

ALOENXERTOS CRIOPRESERVADOS NO TRATAMENTO DE DEFEITOS OSTEOCARTILAGÍNEOS

**Fernando Judas, **Alexandrina Ferreira Mendes*

**Banco de Tecidos dos HUC, Clínica Universitária de Ortopedia dos HUC,
FMUC.*

*** Faculdade de Farmácia e Grupo de Imunologia Celular do Centro de
Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra.*

Ano de 2009.

Resumo

A reparação cirúrgica dos defeitos da cartilagem articular representa uma das situações mais difíceis de tratar em Ortopedia. Os aloenxertos osteocartilagíneos devem ser reservados para a reconstrução de defeitos significativos envolvendo cartilagem e osso (> 3 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade), isto é, nas lesões demasiado extensas para serem corrigidas através de outras técnicas.

Os aloenxertos osteocartilagíneos criopreservados apresentam vantagens em relação aos frescos, que incluem uma maior segurança microbiológica, menor capacidade imunogénica ligada ao tecido ósseo e estão disponíveis em maior número. No entanto, os aloenxertos osteocartilagíneos frescos mantêm uma maior viabilidade condrocitária e, por isso, oferecem um melhor desempenho clínico.

Embora permita recuperar um maior número de condrócitos vivos, a utilização de crioprotectores está ainda longe de originar a protecção completa e eficaz de todos os condrócitos presentes na cartilagem articular, o que compromete significativamente o desempenho clínico a médio ou a longo termo dos aloenxertos osteocartilagíneos criopreservados.

A combinação de um potente agente crioprotector como parece ser a arbutina, com meios mecânicos capazes de exercer uma pressão adequada poderá ser a chave para se alcançar uma percentagem significativa de condrócitos vivos após o processo de descongelação da cartilagem criopreservada e, assim, poderá assegurar a eficácia clínica, a médio e longo prazos, dos aloenxertos osteocartilagíneos criopreservados.

Palavras-chave: aloenxertos osteocartilagíneos criopreservados; defeitos da cartilagem articular; agentes crioprotectores; arbutina; tratamento cirúrgico.

Introdução

As doenças osteoarticulares são causa de um sério problema clínico e de saúde pública, com um impacto sócio-económico notório, de tal gravidade que a Organização Mundial de Saúde declarou a década de 2000 a 2010 como “Década do Osso e da Articulação”. Dentre outras, importa sublinhar a artrose, cuja frequência tende para um crescimento progressivo nos países desenvolvidos, onde se assiste a um aumento da esperança de vida e ao envelhecimento das populações devido, em grande parte, à qualidade dos cuidados de saúde prestados e a uma melhoria das condições de vida.

As doenças artríticas ou artrósicas afectam as articulações sinoviais ou diartroses, englobando numerosas patologias distintas, tanto quanto à etiologia, como quanto aos mecanismos fisiopatológicos e evolução clínica. Apesar dessa diversidade, todas as doenças artríticas envolvem uma destruição da cartilagem articular, a característica mais proeminente e comum, responsável pela dor e perda de mobilidade articular que acompanham estas afecções do aparelho musculoesquelético.

Embora as designações *artrite* e *artrose* se utilizem praticamente como sinónimos, na verdade, traduzem fenómenos de ordem biológica e mecânica diferentes. À primeira está subjacente a presença de um processo inflamatório activo, — mais intenso nas chamadas artrites inflamatórias, de que a artrite reumatóide é o paradigma — enquanto a segunda implica alterações degenerativas mais associadas ao envelhecimento, que são características da osteoartrose (também chamada osteoartrite, sobretudo na literatura de origem anglosaxónica). No entanto, o componente inflamatório, ainda que clinicamente possa não ser muito evidente, está presente em todas as doenças articulares, incluindo a osteoartrose (26,28,47,50). Para nós e ao longo do texto, o termo “artrose” designa as artropatias de tipo predominantemente degenerativo e o termo “artrite” as artropatias de tipo predominantemente inflamatório ou reumatismal.

A incidência das lesões da cartilagem articular do joelho é crescente, tendo como causas os traumatismos, resultantes de acidentes ou da prática desportiva, e a osteocondrite dissecante, particularmente em doentes pertencentes a uma faixa etária jovem. Embora não se conheça, ainda, a exacta incidência dos defeitos cartilagíneos, esta é provavelmente muito maior do que pensamos, sendo certo que muitas das gonartroses precoces e “silenciosas” que surgem em doentes jovens, são devidas a

antecedentes traumáticos que na altura foram pouco valorizados. Por sua vez, a incidência de osteocondrite dissecante do joelho é estimada em 30 a 60 casos por 100 000 habitantes (25).

Movimentos de compressão intensos e repetitivos, geralmente ligados à prática desportiva, podem ser causa de lesões da bem organizada matriz extracelular do tecido cartilágneo. As lesões em que não ocorre ruptura da superfície articular são as de mais difícil diagnóstico, uma vez que a cartilagem não possui nem vasos sanguíneos, nem nervos e, por isso, as lesões que afectam apenas a cartilagem não provocam reacção inflamatória, nem dor. Assim sendo, tanto as lesões traumáticas graves com ruptura da cartilagem e/ou com fractura do osso subcondral, quanto os danos estruturais da sua matriz cartilágnea, podem evoluir no sentido da degeneração e perda funcional da articulação que se traduz, a médio ou longo prazo, na instalação de uma artrose (9,85).

Ainda assim, as hemartroses traumáticas em atletas jovens com lesões do joelho estão associadas, em mais de 10% dos casos, a defeitos cartilágneos (73). Além disso, estudos alargados descrevem lesões cartilágneas graves (grau III e IV de Outerbridge), localizadas com maior frequência no côndilo femoral medial e na patela, em 5% a 11% da população de doentes jovens (menos de 40 anos de idade) e em 60% dos doentes mais idosos. Notar que, nesses trabalhos, muitos doentes apresentavam antecedentes cirúrgicos, tais como uma meniscectomia ou uma reconstrução do ligamento cruzado anterior (20, 49).

Ao contrário do que acontece com o tecido ósseo, a capacidade de regeneração espontânea do tecido cartilágneo é limitada podendo, todavia, ocorrer a reparação das lesões por formação de cartilagem fibrosa, funcionalmente menos eficaz. Este facto foi desde há longo tempo, cerca de 250 anos, reconhecido por Hunter quando descreveu a cartilagem como "... troublesome thing and once destroyed, it is not repaired" (9). Daí, as lesões da cartilagem serem difíceis de tratar, acabando por evoluir para artrose e contribuindo para o enorme impacto desta patologia em termos de saúde pública, tanto mais que as modalidades terapêuticas disponíveis não mostraram capacidade para induzir a regeneração da cartilagem articular.

Com efeito, os fármacos utilizados actualmente suprimem, acima de tudo, as manifestações do processo inflamatório crónico, sem actuarem nas suas causas ou, sequer, originarem a produção de uma cartilagem estrutural e funcionalmente eficaz. A principal razão para isso reside na insuficiência dos conhecimentos em relação aos factores etiológicos e processos patogénicos envolvidos na doença, bem como em relação ao metabolismo articular e à sua regulação. Na última década e graças ao

desenvolvimento e aplicação de metodologias de Biologia Celular e Molecular ao estudo da fisiologia da cartilagem e da patogênese da artrose, foram identificados vários processos celulares, susceptíveis de manipulação farmacológica que parecem desempenhar um papel relevante na gênese e progressão desta doença constituindo, assim, novos alvos para uma abordagem terapêutica futura.

A própria natureza e características da cartilagem articular tornam limitada a sua capacidade de regeneração, tanto espontânea como em resposta a estímulos fisiológicos ou a agentes terapêuticos. De facto, a cartilagem articular é um tecido avascular, desprovido de inervação e composto por um único tipo de célula, o condrócito (17). A substância intercelular ou matriz extracelular — geralmente chamada *matriz cartilágnea* — é muito abundante e complexa e nela se encontram embebidos os condrócitos, únicos responsáveis pela síntese e manutenção dos seus diversos componentes moleculares (69). Para que a cartilagem suporte eficazmente as forças que, em cada momento, se exercem sobre a articulação, necessita de manter uma elevada resistência e flexibilidade que lhe são conferidas pelas fibrilhas de colagénio e pela substância intercelular amorfa que se encontra embebida na rede de colagénio, e que é composta por água e por grandes aglomerados de proteoglicanos e ácido hialurónico. A água é o principal componente da matriz, representando 70 a 80% do seu peso fresco.

Como tecido muito complexo e heterogêneo, a cartilagem articular apresenta-se estratificada em três zonas (superficial 10%-20% da sua espessura, intermédia 40%-60% e profunda 30%) que diferem em relação à composição bioquímica, organização macromolecular e propriedades biomecânicas, diferenças essas que, em última análise, resultam da especialização metabólica dos condrócitos residentes em cada zona (46,69), o que se traduz também em variações da forma, volume, número e organização espacial destas células nas três zonas.

Em última análise, a resposta da cartilagem à lesão depende apenas dos condrócitos, devido à inexistência de vasos sanguíneos e linfáticos que permitam o recrutamento de outras células que possam induzir o processo de reparação. As lesões da cartilagem não causam hemorragia, não ocorre inflamação, pelo menos clinicamente evidente, e não é possível contar com a migração das células mesenquimatosas pluripotenciais, a partir dos vasos sanguíneos para o local da lesão, de modo a proliferarem e diferenciarem-se na linha condroblástica e produzirem, então, uma nova matriz (15,60). Mesmo se ao dano da cartilagem se juntar uma hemorragia, por lesão da sinovial ou dos ligamentos, as células sanguíneas e os sinoviócitos não migram para a zona da lesão, nem tão pouco há

formação de um coágulo de fibrina, porque os proteoglicanos inibem a adesão das células à matriz da cartilagem.

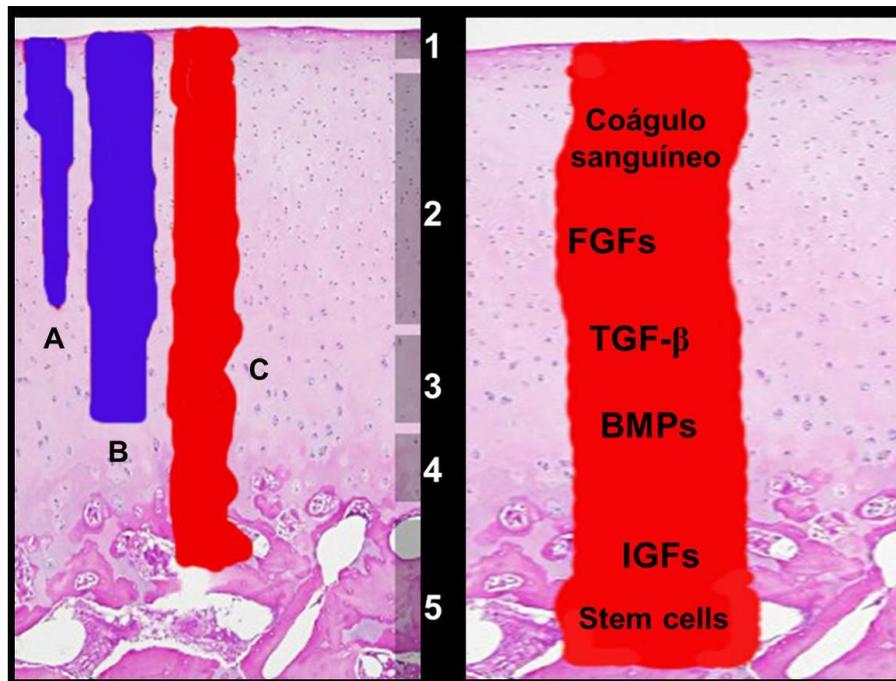


Fig 1. As lesões que envolvem todas as camadas da cartilagem articular e também o osso subcondral (C) são as únicas que desencadeiam uma resposta espontânea de reparação da cartilagem articular, formando-se uma fibrocartilagem.

Como se isto não bastasse, apesar dos condrócitos próximos da zona lesada proliferarem, formarem grupos ou clones e sintetizarem uma nova matriz, não conseguem, porém, migrar através da matriz para o local da lesão, porque estão encarcerados nas fibrilhas de colagénio, muito embora estudos recentes sugiram que o condrócito possa ter movimentos. Assim, a nova matriz permanece perto dos condrócitos mas não preenche o defeito da cartilagem, e as actividades sintéticas cessam pouco tempo depois da ocorrência da lesão (79).

Seja como for, na prática ortopédica é relevante reconhecer que tanto as lesões que penetram as zonas superficial e média da cartilagem articular, como as que atingem toda a sua espessura até à lâmina óssea subcondral, mas sem envolvimento da medula óssea, não desencadeiam uma resposta reparadora espontânea. De facto, só no caso de haver uma lesão osteocartilagínea, isto é, com envolvimento de todas as camadas da cartilagem e também do osso subcondral, se forma um tecido de reparação, distinto da cartilagem hialina normal (Fig. 1). Nestas circunstâncias, constitui-se um hematoma e uma resposta inflamatória aguda, com migração celular intensa, formação de neovasos, libertação de citocinas e de factores

de crescimento, num processo de osteogénese muito semelhante ao que acontece no mecanismo de reparação de uma fractura do osso esponjoso (60,86). No final, a fractura consolida e o defeito cartilágneo é reparado com um tecido cartilágneo fibroso que, por não possuir as propriedades biomecânicas da cartilagem articular, acaba por sofrer um processo degradativo que conduz à doença artrósica (84,86).

Em síntese podemos afirmar que o condrócito é a única célula responsável pela manutenção da integridade e das propriedades biomecânicas da cartilagem articular, regulando os processos de síntese e remodelação da extensa matriz. Contudo, na cartilagem madura a divisão celular é inexistente ou muito modesta, o que conjugado com a sua natureza avascular compromete seriamente o potencial de reparação espontânea de uma lesão situada apenas na cartilagem articular. Daí as lesões limitadas à espessura da cartilagem não apresentarem reparação espontânea podendo, assim, ocorrer fibrilhação da matriz, delaminação da sua superfície ou formação de franjas cartilágneas e de corpos livres intra-articulares. Ao contrário, as lesões que ultrapassam o osso subcondral são reparadas de modo espontâneo, pela formação de uma fibrocartilagem.

Reparação cirúrgica dos defeitos cartilágneos e osteocartilágneos

Conhecidas as limitações da abordagem farmacológica e bem assim da Medicina Física e de Reabilitação no controlo do processo degenerativo osteoarticular, o tratamento da gonartrose nos doentes idosos, mormente em situação unilateral, encontra na substituição artroplástica das superfícies articulares, uma intervenção de elevado sucesso clínico, proporcionando o alívio da dor e o restabelecimento precoce da função articular. Os modelos protéticos actualmente disponíveis apresentam um desenho muito próximo da anatomia normal do joelho, permitindo alcançar um bom resultado clínico com uma baixa frequência de complicações.

Todavia, os excelentes resultados alcançados a curto e médio prazo com as artroplastias totais do joelho não resistem à prova do tempo, além da prótese constituir um corpo estranho que, ao ser introduzido num organismo vivo, pode provocar reacções imprevisíveis, sendo certo que essas reacções estão condicionadas pelo perfil imunogenético que é, naturalmente, diferente de doente para doente. De facto, todo o Ser Humano é imuno e fisicamente único.

À semelhança do que acontece com todas as outras artroplastias de substituição articular aplicadas em cirurgia ortopédica, o desgaste tribológico dos biomateriais incluídos na sua composição, conduz à formação de partículas – nomeadamente, de polietileno –, as quais estão na origem de reacções de intolerância biológica que, entre outros factores, conduzem à formação de lises ósseas periprotéticas comprometendo, desta forma, a estabilidade mecânica da prótese.

A médio ou longo prazo, assiste-se a uma falência mecânica da artroplastia, com desprendimento dos implantes do suporte ósseo, tornando-se necessária a implantação de uma nova prótese, que levanta aspectos particulares de técnica cirúrgica, por forma a criar uma situação similar à da artroplastia primária, o que nem sempre é conseguido.

Apesar do valor clínico da artroplastia do joelho é importante considerá-la como uma operação irreversível (reconstrutiva, mas destruidora), isto é, torna-se impossível regressar à situação clínica anterior se o resultado alcançado não estiver, porventura, à altura das expectativas do paciente ou do cirurgião. Daí, perante uma lesão das superfícies articulares do joelho, ser da maior importância eleger a modalidade de intervenção terapêutica que é suposto trazer o melhor resultado a longo termo, com um menor risco de complicações, levando em conta o binómio risco/benefício e a esperança de vida do paciente. Se assim se fizer, nos doentes com idade inferior a 60 anos, as várias modalidades da cirurgia conservadora encontrarão a melhor indicação, reservando-se a artroplastia para os doentes mais idosos ou, em todo o caso, como a última etapa de uma estratégia cirúrgica bem conduzida, em tempo útil.

Assim, reconhecidas as limitações da artroplastia total do joelho em doentes jovens e activos, os investigadores e os ortopedistas têm procurado modalidades cirúrgicas alternativas, particularmente na emergente área do revestimento biológico da cartilagem articular. Não obstante os progressos conseguidos, o melhor tratamento para as lesões cartilagíneas e osteocartilagíneas do joelho continua, ainda, a ser motivo de uma estimulante controvérsia científica. A reparação cirúrgica dos defeitos da cartilagem representa uma das situações mais difíceis de tratar em Ortopedia. Nenhum dos métodos usados foi capaz de reproduzir, de forma consistente, uma cartilagem hialina normal.

As modalidades cirúrgicas disponíveis actualmente incluem: técnicas de estimulação do osso subcondral (desbridamentos, furagens, artroplastias abrasivas, microfacturas); revestimento articular com perióstio, pericôndrio ou materiais inorgânicos; transplantação de condrócitos autógenos incluídos numa diversidade de

matrizes sintéticas e transplantação osteocartilagínea autógena e alógena (10,13,29,35,39,45,51,79).

As técnicas de estimulação da medula óssea, os revestimentos com periósteeo ou com pericôndrio, as matrizes sintéticas, os factores de crescimento, e outros métodos, produzem muitas vezes uma cartilagem fibrosa (11) que não possui as propriedades reológicas únicas da cartilagem articular, sendo certo que só uma reparação perfeita das lesões da cartilagem, com *restitutum ad integrum*, permite a recuperação das suas propriedades físicas de resistência e de elasticidade, que são condição indispensável para o normal funcionamento da articulação.

No que diz respeito à transplantação de condrócitos autógenos, é um método atractivo, particularmente se forem considerados os recentes avanços na produção de substratos sintéticos matriciais biocompatíveis e biodegradáveis (79).

A transplantação de condrócitos autógenos foi introduzida no arsenal terapêutico por Lars Peterson e colaboradores, em 1987, na Suécia, associada a um retalho de periósteeo de cobertura, por forma a conseguir-se uma câmara de regeneração cartilagínea. Esta técnica preserva a placa óssea subcondral e permite o tratamento de extensas lesões cartilagíneas, com uma área de 1,5 cm² a 12 cm² e na região de carga do côndilo femoral, desde que a superfície articular oposta se apresente intacta. A transplantação de condrócitos pode estar, também, indicada em lesões cartilagíneas de outras articulações, tais como o tornozelo e o ombro (9).

Os resultados da primeira série de 23 doentes foram publicados em 1994 (10). Embora as publicações iniciais tenham mostrado, em doentes seleccionados, uma elevada taxa de sucesso clínico (75), trabalhos comparativos recentes mostram que, nas lesões referentes ao joelho, não há diferenças significativas entre a implantação de condrócitos autógenos e a técnica das microfracturas, aos 2 anos de evolução pós-operatória (53,59). Trata-se de uma técnica que apresenta algumas desvantagens e limitações: requer duas etapas cirúrgicas diferentes, implica a colheita e estabelecimento da cultura de condrócitos; está indicada apenas em doentes jovens, com menos de 45 anos de idade; está contra-indicada nos casos em que existe, concomitantemente, um processo degenerativo; obriga a um programa de reabilitação funcional pós-operatória bastante exigente; tem custos elevados; não se conhece a morbidade a longo termo do local da colheita; e a qualidade e durabilidade da cartilagem produzida por engenharia tecidual são, ainda, inferiores às da cartilagem normal (29).

Quanto a esta última questão, uma das causas principais parece ser, provavelmente, inerente ao processo de desdiferenciação dos condrócitos articulares durante a sua expansão *in vitro*, que é uma fase necessária para a produção de

cartilagem por engenharia tecidual (72). De facto, na fase de proliferação, os condrócitos expressam modificações morfológicas e fenotípicas caracterizadas, em última análise, por uma reduzida síntese de colagénio de tipo II com aumento da síntese de colagénio do tipo I (52,61). A consequência desta desdiferenciação é a produção de um tecido fibrocartilágneo, em vez da cartilagem articular normal, com características bioquímicas e estruturais que o tornam incapaz de suportar o largo espectro de forças compressivas e de tracção que, fisiologicamente, actuam na cartilagem (61).

Por seu turno, as fontes celulares alternativas, tais como as células mesenquimatosas pluripotenciais da medula óssea (*stem cells*), estão ainda no domínio da investigação científica, mas podem vir a reduzir a morbilidade local relacionada com a colheita do tecido cartilágneo (68,89).

Quanto à transplantação osteocartilágnea autógena tem vindo, nos últimos anos, a ocupar um lugar de crescente interesse. A técnica da mosaicoplastia foi descrita pela primeira vez no Japão. Todavia, o seu desenvolvimento deve-se particularmente a Hangody, em 1977, na Hungria (43). Este método consiste na colheita de cilindros osteocartilágneos na periferia articular do joelho que são, depois, implantados directamente no sítio da perda de substância articular. Trata-se de uma técnica que pode ser praticada num só tempo cirúrgico e através de uma pequena incisão. É recomendada no tratamento de defeitos cartilágneos ou osteocartilágneos com uma área de 1 cm² a 4 cm², em doentes jovens, com menos de 45 anos, uma vez que a percentagem de sucessos clínicos começa a declinar a partir dos 35 anos de idade. Além das lesões a nível do joelho, a mosaicoplastia está, também, indicada nos defeitos localizados a nível do talus e da anca (9,44).

Neste método, os espaços entre os cilindros são preenchidos por uma fibrocartilagem e a incorporação do enxerto é, em regra, conseguida. Quanto ao sítio dador, os defeitos são preenchidos, também, por uma fibrocartilagem, não se encontrando, ainda, suficientemente avaliada a morbilidade no local da colheita (1,7). No que toca às complicações, têm sido descritos afundamentos da superfície do enxerto, bem como a formação de quistos subcondrais (24).

Num trabalho de referência (44), a mosaicoplastia demonstrou uma elevada percentagem de bons/excelentes resultados no tratamento de lesões situadas no côndilo femoral (92%), nos pratos da tibia (87%) e na articulação patelofemoral (79%). É de notar que nesta série foram efectuados outros procedimentos cirúrgicos em 80% dos doentes, por forma a corrigir desalinhamentos axiais do joelho e instabilidades ligamentares, assim como para descomprimir a articulação patelofemoral.



Figura 2. Os autoenxertos osteocartilagíneos apresentam limitações quer quanto à quantidade disponível quer quanto à congruência anatómica entre o enxerto e o defeito a reconstituir e, ainda, quanto ao carácter iatrogénico da sua colheita. Mosaicoplastia no tratamento de um defeito osteocartilagíneo no joelho, originado por uma osteocondrite dissecante.

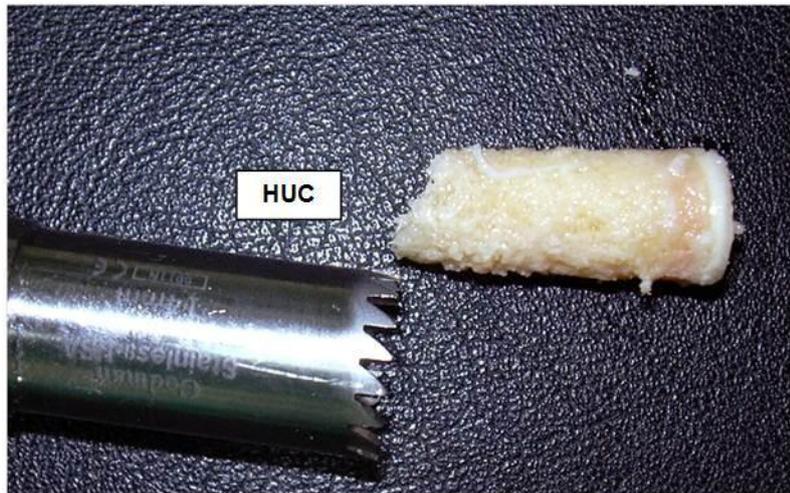
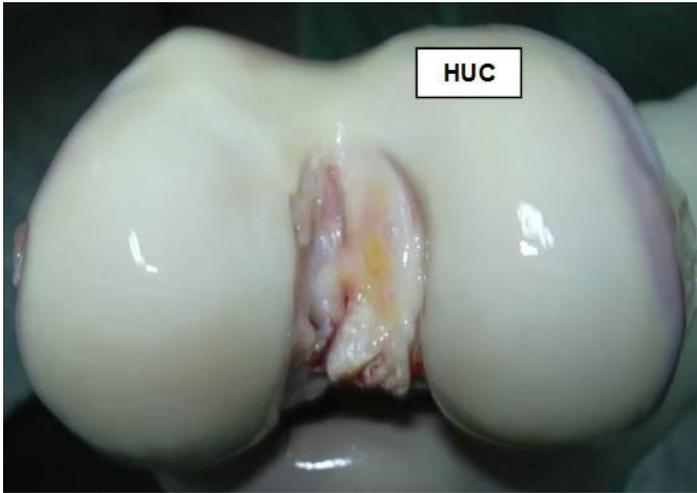


Figura 3. Os aloenxertos permitem reconstrução de todos os defeitos cartilagueos ou osteocartilagueos, independentemente da etiologia (traumática, degenerativa ou tumoral), forma e dimensão.

Além da mosaicoplastia, outros tipos de cartilagem articular autógena podem ser transplantados, incluindo o enxerto autógeno osteocondral da articulação tíbio-peroneal superior (Técnica de Espregueira-Mendes) e os autoenxertos colhidos na região posterior do côndilo medial, fora da zona de carga, com resultados, igualmente, conseguidos (23,68).

Em qualquer caso, os autoenxertos osteocartilagíneos apresentam limitações, não só quanto à quantidade disponível e congruência anatômica entre o enxerto e o defeito a reconstituir, mas também quanto ao carácter iatrogénico da colheita, dado que sacrificam uma estrutura anatomicamente normal (29). Ao contrário, os aloenxertos osteocartilagíneos de origem humana não apresentam esses inconvenientes e provaram, igualmente, ser eficazes na cirurgia reconstrutiva dos defeitos cartilagíneos (figuras 2 e 3).

Aloenxertos osteocartilagíneos

Peças osteocartilagíneas estão disponíveis em todos os tipos, formas e dimensões, nos Bancos de Tecidos, permitindo a reconstrução de quaisquer lesões da cartilagem articular. Todavia, a sua disponibilização para aplicação clínica levanta problemas de ordem logística e o risco potencial de transmissão de doenças ao receptor continua a preocupar a comunidade médica, nomeadamente no que concerne às infecções transmitidas pelos vírus das Hepatites e da Imunodeficiência Humana (VIH). De qualquer modo esse risco é muito baixo, cerca de 1 caso em 1,67 milhões para o VIH (12,73,91), se forem cumpridas com rigor as recomendações internacionais dos Bancos de Tecidos. De facto, em matéria de ciências da vida não existe “risco nulo”.

Por outro lado, o resultado clínico de uma alotransplantação está condicionado pela perenidade do comportamento biológico e mecânico do enxerto ao longo do tempo que, por sua vez, está dependente da intervenção de uma miríade de factores, muitos dos quais não se encontram, ainda, suficientemente esclarecidos. Na prática clínica são usados dois tipos de aloenxertos osteocartilagíneos, os frescos e os criopreservados.

Não constitui motivo de discórdia aceitar que a cartilagem hialina reúne condições favoráveis para a transplantação. Em primeiro lugar, por ser um tecido avascular, dispensa um aporte sanguíneo, sendo as suas necessidades metabólicas asseguradas por um processo de difusão a partir do líquido sinovial. Em segundo lugar, não necessita de inervação para desempenhar a sua função, uma vez que a

cartilagem não possui nervos e, por último, é um tecido imunoprevilegiado porque os condrócitos estão encarcerados numa extensa matriz intercelular, o que lhe confere uma protecção relativa face à resposta imunitária desencadeada por parte do hospedeiro, ao contrário do que acontece, por exemplo, com o tecido ósseo (40).

O outro componente dos aloenxertos osteocartilagíneos é precisamente o tecido ósseo, que funciona como uma estrutura de suporte da cartilagem e permite a fixação do enxerto ao hospedeiro. A porção óssea funciona como um tecido não vivo, desvascularizado, que entra no ciclo imutável da remodelação óssea e, assim, vai sendo progressivamente reabsorvido e substituído por osso novo produzido pelo hospedeiro. Todavia, a lâmina de tecido ósseo pode originar uma resposta imunitária, que em termos de prática clínica é pouco relevante, uma vez que a sua espessura deve ser o mais reduzida possível, apenas a necessária e suficiente para assegurar a estabilidade mecânica do enxerto. Mesmo nos enxertos ósseos de grande superfície, a resposta imunológica não é motivo de grande preocupação (2,30).

O mesmo não acontece com os aloenxertos osteoarticulares maciços, os quais podem estar na origem de fenómenos de rejeição imunológica, traduzidos, na prática clínica, por uma excessiva produção de um transudato seroso. Mas essa reacção imunológica é causada, fundamentalmente, pela presença de tecidos imunologicamente competentes, como são a cápsula articular, tendões e ligamentos, estruturas necessárias para a estabilização mecânica da reconstrução cirúrgica. Por isso, nestas situações justifica-se o emprego de fármacos imunossupressores (8,31,76).

Muita da informação disponível acerca do comportamento biológico dos aloenxertos osteocartilagíneos, tem a ver com enxertos maciços aplicados na cirurgia de excisão tumoral, em alternativa à amputação. O seu uso foi alargado a outras situações ortopédicas, particularmente no início de 1970 e fins de 1980 (63,64). A partir dessa data e até ao início de 1990, as inaceitáveis taxas de complicações e o risco potencial de transmissão de doença ao receptor condicionaram, fortemente, a sua aplicação clínica, surgindo, depois, nas últimas décadas, um período de renovado interesse.

Com efeito, registaram-se progressos relevantes no que concerne aos seus comportamentos biológico, biomecânico e imunológico, assim como se assistiu a uma evolução das técnicas de preservação através do frio (congelação profunda, uso de azoto líquido, vitrificação), em paralelo com um rastreio laboratorial mais seguro. Em consequência disso, houve um incremento do uso de aloenxertos no tratamento das lesões isoladas da cartilagem articular (15).

Os aloenxertos osteocartilagíneos devem ser reservados para os grandes defeitos envolvendo cartilagem e osso (> 3 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade), particularmente em doentes menos jovens, isto é, nas lesões demasiado extensas para serem corrigidas através de outras técnicas (12,39,82,83). Os resultados da sua aplicação clínica têm sido referidos como satisfatórios, uma vez que retardam, sem reverter, o processo degenerativo articular (91). Em todo o caso, ganha-se um período de tempo precioso em relação a uma eventual artroplastia do joelho.

Outras indicações têm a ver com a reconstrução de perdas de substância osteocartilagínea ainda mais extensas, causadas por excisão tumoral e em situações de perdas de substância osteoarticular de etiologia traumática, independentemente da idade.

Assim, os aloenxertos osteocartilagíneos, frescos e criopreservados, mostram actualmente um largo espectro de aplicações clínicas, que incluem a correcção cirúrgica de osteocondrites dissecantes do joelho, osteonecroses, defeitos pós-traumáticos que ocorrem após fracturas do joelho, condroses ou artroses patelo-femorais e certos casos de artrose pós-traumática ou degenerativa tibio-femoral, unicompartimental ou multifocal (15,33,36,38).

Os resultados clínicos dos aloenxertos osteocartilagíneos frescos a nível do joelho têm sido muito satisfatórios, com um tempo de evolução pós-operatória entre os 7 e 10 anos (16,18,34), havendo estudos que confirmam viabilidade da cartilagem articular alógena aos 17, 25 e 29 anos de recuo pós-operatório (54,66,67).

Neste sentido, um estudo recente dá-nos conta dos resultados da aplicação de 60 enxertos osteocartilagíneos frescos de côndilo femoral, no tratamento de defeitos pós-traumáticos do joelho em doentes jovens e activos, com uma taxa de sucesso clínico de 95% aos 5 anos de evolução, de 80% aos 10 anos e de 65% aos 15 anos de recuo (38). De um modo geral, os resultados do tratamento das lesões situadas a nível dos côndilos femorais são melhores do que as dos pratos tíbiais.

Os aloenxertos provaram, também, o seu valor no tratamento de insucessos de outras técnicas cirúrgicas, como método de salvamento, tais como microfracturas, transplantação autógena de condrócitos ou mosaicoplastia. Outras indicações consistem no tratamento de lesões osteocartilagíneas a nível do tornozelo, anca e ombro (9).

Neste tipo de cirurgia, numerosos factores devem ser considerados para se obter o melhor resultado, tais como a dimensão e etiologia do defeito osteocartilagíneo, a idade do paciente e o grau de actividade, as patologias associadas, o programa de reabilitação funcional, entre outros (82).

A etiologia do defeito exerce uma influência significativa no resultado da

transplantação. Assim, lesões secundárias a um traumatismo ou a uma osteocondrite dissecante do joelho, nas quais se observa uma cartilagem circundante basicamente normal, evoluem de forma mais favorável do que as associadas a doença articular degenerativa (27,32). Do mesmo modo, as situações secundárias a uma necrose avascular, apesar de poder estar indicada uma transplantação osteocartilágnea, apresentam melhores resultados se for implantada uma prótese total do joelho (65). A presença de uma artrite reumatisal, inflamatória ou metabólica, bem como de uma sinovite inflamatória de causa desconhecida, são critérios para contraindicar uma alotransplantação.

Outras variáveis devem ser consideradas (16,34). As lesões unipolares do joelho apresentam melhores resultados do que as bipolares. A instabilidade ligamentar ou a ausência de meniscos exercem um efeito negativo no resultado da intervenção cirúrgica. Por isso, a instabilidade deve ser corrigida antes ou no decurso de uma alotransplantação, assim como pode estar indicado um transplante de menisco no mesmo tempo cirúrgico. De igual modo, torna-se da maior importância corrigir os desalinhamentos axiais do joelho, antes ou no decorrer da intervenção cirúrgica, se houver condições para tal. Só assim, se poderá alcançar o melhor resultado.

A idade do paciente é matéria de controvérsia. Enquanto muitos estudos limitam a idade aos 40-45 anos, outros suportam a transplantação osteocartilágnea em doentes com 60 anos de idade (15). Parece-nos que a idade só por si não deve ser critério de exclusão, é muito mais relevante a etiologia da lesão para determinar se um doente idoso deve ser candidato a uma transplantação ou a uma artroplastia do joelho, ou eventualmente, a uma abstenção terapêutica temporária, se for essa a opção.

Um outro aspecto tem a ver com a técnica cirúrgica e a substancial variabilidade da anatomia do joelho. O aloenxerto deve ser aplicado por forma a permitir uma congruência, o mais anatómica que for possível, entre o enxerto e o defeito osteocartilágneo a reconstruir. Embora possam ser usadas a ressonância magnética nuclear ou a tomografia axial computadorizada para seleccionar o aloenxerto mais adequado, o exame radiológico é habitualmente suficiente (13). Discrepâncias da topografia e da curvatura entre o enxerto e o sítio da implantação da ordem dos 10% são aceitáveis, segundo muitos autores, enquanto outros aceitam diferenças de $\pm 2\text{mm}$ (13,32,37).

A idade e o sexo dos dadores têm, também, sido questionadas. A idade dos dadores deve situar-se entre os 17 e os 40 anos, sendo a qualidade da cartilagem a transplantar o factor mais importante a valorizar, ao passo que a compatibilidade entre

os sexos não é clinicamente relevante (15).

Do que acima se disse, parece-nos correcto indicar o diâmetro do defeito cartilagíneo, a profundidade do defeito ósseo e o alinhamento do joelho ou a sua falta, como os factores mais importantes a considerar na eleição da estratégia cirúrgica mais adequada para o tratamento das lesões osteocartilagíneas do joelho. Em todo o caso, os aloenxertos representam a melhor solução para o tratamento de lesões extensas que envolvam a cartilagem e o osso.

A viabilidade condrocitária representa um factor da maior importância para o sucesso clínico da transplantação de cartilagem e deve ser considerada desde logo, na altura da colheita do enxerto (5,90).

Os aloenxertos frescos eram, inicialmente, aplicados poucos dias após a colheita, com a intenção de maximizar a sobrevivência dos condrócitos. À medida que mais estudos foram sendo realizados, o tempo de refrigeração dos aloenxertos foi sendo dilatado até aos 5-7 dias. Existem mesmo estudos que indicam ser possível conservar a cartilagem refrigerada em meio nutritivo adequado, durante 28 dias sem que a redução da viabilidade condrocitária seja muito significativa (80,93).

Mais, Williams e colaboradores (92) mostraram que a maioria dos condrócitos podem manter-se vivos até aos 60 dias após a colheita da cartilagem, embora as suas propriedades diminuam significativamente a partir das 4 semanas. Assim sendo, a conservação da cartilagem articular, sob condições de hipotermia (4º C), num meio de cultura nutritivo contendo aminoácidos, glucose e sais inorgânicos, durante mais de 2 semanas após a colheita, pode assegurar uma percentagem de condrócitos viáveis e uma integridade estrutural da matriz cartilagínea a níveis muito aceitáveis (6,92).

Daí, ao contrário do que acontecia com a prática empírica de transplantar os tecidos 7 dias após a colheita, ser hoje possível proceder a um rastreio serológico rigoroso e aguardar os resultados das culturas microbiológicas dos tecidos a transplantar, minimizando o risco de transmissão de agentes patogénicos ao paciente.

No entanto, esta metodologia não permite realizar a quarentena do enxerto, etapa que consideramos da maior relevância na organização de um Banco de Tecidos. No nosso entender, esse é um ponto crítico no que diz respeito aos aloenxertos osteocartilagíneos frescos. Ao contrário, nos criopreservados é possível efectuar a quarentena, procedimento recomendado pelas organizações internacionais de Bancos de Tecidos e praticada nos países do espaço da União Europeia.

A quarentena permite aumentar o nível de segurança dos aloenxertos, contornando o período de seroconversão, designado por “período de janela”. Trata-se de um procedimento simples que consiste em voltar a controlar a presença de anticorpos para os vírus da hepatite C e da infecção pelo VIH no dador vivo, 6 meses

após a colheita do enxerto. Para a infecção pelo VIH, 2 meses parece ser suficiente, nos países com baixa incidência de SIDA (2,3,42,48,78,88). No caso dos aloenxertos osteocartilagíneos obtidos de doadores em morte cerebral, no contexto da colheita multiorgânica, a quarentena também se aplica, embora, necessariamente, de outra forma. Nestes casos e na nossa instituição, assim como em outras instituições europeias, os anticorpos são pesquisados nos receptores dos órgãos vascularizados (rim, fígado), 3 meses após a transplantação. Durante esse período, os aloenxertos osteocartilagíneos permanecem conservados no vapor do azoto líquido ou congelados a -80° C, e só poderão ser disponibilizados para aplicação clínica, se os marcadores serológicos pesquisados nos receptores daqueles órgãos continuarem negativos.

Em reforço desta prática, a transplantação osteocartilagínea não é uma intervenção urgente, constituindo apenas uma parte de um procedimento cirúrgico electivo que só deve ser efectuado quando todas as condições de máxima segurança biológica estiverem reunidas (57,58). Não é a vida do paciente que está em questão, mas antes a melhoria da sua qualidade de vida. Importa sublinhar, também, que os doadores dos enxertos osteocartilagíneos pertencem a um grupo etário jovem (abaixo dos 45 anos), isto é, a uma população de alto risco em matéria de transmissão de doenças. Este é mais um argumento científico para recomendar a quarentena.

O risco de transmissão de doenças é, sempre foi, um tema da maior actualidade. Os Bancos de Tecidos têm vindo a registar uma evolução significativa, no sentido de disponibilizarem aloenxertos nas mais elevadas condições de integridade biológica e de segurança microbiológica cumprindo, para isso, as diferentes disposições legais vigentes em cada país. No nosso país, a Lei nº 12/93 e os Decretos-Lei subsequentes, permitiram programas desenvolvidos de transplantação, com um nível de valores comparáveis à média dos países europeus.

Com a intenção de uniformizar, no espaço Europeu, as normas de qualidade e segurança relativas à dádiva, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de tecidos e células de origem humana para fins terapêuticos, o Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia, emitiram a Directiva 2004/23/CE de 31 de Março, tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia. Posteriormente, a Directiva 2006/17/CE de 8 de Fevereiro, definiu os requisitos técnicos aplicáveis à dádiva, colheita e análise de tecidos e células de origem humana. Estes dois documentos mereceram uma análise e uma discussão cuidadas em reuniões várias efectuadas na sede da Organização Portuguesa de Transplantação (OPT), envolvendo todas as entidades com responsabilidade nos programas nacionais de transplantação de órgãos, tecidos e células.

Assim e fruto desse trabalho, a Lei 22/2007 de 29 de Junho, que teve o propósito de transpor para a ordem jurídica nacional as Directivas do Parlamento Europeu e do Conselho Europeu e a promulgação do Decreto Regulamentar nº 67/2007, de 29 de Maio, representam suportes legais imprescindíveis para a optimização da organização dos Bancos de Tecidos e Células existentes nas nossas instituições de saúde, e bem assim a nomeação do Presidente da Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação, permitindo à autoridade competente organizar fiscalizações e medidas de controlo adequadas, dentro do espírito da lei nacional.

Do que acima se disse, transcorre que os aloenxertos osteocartilagíneos criopreservados apresentam vantagens em relação aos frescos que incluem: maior segurança microbiológica, por permitirem a quarentena, sendo possível um rastreio serológico ainda mais seguro das doenças infecciosas transmissíveis; diminuição da capacidade imunogénica ligada ao tecido ósseo em consequência da criopreservação, embora nos enxertos de pequena e média dimensões praticamente não haja repercussões clínicas; disponibilidade de maior número de enxertos e, por isso, maior possibilidade de se conseguir a melhor congruência anatómica entre o enxerto e o sítio receptor; e, também, maior facilidade de transporte a longas distâncias, permitindo optimizar a utilização dos enxertos disponíveis, nomeadamente a nível nacional (19,87).

Apesar das vantagens descritas, os aloenxertos criopreservados mostram, porém, uma menor eficácia clínica. A formação de uma fibrocartilagem, condromalácia e perdas de cartilagem na sua superfície ocorrem, frequentemente, algum tempo após a transplantação (19,22,87), conduzindo a uma percentagem variável de falências do enxerto, avaliadas entre os 10% e 50%.

Neste âmbito, muitos estudos suportam o conceito de que a capacidade funcional dos aloenxertos osteocartilagíneos é proporcional ao conteúdo de condrócitos vivos (35,87). Qualquer agressão que destrua, mesmo, um pequeno número de células, pode ser causa de graves consequências na integridade e na durabilidade da cartilagem transplantada (71), uma vez que os condrócitos são essenciais para a manutenção da integridade da matriz cartilagínea, tanto mais que a sua capacidade proliferativa é limitada (69).

Por outro lado, sendo certo que os agentes crioprotectores, tais como o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO), protegem efectivamente os condrócitos, depois de isolados da cartilagem, dos danos provocados pela congelação/descongelação, não é, porém, menos verdade que estes mesmos processos aplicados à cartilagem articular intacta em peças osteocartilagíneas comprometem seriamente a viabilidade

dos condrócitos *in situ*, mesmo na presença dos crioprotectores referidos (4,71,74). Com efeito, a impregnação da cartilagem articular com crioprotectores, com a intenção de evitar a formação de macrocristais de gelo no interior dos condrócitos e, assim, aumentar a taxa de condrócitos viáveis na altura da transplantação, continua a representar um tema de controvérsia científica e de intensa investigação (23,83).

No nosso Serviço, os aloenxertos osteocartilagíneos usados no recobrimento das superfícies articulares da anca e do joelho, mostraram resultados modestos (Fig. 4 e 5). Os enxertos utilizados em todos os casos clínicos foram submetidos a um processo de congelação rápida (-80° C) e tratados com DMSO. Muito embora a etiologia das situações tratadas não fosse a mais favorável (necrose pós-traumática da cabeça femoral, necrose do côndilo femoral e gonartrose unicompartimental), a causa maior do insucesso das transplantações deveu-se, certamente, à pequena percentagem de condrócitos viáveis que sobreviveram ao processo de congelação, que, nas condições utilizadas, foi provavelmente muito baixa ou mesmo nula, apesar do uso do DMSO (77).

De modo semelhante, os enxertos osteocartilagíneos maciços usados em reconstruções de ressecções tumorais alargadas mostraram, ao longo do tempo, um processo de degradação cartilagínea, muito embora tenham, no início, desempenhado a biofuncionalidade requerida. A questão é que não resistiram à prova do tempo (Fig. 6). A degradação da cartilagem foi muito mais notória nos enxertos usados nas reconstruções dos membros inferiores. Por isso, recomendam-se, sempre que tal for possível, aloenxertos osteoarticulares nas reconstruções do membro superior (úmero) e enxertos compostos (prótese metálica + enxerto) na cirurgia reconstrutiva das articulações de carga.

Criopreservação da cartilagem articular e viabilidade condrocitária

A investigação na área da criobiologia tem procurado desenvolver novas metodologias que maximizem a sobrevivência dos condrócitos, durante e após a criopreservação da cartilagem articular, de modo a que os Bancos de Tecidos possam disponibilizar aloenxertos de melhor qualidade que permitam otimizar o desempenho clínico.

Os métodos de conservação da cartilagem incluem a refrigeração (4° C), e a congelação profunda/criopreservação (a - 80° C e em azoto líquido até - 196° C).



Figura 4. Aloenxerto osteocartilágneo de recobrimento total do côndilo femoral e do prato tibial medial. a) gonartrose unicompartmental. b) preparação do enxerto. c) RX pós-operatório. d) Deterioração acentuada do enxerto aos dois anos e meio de evolução pós-operatória.

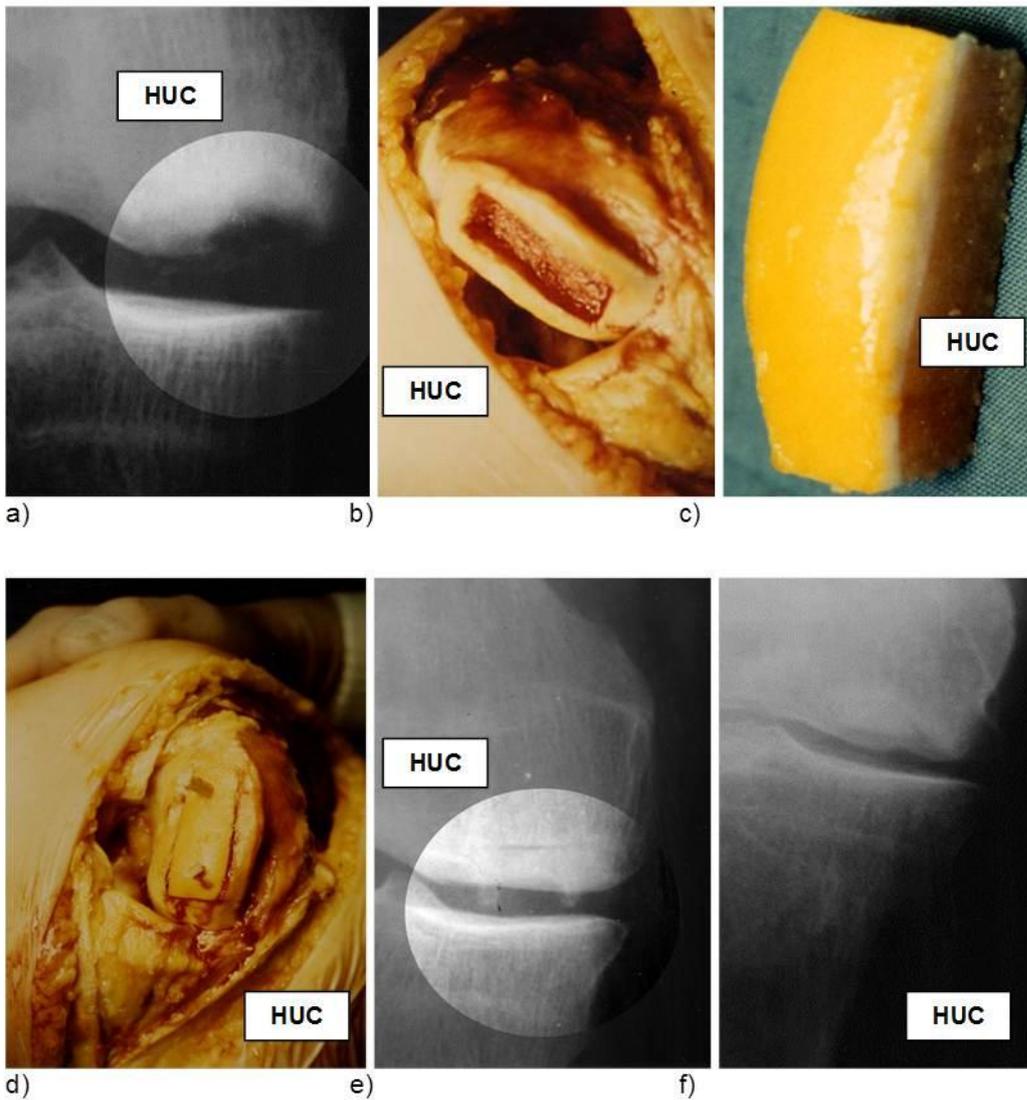


Figura 5. a) Necrose asséptica do côndilo femoral medial. b) Imagem peri-operatória onde se pode observar o defeito osteocartilagíneo a reconstruir. c) Aspecto do aloenxerto após a descongelação e tratamento com rifampicina. d) Aloenxerto *in situ*, fixação com palitos ósseos. e) Exame radiológico do pós-operatório. f) Aos cinco anos de evolução preenchimento da lesão, com um modesto resultado clínico.

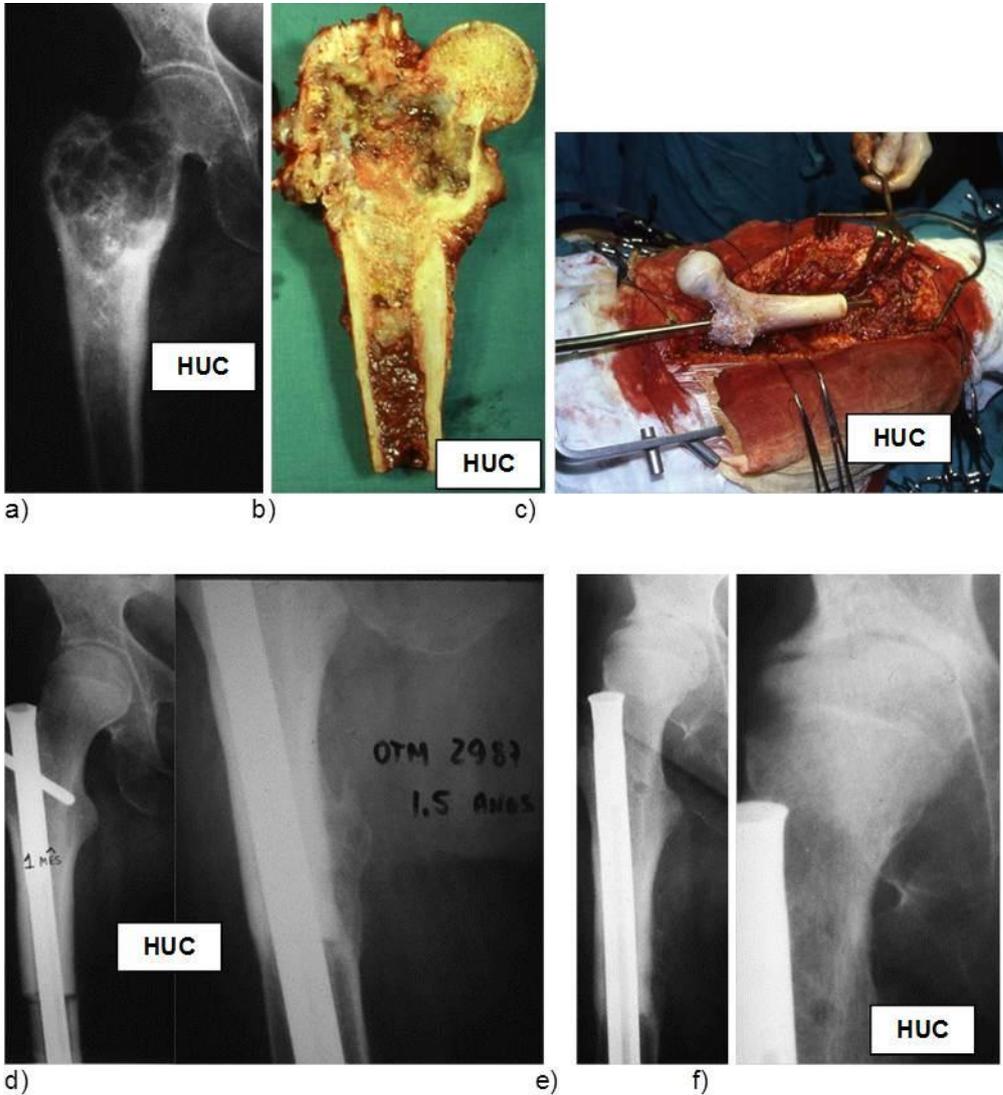


Figura 6. Condrossarcoma da extremidade proximal do fêmur. a) Rx pré-operatório. b) Peça de excisão tumoral. c) Imagem per-operatório onde se pode observar o aloenxerto osteocartilágíneo maciço usado na reconstrução da perda de substância. d) Imagem radiológica com um mês de evolução e aos dezoito meses de evolução: consolidação óssea na junção entre o enxerto e o fêmur do doente. e) e f) Aos 2 anos e 6 meses de evolução observa-se acentuada degenerescência da cartilagem articular do aloenxerto.

Como referido acima, a refrigeração é um método efectivo durante apenas algumas semanas (41,62), por isso, existe necessariamente uma limitação no número de enxertos disponíveis para aplicação clínica.

A criopreservação em cubas de azoto líquido, por seu turno, método que usamos no Banco de Tecidos dos HUC, permite conservar a uma temperatura constante, que pode atingir os -196°C , qualquer tipo de enxerto do aparelho locomotor, independentemente da forma e dimensão, por um tempo prolongado, em teoria indefinidamente. Isto é possível porque a criopreservação, assim como a vitrificação, suprime todas as reacções químicas e todos os fenómenos de desintegração cadavérica.

Quanto à metodologia usada na criopreservação, vários estudos avaliaram, em diferentes espécies, a influência sobre a viabilidade dos condrócitos articulares das curvas de descida de temperatura no processo de congelação, o efeito da descongelação e, ainda, o tipo e concentração do agente crioprotector (35,55,65,70,74).

Um máximo de 20% a 30% de condrócitos articulares que sobreviveram à criopreservação, usando crioprotectores, foi referido em muitos trabalhos, incluindo os nossos (19,56,65,74), enquanto outros dão conta de uma ausência de condrócitos viáveis na cartilagem articular que não foi submetida à acção de agentes crioprotectores. (16).

Por sua vez, Muldrew e colaboradores (70) descreveram a recuperação de aproximadamente 60% de condrócitos viáveis em peças osteocartilagíneas ovinas de pequenas dimensões, usando um curva de descida de temperatura programada no processo de criopreservação. No entanto, quando esse mesmo protocolo foi aplicado à cartilagem articular de origem humana, a percentagem de recuperação de condrócitos viáveis foi muito pequena, indicando que a cartilagem humana pode ser, inerentemente, mais difícil de criopreservar (55).

Uma possível explicação para estes diferentes tipos de comportamento biológico pode ter a ver com o processo de difusão dos agentes crioprotectores na cartilagem articular, que difere entre as diferentes espécies. Com efeito, a capacidade do agente crioprotector para se difundir através de toda a espessura de cartilagem, tem sido apontada como o factor crítico para a protecção efectiva dos condrócitos de danos causados pela congelação/dcongelação da cartilagem articular (14,71).

Mais, as mesmas condições que asseguram uma crioprotecção aceitável em pequenas peças osteocartilagíneas, podem não ser eficazes em peças osteocartilagíneas com grande volume. A maior parte dos estudos experimentais sobre os efeitos da criopreservação na composição e funções da cartilagem,

nomeadamente na viabilidade dos condrócitos, descritos na literatura, usaram como modelo experimental pequenas peças osteocartilagíneas cilíndricas. Porém e designadamente em estudos que visam avaliar a eficácia de diversos compostos como agentes crioprotectores, aquele modelo apresenta limitações que condicionam a transposição e aplicação da informação resultante à conservação das peças osteocartilagíneas de grandes dimensões que são efectivamente processadas e armazenadas nos Bancos de Tecidos. De facto, a pequena dimensão daqueles cilindros representa um obstáculo relativamente pequeno à difusão e penetração do agente crioprotector em toda a espessura da cartilagem, ao contrário das peças osteocartilagíneas para utilização clínica, cujo grande volume e área relativamente pequena dificultam consideravelmente a difusão e, conseqüentemente, a acção dos agentes crioprotectores. Mais ainda, nesses estudos, o processo de congelação decorreu com os cilindros osteocartilagíneos completamente imersos na solução crioprotectora. Ora, essa metodologia não é exequível com peças de grandes dimensões como as utilizadas clinicamente.

A este propósito, atente-se, por exemplo, nos aloenxertos criopreservados aplicados na reconstrução cirúrgica de perdas de substância osteocartilagínea de origem traumática, degenerativa ou tumoral, que podem ser de grandes dimensões, como é o caso da transplantação de um prato tibial ou de parte de um côndilo femoral, das transplantações do fémur proximal e distal, do úmero proximal ou mesmo de uma articulação completa do joelho, consoante o cenário clínico.

Por outro lado, a maioria dos estudos experimentais foi efectuada em peças osteocartilagíneas de animais de várias espécies, cujos resultados são difíceis de extrapolar, de forma linear, para tecidos de origem humana, pelas razões apontadas anteriormente.

De tudo isto e apesar da importância dos estudos referidos, ressalta a inexistência de outros estudos que permitam transpor as metodologias testadas experimentalmente para a prática clínica nos Bancos de Tecidos. Mais ainda, continua a não existir um método que garanta uma protecção adequada dos condrócitos na cartilagem e, como tal, permita a recuperação de uma percentagem de células viáveis e funcionais que assegure a perenidade dos aloenxertos transplantados.

Embora permita recuperar um maior número de condrócitos vivos, a utilização de crioprotectores está ainda longe de originar a protecção completa e eficaz de todos os condrócitos presentes na cartilagem articular, o que compromete significativamente o desempenho clínico a médio ou a longo termo dos aloenxertos osteocartilagíneos criopreservados. Para tal contribui, pelo menos em parte, a toxicidade inerente a todos os crioprotectores correntemente utilizados que condiciona as condições em

que podem ser usados, nomeadamente quanto à sua concentração, temperatura e duração da exposição.

Tendo em conta a pouca eficácia dos agentes crioprotectores actuais, torna-se importante identificar novos compostos com propriedades crioprotectoras e menor toxicidade que permitam aumentar a eficácia da criopreservação, isto é, assegurar a sobrevivência do maior número possível de condrócitos, não só durante o período de criopreservação dos enxertos osteocartilagíneos de origem humana, como após o processo de descongelação, de modo a alcançar-se o melhor resultado clínico.

Dentro deste contexto, a combinação de um agente crioprotector como a arbutina, uma hidroquinona glicosilada de origem natural que se encontra em concentrações elevadas em plantas resistentes ao frio e à seca, com meios mecânicos capazes de exercer uma pressão adequada poderá ser a chave para se alcançar aquele objectivo. De salientar que a arbutina parece ser um agente crioprotector efectivo para os aloenxertos osteocartilagíneos humanos, com potenciais benefícios em relação ao DMSO e ao glicerol (56,80). Se assim for, a percentagem de condrócitos vivos após o processo de descongelação da cartilagem criopreservada será com certeza mais significativa, e poderá assegurar a eficácia clínica, a médio e longo prazos, dos aloenxertos osteocartilagíneos criopreservados.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad CS, Cohen ZA, Levine WN, et al. Biomechanical and topographic consideration for autologous osteochondral grafting in the knee. *Am J Sports Med.* 2001; 29:201–6.
2. Aho AJ, Eskola J, Ekfors T, et al. Immune response and clinical outcome of massive human osteoarticular allografts. *Clin Orthop.* 1998;346:196-206.
3. Aho AJ, Hirn M, Aro HT, et al. Bank bone sevice in Finland. *Acta Orthop Scand.* 1998;69:559-65.
4. Almqvist KF, Wang L, Broddelez C, Veys EM, Verbruggen G. Biological freezing of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9: 341-50.
5. Amiel D, Harwood FL, Hoover JA, et al. A histological and biomechanical assessment of the articular cartilage matrix obtained from in vitro storage of osteochondral allografts. *Connect Tissue Res.* 1989;23:89-99.
6. Ball ST, Amiel D, Williams SK, Tontz W, Chen AC, Sah RL, Bugbee WD. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. *Clin Orthop.* 2004;418:246–52.
7. Bartz RL, Kamaric E, Noble PC, et al. Topographic matching of selected donor and recipient sites for osteochondral autografting of the articular surface of the femoral condyles. *Am J Sports Med.* 2001;29:207–12.
8. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop.* 2000;371:10-27.
9. Bentley G, Manktelow ARJ. Repair of articular cartilage defects in the knee. In: *Surgical Techniques in Orthopaedics and Traumatology.* Editions Scientifique et Médicales Elsevier (SAS) Paris; 2001. 55-590-C-10, 9p.
10. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331:889–95.
11. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *AAOS Instrum Course Lect.* 1998;47:487-504.
12. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop.* 2002;42:21-37.
13. Bugbee WD. Fresh osteochondral allografting. *Op Tech Sports Med.* 2000;8:158-162.
14. Carsi B, Lopez-Lacomba JL, Sanz J, Marco F, Lopez-Duran L. Cryopreservative permeation through human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12: 787 92.
15. Carter TR. Osteochondral allografts. *Techniques in Knee Surgery.* 2005;4(1):2-11.
16. Chu CR, Convery FR, Akeson WH, et al. Articular cartilage transplantation: Clinical results in the knee. *Clin Orthop.* 1999;360:159-68.
17. Clarke C.C, Tolin B.S., Brighton C.T. The effect of oxygen tension on proteoglycan synthesis and aggregation in mammalian growth plate chondrocytes. *J Orthoped Res.* 1991; 9: 477 84.

18. Convery FR, Akesson WH, Amiel D, et al. Long-term survival of chondrocytes in an osteochondral articular cartilage allograft. *J Bone Joint Surg Am.* 1996;78:1082-8.
19. Csöngé L, Bravo D, Newman-Gage H, Rigley T, Conrad EU, Bakay A, Strong DM, Pellet S. Banking of osteochondral allografts, part II. Preservation of chondrocyte viability during long-term storage. *Cell Tissue Banking.* 2002;3:161-8.
20. Curl WW, Krome J, Gordon ES, et al. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy.* 1997;13:456-60.
21. Delloy Ch. Current situation and future of tissue banking in orthopaedics. In: *Post Graduate Lectures - EFFORT 1*, Masson Ed. 1993. p.161-172.
22. Enneking WF, Mindell ER. Observations on massive retrieved human allografts. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1991;73:1123-42.
23. Espregueira-Mendes, Monteiro A, Amado P, Silva MV. Lesões cartilagíneas. In: *O Joelho*. Ed Lidel. 2006. p. 101-21.
24. Evans NA, Jackson DW, Simon TM. MRI and histologic evaluation of two cases of osteochondral autograft transplantation procedures. *J Knee Surg.* 2005;18:43-8.
25. Federico DJ, Lynch JK, Jokl P. Osteochondritis dissecans of the knee: a historical review of etiology and treatment. *Arthroscopy.* 1990;6(3):190-7.
26. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology.* 2002;39:237-46.
27. Fitzpatrick PL, Morgan DA. Fresh osteochondral allografts: a 6-10 year review. *Aust NZ Surg.* 1998;68:573-9.
28. Fonseca F. Artrose. In: *O Joelho*. Ed Lidel; 2006. p. 273-99.
29. Frenkel SR, Kubiak EN, Truncala KG. The repair response to osteochondral implant types in a rabbit model. *Cell Tissue Bank.* 2006;7:29-37.
30. Friedlaender GE, Horowitz MC. Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics.* 1992;15:1171-5
31. Friedlaender GE. Bone banking in revision surgery. *Total Hip Revision Surgery*. Ed. Raven Press, Ltd, New York; 1995. p.189-95.
32. Garrett JC. Fresh osteochondral allografts for treatment of articular cartilage defects in osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle in adults. *Clin Orthop.* 1994;303:33-7.
33. Garrett JC. Osteochondral allografts for reconstruction of articular defects of the knee. *AAOS Inst Course Lect.* 1998;47:517-22.
34. Ghazavi MT, Prizker KP, Davis AM, et al. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79:1008-13.
35. Gole MD, Poulsen D, Marzo JM, Ko S-H, Ziv I. Chondrocyte viability in press-fit cryopreserved osteochondral allografts. *J Orthop Res.* 2004;22:781-7.
36. Gortz S, Bugbee WD. Allografts in articular cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88-A(6):1374-84.

37. Gross AE, Beaver RJ, Mohammed MN. Fresh small fragment osteochondral allografts used for post-traumatic defects in the knee joint. In: Finerman GAM, Noyes FR, eds. *Biology and Biomechanics of the Traumatized Synovial Joint: The Knee as a Model*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1992. p 123-141.
38. Gross AE, Shasha N, Aubin P. Long-term followup of the use of fresh osteochondral allografts for post-traumatic knee defects. *Clin Orthop*. 2005;435:79-87.
39. Gross AE. Cartilage resurfacing, filling defects. *J Arthroplasty*. 2003;18(suppl 1):14-7.
40. Gross AE. Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1974;56:297-304.
41. Guan J, Urban JP, Li ZH, Ferguson DJ, Gong CY, Cui ZF. Effects of rapid cooling on articular cartilage. *Cryobiology*. 2006;52:430-9.
42. Guidelines for preventing transmission of human immunodeficiency virus through transplantation of human tissue and organs. *Morbidity and mortality weekly report - MMWR*. 1994. Vol. 43/ n° RR-8.
43. Hangody L - Medium term results of the clinical practice of the autologous osteochondral mosaicplasty. *Proceedings of International Cartilage Repair Society, 2nd Symposium*. Boston (USA), 16-19th; November 1998.
44. Hangody L, Fules P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85:25-32.
45. Hangody L, Kish G, Karpati Z, et al. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopaedics*. 1998;21:751-6.
46. Häuselmann HJ, Flechtenmacher J, Michal L, Thonar EJ-MA, Shinmei M, Kuettner KE, Aydelotte MB. The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers. *Arthritis Rheum*. 1996; 39: 478-88.
47. He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA. Synthesis of interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol*. 2002; 29: 546-53.
48. Hirn MYJ, Krusius T. Retesting of bone donors 2 months after donation guarantees sufficient safety of bone allografts. *Acta Orthop Scand*. 1998;69:566-9.
49. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 2002;18:730-4.
50. Ishii H, Tanaka H, Katoh K, Nakamura H, Nagashima M, Yoshino S. Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2 cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:277-81.
51. Jackson DW. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthros*. 2006;14:146-54.
52. Jakob M, Démarteau O, Schäfer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human

- articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem.* 2001;81:368-77.
53. Jakobsen RB, Engebretsen L, Slauterbeck JR. An analysis of the quality of cartilage repair studies. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87:2232-9.
 54. Jamali AA, Hatcher SI, You Z. Donor cell survival in a fresh osteochondral allograft at twenty-nine years. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:166-9.
 55. Jomha NM, Lavoie G, Muldrew K, Schachar NS, McGann LE. Cryopreservation of intact human articular cartilage. *J Orthop Res.* 2002;20:1253-5.
 56. Judas F, Rosa S, Teixeira L, Lopes C, Mendes AF. Chondrocyte viability in fresh and frozen large human osteochondral allografts: effect of cryoprotective agents. *Transplantation Proceedings.* 2007;29: 2631-2534.
 57. Judas F, Teixeira L, Proença A. Coimbra University Hospitals Bone and Tissue Bank: 22 Years of experience. *Transplantation Proceedings.* 2005;37:2799-801.
 58. Judas F. Contribuição para o estudo de enxertos ósseos granulados alógenos e de biomateriais. Tese de Doutoramento. Coimbra, 2002.
 59. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A:455-64.
 60. Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop.* 2001;391 (suppl): S108-S115.
 61. Malda J, Kreijveld E, Temenoff JS, van Blitterswijk CA, Riesle J. Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation. *Biomaterials.* 2003;24:5153-61.
 62. Malinin T, Temple HT, Buck BE. Transplantation of osteochondral allografts after cold storage. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88:762-70.
 63. Mankin HJ, Fogelson FS, Thrasher AZ. Massive resection an allograft replacement in treatment of malignant bone tumors. *N Engl J Med.* 1976;294:1247-55.
 64. Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, et al. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumours. *Clin Orthop.* 1996;324:86-97.
 65. Marco F, Lopez-Oliva F, Fernandez-Arroyo JM, et al. Osteochondral allografts for osteochondritis dissecans and osteonecrosis of the femoral condyles. *Int Orthop.* 1993;17:104-8.
 66. Maury AC, Safir O, Las Heras F, et al. Twenty-five-year chondrocyte viability in fresh osteochondral allograft. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:166-9.
 67. McGoveran BM, Pritzker KP, Shasha N, et al. Long-term chondrocyte viability in a fresh osteochondral allograft. *J Knee Surg.* 2002;15:97-100.
 68. Minas T, Gomoll AH. New frontiers in surgery of osteoarthritis. In: Roland W Moskowitz et al, editors. *Osteoarthritis, diagnosis and medical/surgical management.* Wolters Kluwer/ Lippincott, Williams & Wilkins; 2007. p. 453-9.
 69. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.* *BioEssays.* 1995; 17: 1039 48

70. Muldrew K, Novak K, Studholme C, Wohl G, Zernicke R, Schachar NS, McGann LE. Transplantation of articular cartilage following a step-cooling cryopreservation protocol. *Cryobiology*. 2001;43:260-7.
71. Muldrew K, Novak K, Yang H, Zernicke R, Schachar NS, McGann LE. Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes. *Cryobiology*. 2000;40:102-9.
72. Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM, Pörtner R. Cultivation of three-dimensional cartilage-carrier-constructs under reduced oxygen tension. *J Biotechnol*. 2006;121:486-97.
73. Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, et al. Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg Am*. 1980;62:687-95.
74. Ohlendorf C, Tomford WW, Mankin HJ. Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res*. 1996;14:413-6.
75. Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two - to 9 -year outcome after autologous chondrocyte transplantation on the knee. *Clin Orthop*. 2000;374:212–34.
76. Poitout DG, Gorce N. Banque d'os: aspects techniques de préparation et de conservation des allogreffes articulaires. Table Ronde du GESTO 1997. *Rev Chir Orthop*. 1998;84:35-63.
77. Proença A. Transplantações ósseas e osteocartilagíneas alógenas. Tese de Doutorado. Coimbra, 1990.
78. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. In: *MMWR* 47, nº RR-19, CDC, 1998.
79. Richter W. Cell-based cartilage repair: illusion or solution for osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19:451-6.
80. Rosa SC, Gonçalves J, Judas F, Lopes C, Mendes AF . Assessment of strategies to increase chondrocyte viability in cryopreserved human osteochondral allografts: evaluation of the glycosylated hydroquinone, arbutin. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Dec;17(12):1657-61.
81. Sammarco VJ, Gorab R, Miller R, et al. Human articular cartilage store in cell culture medium: Guidelines for storage of fresh osteochondral allografts. *Orthopedics*. 1997;20:497-500.
82. Sgaglione N, Miniaci A, Gilogly S, et al. Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy*. 2002;18:9-32.
83. Shelton WR, Treacy SH, Dukes AD, et al. Use of allografts in reconstruction: I. Basic science aspects and current status. *J Am Acad Orthop Surg*. 1998;6:165-8.
84. Simon TM, Jackson DW. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthros*. 2006;14:146-54.
85. Twyman RS, Desai K. Osteochondritis dissecans of the knee: a long-term study. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73-B: 6461-64.

86. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, et al. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Sur* 2003;11:421-30.
87. Vangsness CT Jr, 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;31:474-81.
88. Vastel L, Lemerrier V, Kerboull L, Kerboull M. Fonctionnement d'une banque de tissus osseux en 1998. *Rev Chir Orthop.* 1999;82:458-65.
89. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:199-206.
90. Wayne JS, Amiel D, Kwan MK. Long-term storage effects on canine osteochondral allografts. *Acad Orthop Scand.* 1990;61:539-45.
91. Weinand C, Peretti GM, Adams Jr SB, Randolph MA, Savvidis E, Gill TJ. Healing potential of transplanted allogeneic chondrocytes of three different sources in lesions of the avascular zone of the meniscus: a pilot study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2006;126:599-605.
92. Williams RJ, Dreese JC, Chih-Tung C, et al. Chondrocyte survival and material properties of hypothermically stored cartilage: An evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation. *Am J Sports Med.* 2004;32:132-9.
93. Williams SK, Amiel D, Ball ST, et al. Prolonged storage effects on the articular cartilage of fresh human osteochondral allografts. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85A:2111-20.