^{53,54,55,64}.

O banco de meniscos também já é uma realidade²³. No entanto, ainda não há na literatura biomédica um embasamento suficiente para se estabelecer qual o método de preservação mais adequado para um enxerto homólogo de menisco. Os trabalhos que tratam dos transplantes de meniscos fazem referências pouco aprofundadas aos processos de preservação^{5,12,25,44,49,58}.

Um método referido como método de preservação à fresco diz respeito a meniscos que após a retirada do doador permanecem de dois a cinco dias em temperatura de quatro graus Celsius positivos, o que corresponde a temperatura habitual de um refrigerador doméstico^{41,61,62,65}. O fator limitante é o curto período de disponibilidade para o uso deste enxerto. Este método, utilizado historicamente para preservação de tecidos conectivos de tendões e ligamentos, atualmente está em desuso para preservação de menisco.

Baseados em modelos de preservação de outros tecidos ósteo-musculares ou ósteo-cartilagosos são referidos que os meniscos podem ser preservados em temperaturas ditas de congelamento sem informações consistentes das características morfológicas dos enxertos após este procedimento e manutenção^{5,12,14,15,17,20,44,58,65}.

O congelamento profundo implica em armazenamento e congelamento do tecido em temperaturas negativas a partir de 70° Celsius. É um método simples e o mais amplamente utilizado para preservação de meniscos. As vantagens incluem um processo menos custoso e, apesar da conjectura teórica a respeito da extensa ou quase total morte celular, tem mostrado resultados clínicos muito bons. As desvantagens ficariam por conta do fato, pelo menos até recentemente, da presença de inviabilidade celular associada. Há autores que afirmam que todas as células são destruídas dentro do tecido, mas que não são notados efeitos clínicos deletérios causados pela relativa acelularidade de tecido meniscal. O tempo médio de estocagem é referido como sendo entre quatro e oito semanas^{8,12,20,25,66}.

Uma situação controversa é sobre a viabilidade das células do menisco após um processo de congelamento e um período de estocagem. Dependendo do tipo de preservação utilizado, há referências variadas sobre o tempo que o menisco pode ser conservado e o número de células viáveis^{3,8,18,20,36,50,58} quando do momento da enxertia. Não há trabalho sistematizado sobre a relação entre o tipo de preservação e a quantidade de células viáveis no decorrer do período de estocagem. Também não há referência explícita sobre o que é mais adequado para o transplante: um número maior de células viáveis ou um menor número de células viáveis.

Outro aspecto referido nos trabalhos diz respeito a repopularização do menisco transplantado. Uma vez que as células do doador são poucas ou ausentes, a integridade do enxerto dependeria da infiltração celular da matriz por células do hospedeiro.

Há referências que de um a seis meses ocorre a repopularização do menisco por células do hospedeiro^{20,30,67,68}. Após um ano, 95% do DNA identificável é atribuído ao receptor²⁴. Será que neste período seria mais adequado um enxerto com poucas células do doador para facilitar a repopularização ou um enxerto com um número mínimo de células viáveis do doador que manteriam as qualidades do enxerto enquanto ocorre a substituição pelas células do receptor?

Na tentativa de responder estas questões é necessário, antes de qualquer coisa, uma sistematização do processo de congelamento e o estudo do número de células viáveis.

Levando em consideração os trabalhos da literatura biomédica, percebeu-se não haver um consenso e embasamento consistente para a escolha do tipo de preservação, principalmente na relação entre a temperatura e a viabilidade celular. Propôs-se então a pesquisar em um modelo animal de experimentação a relação de três temperaturas com a sobrevivência de células do menisco.

A escolha das temperaturas foi realizada de acordo com as referências de temperaturas mais freqüentemente citadas na literatura^{3,5,8,10,20,45,67} de modo que a análise futura dos dados permitisse uma comparação confiável.

Escolheu-se a temperatura de 7,2°C negativos (Grupo I) para contemplar uma temperatura ligeiramente mais baixa do que aquela utilizada para a chamada preservação à fresco. A justificativa teórica seria conseguir um maior número de células viáveis, o que facilitaria a logística desde a retirada do doador até o implante no receptor. O valor exato de

7,2°Celsius negativos deveu-se à calibragem conseguida e passível de ser padronizada e estável no congelador doméstico disponível no laboratório.

A escolha da temperatura de 21,4°Celsius negativos (Grupo II) baseou-se na disponibilidade de um congelador comercial, usado comumente para conservação de carne animal para consumo. O valor exato da temperatura também se deveu à calibragem conseguida e passível de ser padronizada e estável.

A temperatura de 73°Celsius negativos (Grupo III) foi o valor que é referido na literatura como limite mínimo de um congelamento profundo. O valor exato da temperatura também se deveu à calibragem conseguida e passível de ser padronizada e estável.

No tocante a escolha do animal seguiu-se também a tendência da literatura na qual o coelho é tido como um modelo adequado e mais amplamente utilizado^{2,20,69,70,71,72,73,74,75}. Outros animais como o cão e o porco têm sido pouco utilizados^{76,77}. Alguns trabalhos também referem o uso de cabras e ovelhas^{8,12,66}.

A distribuição dos animais nos diferentes grupos de estudo foi feita de modo aleatório, por sorteio, no momento da retirada do menisco.

Os procedimentos anestésicos foram aqueles já padronizados no laboratório experimental do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação^{74,78,79} e, assim como todos os demais procedimentos experimentais, foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM.

Para um acompanhamento mais fidedigno das eventuais alterações morfológicas foi escolhido um período de dois dias para cada observação. Partiu-se do pressuposto que neste período seria possível traçar uma curva de eventos com significância estatística. O número de quatro espécimes para cada dia de observação também foi estabelecido de acordo com os parâmetros que permitissem a análise estatística.

A avaliação histológica baseou-se em uma contagem extensiva e minuciosa de todos os elementos celulares presentes em quinhentos campos, selecionados aleatoriamente em cada lâmina estudada. As células viáveis presentes (condrócitos, fibrocondrócitos e fibroblastos) e aquelas que exibiram sinais de necrose celular, traduzida pelo fenômeno da picnose, foram identificadas, marcadas e contadas. Levou-se em média três horas para leitura de cada lâmina. As figuras de 23 a 37 mostram caracteristicamente os achados em cada período em cada grupo.

A matriz fibrocartilaginosa inorgânica do menisco é em grande parte responsável pela manutenção de sua arquitetura, porém sua manutenção e estabilidade dependem da viabilidade dos condrócitos e fibrocondrócitos que renovam constantemente esta matriz^{80,81}. Os resultados desta pesquisa mostraram que macroscopicamente os meniscos conservados até trinta dias, em qualquer das três temperaturas estudadas, não sofreram alterações importantes. A extensão dos meniscos manteve-se e a sua consistência permaneceu estável, não mostrando sinais de ressecamento ou perda de arquitetura como a que se refere a literatura nos casos de liofilização.

A tentativa de quantificar estas características macroscópicas, já verificadas anteriormente no projeto piloto, não mostrou sensibilidade suficiente para diferenciar os grupos entre si. A medida da extensão dos meniscos ou a comparação dos pesos não mostrou nenhuma diferença significativa. Em relação à sensação de textura (maciez ou rigidez) do tecido, também não houve maneira sensível de quantificar. Em continuidade a esta linha de pesquisa talvez seja possível estabelecer um modelo para submeter estes meniscos a uma máquina de testes de tensão de ruptura e assim verificar a sua capacidade de deformação.

Nos animais do Grupo I a análise dos resultados mostra que até o décimo sexto dia de preservação a média de células viáveis variou de 99,83% a 80,38% e que a partir do décimo oitavo até o trigésimo dia a queda foi mais acentuada. Mesmo assim, no final do período obteve-se uma média de 34,85% de células viáveis (Tabela 1 e Gráfico 1). O quadro 1 mostra que no período do segundo ao décimo quarto dia, praticamente a média de células viáveis manteve-se estável sem diferenças significativas entre os dias de observação. Isto significa que aqueles autores que preconizam o transplante de menisco à fresco poderão estar oferecendo, se o modelo for aplicável aos seres humanos, uma grande quantidade de células com potencial antigênico para o receptor. A rejeição não parece ser um problema, uma vez que a pobreza de vasos sanguíneos e a densidade da matriz são fatores desfavoráveis aos processos de imuno-rejeição⁵⁹. Também pode implicar que aqueles autores^{41,60,62} que têm preferência por transplantar um menor número de células viáveis podem ou devem aguardar um período mais longo para o procedimento, quando utilizam a preservação à fresco.

A matriz extra-celular composta principalmente de colágeno e proteoglicanos é mantida e renovada a partir das células intersticiais. Quanto maior o número de células viáveis, maior a possibilidade de manter um menisco próximo de sua morfologia e funcionalidade normal. Considerando que de um a quatro meses ocorre a repopularização do

menisco por células do hospedeiro^{20,30,67,68} e que após um ano 95% do DNA identificável é atribuído ao receptor²⁴, a viabilidade das células do doador poderá ser importante fator na manutenção da integridade do menisco até a substituição destas pelas do hospedeiro.

A análise dos resultados nos animais dos Grupos II e III mostra comportamento semelhante até o 16º dia, no tocante a média de células viáveis, quer no congelamento a 21,4°Celsius negativos, quer no congelamento profundo a 73°Celsius negativos (Tabela 2 e Gráfico 2).

O gráfico 2 mostra que as curvas com as médias e respectivos desvios-padrões são superponíveis e que podem ser analisadas como um grupo único. A implicação deste resultado significa que os autores que preconizam a preservação por congelamento poderão prescindir, baseados neste modelo experimental, do congelamento profundo (-73°Celsius) uma vez que temperaturas menores de congelamento (-21,4°Celsius), levam a resultados semelhantes.

A tabela 3 e o gráfico 3 mostram que do segundo ao décimo sexto dia a média de células viáveis têm uma queda semelhante ao Grupo I variando de 97,63% à 83,68%. Isto implica que o transplante de menisco em qualquer das três temperaturas estudadas até o décimo sexto dia carrega uma população considerável de células do doador.

A partir do décimo oitavo dia até o trigésimo a queda na média de células viáveis foi significativamente maior nos animais submetidos a congelamento profundo. As médias do grupo II sobrepuseram-se às médias do grupo I, no entanto foram significativamente menores que as médias do grupo III. Portanto o congelamento profundo permite uma média de células viáveis menores que as temperaturas mais altas de congelamento. Apesar deste número menor de células viáveis, elas ainda se mantêm em torno de trinta por cento ao final do período de trinta dias de preservação.

As curvas de regressão polinomial elaboradas a partir dos dados coletados mostram esta relação de maneira mais explícita (Quadros 5, 6 e 7 e Gráficos 5, 6 e 7). A queda da celularidade nas três temperaturas até o décimo sexto dia é semelhante. A variação a partir do décimo oitavo dia apresenta diferenças discretas, mas relevantes. A queda da viabilidade no grupo I é próxima a uma queda linear, porém significativamente mais intensa que nos Grupos II e III. Nos animais do Grupo III a queda é linear, significando uma perda constante e equitativa de viabilidade a cada dia. Nos animais do Grupo II esta queda é uma curva de um polinômio de segundo grau, onde a queda da viabilidade é constante, mas em quantidades

menores a cada dia, tendo uma queda acentuada apenas nos dois últimos dias de observação, quando se superpõe no final aos níveis observados nos outros dois grupos.

Estes achados sobre a viabilidade celular, estudada de modo sistematizado, não tem correspondência em nenhum outro trabalho da literatura pesquisada. De modo geral este trabalho permite concluir que, independente do método de congelamento utilizado, até o décimo sexto dia a queda de celularidade é semelhante, sendo que persistem cerca de oitenta por cento de células viáveis. A partir do décimo oitavo até o trigésimo dia a celularidade diminui de modo diferente conforme o tipo de congelamento usado, mas todos terminam com cerca de trinta por cento de células viáveis.

Além da quantificação pela contagem das células (condrócitos, fibrocondrócitos e fibroblastos e picnose) foi possível o acompanhamento qualitativo das alterações morfológicas que ocorreram no menisco preservado. As figuras de 23 a 30 mostram que no período de dois a dezesseis dias não houve alterações importantes identificáveis na disposição das células e no arranjo estrutural destas, e o índice de picnose é baixo. A partir do décimo oitavo dia (Figuras de 31 a 37) as alterações passaram a se tornar evidentes com aumento do número de picnoses e um desarranjo estrutural na disposição das células e na sua própria composição. Foi possível identificar uma tortuosidade na disposição dos fibrocondrócitos e fibroblastos, um afastamento entre as células, que foi preenchido por líquido intersticial ou edema, e um ligeiro aumento do volume celular que perdeu seu aspecto fusiforme. Em resumo aumentaram os sinais de necrose celular por liquefação, deixando apenas o tecido amorfo correspondente à matriz inorgânica⁸².

Este estudo limitou-se uma a avaliação para caracterizar as células remanescentes no menisco preservado utilizando a coloração pela hematoxilina e eosina. Este mesmo material poderá valer-se de outros métodos, como prico-sirius red ou microscopia de polarização para identificação do colágeno⁸³. Métodos imuno-histoquímicos⁶⁰ poderão ser utilizados para identificação e quantificação de elementos constituintes da matriz inorgânica.

A pesquisa poderá prosseguir na investigação das qualidades macroscópicas e físico-químicas dos meniscos preservados, para averiguar a sua resistência à tração, deformação e ruptura. A variação na composição da matriz, conforme o período de preservação, pela medida de ácido condroitin-sulfúrico ou de outros elementos constituintes é uma alternativa viável para avaliar a adequação do enxerto frente aos métodos de congelamento. A avaliação do índice de apoptose também é uma alternativa para avaliar o comportamento das células

remanescentes e que serão transplantadas ao doador. A capacidade antigênica das células remanescentes poderá ser testada em modelo “in vitro” ou em modelo animal. A perspectiva mais atraente será o estudo destes meniscos preservados a serem transplantados de modo homólogo e verificar a repopularização do enxerto. A continuidade da linha de pesquisa abre perspectivas para o estudo sistemático dos enxertos preservados não só de meniscos, mas também de outros tecidos conectivos.

6. CONCLUSÕES

1. A celularidade de meniscos de coelhos preservados até o décimo sexto dia, independente da temperatura de congelamento ($-7,2^{\circ}\text{Celsius}$, $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$, $-73^{\circ}\text{Celsius}$), tem uma queda constante e semelhante, persistindo cerca de oitenta por cento de células viáveis.
2. A celularidade de meniscos de coelhos preservados do décimo oitavo ao trigésimo dia, tem uma queda constante, porém com perfis diferentes conforme a temperatura considerada ($-7,2^{\circ}\text{Celsius}$, $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$, $-73^{\circ}\text{Celsius}$).
3. Independente da temperatura considerada ($-7,2^{\circ}\text{Celsius}$, $-21,4^{\circ}\text{Celsius}$, $-73^{\circ}\text{Celsius}$), ao final de trinta dias de preservação, persistem cerca de trinta por cento de células viáveis.

6. CONCLUSÕES

4. A celularidade de meniscos de coelhos preservados até o décimo sexto dia, independente da temperatura de congelamento (-7,2°Celsius, -21,4°Celsius, -73°Celsius), tem uma queda constante e semelhante, persistindo cerca de oitenta por cento de células viáveis.
5. A celularidade de meniscos de coelhos preservados do décimo oitavo ao trigésimo dia, tem uma queda constante, porém com perfis diferentes conforme a temperatura considerada (-7,2°Celsius, -21,4°Celsius, -73°Celsius).
6. Independente da temperatura considerada (-7,2°Celsius, -21,4°Celsius, -73°Celsius), ao final de trinta dias de preservação, persistem cerca de trinta por cento de células viáveis.

7. REFERÊNCIAS

1. Bronstein RD. Meniscal tears: current treatment options. *Curr Opin Orthop* 2002;13:143-50.
2. Cardoso TP. Prótese meniscal de polímero bioabsorvível: estudo em coelhos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo – USP; 2002.
3. Felix NA, Paulos LE. Current status of meniscal transplantation. *Knee* 2003;10:13-7.
4. Boss A, Klimkiewicz J, Fu FH. Technical innovation: creation of a peripheral vascularized trough to enhance healing in cryopreserved meniscal allograft reconstruction. *Knee* 2000;8:159-62.
5. Wirth CJ, Peters G, Milachowski KA, Weismeier KG, Kohn D. Long term results of meniscal allograft transplantation. *Am J Sports Med* 2002;30(2):174-81.
6. Klimkiewicz JJ, Shaffer B. Meniscal surgery 2002 updates: Indications and techniques for resection, repair, regeneration, and replacement. *Arthroscopy* 2002;18(9):14-25.
7. John R. Future directions in meniscus surgery: new horizons in fixation, healing, and replacement. *Sports Med Arth Rev* 2004;12(1):1-7.
8. Fabbriani C, Lucania L, Milano G, Pannia AS, Evangelisti M. Meniscal allografts: cryopreservation vs deep-frozen technique. An experimental study in goats. *Arthroscopy* 1997;5:124-34.
9. Sgaglione NA, Steadman R, Shafter B, Miller MD, Fu FH. Current concepts in meniscus surgery: resection to replacement. *Arthroscopy* 2003;19(10):161-88.
10. Anderson-Molina H, Karlsson H, Rockborn P. Arthroscopic partial and total meniscectomy: Long-term follow-up study with matched controls. *Arthroscopy* 2003;18:183-89.
11. Uchio Y, Ochi M, Adachi N, Kawasaki K, Iwasa J. Results of rasping of meniscal tears with and without anterior cruciate ligament injury as evaluated by second-look arthroscopy. *Arthroscopy* 2003;19:463-69.
12. Mora G, Alvarez E. Articular cartilage degeneration after frozen meniscus and achilles tendon allograft transplantation: experimental study in sheep. *Arthroscopy* 2003;19(8):833-41.
13. van Arkel ERA, de Boer HH. Human meniscal transplantation: preliminary results at 2 to 5-year follow-up. *J Bone Joint Surg [Br]* 1995;77(4):589-95.
14. Milachowski KA, Weismeier K, Wirth CJ. Homologous meniscus transplantation. Experimental and clinical results. *Int Orthop* 1989;13:1-11.
15. Peters G, Wirth CJ. The current state of meniscal allograft transplantation and replacement. *Knee* 2003;10:19-31.
16. McDermot D, Sharifi F, Bull AMJ, Gupte CM, Thomas RW, Amis AA. An anatomical study of meniscal allograft sizing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2004;12(2):130-35.

17. Ellingson CI, Sekija JK. Current opinion in meniscal allograft transplantation. *Curr Opin Orthop* 2004;15(2):79-85.
18. Verdonk R. Meniscal transplantation. *Acta Orth Bel* 2002;68:118-127.
19. Sekiya JK, Giffin R, Irrgang JJ, Fu FH, Harner CD. Clinical outcomes after combined meniscal allograft transplantation and anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 2003;31(6):896-905.
20. Cury RPL, Camargo OPA, Próspero JD, Botter FCS, Severino NR, Aihara T, Oliveira VM. Transplante homólogo de meniscos: estudo experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop* 2002;37(8):341-49.
21. Friedman MD. Meniscal Allografts. *Arthroscopy* 2003;18:33-9.
22. Tom JA, Rodeo SA. Soft tissue allografts for knee reconstruction in sports medicine. *Clin Orthop* 2002;(402):135-56.
23. Vangsness CT, Garcia IA, Mills CR, Kainer MA, Roberts MR, Moore TM. Allograft transplantation in the knee: tissue regulation, procurement, processing, and sterilization. *Am J Sports Med* 2003;31(3):474-81.
24. Debeer P, Decorte R, Bellemans J. DNA analysis of a transplanted cryopreserved meniscal allograft. *Arthroscopy* 2000;16(1):71-5.
25. Graf Jr KW, Sekija JK, Wojtys EM. Long-term results after combined medial meniscal allograft transplantation and anterior cruciate ligament reconstruction: minimum 8,5 – year follow-up study. *Arthroscopy* 2004;20(2):129-40.
26. Bugbee WD. Fresh osteochondral allografting. *Operative Teach Sports Med* 2000;8:158-62.
27. Bugbee WD. Alternatives to arthroplasty of the knee: Biologic resurfacing. *Curr Opin Orthop* 2001;12:1-7.
28. Chu CR, Convery FR, Akeson WH. Articular cartilage transplantation. *Clin Orthop* 1999;360:159-68.
29. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts: A clinicopathological study. *J Bone Joint Surg* 2001;83A:971-86.
30. Hamlet W, Liu SH, Yang R. Destruction of a cryopreserved meniscal allograft: a case for acute rejection. *Arthroscopy* 1997;13:517-21.
31. Jackson DW, Simon T. Biology of meniscal allograft. In: Mow VC, Arnoczky SP, Jackson DW (eds) *Knee meniscus: basic and clinical foundations*. New York: Raven press; 1992. p.141-52.
32. Verdonk R. Alternative treatment for menisci injuries. *J Bone Joint Surg [Br]* 1997;79B:866-73.
33. McCarty EC, Marx RG, DeHaven KE. Meniscus Repair. *Clin Orthop* 2002;(402):122-34.
34. Garret JC. Meniscal transplantation. *Am J Knee Surg* 1996;91:32-4.
35. Farr J, Meneghini RM, Cole BJ. Allograft interference screw fixation in meniscus transplantation. *Arthroscopy* 2004;20(3):322-27.

36. Silver FH, Christiansen DL, Snowhill PB, Chen Y. Role of storage on changes in the mechanical properties of tendon and self-assembled collagen fibers. *Connect Tissue Res* 2000;41(2):155-64.
37. Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W. Clinical experience with allograft implantation: the first ten years. *Clin Orthop Relat Res* 1983;(174):69-86.
38. Neter J. *Applied linear statistical models*. 4 ed. New York: McGraw-Hill; 1996.
39. Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *J Bone Joint Surg* 1948;30:664-70.
40. Morgan CD, Wojtys EM, Cascells CD, Cascells SW. Arthroscopic meniscal repair evaluated by second look arthroscopy. *Am J Sports Med* 1991;19:632-38.
41. Carter TR. Osteochondral allograft transplantation. *Sports Med Arth Rev* 2004;11(4):264-71.
42. Shelbourne KD, Gray T. Results of anterior cruciate ligament reconstruction based on meniscus and articular cartilage status at the time of surgery: five-to fifteen-year evaluations. *Am J Sports Med* 2000;28:446-52.
43. Allen CR. Importance of the medial meniscus in the anterior cruciate ligament deficient knee. *J Orthop Res* 2000;18:109-15.
44. Arnoczky SP, Warren RF. The microvasculature of the meniscus and its response to injury: an experimental study in the dog. *Am J Sports Med* 1983;11(3):131-41.
45. Yoldas EA, Sekija JK, Irrgang JJ, Fu FH, Harner CD. Arthroscopically assisted meniscal allograft transplantation with and without combined anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003;11(3):173-82.
46. Strobel M, Stedtfeld HW. Avaliação das lesões meniscais. In: Strobel M, Stedtfeld HW. *Joelho: Procedimentos Diagnósticos*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.151-64.
47. Cohen M, Abdalla RJ, Ferretti Filho M, Nakano KK. Lesões Meniscais. In: Cohen M, Abdalla RJ. *Lesões nos Esportes*. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p.514-18.
48. Kimura M, Shirakura K, Higuchi H, Kobayaashi Y, Takagishi K. Eight- to 14-Year follow-up of arthroscopic meniscal repair. *Clin Orthop Relat Res* 2004;1(421):175-80.
49. Noyes FR, Barber SD. Irradiated meniscal allografts in the human knee: a two to five year follow-up. *Orthop Trans* 1995;19:417.
50. Alhalki MM, Howell SM, Hull ML. How three methods for fixing a medial meniscal allograft affect tibial contact mechanics. *Am J Sports Med* 1999;27(3):320-28.
51. van Arkel ERA, de Boer HH. Survival analysis of human meniscal transplantations. *J Bone Joint Surg [Br]* 2002;84(2):227-31.
52. Shaffer B, Kennedy S, Klimkiewicz J, Yao L. Preoperative sizing of meniscal allografts in meniscus transplantation. *Am J Sports Med* 2000;28(4):524-33.
53. Johnson LL, Feagin Jr JA. Autogenous tendon graft substitution for absent knee joint meniscus: a pilot study. *Arthroscopy* 2000;(16):191-96.

54. Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W. Autologous meniscus replacement with rib perichondrium. Experimental results. *Orthopade* 2000;29:145-50.
55. Milachowski KA, Kohn D, Wirth CJ. Meniscus replacement using hoffás infrapatellar fad bodies – initial clinical results. *Unfallchirurgie* 1990;16:190-5.
56. Rath E, Richmond JC. The menisci basic science and advances in treatment. *Br J Sports Med* 2000;34(4):252-57.
57. Messner K, Gillquist J. Prosthetic replacement of the rabbit medial meniscus. *J Biom Mat Res* 1993;27:116-73.
58. Rodkey WG, Steadman JR LST. A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus. *Clin Orthop* 1999;367:281-92.
59. Rijk PC. Meniscal allograft transplantation – part I: Background, results, graft selection, preservation, and surgical considerations. *Arthroscopy* 2004;20(7):728-43.
60. Wada Y. Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts. An experimental study in the genetically defined rat. *J Jpn Orthop Assoc* 1993;67:677-83.
61. Rijk PC, van Noorden CJF. Structural analysis of meniscal allografts after immediate and delayed transplantation in rabbits. *Arthroscopy* 2002;18:995-1001.
62. Ochi M, Ishida O, Daisaku H, Ikuda Y, Akiyama M. Immune response to fresh meniscal allografts in mice. *J Surg Res* 1995;58:478-84.
63. Buck BE, Resnick L, Shah SM, Malinin TI. Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. *Clin Orthop Relat Res* 1990;251:249-53.
64. Indelli PF, Dillingham MD, Fanton G, Schurman FG. Anterior cruciate ligament reconstruction using cryopreserved allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2004;1(420):268-75.
65. Ball S, Amiel D, Williams S, Tontz W, Chen A, Sah R, Bugbee W. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2004;1(418):246-52.
66. Aagaard H, Jörgensen U, Bojsen-Møller F. Reduced degenerative articular cartilage changes after meniscal allograft transplantation in sheep. *Knee* 1999;7:184-91.
67. Arnoczky SP, Dicarlo EF, O'Brien SJ, Warren RF. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog. *Arthroscopy* 1992;8:428-36.
68. Arnoczky SP, Warren RF, McDevitt CA. Meniscal replacement using a cryopreserved allograft. *Clin Orthop Relat Res* 1990;252:121-28.
69. Cummins JF, Mansour JN, Howe Z, Allan DG. Meniscal transplantation and degenerative articular change: An experimental study in a rabbit. *Arthroscopy* 1997;13:485-91.
70. Goertzen D, Gillquist J, Messner K. Tensile strenght of tibial meniscal attachments in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1996;30(1):125-28.

71. Kim JM, Moon MS. The effect of synovectomy upon regeneration of meniscus in rabbits. *Clin Orthop* 1979;141:287-94.
72. Walsh CJ, Goodman D, Caplan AL, Goldberg VM. Meniscus regeneration in rabbit partial meniscectomy model. *Tissue Eng* 1999;5:327-37.
73. Sommerlath K, Gillquist J. The effect of a meniscal prosthesis on knee biomechanics and cartilage – an experimental study in rabbits. *Am J Sports Med* 1992;20:73-81.
74. Sakihama AK. Estudo morfológico da articulação do joelho de coelhos, após a reparação de um defeito osteocondral com adesivo de resorcina ou síntese metálica[tese] São Paulo: Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP; 2003.
75. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 2004;19(1):59-65.
76. Peretti GM, Gill TJ, Wei Xu J, Randolph MA, Morse KR, Zaleske DJ. Cell-Based therapy for meniscal repair: a large animal study. *Am J Sports Med* 2004;32:146-58.
77. Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, Cook CR. Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *Am J Sports Med* 1999;27:658-65.
78. Figueiredo AS, Fagundes DJ, Novo NF, Inouye CM, Takita LC, Sassioto MCP. Osteointegração de osso bovino desvitalizado, hidróxiapatita de coral, poliuretano de mamona e enxerto autógeno em coelhos. *Acta Cir Bras* 2004;19(4):370-82.
79. Jaques JW, Fagundes DJ, Figueiredo AS, Inouye CM, Scapulatempo RP, Sassioto MCP. O papel da poliuretano de mamona como substituto do enxerto ósseo autólogo em coelhos. *Rev Col Bras Cir* 2004;31(4):236-41.
80. Wada Y, Amiel M, Harwood F, Moriya H, Amiel D. Architectural remodeling in deep frozen meniscal allografts after total meniscectomy. *Arthroscopy* 1998;14(3):250-57.
81. Salai M, Givon U, Messer Y, Versen R. Electron microscopic study on the effects of different preservation methods for meniscal cartilage. *Ann Transplant* 1997;2(1):52-4.
82. Pereira FEL. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. In: Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2000; p.38-69.
83. Verbruggen G, Verdonk R, Veys EM, van Daele P, De Smet P, van den Abbeele K, Baeten CB. Human meniscal proteoglycan metabolism in long-term tissue culture. *Knee* 1996;4(1):57-63.

8. NORMAS ADOTADAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Apresentação de originais:NB-1139. Rio de Janeiro, 2000.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE - n?. 01/88: Normas de pesquisas em saúde. Bioética 1955, 3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências de Saúde. 3^a ed. São Paulo. Bireme; 1992.

FAGUNDES DJ. NORMAS PARA ELABORAÇÃO DE RELATÓRIO DE PESQUISA [edição eletrônica-disquete]. São Paulo: UNIFESP-EPM-TOCE; 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/toce/pg>.

FAGUNDES DJ. NORMAS PARA CITAÇÕES E REFERÊNCIAS [edição eletrônica- disquete] São Paulo: Unifesp-EPM-TOCE, 2001. Disponível em <http://www.unifesp.br/dcir/toce/pg>.

UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS. INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL EDITORS. Ann Intern Med 1997, 126:36-47.

FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY. Terminologia Anatômica, [Tradução para o Português por CTA-SBA]. São Paulo, Manole, 2001, 248.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY ANATOMICAL NOMENCLATURE. NOMINA ANATOMICA VETERINÁRIA. 4 ed, ver. Zurich, 1994 (Together with Nomina Histológica, 2 ed. And Nomina embriológica veterinária).

APÊNDICE

RESULTADOS

Dados na temperatura -7,2°C:

Número	Temperatura	Dia	Menisco	Células viáveis	
				(%)	Picnose (%)
1	-7,2	2	1	100	0
2	-7,2	2	2	99,8	0,2
3	-7,2	2	3	100	0
4	-7,2	2	4	99,5	0,5
5	-7,2	4	1	99	1
6	-7,2	4	2	98	2
7	-7,2	4	3	98	2
8	-7,2	4	4	99	1
9	-7,2	6	1	97,2	2,8
10	-7,2	6	2	96,2	3,8
11	-7,2	6	3	97	3
12	-7,2	6	4	96	4
13	-7,2	8	1	95	5
14	-7,2	8	2	93	7
15	-7,2	8	3	97	3
16	-7,2	8	4	96	4
17	-7,2	10	1	92	8
18	-7,2	10	2	94,4	5,6
19	-7,2	10	3	96,2	3,8
20	-7,2	10	4	93,2	6,8
21	-7,2	12	1	93,6	6,4
22	-7,2	12	2	94	6
23	-7,2	12	3	94,2	5,8
24	-7,2	12	4	93,9	6,1
25	-7,2	14	1	93	7
26	-7,2	14	2	92,5	7,5
27	-7,2	14	3	94	6
28	-7,2	14	4	90	10
29	-7,2	16	1	86,2	13,8
30	-7,2	16	2	81	19
31	-7,2	16	3	78,4	21,6
32	-7,2	16	4	75,9	24,1
33	-7,2	18	1	69,8	30,2
34	-7,2	18	2	64,5	35,5
35	-7,2	18	3	59,5	40,5
36	-7,2	18	4	58,9	41,1
37	-7,2	20	1	53,4	46,6
38	-7,2	20	2	57,4	42,6
39	-7,2	20	3	53	47
40	-7,2	20	4	57,8	42,2
41	-7,2	22	1	54,6	45,4
42	-7,2	22	2	55,8	45,8
43	-7,2	22	3	56	44

44	-7,2	22	4	54,9	45,1
45	-7,2	24	1	51	49
46	-7,2	24	2	52,4	47,6
47	-7,2	24	3	49,9	50,1
48	-7,2	24	4	50,7	49,3
49	-7,2	26	1	48,2	51,8
50	-7,2	26	2	42,2	57,8
51	-7,2	26	3	45,7	54,3
52	-7,2	26	4	45,2	54,8
53	-7,2	28	1	41	59
54	-7,2	28	2	42,5	57,5
55	-7,2	28	3	43,5	56,5
56	-7,2	28	4	39,6	60,4
57	-7,2	30	1	42	58
58	-7,2	30	2	32,2	67,8
59	-7,2	30	3	34	66
60	-7,2	30	4	31,2	68,8

Dados na temperatura -21,4°C:

Número	Temperatura	Dia	Menisco	Células viáveis (%)	Picnose (%)
62	-21,4	2	2	98	2
63	-21,4	2	3	96,5	3,5
64	-21,4	2	4	98,5	1,5
65	-21,4	4	1	95	5
66	-21,4	4	2	95,4	4,6
67	-21,4	4	3	94	6
68	-21,4	4	4	96,4	3,6
69	-21,4	6	1	91	9
70	-21,4	6	2	92	8
71	-21,4	6	3	93,4	6,6
72	-21,4	6	4	91,2	8,8
73	-21,4	8	1	90,8	9,2
74	-21,4	8	2	93,2	6,8
75	-21,4	8	3	90	10
76	-21,4	8	4	91,4	8,6
77	-21,4	10	1	89	11
78	-21,4	10	2	91	9
79	-21,4	10	3	87,2	12,8
80	-21,4	10	4	92,8	7,2
81	-21,4	12	1	84,5	15,5
82	-21,4	12	2	85,5	14,5
83	-21,4	12	3	84,8	15,2
84	-21,4	12	4	85,7	14,3
85	-21,4	14	1	84	16
86	-21,4	14	2	84,5	15,5
87	-21,4	14	3	83	17
88	-21,4	14	4	87	13
89	-21,4	16	1	83,8	16,2
90	-21,4	16	2	83,2	16,8
91	-21,4	16	3	82	18

92	-21,4	16	4	85,2	14,8
93	-21,4	18	1	81	19
94	-21,4	18	2	83,8	16,2
95	-21,4	18	3	80	20
96	-21,4	18	4	85,6	14,4
97	-21,4	20	1	79	21
98	-21,4	20	2	80,2	19,8
99	-21,4	20	3	79,3	20,7
100	-21,4	20	4	78,9	21,1
101	-21,4	22	1	78	22
102	-21,4	22	2	79,2	20,8
103	-21,4	22	3	77,6	22,4
104	-21,4	22	4	79,6	20,4
105	-21,4	24	1	72,8	26,2
106	-21,4	24	2	74,8	25,2
107	-21,4	24	3	73	27
108	-21,4	24	4	74,6	25,4
109	-21,4	26	1	71,2	28,8
110	-21,4	26	2	69,2	30,8
111	-21,4	26	3	68,7	31,3
112	-21,4	26	4	72,2	27,8
113	-21,4	28	1	51,8	48,2
114	-21,4	28	2	52,2	47,8
115	-21,4	28	3	56,8	43,2
116	-21,4	28	4	57,2	42,8
117	-21,4	30	1	31	69
118	-21,4	30	2	29	71
119	-21,4	30	3	32	68
120	-21,4	30	4	28	72

Dados na temperatura -73°C:

Número	Temperatura	Dia	Menisco	Células viáveis	
				(%)	Picnose (%)
121	-73	2	1	97,5	2,5
122	-73	2	2	98,5	1,5
123	-73	2	3	99	1
124	-73	2	4	97	3
125	-73	4	1	95,5	4,5
126	-73	4	2	96	4
127	-73	4	3	95,8	4,2
128	-73	4	4	97	3
129	-73	6	1	94,2	5,8
130	-73	6	2	90,2	9,8
131	-73	6	3	92	8
132	-73	6	4	92,4	7,6
133	-73	8	1	91,2	8,8
134	-73	8	2	89,8	10,2
135	-73	8	3	90,5	9,5
136	-73	8	4	89,5	10,5
137	-73	10	1	89	11
138	-73	10	2	91	9

139	-73	10	3	90	10
140	-73	10	4	90	10
141	-73	12	1	84	16
142	-73	12	2	84,4	15,6
143	-73	12	3	82,2	17,8
144	-73	12	4	86,2	13,8
145	-73	14	1	85	15
146	-73	14	2	85,4	14,6
147	-73	14	3	83	17
148	-73	14	4	87,2	12,8
149	-73	16	1	86	14
150	-73	16	2	85,4	14,6
151	-73	16	3	82	18
152	-73	16	4	81,8	18,2
153	-73	18	1	78	22
154	-73	18	2	75,5	24,5
155	-73	18	3	76	24
156	-73	18	4	74,4	25,6
157	-73	20	1	72,2	27,8
158	-73	20	2	73	27
159	-73	20	3	71,6	28,4
160	-73	20	4	70,2	29,8
161	-73	22	1	66,4	33,6
162	-73	22	2	68,4	31,6
163	-73	22	3	67	13
164	-73	22	4	67,8	32,2
165	-73	24	1	57,8	42,2
166	-73	24	2	55,9	44,1
167	-73	24	3	56,3	43,7
168	-73	24	4	54,2	45,8
169	-73	26	1	43,6	56,4
170	-73	26	2	47,3	52,7
171	-73	26	3	44,4	55,6
172	-73	26	4	46,7	53,3
173	-73	28	1	40,9	59,1
174	-73	28	2	41,4	58,6
175	-73	28	3	38,8	61,2
176	-73	28	4	39,9	60,1
177	-73	30	1	37,8	62,2
178	-73	30	2	39,8	60,2
179	-73	30	3	38,5	61,5
180	-73	30	4	35,6	64,4