

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD  
**Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético**

**CAPTAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE DISCO INTERVERTEBRAL HUMANO EM  
BANCO DE TECIDOS**

Luis Antônio Medeiros Moliterno

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar

Rio de Janeiro  
Março  
2019

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD  
**Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético**

**CAPTAÇÃO E PRESERVAÇÃO DE DISCO INTERVERTEBRAL HUMANO EM  
BANCO DE TECIDOS**

Luis Antônio Medeiros Moliterno

**Banca examinadora:**

Dr. João Antônio Matheus Guimarães (INTO)

Dr. Arnon Dias Jurberg (Fiocruz)

Dr. Claudio Gustavo Stefanoff (INCA)

Dra. Maria Eugênia Leite Duarte (INTO) - Suplente

Dra. Verônica Aran Ponte (INTO) - Revisora

Rio de Janeiro  
Março  
2019

*“Aos meus filhos Luis e Miguel, minha esposa Roberta, meus pais e irmãos e, especialmente, ao meu avô Antonio que criou os alicerces para que eu chegasse até aqui.”*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar por me guiar de forma ética, comprometida e incansável nesta obra.

Ao meu amigo e exemplar profissional Rafael Augusto Dantas Prinz e equipe multidisciplinar da área de transplantes multitecidos do instituto.

À profa. Dr<sup>a</sup> Maria Eugênia Duarte pelo fundamental suporte no desenvolvimento da pesquisa.

A todos os professores que permitiram alcançar meus objetivos.

Ao Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, local que escolhi para meu crescimento profissional.

**“Sonhos determinam o que você quer.  
Ação determina o que você conquista.”**

**Aldo Novak**

## RESUMO

---

MOLITERNO, Luis A. Captação e preservação de disco intervertebral humano em banco de tecidos. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Ministério da Saúde, 2019.

Doença degenerativa da coluna vertebral, sobretudo, o acometimento do disco intervertebral, é frequente na população mundial. O tratamento cirúrgico apresenta indicações precisas constituindo o padrão-ouro, a artrodese. Esta modalidade, entretanto, altera a mobilidade e a biomecânica do segmento funcional. A criopreservação de disco intervertebral em banco de tecidos e sua posterior utilização como substituto do disco degenerado objetivam manter a fisiologia local. Propor técnica cirúrgica de ressecção de bloco de coluna lombar e avaliar a possibilidade da manutenção das características histológicas dos discos intervertebrais submetidos ao congelamento com criopreservante. Foram obtidos espécimes de 6 doadores cadáveres humanos após avaliação e autorização de captação de tecido musculoesquelético de acordo com as normas do Sistema Nacional de Transplantes por meio da Portaria nº 2600 de 21 de outubro de 2009 do Ministério da Saúde. Após a realização de uma técnica de ressecção no bloco da coluna lombar, o material foi transportado para o banco de tecidos do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad em um recipiente específico com soro fisiológico 0,9% à temperatura de 4°C. Cada bloco de coluna lombar gerou, após o processamento do tecido realizado até 8 horas da captação, 3 discos intervertebrais. Dois discos foram armazenados em meio crioprotetor e congelados de forma gradual até -80°C. Cada disco foi descongelado no 7º e 15º dia, seccionados longitudinal e transversalmente e então, confeccionadas lâminas coradas com hematoxilina-eosina para análise histológica; Um disco controle, não-congelado, foi preservado em formol 10% e sofreu o mesmo processo de secção e preparo de lâminas, coloração. O estudo histológico das lâminas observou a presença ou não de alterações morfo-estruturais (ânulo fibroso, núcleo pulposo) e celularidade, pontuada e classificada em muito alterada (0-3 pontos), moderadamente alterada (4-7 pontos) e inalterada (8-10 pontos). A técnica cirúrgica de ressecção *en bloc* da coluna vertebral foi reproduzida em todos os doadores cadáveres. A análise histológica revelou que poucas alterações foram observadas após 7 dias de congelamento do disco em meio criopreservante. Observamos que, embora tecnicamente demandante, a ressecção de bloco de coluna lombar é reprodutível. A preservação das propriedades do disco intervertebral por, no mínimo, 7 dias é possível e torna-se uma possibilidade de material para transplantação em futuras artroplastias biológicas.

**Palavras-Chave:** Disco intervertebral; Criopreservação; Transplante.

## ABSTRACT

---

*MOLITERNO*, Luis A. Capture and preservation of human intervertebral disc in a tissue bank. Rio de Janeiro, 2019. Master Thesis (Master's Degree in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) National Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ministry of Health, 2019.

Degenerative disease of the vertebral column, especially the involvement of the intervertebral disc, is frequent in the world population. The surgical treatment presents precise indications constituting the gold standard, the arthrodesis. This modality, however, alters the mobility and biomechanics of the functional segment. The cryopreservation of intervertebral disc in a tissue bank and its posterior use as a substitute for the degenerate disc aim to maintain the local physiology. To propose surgical technique of lumbar spine block resection and to evaluate the possibility of maintaining the histological characteristics of the intervertebral discs submitted to the freezing with cryopreservant. Specimens of 6 human cadaveric donors were obtained after evaluation and authorization of the capture of musculo-skeletal tissue in accordance with the norms of the National System of Transplants through Ordinance No. 2600 of October 21, 2009 of the Ministry of Health. After performing a resection technique in the lumbar spine block, the material was transported to the tissue bank of Jamil Haddad National Institute of Traumatology and Orthopedics in a specific container with 0.9% saline solution at 4 ° C. Each lumbar spine block generated, after processing the tissue performed up to 8 hours of the capture, 3 intervertebral discs. Two discs were stored in cryopreservation and frozen gradually to -80 ° C. Each disc was thawed on day 7 and day 15, sectioned longitudinally and transversely, and then, blades stained with hematoxylin-eosin for histological analysis; One disc control, non-frozen, was preserved in 10% formaldehyde and underwent the same process of sectioning and preparation of blades staining. The histological study of the slides observed the presence or absence of morphostructural alterations (fibrous annulus, nucleus pulposus) and cellularity, scored and classified as highly altered (0-3 points), moderately altered (4-7 points) and unchanged (8-10 points). The surgical technique of *en bloc* resection of the spine was reproduced in all cadaveric donors. Histological analysis revealed that few changes were observed after 7 days of cryopreservant disk freezing. We observed that, although technically demanding, lumbar spine block resection is reproducible. The preservation of the intervertebral disc properties for at least 7 days is possible and becomes a possibility of material for transplantation in future biological arthroplasties.

**Key words:** Intervertebral disc;Criopreservation;Transplantation.

## SUMÁRIO

---

RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
SUMÁRIO .....	IX
LISTA DE SIGLAS E ABRAVIATURAS .....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE TABELAS .....	XIV
LISTA DE GRÁFICOS .....	XV
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 A coluna vertebral .....	16
1.2 Curvaturas da coluna vertebral .....	18
1.3 Vértebras .....	19
1.4 Ligamentos da coluna vertebral .....	23
1.5 Disco intervertebral .....	25
1.5.1 Ânulo fibroso .....	28
1.5.2 Núcleo pulposo .....	29
1.5.3 Placas terminais .....	29
1.5.4 Vascularização e inervação .....	30
1.6 Morfofisiologia do disco intervertebral .....	30
1.7 Doença degenerativa vertebral .....	34
1.8 Tratamento da doença degenerativa discal .....	35
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>40</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
4.1 Seleção do doador cadáver .....	42
4.2 Equipe de captação .....	43
4.3 Fluxograma do protocolo de captação e processamento ..	43
4.4 Técnica de captação .....	44
4.5 Material necessário para ressecção do bloco de coluna lombar .....	49
4.6 Embalagem do tecido captado .....	50
4.7 Transporte do tecido .....	50
4.8 Processamento do tecido .....	50
4.9 Material específico .....	50
4.10 Peças geradas .....	51
4.11 Preparação do tecido processado para confecção dos cortes histológicos .....	52
4.12 Preparo da amostra para estudo da histologia .....	55
4.12.1 Fixação e parafinização .....	55
4.12.2 Desparafinização e hidratação .....	55

4.12.3 Coloração das lâminas com Hematoxilina.....	56
4.13 Método de avaliação dos cortes histológicos .....	56
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
5.1 Dados epidemiológicos.....	59
5.2 Execução da técnica cirúrgica proposta no doador cadáver .....	60
5.3 Análise das lâminas do disco Intervertebral .....	69
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>89</b>
ANEXO A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 220, DE 27 DE Dezembro de 2006 .....	89
ANEXO B PORTARIA Nº 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009 .....	91
ANEXO C FOLHA DE ROSTO PLATAFORMA BRASIL .....	94
ANEXO D Definição de sala limpa .....	96
ANEXO E Composição do meio Iscove's (Modified Dulbecco's Medium) .....	97
ANEXO F Rotina de captação de tecidos de doador cadáver .....	98

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

ATMIT	Área de Transplante multitecidos
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BMT	Banco Multitecidos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLP	Complexo Ligamentar Posterior
DC	Doador Cadáver
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Doença do Nível Adjacente
EZ	Elastic Zone (Zona Elástica)
F	Feminino
H&E	Hematoxilina-Eosina
HE	Hospital Estadual
HF	Hospital Federal
HM	Hospital Municipal
HP	Hospital Privado
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
LCS	Linha Centro Sacral
LLA	Ligamento Longitudinal Anterior
LLP	Ligamento Longitudinal Posterior
M	Masculino
ME	Morte Encefálica
NZ	Neutral Zone (Zona Neutra)
PCR	Parada Cardiorespiratória
ROM	Range of Motion (Arco de Movimento)
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
UFV	Unidade Funcional Vertebral

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Estrutura anatômica da coluna .....	17
Figura 2. Estrutura anatômica De uma vértebra .....	20
Figura 3. Anatomia da vértebra.....	21
Figura 4. Estrutura anatômica do sacro e cóccix .....	22
Figura 5. Ligamentos da coluna vertebral.....	24
Figura 6. Disco intervertebral .....	25
Figura 7. Forças que atuam sobre o disco intervertebral .....	26
Figura 8. Características anatômicas do disco intervertebral .....	27
Figura 9. Curva carga/deformação em tecidos biológicos.....	32
Figura 10. Equilíbrio espino-pélvico .....	33
Figura 11. Radiografia da coluna vertebral lombar instrumentada .....	36
Figura 12. Logística do protocolo de captação, transporte e processamento do bloco de coluna .....	43
Figura 13. Acesso à cavidade abdominal.....	45
Figura 14. Desinserção do músculo psoas maior bilateral .....	46
Figura 15. Plexo lombar.....	47
Figura 16. Identificação do ponto da osteotomia.....	48
Figura 17. Locais da discectomia .....	49
Figura 18. Disco intervertebral embalado e conservado em solução criopreservante .....	52
Figura 19. Disco intervertebral seccionado onde podemos identificar as placas terminais superior e inferior, ânulo fibroso e núcleo pulposo .....	53
Figura 20. Fotografia do frasco de acondicionamento da amostra antes da criopreservação .....	54
Figura 21. Incisão prévia à cavidade abdominal utilizada para o acesso ..	61
Figura 22. Cavidade abdominal exposta .....	62
Figura 23. Identificada a coluna lombar e o músculo psoas maior .....	63
Figura 24. Músculo psoas maior é dissecado e são removidas suas inserções na coluna lombar até a visualização do plexo lombar .....	64
Figura 25. Anatomia do plexo neural.....	64

<b>Figura 26. Ostetomia do processo transverso e pedículo com motor elétrico e serra sagital na base dos processos transversos na confluência do pedículo e o corpo vertebral .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 27. Dissectomia do disco vertebral .....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 28. Bloco da coluna vertebral livre .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 29. Coluna vertebral dissecada .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 30. Histologia do ânulo fibroso (A, B e C) e núcleo pulposo (A`, B` e C`) nos grupos controle (A), após 7e 14 dias (B e C) de congelamento ...</b>	<b>73</b>

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1. Pontuação atribuída de acordo com a presença ou ausência de alterações morfo-estruturais à análise histológica dos discos intervertebrais .....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 2. Achados à análise microscópica dos discos intervertebrais que definem a presença ou ausência de alterações histológicas .....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 3. Perfil epidemiológico dos doadores cadáveres.....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1. Morfologia e estrutura da matriz do ânulo fibroso .....	70
Gráfico 2. Morfologia e estrutura da matriz do núcleo pulposo .....	71
Gráfico 3. Celularidade do ânulo fibroso .....	72
Gráfico 4. Celularidade do núcleo pulposo.....	72

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

M725c Moliterno, Luis Antônio Medeiros.  
Captação e preservação de disco intervertebral humano em banco de  
tecidos / Luis Antônio Medeiros Moliterno. — 2019.  
113f.

Orientador: Diego Pinheiro Aguiar.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema  
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia  
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2019.

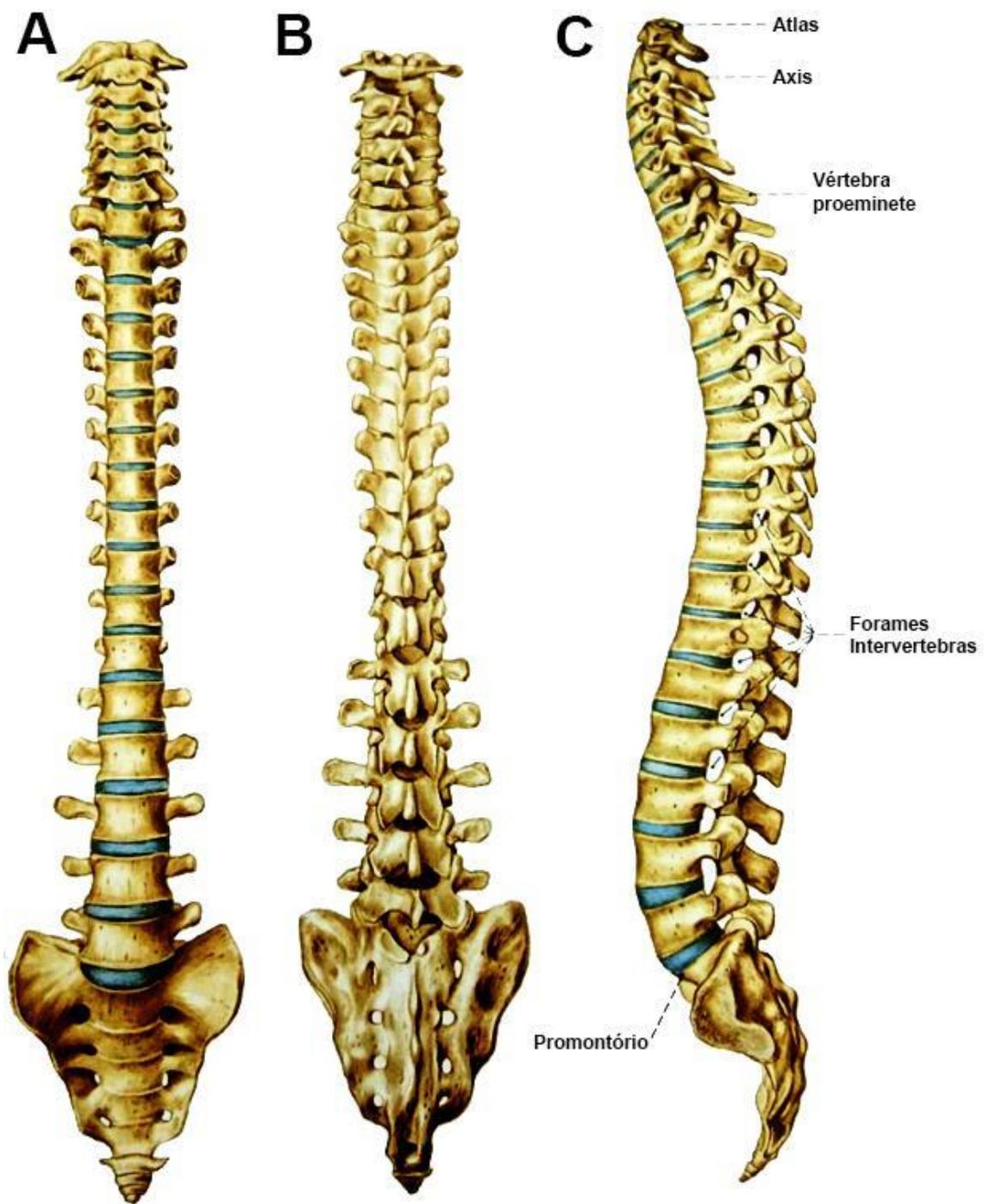
1. Disco intervertebral. 2. Criopreservação. 3. Transplante. 4.  
Ortopedia. I. Aguiar, Diego Pinheiro, orient. II. Título.

NLM WE 725

## 1. Introdução

### 1.1 A coluna vertebral

A coluna vertebral é o principal constituinte do esqueleto axial. É formada por vértebras que, conectadas, funcionam como um importante eixo de sustentação e ao mesmo tempo apresenta flexibilidade relativa de forma a garantir mobilidade (MOORE, 2014). A coluna vertebral tem como função a sustentação, manutenção da postura, locomoção e proteção de estruturas neurais. Constituída por 33 vértebras distribuídas nas regiões cervical, torácica, lombar, sacral e coccígea que relacionam entre si através dos discos intervertebrais anteriormente e articulações zigoapofisárias e ligamentos, posteriormente. A exceção ocorre nos segmentos sacral e coccígeo onde são fundidas e, portanto, não realizam movimento (VACCARO, 2007). A coluna cervical em humanos é composta de 7 vértebras cervicais ( C1 a C7 ) e é subdivida em região cervical alta (C1-C2) e subaxial (C3-C7). A porção torácica ou dorsal da coluna vertebral é formada por 12 vértebras (T1-T12) em suas regiões alta (T1-T4), média (T4-T8) e baixa (T8-T12). A porção dorsal da coluna vertebral possui a característica de estar conectada ao tórax através das costelas e cartilagens costais o que diminui seu arco de movimento. A coluna lombar consiste em 5 vértebras (L1-L5) e tem em sua região distal nos níveis L4-L5, L5-S1 seu centro de rotação. O sacro e o cóccix são porções da coluna vertebral compostas, cada uma, de 5 vértebras (4-5 cóccix), fundidas (MOORE, 2014) (**Figura 1**).



**Figura 1. Estrutura anatômica da coluna.** Vista anterior (A), vista posterior (B) e vista lateral (C). (Modificado de Prometheus, 2013).

## 1.2 Curvaturas da coluna vertebral

Em uma vista lateral, a coluna vertebral apresenta quatro curvaturas: duas lordoses e duas cifoses. As faces côncavas, direcionadas anteriormente, são denominadas cifoses e estão presentes na região torácica e sacral (DEFINO e PUDLES, 2014). A lordose é a forma que encontramos nas regiões cervical e lombar e têm como características a concavidade direcionada posteriormente, surgem com o crescimento, apresentam maior mobilidade que as curvaturas primárias e têm importância no equilíbrio espino-pélvico. A lordose cervical surge entre o terceiro e quarto mês de vida extra-uterina quando tem início o controle motor da musculatura cervical anterior e posterior promovendo a sustentação da cabeça e o olhar ao horizonte (GIGLIO e VOLPON, 2007). As curvaturas observadas ao nascimento por influência da posição fetal intra-uterina são consideradas primárias (**Figura 1**).

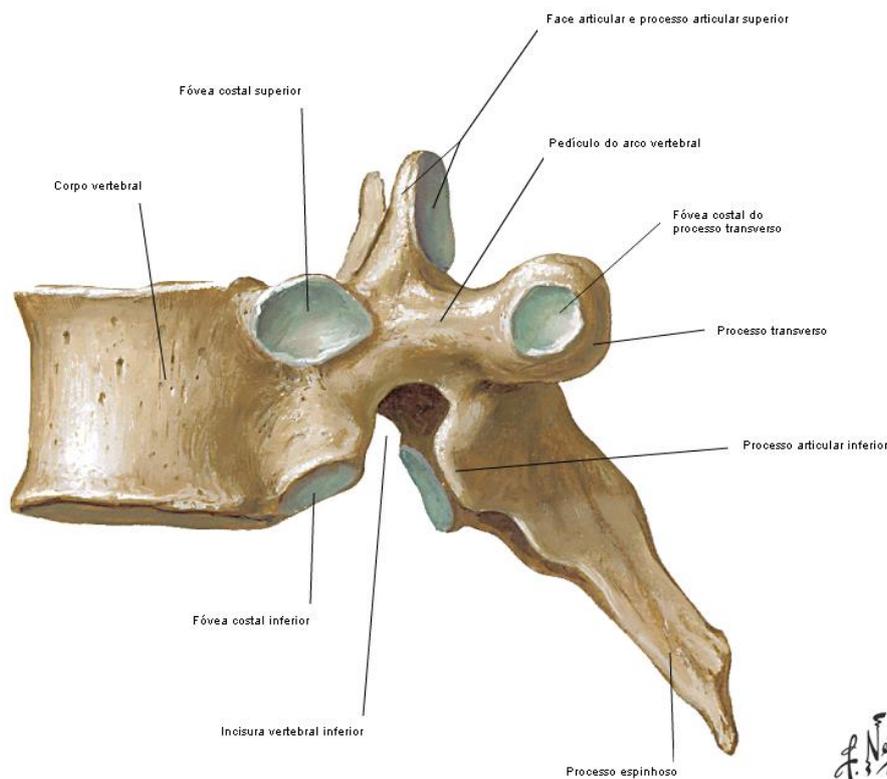
A lordose lombar desenvolve-se entre os 9 e 13 meses, período em que ocorre o controle da motricidade dos músculos do tronco (abdominais e dorso) permitindo, inicialmente a posição sentada e, em seguida, a ortostase e marcha. As lordoses cervical e lombar são consideradas curvaturas secundárias, pois se desenvolvem à medida que a necessidade do equilíbrio corpóreo se impõe, ou seja, manter o crânio centrado sobre a pelve em um eixo de gravidade localizado até 2 cm anterior ao promontório sacral. Móveis, estas duas regiões são mais susceptíveis aos processos degenerativos encontrados em pacientes, sobretudo, acima dos 40 anos de idade (BARREY, 2007).

### 1.3 Vértex

A vértebra é a unidade da coluna vertebral. As vértebras apresentam características comuns e diferenças na forma e tamanho de acordo com a região em que se localizam. Podem ser classificadas como típicas e atípicas. Considera-se como típica aquela formada por um corpo vertebral (a parte anterior) e um arco vertebral (parte posterior). O corpo vertebral tem a forma de um cilindro curto. Sua anatomia é constituída por uma grande quantidade de osso esponjoso no seu interior. Esta característica histológica permite que a sua principal função, a sustentação de carga, seja realizada com eficiência no sentido crânio-caudal (SMIT *et al.*, 1997). Suas superfícies superior e inferior, as placas vertebrais, são rugosas e estão em íntimo contato com os discos intervertebrais. Na região cervical, os corpos têm formato oval e apresentam duas saliências laterais nomeadas processos uncinados. A forma de coração de um corpo vertebral é vista na região torácica, enquanto um aspecto reniforme, na região lombar (NOTOUR, 2004) (**Figura 2**).

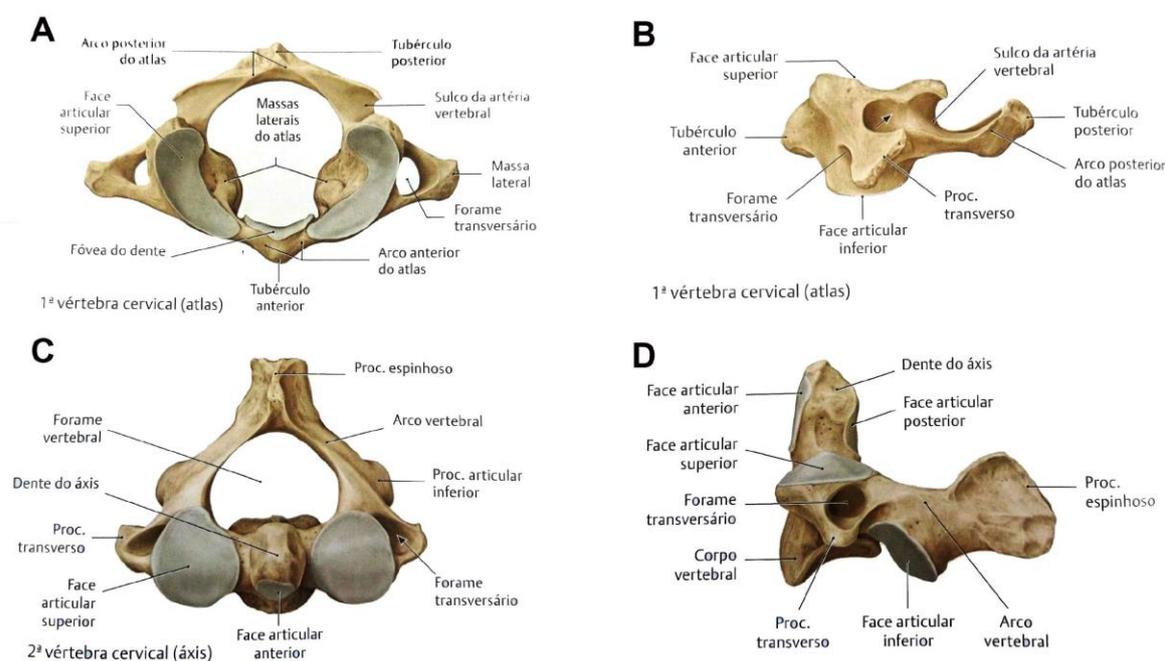
O arco vertebral ósseo forma os limites do canal vertebral, espaço onde encontramos, principalmente, o tecido neural, seus envoltórios e vascularização, e tem como função de proteção destas estruturas. A vértebra é composta por dois pedículos os quais projetam-se posteriormente formando duas lâminas e que por fim, fundem-se formando o processo espinhoso da vértebra. Quatro processos articulares e dois processos transversos originam-se do arco vertebral. Os processos articulares direcionam-se superior e inferiormente (formando as articulações zigoapofisárias) e possuem, cada um, uma faceta articular (MOORE, 2014). Funcionam como ancoragem para que a relação com uma vértebra superior

e inferior seja mantida e concomitantemente permita determinado grau de mobilidade sem prejuízo à estabilidade. Na região cervical os processos articulares têm orientação horizontal, portanto, permitindo maior grau de movimento nos planos coronal, axial e sagital. São verticalizados nas regiões torácica e lombar. Nas vértebras torácicas são paralelas ao plano coronal o que permite a rotação do segmento enquanto que nas lombares são perpendiculares ao mesmo plano proporcionando importante arco de movimento de flexo-extensão (TOYONE *et al.*, 2009). Os processos transversos projetam-se lateralmente e são locais de inserção de músculos profundos do dorso. As incisuras vertebrais são entalhes dos pedículos e, quando conjugados à uma vértebra superior ou inferior, formam os forâmens intervertebrais. Nesta região localizam-se as raízes nervosas (GILCHRIST *et al.*, 2002) (**Figura 2**).



**Figura 2. Estrutura anatômica de uma vértebra.** Vértebra torácica em vista lateral e seus principais relevos ósseos (Modificado de Netter, 2014)

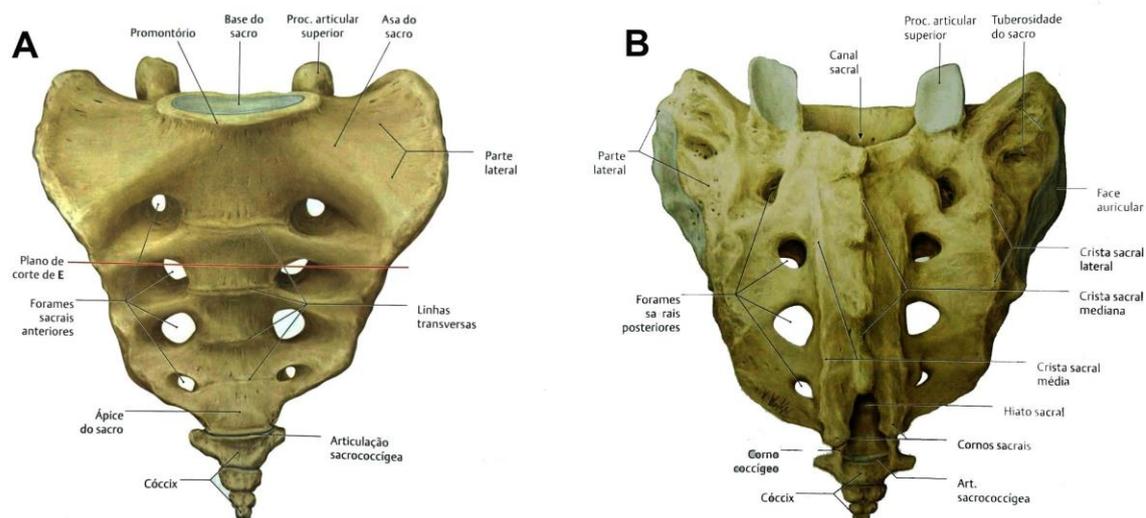
As vértebras atípicas são aquelas que apresentam características distintas das demais. O atlas, ou C1, é o elo entre o crânio e a coluna vertebral. Apresenta dois arcos (anterior e posterior) e se relaciona com os côndilos occipitais e a vértebra C2, ou eixo, através das massas laterais. Durante o desenvolvimento embrionário o primórdio do corpo vertebral do atlas funde-se ao corpo vertebral do eixo dando origem ao processo odontóide. Esta estrutura funciona como um verdadeiro eixo constituindo o principal sítio de movimento de rotação da região. As relações atlanto-occipital e atlanto-axial formam um importante e complexo sistema de suporte do crânio e mobilização da cabeça ao mesmo tempo em que garantem a estabilidade desta região (OFFIAH e DAY, 2016) (**Figura 3**).



**Figura 3. Anatomia da vértebra.** Primeira vértebra cervical - atlas (A), primeira vértebra cervical – atlas (B), segunda vértebra cervical – eixo (C) e segunda vértebra – eixo (D). (Modificado de Prometheus, 2013)

O sacro e o cóccix são compostos de vértebras fundidas. O sacro tem forma triangular e apresenta importante função de transmissão de forças aos ossos íliacos através de suas faces auriculares. É, portanto, o elo entre o esqueleto axial e o

apendicular. São cinco vértebras unidas que diminuem de tamanho no sentido caudal até sua articulação com o cóccix (CHENG e SONG, 2003). Anteriormente à primeira vértebra sacral (S1) localiza-se o centro de gravidade do corpo em uma região denominada promontório sacral. Sua face anterior é lisa e contém os forames sacrais por onde as raízes alcançam a região pélvica. Seu aspecto posterior é rugoso e dividido em cristas sacrais mediana, intermédia e lateral que são, respectivamente, fusão dos processos espinhosos, processos articulares e processos transversos a exceção da vértebra S5 cujo arco posterior não se une e forma uma abertura chamada hiato sacral (XU, 2008) (**Figura 4**). O cóccix é remanescente da cauda em embriões humanos e é composto de 4 vértebras. É local de inserção de ligamentos e tendões.

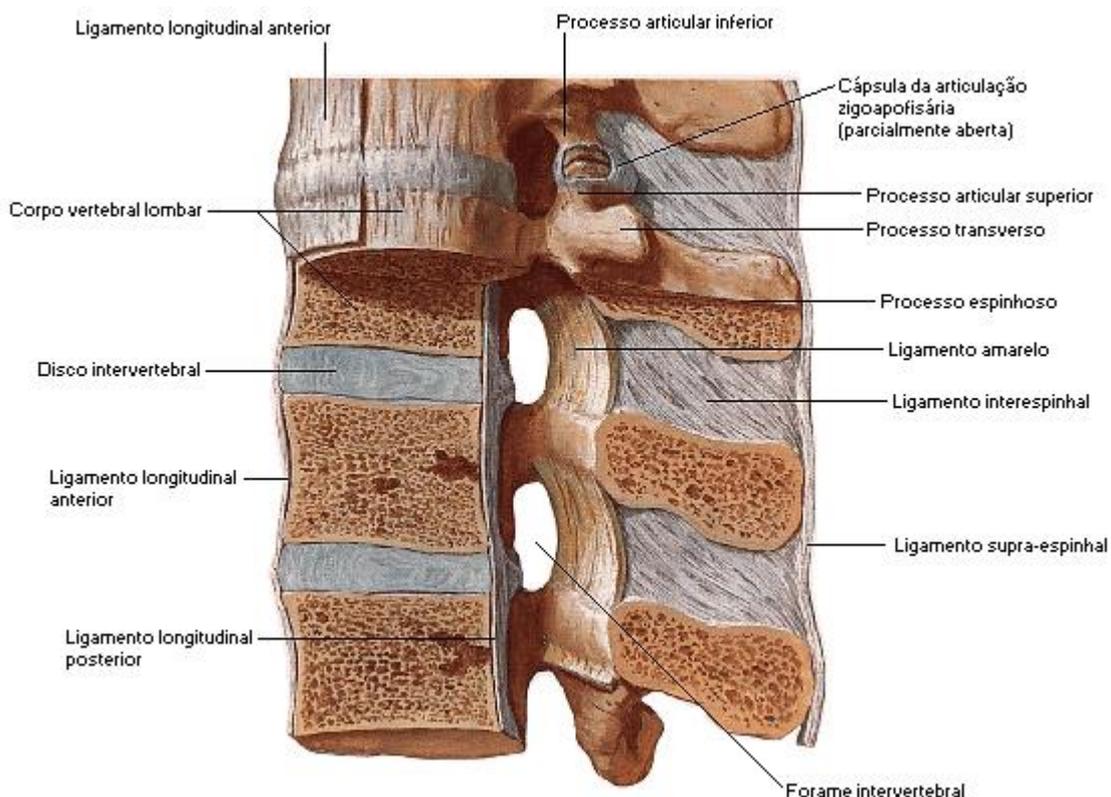


**Figura 4. Estrutura anatômica do sacro e cóccix. Visão anterior (A) e visão posterior(B). (Modificado de Prometheus, 2013)**

## 1.4 Ligamentos da coluna vertebral

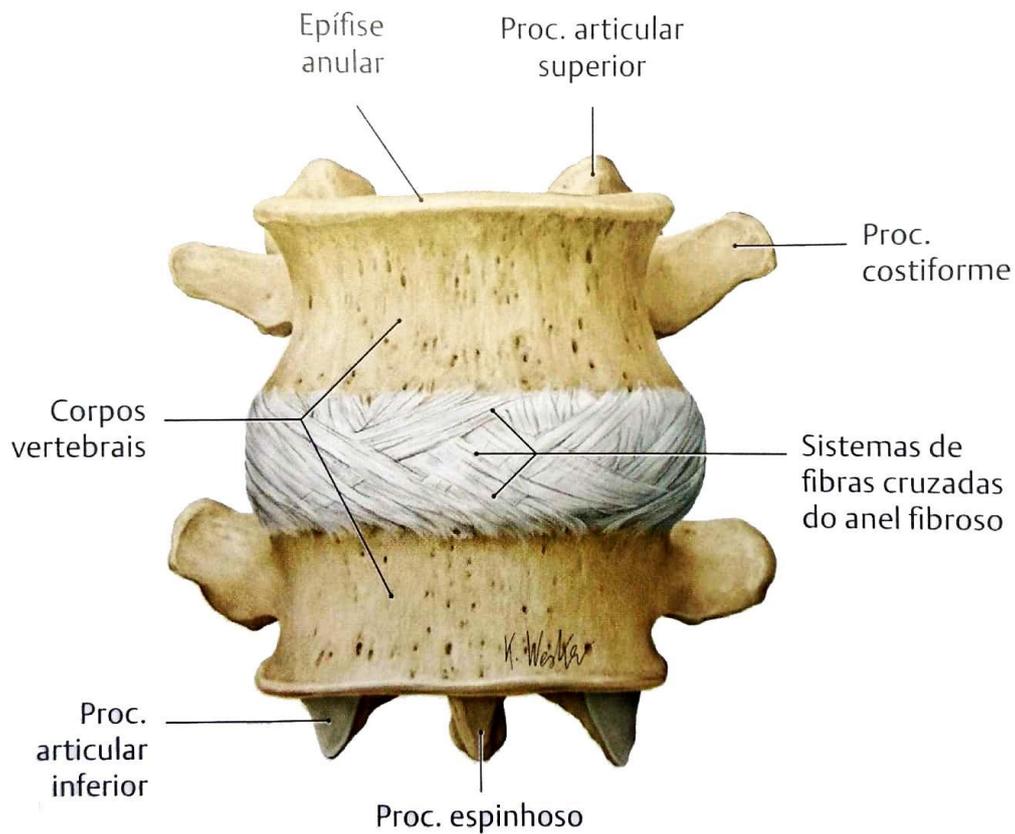
As 24 vértebras móveis situadas nas regiões cervical, torácica e lombar são unidas por ligamentos e sínfises. Esta união permite a formação de uma estrutura única resistente e móvel. Na face anterior da coluna vertebral localiza-se um ligamento largo e espesso o qual se estende desde a base do crânio até o sacro chamado ligamento longitudinal anterior (LLA) responsável não somente pela união de vértebras contíguas como também é um estabilizador do movimento de hiperextensão. De forma análoga, unindo as vértebras nas faces posteriores dos corpos vertebrais, localiza-se o ligamento longitudinal posterior (LLP), fino e estreito. É um restritor do movimento de hiperflexão (HAYASHI *et al.*, 1977).

No arco posterior, unindo os processos espinhosos e encontrados em toda a extensão da coluna vertebral encontram-se os ligamentos interespinhosos e supra-espinhosos, estes mais resistentes (**Figura 5**). Ambos contribuem para estabilização também contra os movimentos de hiperflexão assim como o LLP. Encerrando o canal vertebral e presentes entre as lâminas vertebrais onde se inserem, os ligamentos amarelos (*flavum*), em associação aos outros ligamentos restritores à hiperflexão, formam o Complexo Ligamentar Posterior (CLP) (PINTAR *et al.*, 1992) (**Figura 5**).



**Figura 5. Ligamentos da coluna vertebral.** Vista lateral da coluna vertebral com visualização dos ligamentos intervertebrais. (Modificado de Anatomia de Netter, 2014).

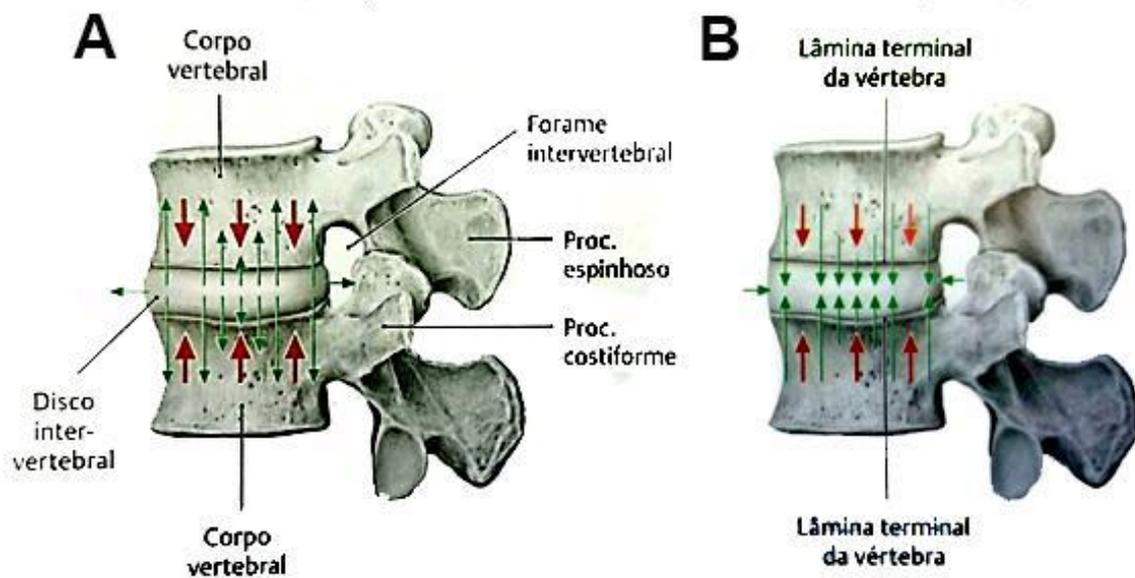
A união entre os corpos vertebrais é realizada através dos discos intervertebrais (sínfises). São estruturas fibro-cartilaginosas formadas por uma região central, o núcleo pulposo; e uma região periférica, o ânulo fibroso (**Figura 6**). Duas vértebras unidas através de um disco intervertebral e de um par de articulações interfacetárias (zigoapofisária) formam a unidade funcional vertebral (UFV).



**Figura 6. Disco intervertebral.** Vista anterior do disco intervertebral unindo os corpos vertebrais. (Modificado de Prometheus, 2013).

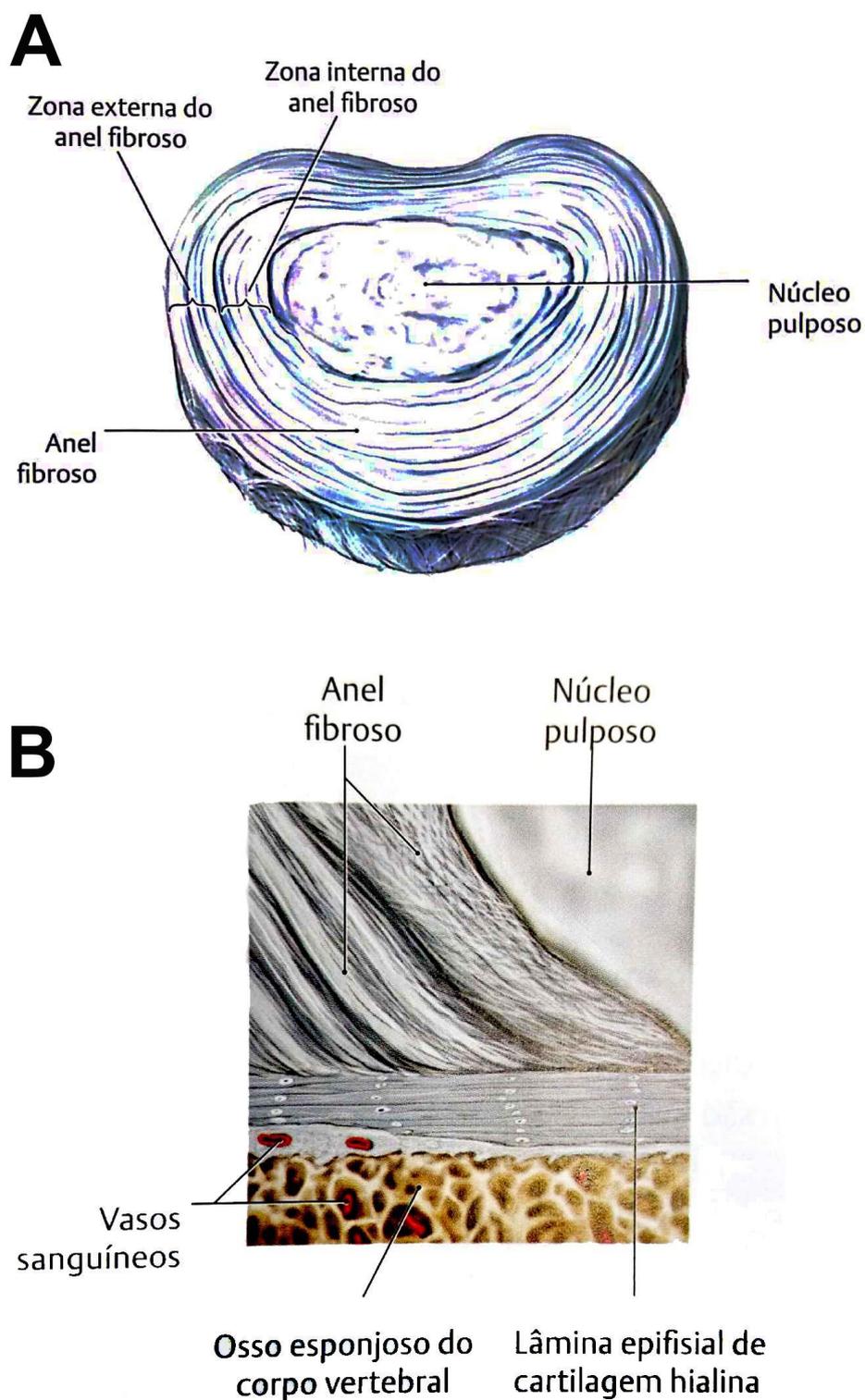
### 1.5 Disco intervertebral

O disco intervertebral funciona como um amortecedor de cargas axiais cíclicas além de permitir mobilidade e flexibilidade à coluna vertebral (ROBERTS, 2006). Na espécie humana, o desenvolvimento adaptativo da lordose lombar, objetivando o equilíbrio espino-pélvico, torna estas sínfises especialmente expostas a forças no eixo axial acelerando seu processo de degeneração (**Figura 7**).



**Figura 7. Forças que atuam sobre o disco intervertebral.** Distração (A) e compressão (B). (Modificado de Prometheus, 2013).

Macroscopicamente, o disco intervertebral é composto por três porções que mantêm relação entre si: o ânulo fibroso, mais externo; núcleo pulposo, central, gelatinoso e hidratado e; placas vertebrais terminais, superior e inferior. Esta estrutura fibrocartilaginosa é encontrada entre os corpos vertebrais permitindo o contato entre eles. Somando-se a altura dos discos intervertebrais, representam um terço do comprimento da coluna vertebral (WALTER *et al.*, 2015) (**Figura 8**).



**Figura 8. Características Anatômicas do Disco intervertebral.** Estrutura macroscópica do disco intervertebral: núcleo pulposos e ânulo fibroso (A); Abaixo: Observa-se a junção do disco intervertebral com o corpo vertebral na região chamada placa terminal (B). (Modificado de Prometheus, 2013)

O disco intervertebral apresenta reduzida densidade celular. Contudo, a atividade destas células é vital para a manutenção da integridade estrutural. Além disso, a celularidade do disco não é distribuída uniformemente, sendo mais elevada nas regiões próximas às placas terminais e nas regiões mais externas do ânulo fibroso ( $9 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup>) do que no núcleo pulposo ( $6 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup>) (BRUEHLMANN *et al.*, 2002). Pela característica avascular do disco intervertebral, devido à sua irrigação por difusão, as células vivem em meio com pH baixo consequente aos baixos níveis de oxigênio e à produção de ácido láctico (ERRINGTON, 1998; ROUGHLEY, 2004). A matriz extracelular é uma estrutura dinâmica e composta por diversos componentes que em conjunto conferem suas propriedades mecânicas, através do balanço da expressão dos genes que codificam os proteoglicanos como agrecan e pequenos componentes intersticiais tais como o versicano, decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano e perlecano (CS-SZABO *et al.*, 2002). Está em constante processo de degradação e síntese de novas moléculas controladas através de eventos da mecanobiologia, com ação de proteases e fatores de crescimento (GRANGE *et al.*, 2001).

### **1.5.1 Ânulo Fibroso**

Originalmente formado a partir do mesênquima pericondral, o ânulo fibroso é constituído em torno de 15 a 25 lamelas concêntricas de fibrocartilagem proporcionando a forma circunferencial dos discos intervertebrais. As fibras formadoras das lamelas apresentam disposição oblíqua direcionadas de uma vértebra à outra em ângulos de aproximadamente 60° até inserirem-se nos anéis epifisários das placas terminais superior e inferior. Sua resistência é conferida,

sobretudo, pela presença de colágeno do tipo 1 e 2 e de fibras de elastina, estas responsáveis pelo retorno à forma do disco após os movimentos em distintas direções (MARCHAND e AHMED, 1990).

### **1.5.2 Núcleo Pulposo**

O núcleo pulposo, proveniente da segmentação da notocorda, é o componente interno do disco intervertebral, sendo mais cartilágneo do que fibroso e com considerável elasticidade. Seu principal componente são moléculas de agregan, glicoproteínas com cargas negativas que atraem água para o núcleo mantendo sua hidratação, a qual diminui com a senescência (FENG *et al.*, 2006). Contém fibras colágenas e de elastina em uma conformação radial. Não recebe vascularização direta. Sua nutrição é dada por difusão a partir de vasos sanguíneos presentes na região central e crivosas das placas terminais e no entorno do ânulo fibroso (MELROSE *et al.*, 2007).

### **1.5.3 Placas Terminais**

As placas vertebrais terminais são responsáveis por interligar o disco aos corpos vertebrais que formam a unidade funcional, impedindo a projeção do núcleo para seus interiores. Além de suportar forças hidrostáticas, são o principal sítio anatômico de secreção de prostaglandinas e funcionam à semelhança das placas epifisárias de crescimento dos ossos longos. Ao nascimento, as placas terminais correspondem a aproximadamente 50% do espaço intervertebral. Sua altura é reduzida em 45%, aproximadamente 0,6 cm de espessura, com o envelhecimento

do indivíduo (ROBERTS, 2006). São compostas de uma fina camada de cartilagem hialina de aproximadamente 0,1 cm. As fibras colágenas apresentam orientação horizontal e paralela aos corpos vertebrais (BISHOP, 1992).

#### **1.5.4 Vascularização e inervação**

No indivíduo adulto, o disco intervertebral sadio apresenta poucos vasos sanguíneos, geralmente pequenos ramos das artérias espinhais anteriores e posteriores que circundam o ânulo fibroso. A difusão é o mecanismo pelo qual os discos são nutridos, principalmente pelos vasos presentes nos corpos vertebrais que formam plexos artério-venosos adjacentes, porém, não penetrantes, às placas terminais (MELROSE *et al.*, 2007). A inervação discal acompanha a disposição dos vasos sanguíneos. Presente na periferia do ânulo fibroso, o nervo sino-vertebral, ramo da raiz dorsal, penetra o canal vertebral através do forame intervertebral dividindo-se em feixes ascendente e descendente. Estes emitem fibras aferentes sensitivas e proprioceptivas. O ligamento longitudinal posterior, intimamente relacionado ao disco intervertebral, é ricamente innervado por fibras nociceptivas provenientes de ramos ascendentes do nervo sino-vertebral (RAOUL *et al.*, 2003).

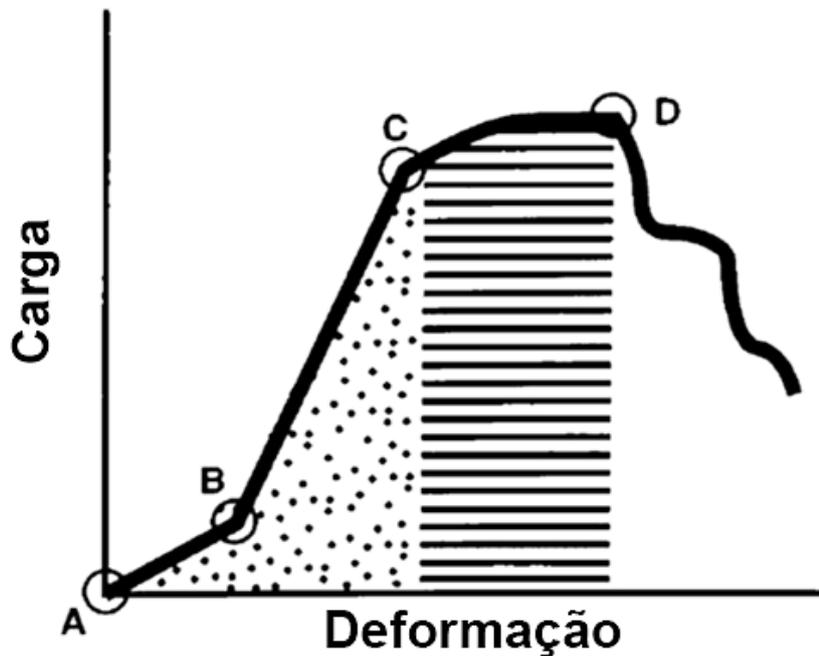
#### **1.6 Morfofisiologia do disco intervertebral**

A estrutura anatômica da coluna vertebral permite estabilidade suficiente para, ao fornecer um pilar de sustentação para o corpo humano, garantir proteção às estruturas neurais e mobilidade. A distribuição de forças através de suas regiões e elementos que as compõem também é peculiar. A centralização da cabeça sobre

a bacia e, conseqüentemente, determinando uma linha de prumo até 2 cm anterior ao promontório sacral, o centro de gravidade, estabelece uma coluna vertebral equilibrada no plano sagital. Este equilíbrio é dado pela harmonia entre as curvaturas em cifose e lordose. No plano coronal, a coluna vertebral é reta, porém, desvios de até 2 cm da linha centro-sacral (LCS) são considerados normais (KURRA *et al.*, 2018).

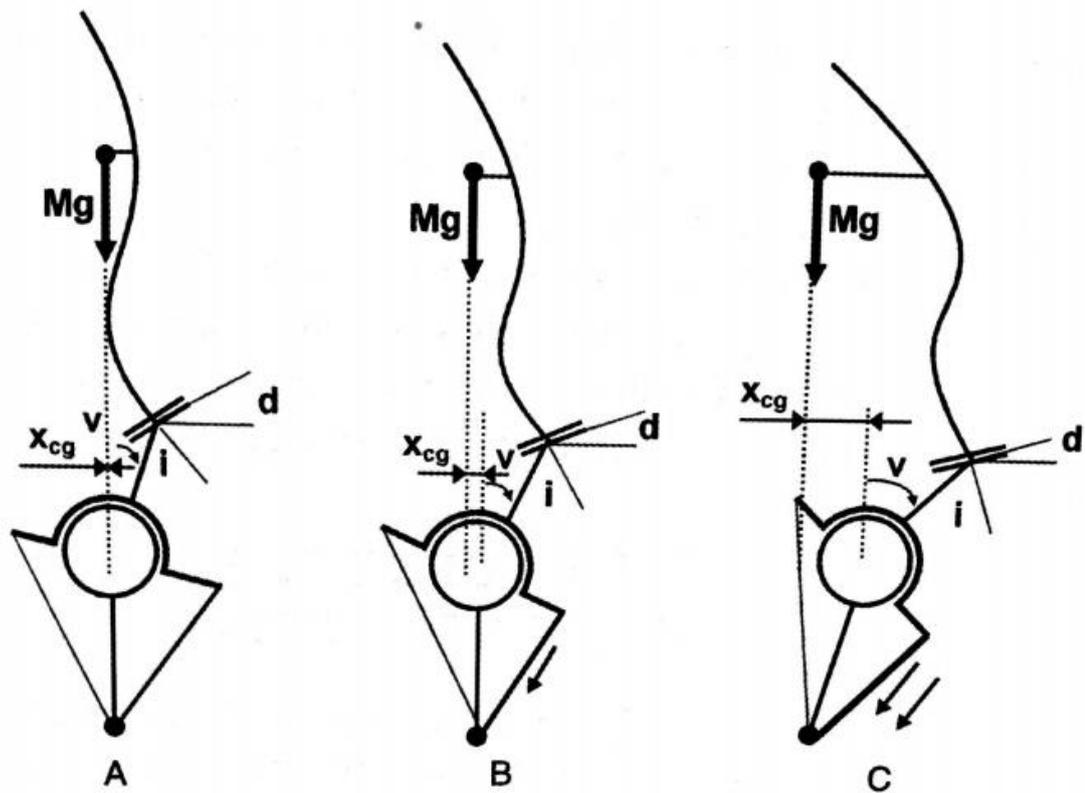
A principal força que incide sobre a coluna vertebral é a carga axial (peso). Somam-se forças de rotação axial, lateral e sagital e de translações ântero-posteriores, axiais e laterais. Esta resistência aos movimentos e cargas é proporcionada pela UFV através das importantes conexões proporcionadas pelos discos intervertebrais, cápsulas, ligamentos e músculos (CISZKIEWICS e MILEWSKI, 2016).

A aplicação de uma determinada força à UFV, inicialmente, a posiciona em uma zona neutra (*Neutral Zone-NZ*). Esta zona representa a dissipação da energia previamente à deformação da coluna vertebral. A continuidade da incidência da carga faz com que a UFV entre em uma faixa onde a deformação ocorre denominada zona elástica (*Elastic Zone-EZ*). Este momento é regido pela lei de Hooke: para pequenos deslocamentos, a deformação é proporcional à força aplicada (BENZEL *et al.*, 2001). Esta é uma relação linear e, portanto, há recuperação da forma quando cessada a tensão. Cargas ou tensões elevadas que excedam este limite levam à zona plástica. Neste momento a Lei de Hooke não mais é aplicada e a deformação permanece mesmo após o término do estresse mecânico (BENZEL *et al.*, 2001; KOWALSKI *et al.*, 2015) (**Figura 9**). O deslocamento realizado pela máxima carga aplicada ou ao limite do movimento é chamado de arco de movimento (*range of motion-ROM*) (WHITE, 1990).



**Figura 9. Curva carga/deformação em tecidos biológicos.** A região do ponto A ao B corresponde à zona neutra, entre B e C à zona elástica e entre os pontos C e D a zona plástica. Ao alcançar o ponto C a deformação ocorre e persiste até o ponto D. Após a falha ocorre. (Modificado de Benzel, 2001).

O equilíbrio da coluna vertebral ocorre em consequência de um sistema mecânico composto por estruturas músculo-ligamentares, articulares e neuromiofasciais que envolve, além da própria coluna, a pelve e os membros inferiores (LEGAYE, 1998). É considerado um sistema espino-pélvico equilibrado quando há harmonia do segmento corporal em posição ao cranial ao eixo bicoxofemoral (linha que une os dois centros de rotação das cabeças femorais) de forma a proporcionar gasto energético mínimo para que, em posição ortostática, a linha de gravidade esteja situada em uma posição de menor torque (GEIGER *et al.*, 2007) (**Figura 10**).



**Figura 10. Equilíbrio espino-pélvico.** Pêndulo inverso em equilíbrio (A). Deslocamento anterior do centro de massa corporal (B e C). (Modificado de Clínica Ortopédica da SBOT: Doenças Degenerativas da Coluna, 2010).

O equilíbrio espino-pélvico funciona como um pêndulo inverso onde a bacia é base deste sistema (LORAM *et al.*, 2002). Uma coluna vertebral equilibrada corresponde à adequada adaptação às modificações do centro de massa corporal dentro de limites anatômicos definidos pelos parâmetros pélvicos como a incidência pélvica (diâmetro ântero-posterior da bacia), o tilt pélvico (versão da bacia) e o slope sacral (inclinação do osso sacro (DUVAL-BEAUPÈRE *et al.*, 1992). A perfeita harmonia entre estas forças permite a sustentação e o equilíbrio do corpo.

## 1.7 Doença degenerativa discal

Os discos intervertebrais conectam as vértebras entre si proporcionando ao mesmo tempo integridade estrutural e flexibilidade. Desde que assumimos a posição bípede, graças à formação das curvaturas lordóticas compensatórias observadas no plano sagital, os discos intervertebrais recebem cargas cíclicas diárias (LOTZ e CHIN, 2000). Esse fator, associado a exposições ambientais tais como o sobrepeso, tabagismo, vibrações veiculares e industriais acelera o processo de degeneração discal (ELFERING *et al.*, 2002). Somam-se ainda questões hereditárias possivelmente envolvidas. As alterações degenerativas do disco intervertebral são observadas já a partir do final da primeira década de vida. Sua origem é atribuída à diminuição da irrigação sanguínea que se inicia em torno dos três meses de vida proporcionando menor aporte de nutrientes para uma estrutura praticamente avascular. São observadas precocemente fendas, rupturas, presença de material granular, morte celular, diminuição de glicosaminoglicanos, afinamento das placas terminais, alteração na densidade celular, microfraturas e esclerose no osso subcondral (ADAMS, 1986). As placas terminais são as primeiras estruturas acometidas seguidas do núcleo pulposo e por fim, o ânulo fibroso. Modificações ao nível molecular também são observadas: aumento da produção de citocinas, ativação de metaloproteinases, produção e alteração de densidades de diferentes moléculas como colágeno tipo III, VI, X, fibronectina e amiloide (BOOS, 2002).

O paciente que evolui clinicamente com degeneração discal sintomática apresenta quadro de dor na região lombar de forma contínua ou em exacerbações. Pode ocorrer irradiação para as articulações sacroilíacas, glúteos e face posterior

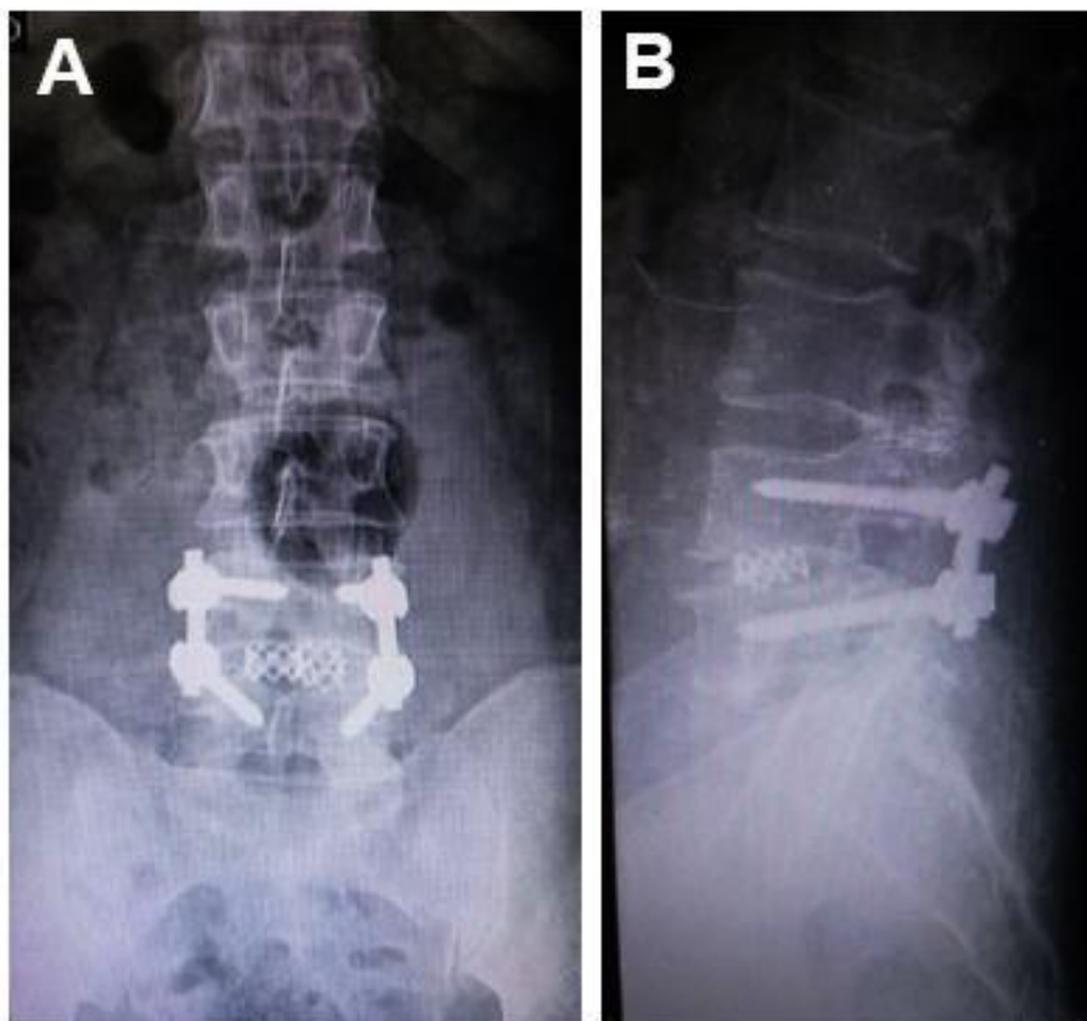
das coxas. Caracteristicamente a dor de origem discogênica piora à sedestação e à flexão anterior do tronco (PNEUMATICOS, 2006). Na presença de processo inflamatório ou compressão por conteúdo herniário, radiculopatia pode estar associada apresentando-se desde dor até prejuízo à força muscular (RIGHESSO *et al.*, 2007).

### **1.8 Tratamento da doença degenerativa discal**

O estabelecimento da doença degenerativa discal requer tratamento apropriado. Medidas conservadoras incluem tratamento físico e medicamentoso. O trabalho dos estabilizadores dinâmicos, ou seja, a ação muscular, objetiva prover o equilíbrio do sistema espino-pélvico e, conseqüentemente, retarda a progressão da doença. Quatro grupamentos musculares são importantes: músculos lombares (superficiais e profundos), músculos da parede abdominal e músculos anteriores e posteriores da coxa (FRANÇA *et al.*, 2008). Quando atuam de forma equilibrada e harmoniosa, permitem movimentos compensatórios através da versão pélvica e da variação angular da lordose lombar. O tratamento medicamentoso é, sobretudo, indicado nas crises álgicas e é composto de anti-inflamatórios, relaxantes musculares e analgésicos (ATLAS *et al.*, 2001).

Quando indicado, o tratamento cirúrgico varia desde a discectomia simples à artrodese (intersomática/pósterolateral) do segmento, este considerado o padrão-ouro. Neste caso, é realizada ressecção completa do disco intervertebral com substituição por suporte estrutural intersomático com enxerto autólogo (eventualmente, homólogo) e instrumentação metálica com parafusos pediculares com vistas à estabilidade do segmento. Além disso, permite um ambiente propício

à consolidação (FRITZEL, 2002) (**Figura 11**). Todavia, a fusão local proporciona a transferência de carga para o nível adjacente superior e/ou inferior dessa forma, acelerando a degeneração do disco ainda viável. Esta complicação é denominada Doença do Nível Adjacente (DNA) ou transição e pode ser observada após o procedimento primário de fusão (SAVEDRA-POZO, 2014).



**Figura 11. Radiografia da coluna vertebral lombar instrumentada.** Radiografia da coluna lombar em ântero-posterior (A) e perfil (B). Observa-se instrumentação pedicular e artrodese inter-somática entre L4-L5. (Arquivo pessoal).

Com a evolução das técnicas de cirurgia da coluna vertebral, cada vez mais tem se objetivado melhorar o quadro álgico, estabilizar o nível acometido e manter

em segurança os elementos neurais ao mesmo tempo evitando este tipo de complicação. Sendo assim, as artroplastias discais e os estabilizadores dinâmicos têm como finalidade mimetizar a função mecânica de um disco intervertebral saudável, manter o grau de mobilidade local sem comprometer a estabilidade e evitar a transferência de trabalho para níveis sub e suprajacentes (ZIGLER, 2007). Entretanto, a utilização de novos materiais eleva os custos entre 50%-70% (em torno de \$971-\$1,665 por paciente) em relação às discectomias simples, nos Estados Unidos da América (SHERMAN *et al.*, 2010).

A artroplastia discal é uma opção de tratamento cirúrgico com indicações precisas e que quando presentes trazem o potencial benefício de evitar a doença do nível adjacente observada em 92% dos pacientes submetidos à fusão em um seguimento de 5 anos (GOFFIN, 2004). A técnica foi desenvolvida com o objetivo de preservar o movimento do segmento, não apresentar as limitações impostas proporcionadas pelas fusões intervertebrais e permitir ao paciente o retorno precoce às suas atividades diárias. Além disso, através da remoção completa do disco intervertebral degenerado, restaura a altura do espaço intersomático contribuindo para a correção do alinhamento da coluna cervical. A inexistência de complicações com o uso de aloenxerto como morbidade no sítio de doação e a rejeição quando utilizada enxertia homóloga, além de pseudoartrose, também são vantagens atribuídas à artroplastia discal (SILBER, 2003).

Com o avanço da bioengenharia e das técnicas de obtenção e preservação tecidual, interesses na transplantação de disco intervertebral têm sido observados. Da mesma forma que os novos dispositivos, têm como finalidade a substituição do disco degenerado por outro saudável sem comprometer a estabilidade local e a função protetora neural. Além disso, há potencial redução dos custos do tratamento

por não exigir o uso implantes. O transplante de disco intervertebral atuaria como uma artroplastia biológica apresentando as mesmas indicações e técnica cirúrgica das tradicionais cujo objetivo é a manutenção da mecânica local. Baseado nesta nova proposta, diversos estudos têm objetivado definir um protocolo de preservação do disco intervertebral sem que haja prejuízo à suas propriedades biomecânicas e à atividade celular, importantes para a anátomo-fisiologia local (LAM *et al.*, 2011). Embora promissora, esta nova proposta encontra empecilhos tais como a viabilidade conferida pelos métodos de preservação e questões como osteointegração e fixação por pressão no sítio receptor e manutenção de propriedades no período pós-transplantação. A tentativa de preservação com o congelamento simples permitiu observar o dano provocado às células do tecido. Entretanto, o emprego de agente crioprotetor como o dimetil sulfóxido (DMSO) associado ao congelamento de forma gradual mostrou-se capaz de manter propriedades teciduais locais (TOMFORD, 1986). É o método padrão de preservação e que confere menor imunogenicidade (LANGER *et al.*, 1975). Utilizando solução criopreservante com dimetil sulfóxido e congelamento gradual até -80°C, Katsuura e colaboradores (1994) não encontraram alterações da histologia discal até 4 semanas observando, após esse período, redução da atividade metabólica discal para 44% e diminuição moderada no número de células, sendo menos afetadas aquelas presentes no ânulo fibroso (KATSUURA *et al.*, 1994). Lam e colaboradores, em 2011, realizaram estudo o qual compararam a criopreservação de discos intervertebrais obtidos de porcos em meio específico com concentrações diferentes e discos à fresco quanto seus módulos de elasticidade e viscosidade (LAM *et al.*, 2011). Foi observado que em concentrações ótimas do meio, a manutenção de propriedades biomecânicas é preservada.

Portanto, a transplantação de um disco intervertebral preservado, como modalidade terapêutica, é uma possibilidade futura. Os mesmos autores, buscaram observar o desfecho (reprodutibilidade e segurança) de transplantação de discos intervertebrais em humanos. Cinco pacientes com doença discal cervical foram submetidos ao procedimento. União das placas terminais foi observada após 3 meses da cirurgia. Hidratação discal ocorreu 5 anos após. Um disco restringiu os movimentos. Não houve deterioração neurológica (RUAN *et al.*, 2007). Chan e colaboradores (2010), observaram as alterações celulares e metabólicas de discos intervertebrais preservados à determinada temperatura e com agente criopreservante específico (CHAN *et al.*, 2010). Os autores observaram que as características metabólicas e estruturais celulares foram mantidas quando congelados de  $-0.3^{\circ}$  a  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  em meio de DMSO a 10% e 10% propileno-glicol.

Face ao exposto até aqui, diversos questionamentos naturalmente surgem no âmbito da elaboração de estratégias que tornem possível a captação do disco intervertebral, uma estrutura com característica morfológica simples, entretanto, com alta complexidade funcional. Com esse intuito, trabalhamos para propor uma logística de captação e de criopreservação do disco intervertebral humano para curadoria em banco de tecidos musculoesquelético.

## 2. Justificativa

As doenças degenerativas vertebrais das regiões cervical e lombar sintomáticas têm aumentado sua frequência devida, em parte, ao envelhecimento populacional e à exposição ambiental a fatores de risco. O tratamento cirúrgico de artrodese constitui o método padrão-ouro nos casos refratários às medidas conservadoras. Entretanto, apresenta como principal desvantagem o desenvolvimento ou aceleração da degeneração discal no nível adjacente, também conhecida como síndrome juncional ou de transição. Neste sentido, inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas a fim de evitar o desenvolvimento desta síndrome, tais como, os estabilizadores dinâmicos e artroplastias. Estes procedimentos visam preservar e controlar a transmissão de carga aos disco supra- e subjacentes. Com o avanço nas técnicas de captação e preservação de material musculoesquelético para transplante a partir de doadores cadáveres, surge uma nova perspectiva de tratamento a qual busca mimetizar a biomecânica local. O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO/MS), através da Área de Transplante Multitecidos (ATMIT) é o principal banco fornecedor de tecido musculoesquelético para transplantação no Brasil. Além de auxiliar como órgão regulatório, apresenta infra-estrutura necessária para o desenvolvimento de pesquisa e geração de protocolos, ambos amparados pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 220 de 27/12/2016 (**ANEXO A**).

### **3. Objetivos**

#### **1. Objetivo Geral**

Construir os parâmetros logísticos e técnicos para a captação e criopreservação do disco intervertebral humano.

#### **2. Objetivos Específicos**

1. Elaborar um programa operacional padrão, logístico, desde o processo de captação do bloco de coluna lombar até o processamento do disco intervertebral;
2. Estabelecer o tempo máximo de efetividade da preservação em meio crioprotetor.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Seleção do Doador Cadáver

Conforme orientação do Sistema Nacional de Transplantes (SNT), todo doador de tecido musculoesquelético é selecionado de acordo com a Portaria nº 2600 de 21 de outubro de 2009 do Ministério da Saúde (**ANEXO B**). Este processo é realizado pelos responsáveis-técnicos do Banco Multitecidos do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad-INTO/MS através de um questionário de triagem epidemiológica considerando avaliação laboratorial, suspeita ou confirmação de determinadas patologias e questões sociais (exclusão de atividade sexual e/ou social de risco e uso de droga endovenosa), assim como o consentimento familiar para doação do tecido.

São critérios de inclusão para o estudo espécimes obtidos de doadores cadáveres (DC) de ambos os sexos com idade entre 18-55 anos que preencham os requisitos de acordo com a referida Portaria e cujo processo de captação e processamento esteja em conformidade ao protocolo técnico proposto. Foram utilizados para o estudo apenas tecidos provenientes de captações no estado do Rio de Janeiro devido ao tempo de transporte e manutenção de condições adequadas até a realização do processamento no Banco Multitecidos (BMT) do INTO/MS. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em nossa instituição. (**ANEXO C**). Aplicados os critérios de exclusão e inclusão, foram selecionados 6 doadores cadáveres para o estudo.

## 4.2 Equipe de Captação

Formada por um médico captador especialista em cirurgia ortopédica e dois técnicos em enfermagem, ambos os membros da ATMIT e cinco médicos residentes do INTO/MS atuantes como cirurgiões auxiliares. A captação de tecido musculoesquelético é realizada após a retirada de órgãos como fígado, rim, coração e córnea por equipes específicas.

## 4.3 Fluxograma do protocolo de captação e processamento

Os processos de seleção do doador, captação, processamento dos espécimes estão demonstrados no fluxograma a seguir, (Figura 12).

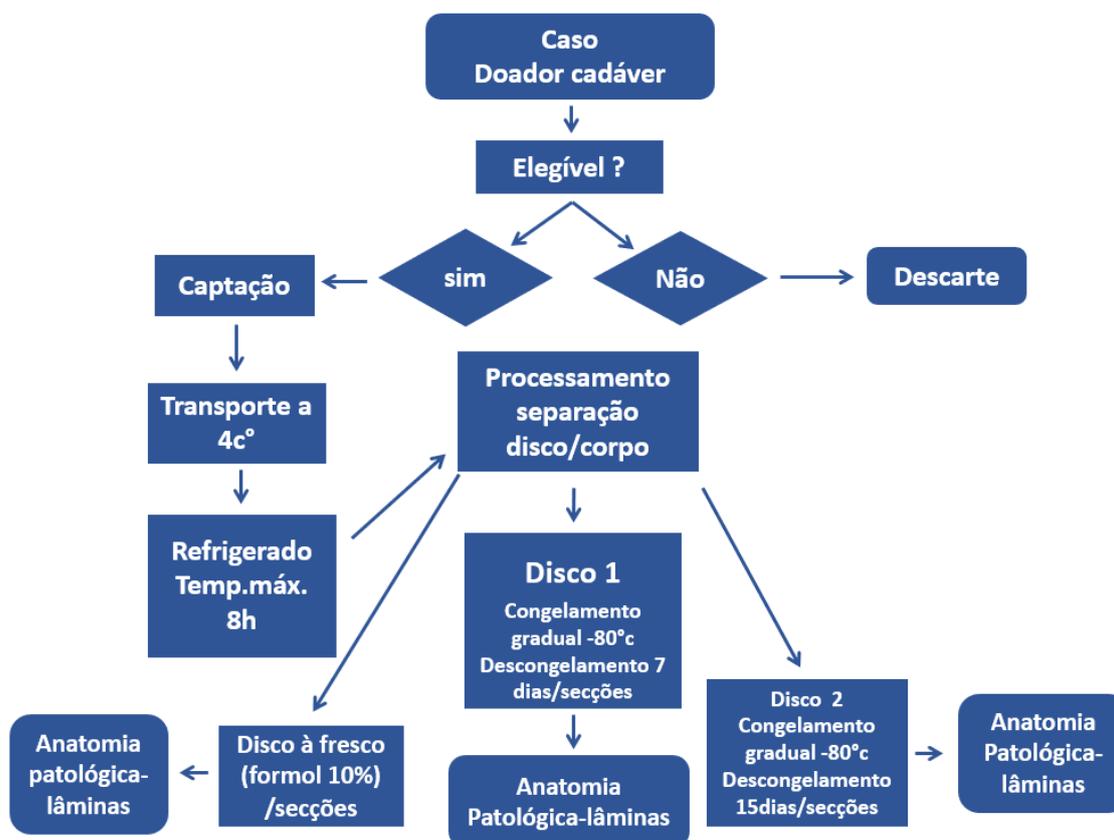
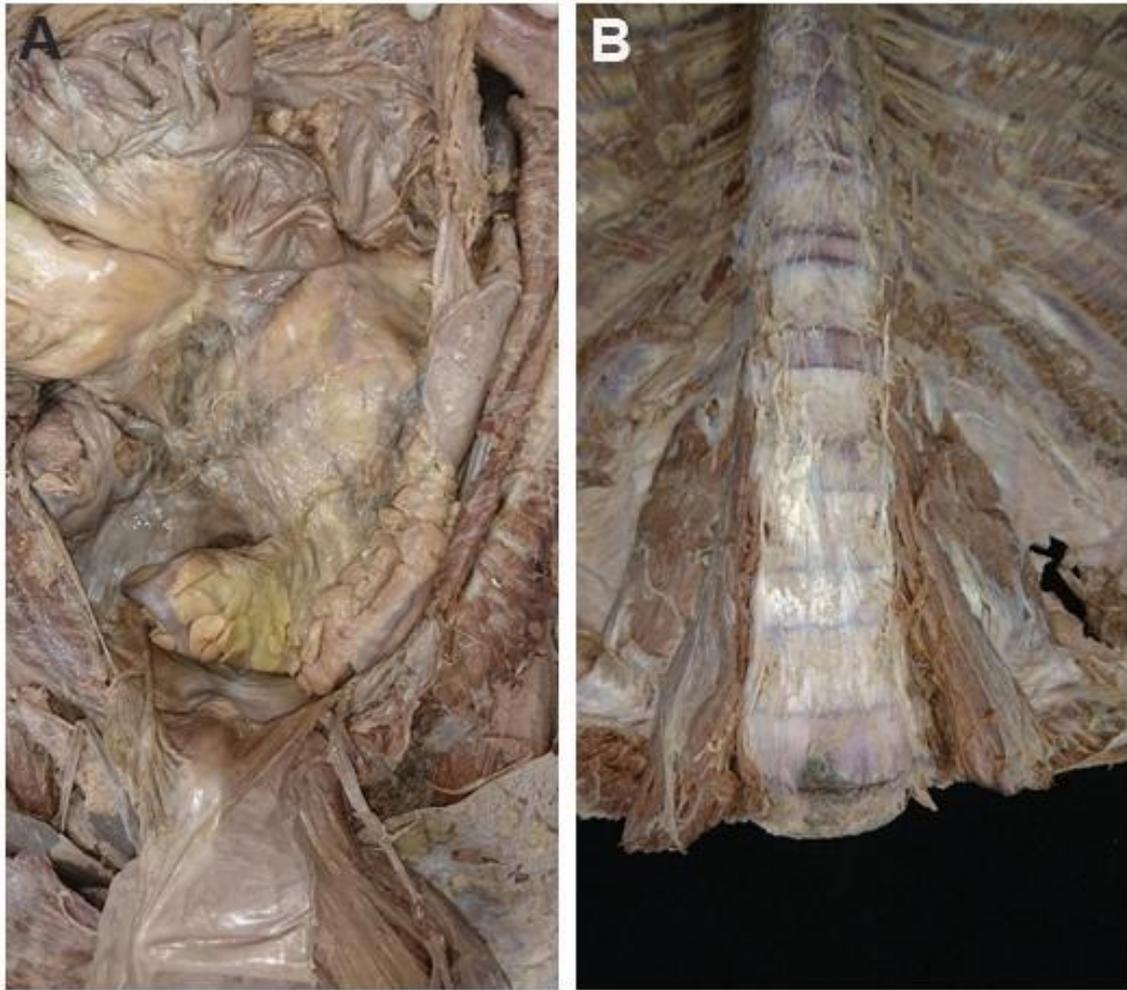


Figura 12. Logística do protocolo de captação, transporte e processamento do bloco de coluna.

#### 4.4 Técnica de captação

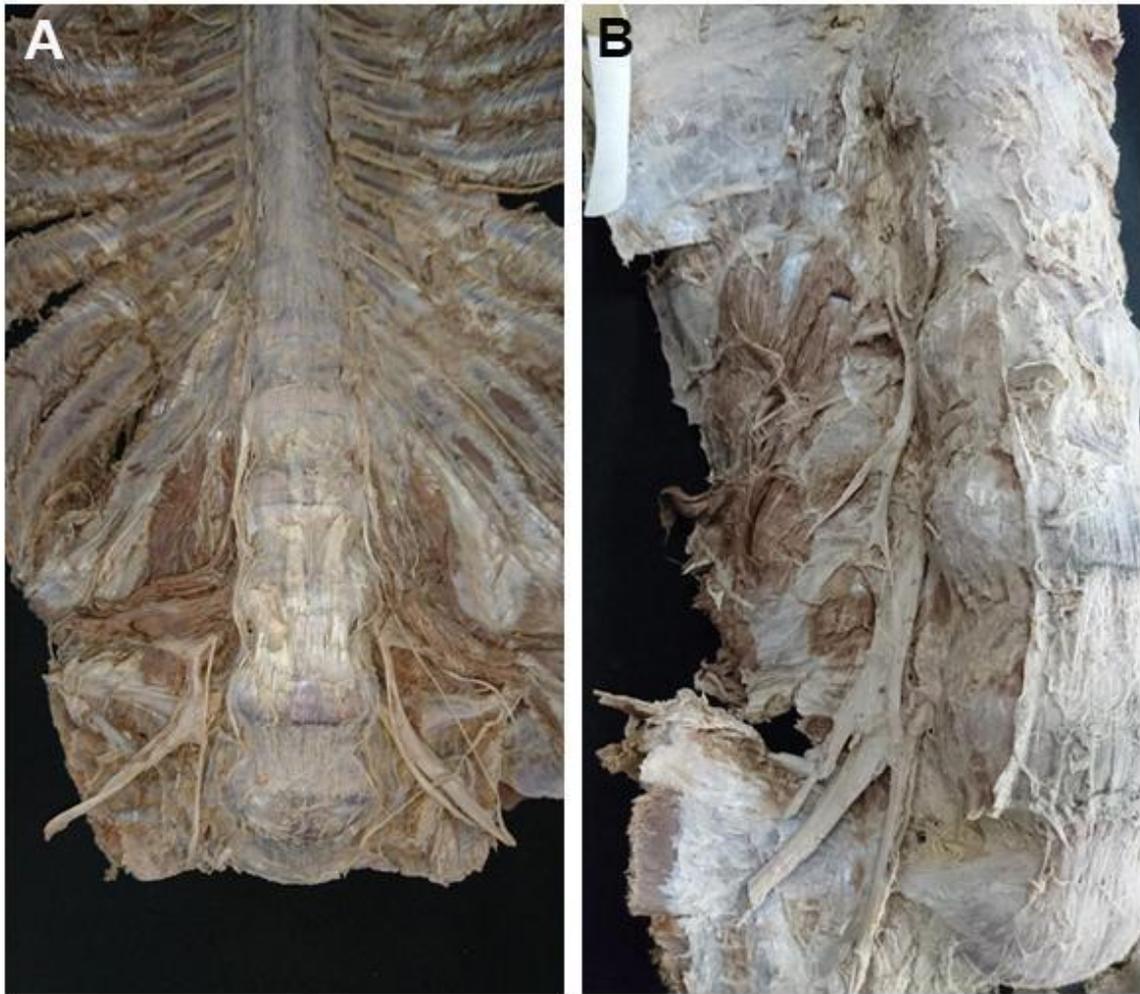
O desenvolvimento e proposição do procedimento de ressecção em bloco da coluna lombar teve como base conhecimento da anatomia local e de técnicas em cirurgia da coluna vertebral sendo realizado em espécimes cadavéricos preservados em formaldeído. Procede-se incisão xifopubiana e acesso à cavidade abdominal, com dissecação e proteção das estruturas viscerais com compressas até o retroperitônio o qual é seccionado longitudinalmente (**Figura 13**). Identifica-se o músculo psoas maior bilateralmente o qual é desinserido da coluna vertebral com bisturi frio (**Figura 14**). A seguir, são identificados o plexo lombar (**Figura 15**) e, por conseguinte, os processos transversos da vértebra L2 à L5 os quais serão separados através de osteotomia bilateral no seu encontro com o pedículo e corpo vertebral. Esta etapa é realizada com motor elétrico e serra tipo sagital em sua junção aos corpos vertebrais correspondentes e finalizada com auxílio de osteótomos curvos (**Figura 16**). Realiza-se, após discectomia nos níveis L1-L2 e L5-S1 para remoção em bloco com bisturi frio e, caso necessário, complementado com curetagem do espaço intervertebral (**Figura 17**).



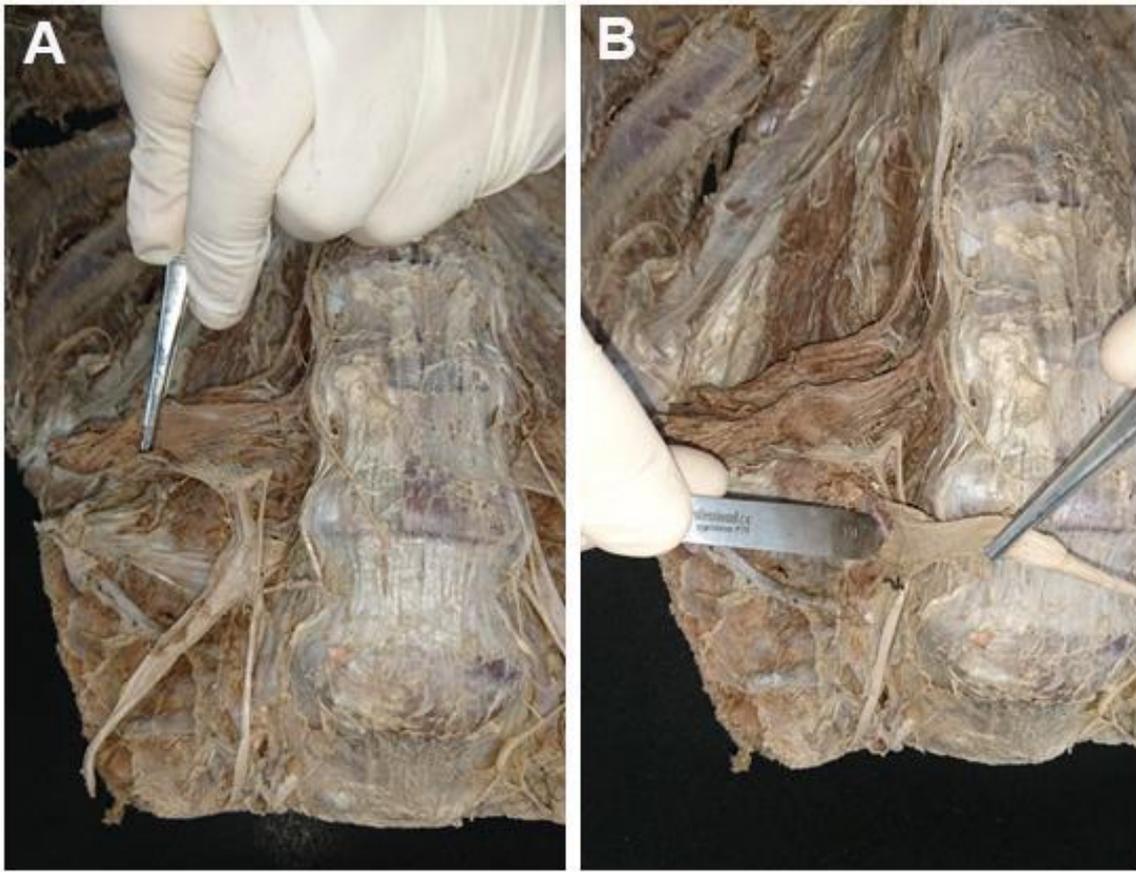
**Figura 13. Acesso à cavidade abdominal.** Exposição da cavidade abdominal e identificação das vísceras abdominais (A). Acesso ao retroperitônio e observação da coluna vertebral e parede abdominal posterior (B). (Arquivo pessoal).



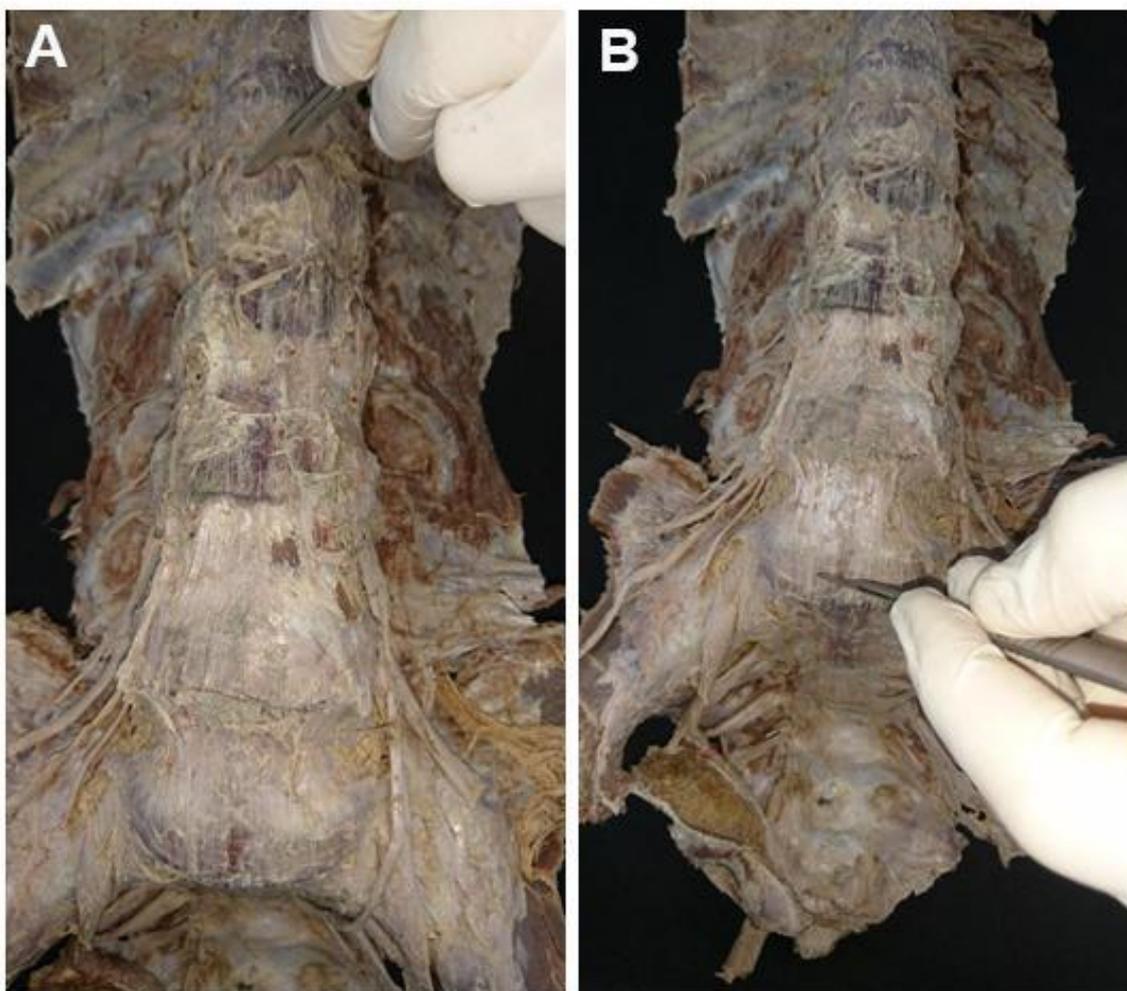
**Figura 14. Desinserção do músculo psoas maior em ambos os lados. (Arquivo pessoal).**



**Figura 15. Plexo lombar.** Dissecção do plexo lombar bilateralmente após desinserção do músculo psoas maior (A). Em detalhe o plexo dissecado (B). (Arquivo pessoal).



**Figura 16. Identificação do ponto da osteotomia.** Dissecado o plexo lombar (A), identificamos os processos transversos e os pontos-chave para a osteotomias (B), (Arquivo pessoal).



**Figura 17. Locais de discectomia.** No nível L1-L2 (A), no nível L4-L5 (B). Após esta etapa o bloco encontra-se móvel e poderá ser removido. (Arquivo pessoal).

#### **4.5 Material necessário para ressecção do bloco de coluna lombar**

Os materiais necessários são: Caixa básica de instrumental cirúrgico contendo afastadores auto-estáticos, bisturi número 23, martelo metálico, osteótomos retos e curvos de 10mm, goiva, motor à bateria com serra sagital.

#### **4.6 Embalagem do tecido captado**

No cenário da captação, o espécime obtido é imerso em soro fisiológico à 0,9 % e armazenado em tripla embalagem com dupla selagem estéril.

#### **4.7 Transporte do tecido**

Imediatamente após término da embalagem, o bloco de coluna lombar (vértebras e discos intervertebrais) é mantido em temperatura média de 4°C em contêiner térmico controlado por termostato e transportado para o Banco Multitecidos do INTO/MS onde permanece refrigerado (4°C) até o início do processamento.

#### **4.8 Processamento do tecido**

O processamento do tecido foi realizado em sala com classificação – ISO 5 (**ANEXO D**) no BMT em tempo médio de 8 horas após captação. Nesta etapa, a equipe é formada pelo médico captador e responsável pela pesquisa com auxílio de um técnico de enfermagem, ambos devidamente paramentados com vestimenta de área limpa, máscara, touca, capote e luvas estéreis.

#### **4.9 Material específico**

Caixa de processamento osteocondral (osteótomo de 10mm, martelo metálico pesado). Caixa básica de processamento. A solução do meio de

preservação é composta por 30% de Iscove's® (Thermo Fischer Brasil) (**ANEXO E**), 60% de soro fetal bovino e 10% dimetilsulfóxido e mantida à temperatura de 4°C na geladeira de insumos. Frasco coletor plástico (6-8 unidades). Formaldeído a 10%.

#### **4.10 Peças Geradas**

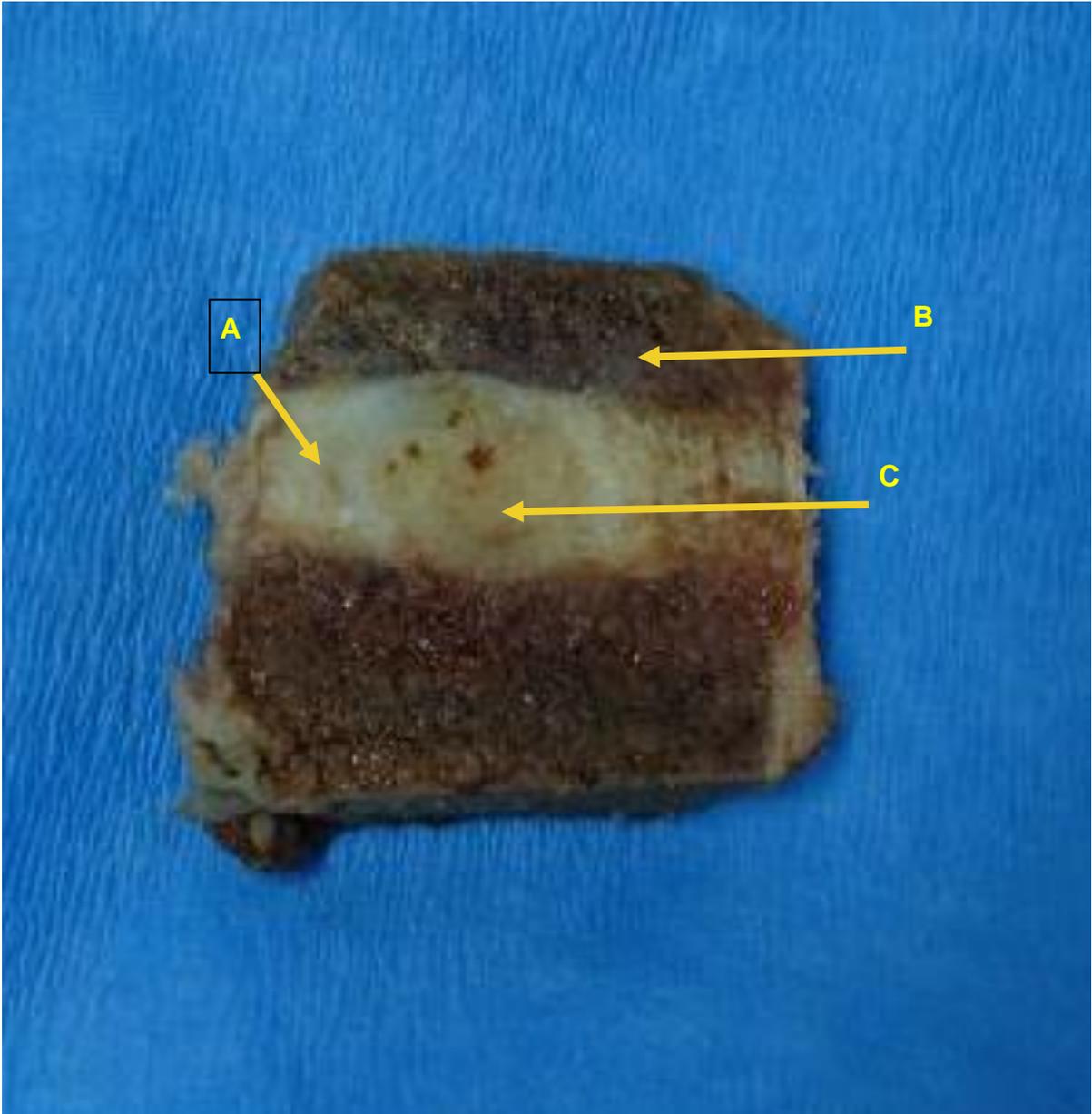
São obtidos 3 discos intervertebrais (L2-L3, L3-L4 e L4-L5) por doador cadáver a partir da separação dos corpos vertebrais com auxílio de osteótomos e serra. Em seguida, são armazenados em recipientes plásticos com meio específico de preservação e então, submetidos à congelamento gradual até -80°C (**Figura 18**). O congelamento das amostras seguiu o mesmo padrão, onde os espécimes foram alocados em recipiente de poliestireno (isopor) envolvidos em papel filtro (Wypall®) pelo período de 2 horas a uma temperatura de -80°C, após o qual é removido. Hum (1) disco foi armazenado em recipiente plástico embebido em formol à 10% e nomeado à “fresco” o qual não foi criopreservado (controle/d0).



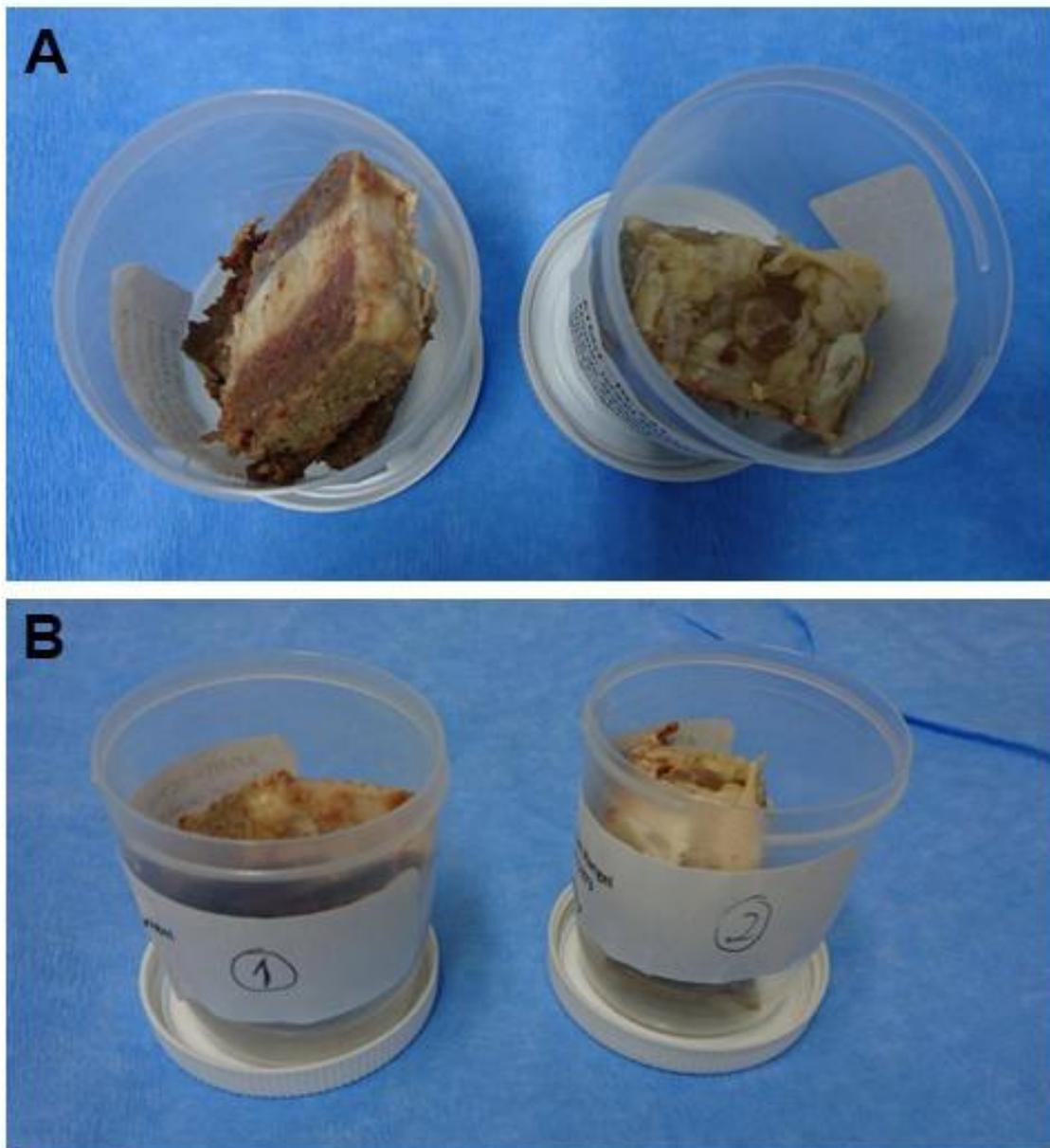
**Figura 18. Disco intervertebral embalado e conservado em solução criopreservante. (Arquivo pessoal).**

#### **4.11 Preparação do tecido processado para confecção dos cortes histológicos**

O disco à fresco (controle) foi seccionado com bisturi frio em duas partes iguais (**Figura 19**), armazenados em recipientes plásticos distintos contendo formol à 10% devidamente identificados e encaminhados para o laboratório de anatomia patológica para o preparo das lâminas histológicas. Foram realizadas secções transversais e longitudinais de cada metade dos discos intervertebrais e confeccionadas lâminas coradas com a técnica da hematoxilina-eosina. Os discos em meio específico foram submetidos a descongelamento rápido em banho-maria nos intervalos de 7 (d7) e 14 (d14) dias após a criopreservação. Novamente, cada disco foi seccionado com bisturi frio em metades e cada hemi-disco, em suas respectivas secções longitudinais e transversais. As peças geradas foram encaminhadas ao laboratório de anatomia patológica para o mesmo processo de obtenção das lâminas.



**Figura 19. Disco intervertebral seccionado onde podemos identificar as placas terminais superior e inferior, ânulo fibroso e núcleo pulposo. Ânulo fibroso (A), placa terminal (B) e núcleo pulposo (C). Visualização da secção longitudinal do hemi-disco (Arquivo pessoal).**



**Figura 20. Fotografia do frasco de acondicionamento da amostra antes da criopreservação.** Vista superior (A), Vista lateral (B). Observamos os discos seccionados em orientação longitudinal (Esquerda) e transversal (Direita) (Arquivo pessoal).

## **4.12. Preparo da amostra para estudo da histologia**

### **4.12.1 Fixação e Parafinização**

Para cada análise foram obtidas 3 amostras: 2 pós-criopreservação e descongelamento no 7º (d7) e 14º (d14) dia e 1 preservada apenas em formol à 10% (controle/d0). Após o período de incubação as amostras foram clivadas e colocadas em cassetes imersos em formol 10% por 24 horas para fixação. Cada amostra passou pelo processo de desidratação seriada com quatro banhos de 40 minutos em cubas contendo álcool absoluto seguidos de 3 banhos, também de 40 minutos, em cubas com xileno P.A.. Para a desidratação, as amostras foram envolvidas cuidadosamente em gaze e colocadas em um cassete histológico tradicional, onde passaram por 2 banhos de 60 minutos, cada, em parafina líquida a 65°C para que o excesso de xilol fosse removido. As amostras foram posicionadas em um molde metálico e parafinizadas até a solidificação. Após esta etapa, o bloco é removido do molde e então, posicionado sobre superfície fria. O bloco de parafina foi cortado em micrótomo, em fitas de espessura de 4 µm e, subsequentemente, sobrepostos em lâmina histológica dispostas em molas ou berços.

### **4.12.2. Desparafinização e hidratação**

As lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida em temperatura de 65°C por 30 a 40 minutos para que a parafina se liquefizesse e permitisse sua remoção com maior facilidade. Após o aquecimento, as lâminas passaram por 2 cubas contendo xileno P.A.. Em cada cuba, as lâminas foram mergulhadas 10

vezes. Em sequência, 10 banhos em cada cuba 4 álcoois. As lâminas foram, então, transferidas para outro recipiente contendo água em fluxo contínuo e deixadas por 5 minutos.

#### **4.12.3 Coloração das lâminas com Hematoxilina-eosina**

Após a desparafinização e hidratação, os cortes passaram pela bateria de coloração em Hematoxilina 1%: cada lâmina foi exposta ao corante por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 5 minutos, diferenciadas em álcool ácido a 5% e, novamente, expostas à água corrente por 5 minutos até que fosse retirado o excesso. A etapa de desidratação é realizada a partir de 1 mergulho em álcool a 70%, exposição por 1 minuto à eosina a 1% e após, banhos de 4 álcoois e 3 xilóis. Por fim, foram montadas em lamínulas de vidro e bálsamo do Canadá (Merck®).

#### **4.13 Método de avaliação dos cortes histológicos**

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico Nikon® Eclipse TS 100 em aumento de 4x e fotografadas com câmera Nikon® DS-Fi1c para registro dos resultados utilizando o programa NIS-Elements F versão 4.60.00 (Nikon®). Dessa forma, buscamos identificar possíveis diferenças entre os discos intervertebrais à fresco (controle) e aos submetidos aos processos de criopreservação e descongelamento após d7 e d14. As imagens obtidas dos cortes histológicos dos discos intervertebrais foram classificadas por dois patologistas experientes em microscopia os quais, no momento da análise, desconheciam o grupo (controle ou

ultracongelado por 7 ou 14 dias) o qual pertencia a amostra do tecido. As regiões do disco intervertebral estudadas na análise histológica foram o anel fibroso e o núcleo pulposo quanto seus aspectos morfo-estruturais e celularidade. Em relação à possível alteração da morfologia e estrutura decorrente do ultracongelamento ou do controle (preservado em formaldeído) foi determinado, através de análise qualitativa e descritiva, um grau em escala de 0 a 10 pontos.

Propomos uma escala de pontuação para a presença de alterações morfo-estruturais de acordo com a **Tabela 1**. A **Tabela 2** informa os achados à microscopia os quais permitem pontuar estas modificações. Quanto à preservação das células no núcleo pulposo e ânulo fibroso foi avaliada a presença de vacuolização em mais de 50% e menos que 50% (raras ou ausentes) no campo histológico.

**Tabela 1. Pontuação atribuída de acordo com a presença ou ausência de alterações morfo-estruturais à análise histológica dos discos intervertebrais.**

<b>Alteração morfo-estrutural</b>	<b>Pontos</b>
Muito alterada	0-3
Alterada	4-7
Não alterada	8-10

**Tabela 2. Achados à análise microscópica dos discos intervertebrais que definem a presença ou ausência de alterações histológicas.**

<b>Muito alterado</b>	<b>Alterado</b>	<b>Não alterado</b>
Matriz desorganizada	Matriz parcialmente organizada	Matriz organizada
Vacúolos de água presentes (> 50%)	Raros vacúolos (< 50%)	Ausência de vacúolos (< 50%)

## 5. Resultados

### 5.1 Dados epidemiológicos

Foram selecionados 6 (seis) doadores cadáveres que preenchem os critérios determinados para o estudo e encontravam-se aptos de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema Nacional de transplantes. Em relação ao sexo, foram 4 doadores do sexo masculino e 2 do sexo feminino. A faixa etária variou de 42 a 55 anos com idade média de 48 anos. Todos os óbitos ocorreram a partir da abertura de protocolo de morte encefálica (ME). Acidente Vascular Cerebral hemorrágico (AVC) constituiu causa mortis em 3 doadores enquanto AVC isquêmico, encefalopatia anóxica e lesão por projétil de arma de fogo (PAF) corresponderam as causas em cada um dos outros 3. Os processos de captação ocorreram em hospitais públicos municipais (HM), estaduais (HE), federais (HF) e privado (P) no estado do Rio de Janeiro (**Tabela 3**).

**Tabela 3. Perfil epidemiológico dos doadores cadáveres.**

<b>Doador cadáver</b>	<b>sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Causa mortis</b>	<b>Hospital</b>	<b>Protocolo ME/PCR</b>
<b>DC 700</b>	F	55	AVE isquêmico	HE	ME
<b>DC704</b>	M	54	PAF	HE	ME
<b>DC709</b>	M	42	AVE hemorrágico	HE	ME
<b>DC714</b>	M	46	Encefalopatia anóxica	HF	ME
<b>DC741</b>	M	52	AVE hemorrágico	HM	ME
<b>DC748</b>	F	44	AVE hemorrágico	HP	ME

M (Masculino), F (Feminino), AVE (Acidente Vascular Encefálico), HE (Hospital Estadual), HM (Hospital Municipal), HF (Hospital Federal), HP (Hospital Privado), ME (Morte Encefálica).

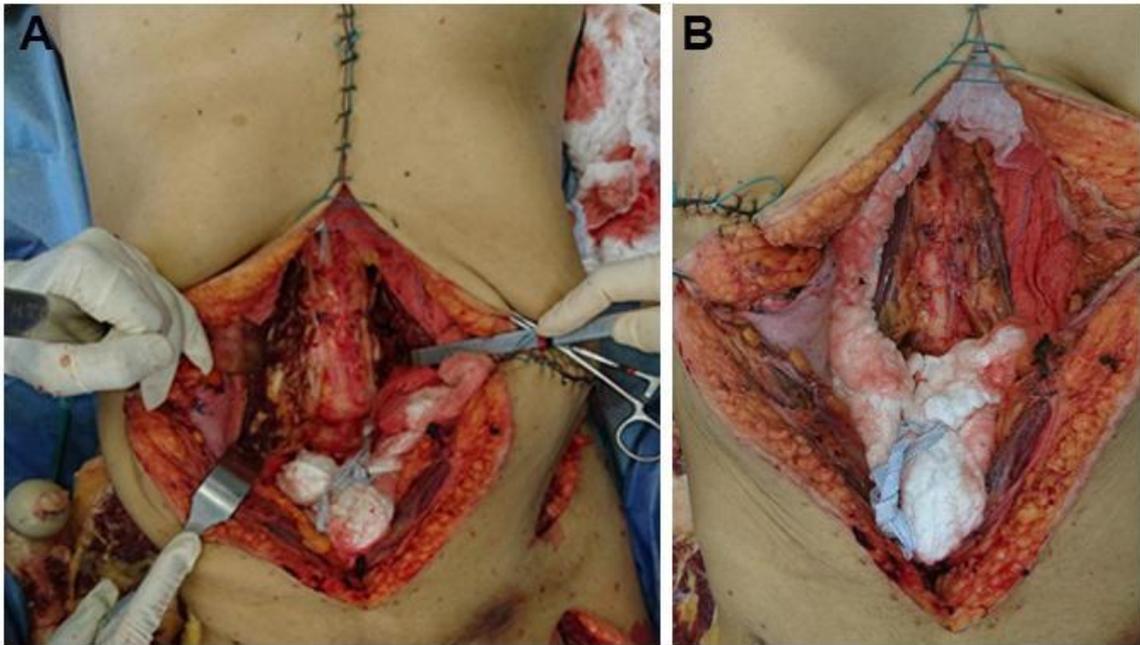
## 5.2 Execução da técnica cirúrgica proposta no doador cadáver

A técnica cirúrgica para a remoção do bloco de coluna lombar desenvolvida em espécimes cadavéricos foi reproduzida nos 6 doadores selecionados e realizados pelo médico captador. Em cada doador cadáver foi ressecado um bloco de coluna lombar contendo os discos intervertebrais L2-L3, L3-L4 e L4-L5. As obtenções de tecido doado ocorreram em sala cirúrgica com temperatura ambiente entre 22°-23°C e umidade relativa do ar entre 55 e 60% (NBR n°7256/82). Foi realizada assepsia e antissepsia de todos os doadores cadáveres e da equipe cirúrgica, além da colocação de campos estéreis. Foi utilizada incisão xifopubiana prévia para ressecção de vísceras abdominais (**Figura 21**). A exposição da cavidade abdominal permite identificação dos órgãos viscerais os quais são deslocados lateralmente e protegidos com compressas cirúrgicas até visualização da região retroperitoneal (**Figura 22**). Neste momento, o músculo psoas maior torna-se visível em posição paravertebral e bilateral onde é cuidadosamente desinserido da coluna vertebral (**Figuras 23 e 24**) até identificação das raízes do plexo neural lombar (**Figura 25**). Esta etapa facilita a visualização e palpação dos processos transversos das vértebras L2 à L5 os quais foram os pontos-chave para o local das osteotomias e início da separação entre o corpo vertebral e o arco ósseo posterior (**Figura 26**). A osteotomia bilateral foi realizada no ponto de junção do pedículo vertebral, processo transversos e corpo da vértebra com motor elétrico e serra tipo sagital e finalizada com auxílio de osteótomos curvos. Após a dissociação dos corpos vertebrais com os arcos neurais, procedemos com as discectomias nos níveis L1-L2 e L5-S1 para remoção em bloco (**Figura 27**). A partir deste momento, o bloco de coluna lombar foi facilmente mobilizado (**Figura 28**). Removido, o

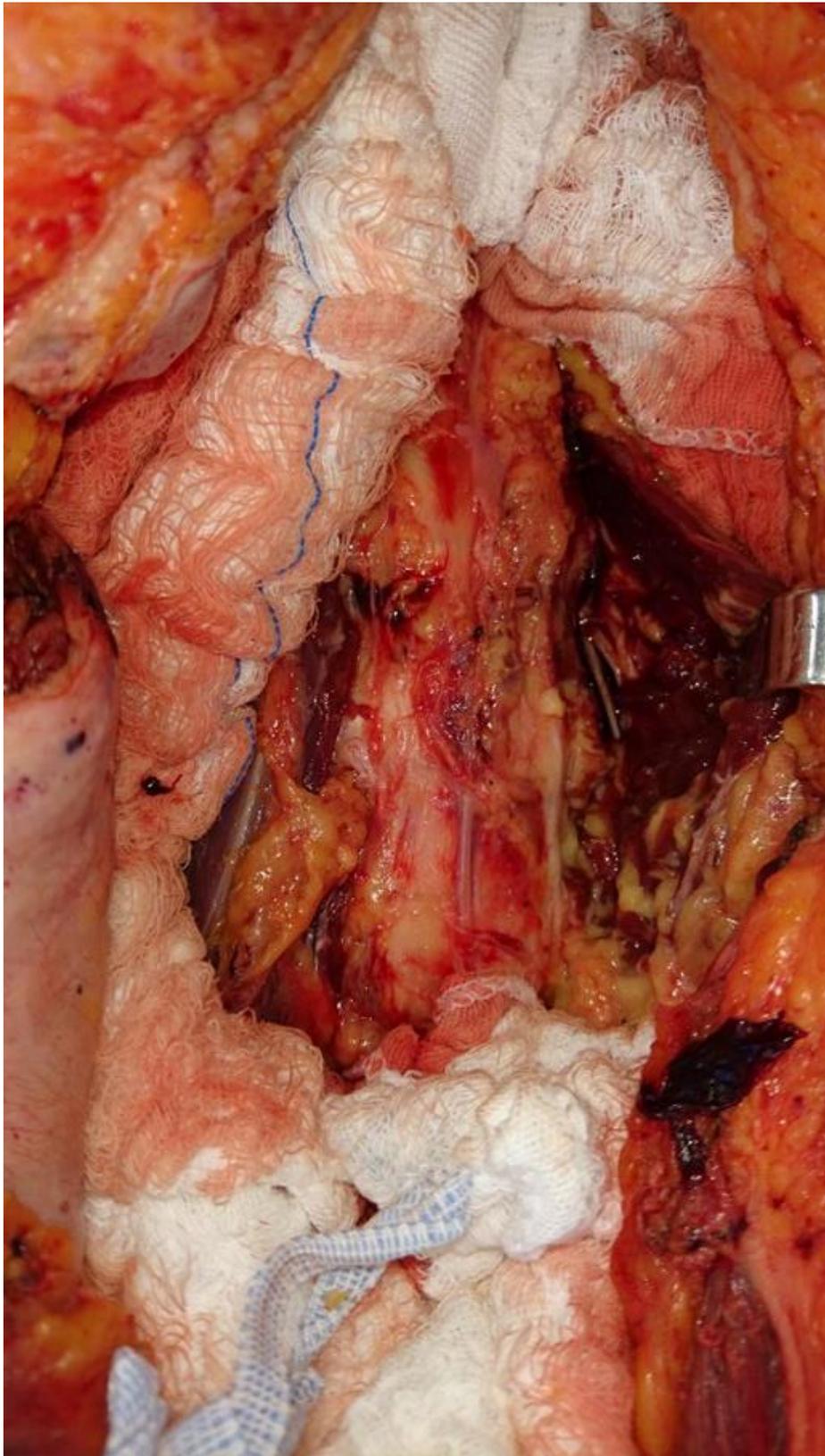
espécime foi imediatamente manipulado pelo auxiliar técnico de enfermagem de forma asséptica e então, procede ao armazenamento. A técnica de captação do bloco de coluna lombar foi incluída na Rotina de Captação de Tecidos de Doador Cadáver do Banco Multitecidos do INTO (**ANEXO F**).



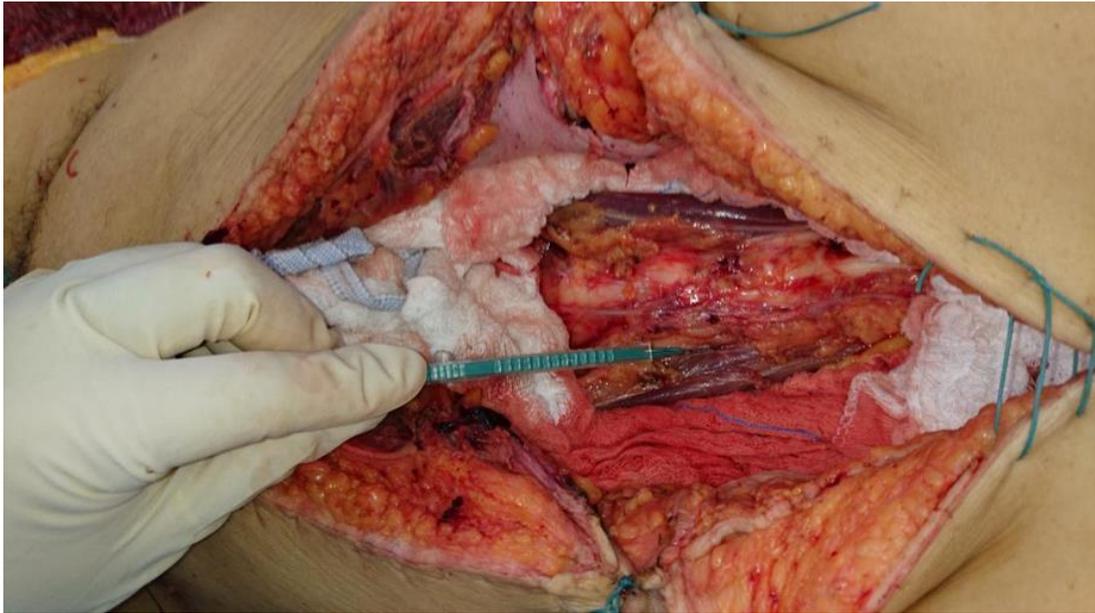
**Figura 21. Incisão prévia à cavidade abdominal utilizada para o acesso.** (Arquivo pessoal).



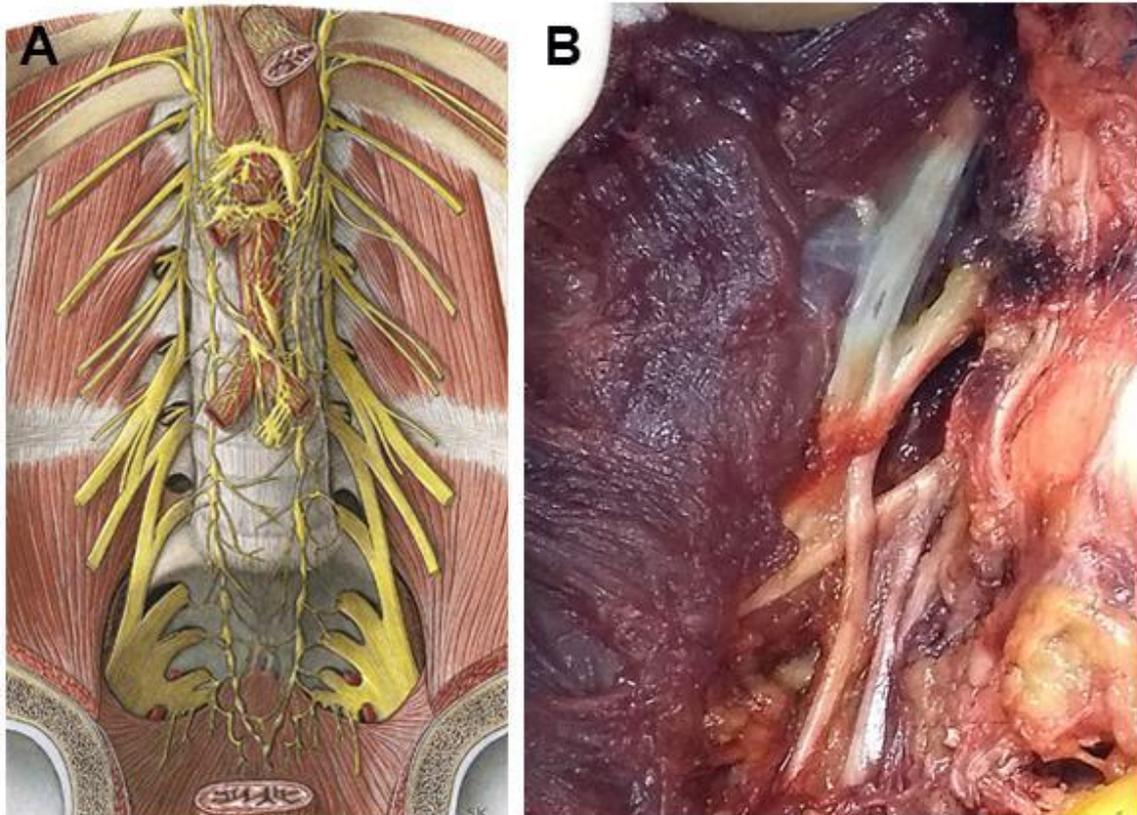
**Figura 22. Cavidade abdominal exposta.** Exposição da cavidade abdominal (A), e afastamento e proteção das vísceras com compressas para auxiliar na exposição do retroperitônio (B). (Arquivo pessoal).



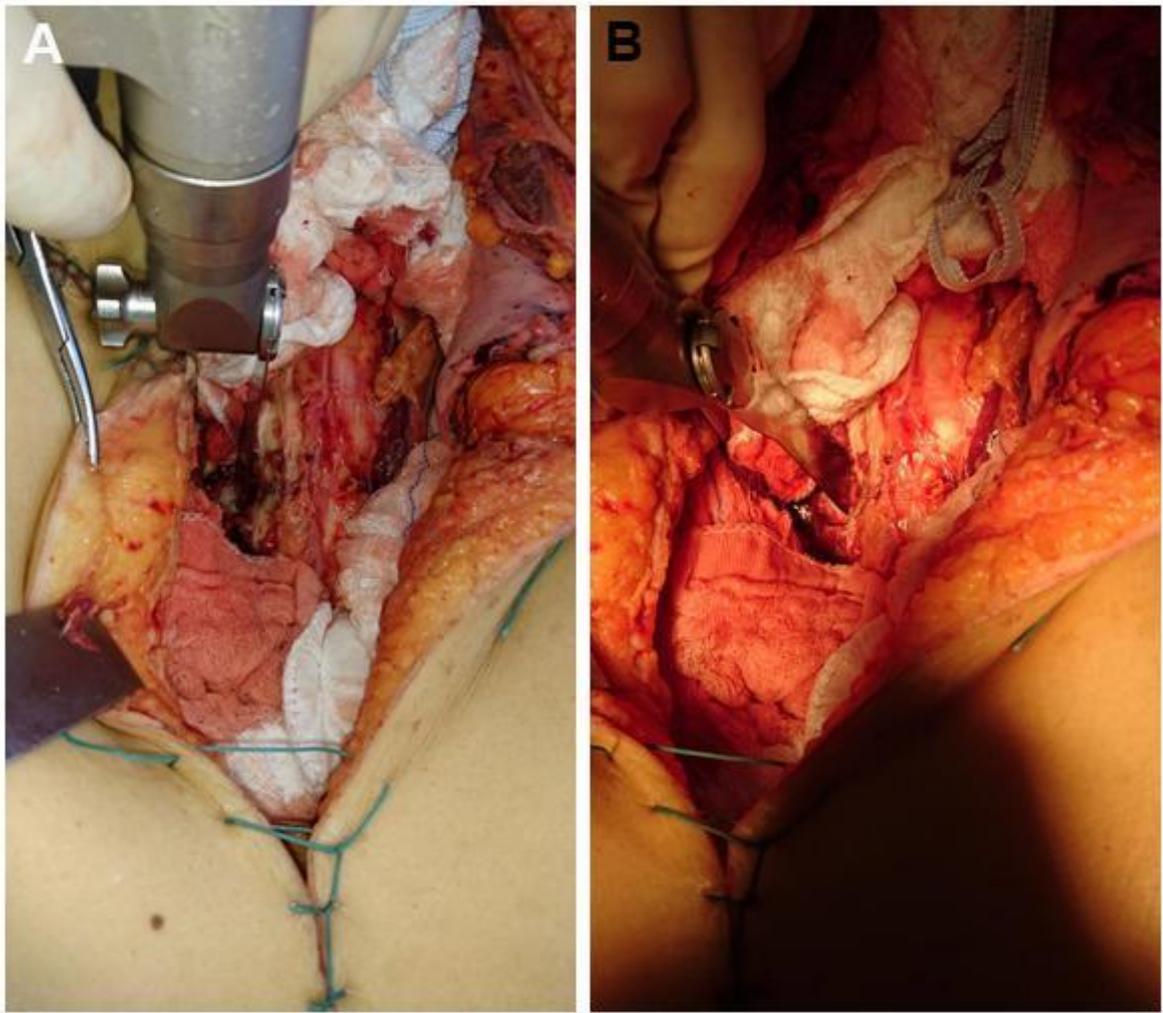
**Figura 23. Identificada a coluna lombar e o músculo psoas maior. (Arquivo pessoal).**



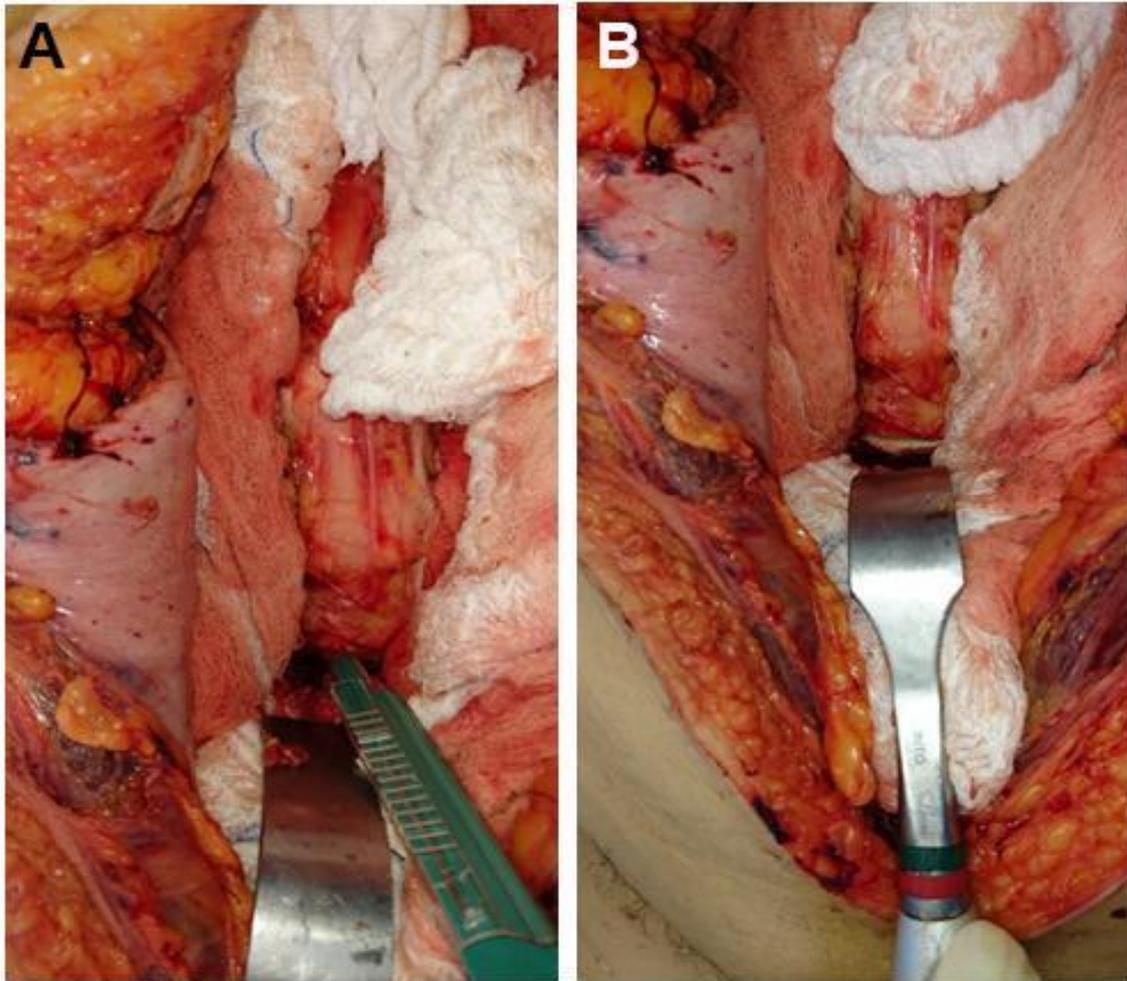
**Figura 24.** Músculo psoas maior é dissecado e são removidas suas inserções na coluna lombar até a visualização do plexo lombar. (Arquivo pessoal).



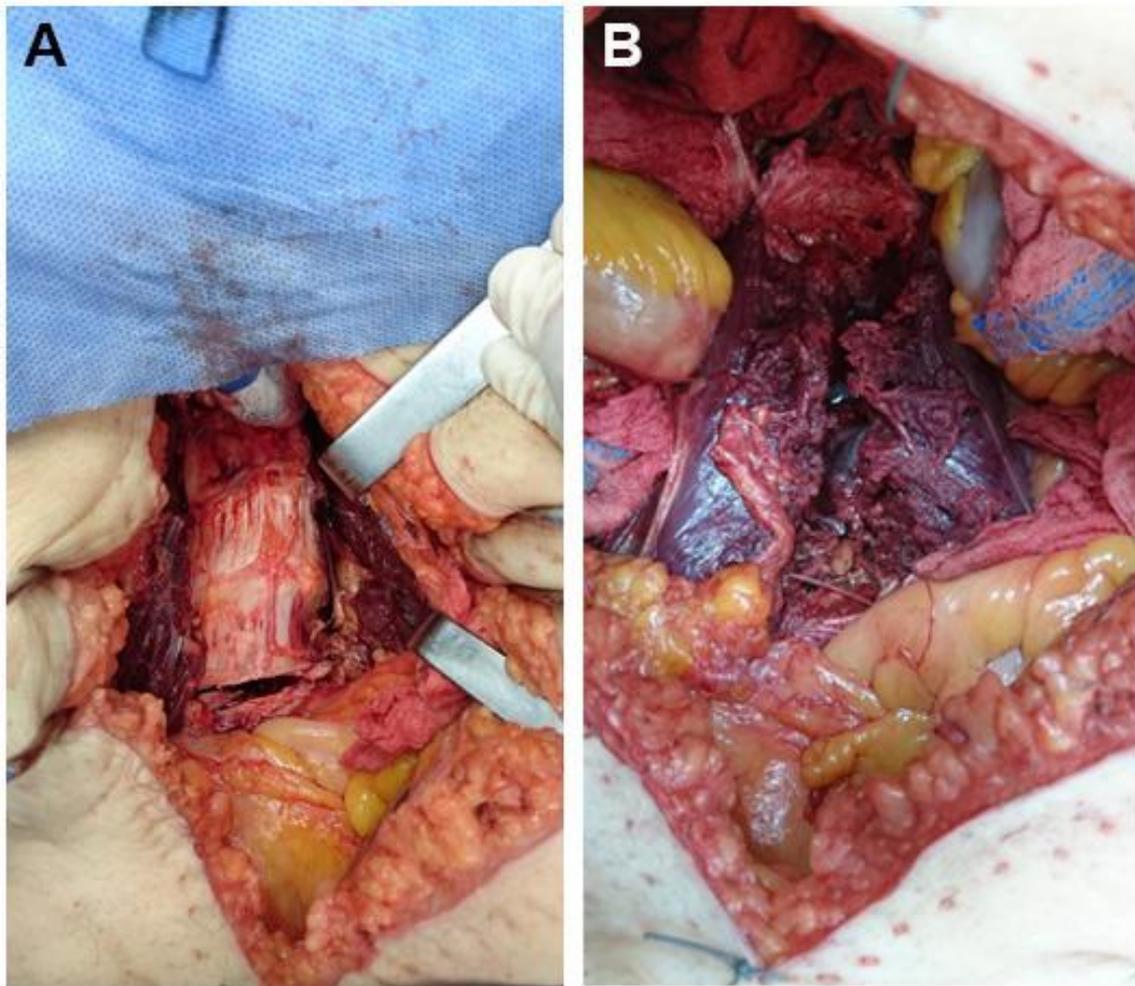
**Figura 25. Anatomia do plexo neural.** Representação esquemática anatômica do plexo lombar (A), plexo neural lombar dissecado após descolamento do músculo psoas maior da coluna lombar (B). [Modificado de Sobotta (A) Arquivo pessoal (B)].



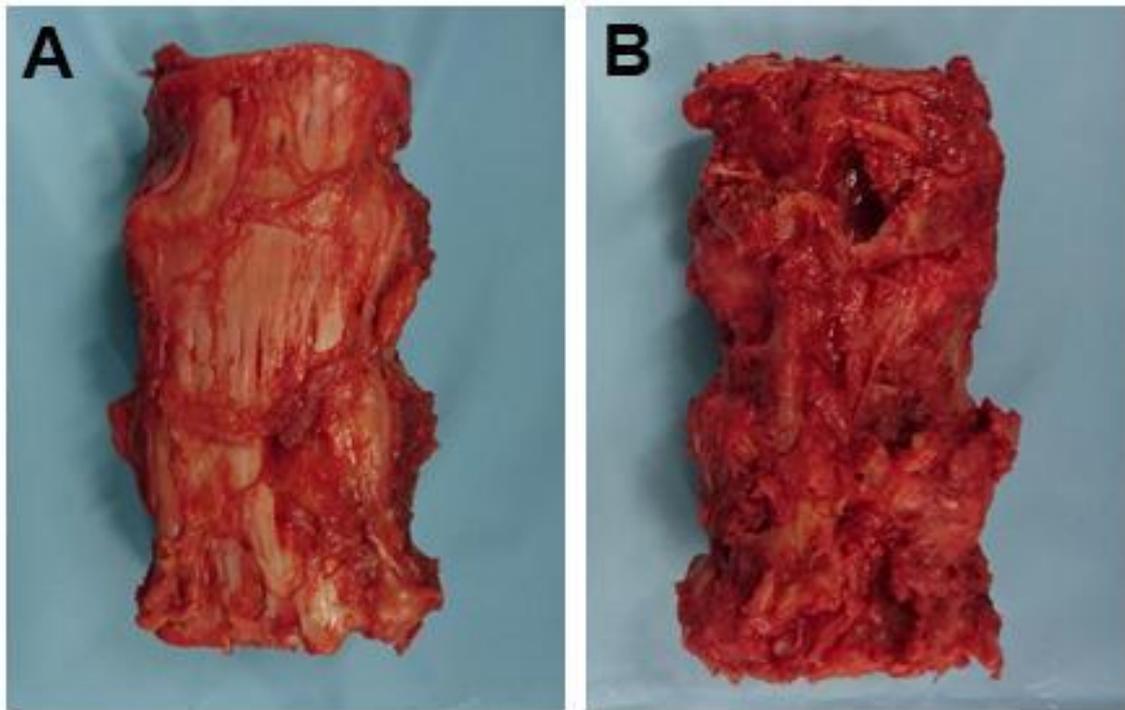
**Figura 26. Ostetomia do processo transverso e pedículo com motor elétrico e serra sagital na base dos processos transversos na confluência do pedículo e o corpo vertebral. (Arquivo pessoal).**



**Figura 27. Discectomia.** Discectomia no nível L5-S1 com bisturi frio (A) e espaço intersomático após curetagem (B). (Arquivo pessoal).



**Figura 28. Bloco da coluna vertebral livre.** Neste momento, o espécime torna-se móvel e facilmente manipulado até sua remoção completa (A) e aspecto final pós remoção do bloco. (Arquivo pessoal).



**Figura 29. Coluna vertebral ressecada.** Vista anterior (A) e posterior (B) do bloco de coluna removido de doador cadáver. (Arquivo pessoal).

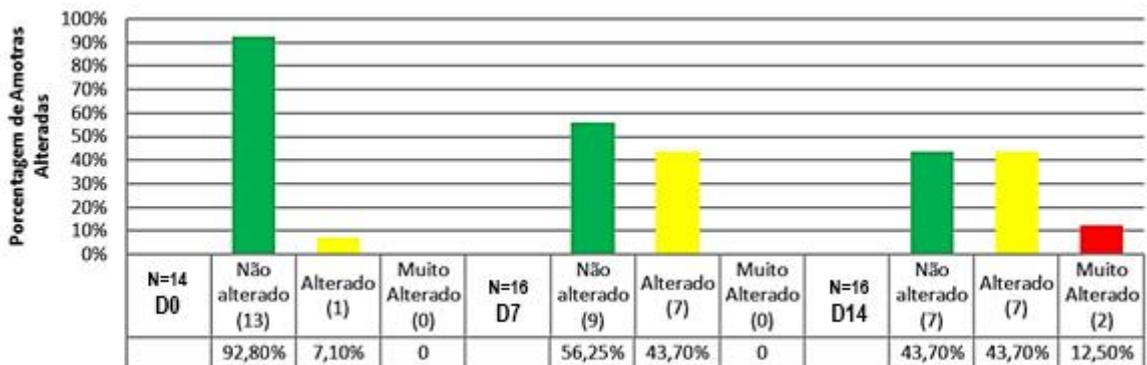
### 5.3 Análise das lâminas do disco intervertebral

Foram captados 6 blocos de coluna lombar (1 por doador cadáver) contendo 3 discos intervertebrais em cada um (L2-L3, L3-L4 e L4-L5) o que permitiu para o estudo um total de 18 espécimes disponíveis. Os 3 discos intervertebrais de cada doador foram distribuídos aleatoriamente quanto ao tempo e processo de criopreservação (por 7 ou 14 dias) ou apenas preservado em formaldeído à 10% (controle/d0). Dessa forma, obtivemos 6 amostras como controle (d0), 6 para congelamento por 7 dias (7d) e 6 para congelamento por 14 dias (d14). Cada espécime, por doador cadáver, classificado como d0, d7 ou d14 foi seccionado em metades e foram realizados, em seguida, um corte transversal e um longitudinal para cada hemi-disco. Este processo gerou 24 lâminas referentes ao controle (d0), 24 para as amostras criopreservadas por 7 dias e 24 para as congeladas por 14 dias. Devido à má qualidade, decorrente do preparo, de determinadas lâminas para a avaliação da matriz extracelular do ânulo fibroso e do núcleo pulposo ou a celularidade destas regiões, obtivemos para as análises finais: um total de 14 amostras histológicas disponíveis referentes ao d0, 16 referentes ao d7 e 16 ao d14 para a avaliação da morfologia e estrutura da matriz do ânulo fibroso; 18 no d0, 20 no d7 e 16 no d14 para morfologia e estrutura da matriz do núcleo pulposo; 15 no d0, 16 no d7 e 15 no d14 para análise da celularidade do ânulo fibroso e; 18 no d0, 21 no d7 e 14 no d14 para avaliação da celularidade do núcleo pulposo.

Os discos intervertebrais foram avaliados quanto as alterações histológicas, possivelmente causadas pelo processo de congelamento, por 2 patologistas os quais tiveram como base a classificação proposta neste estudo elaborada a partir de escores estabelecidos para doença degenerativa discal na literatura

especializada (WEILER *et al*, 2011; RUTGES *et al*, 2013). Determinamos a presença de dano ou manutenção de seu aspecto, independente de possível patologia discal prévia, quando os dois patologistas concordaram com a classificação em inalterado, alterado, muito alterado na avaliação da morfologia e estrutura da matriz e celularidade do ânulo fibroso e núcleo pulposo. Não houve discordância de pontuação entre os avaliadores na análise das lâminas.

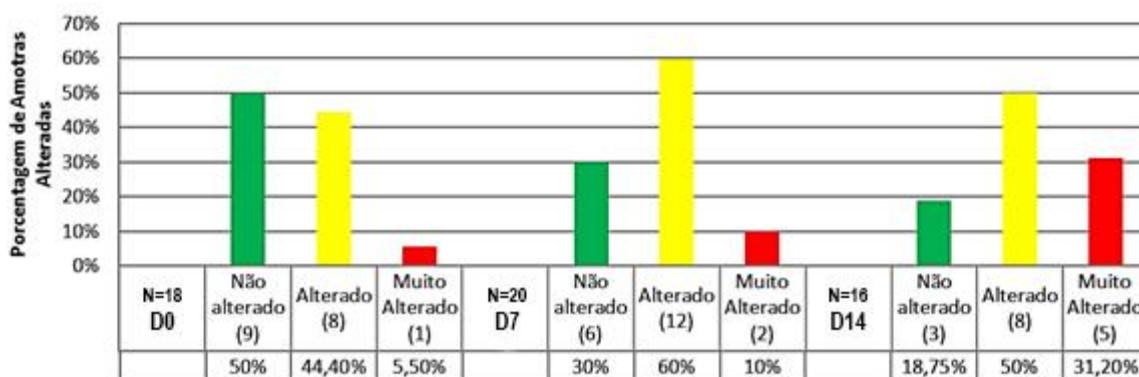
Em relação ao ânulo fibroso no grupo controle, 13 (92,8%) amostras foram classificadas como não alteradas, 1 (7,1%) alterada e nenhuma muito alterada. Após 7 dias de congelamento, permaneceram não alteradas 9 (56,25%), 7 (43,7%) sofreram alteração, porém, nenhuma foi classificada como muito alterada. As análises dos espécimes descongelados no 14º dia evidenciaram 7 (43,7%) como não alteradas, 7 (43,7%) alteradas e 2 (12,5%) muito alteradas. (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1. Morfologia e estrutura da matriz do ânulo fibroso**

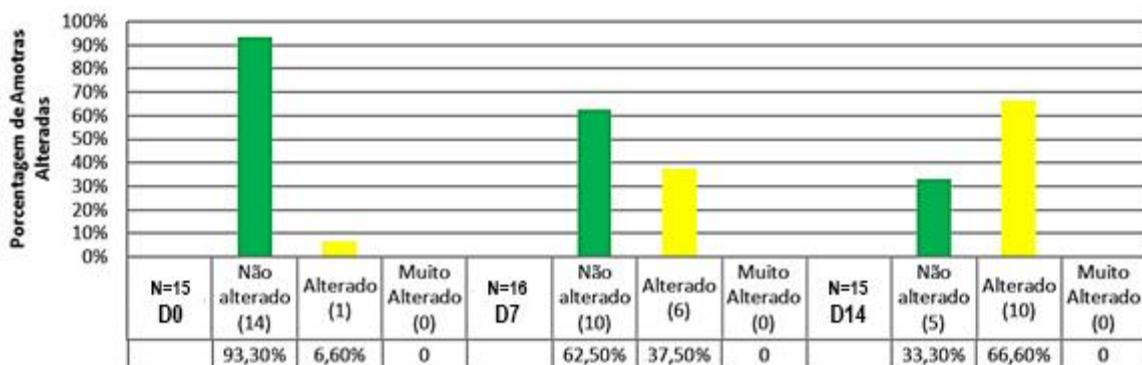
A análise do núcleo pulposo apresentou, no grupo controle, não alteração em 9 (50%) amostras, alteração em 8 (44,4%) e apenas 1 (5,5%) classificada como muito alterada. A partir do sétimo dia de congelamento, 6 (30%) não

apresentaram alteração, 12 (60%) tornaram-se alteradas e 2 (10%) foram classificadas como muito alteradas. Quando descongelados a partir dos 14 dias, 3 amostras do disco intervertebral (18,75%) permaneceram inalteradas enquanto 8 (50%) apresentaram alteração e 5 (31,2%) sofreram muita alteração (**Gráfico 2**).



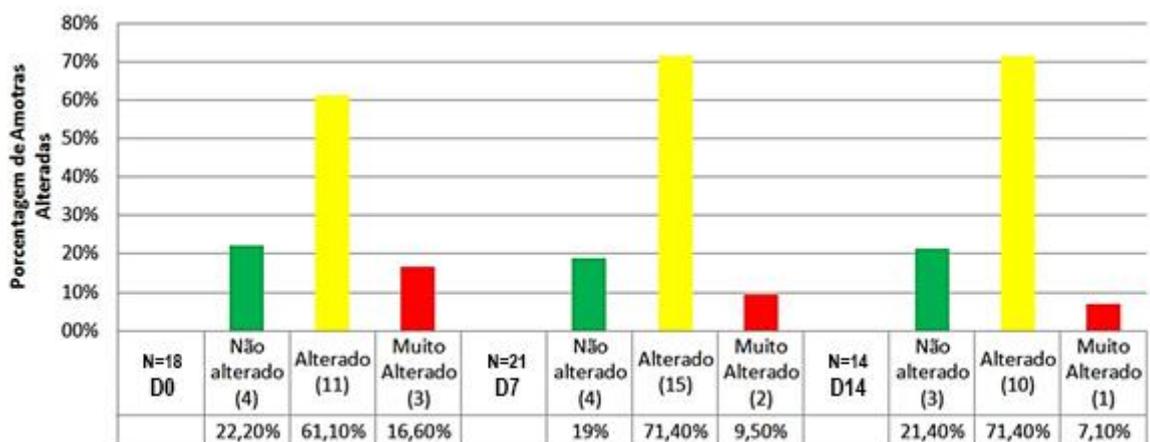
**Gráfico 2. Morfologia e estrutura da matriz do núcleo pulposo**

A avaliação da celularidade do ânulo fibroso do grupo controle não encontrou alterações em 14 (93,3%) amostras e apenas 1 (6,6%) apresentava alteração. Nenhuma fora classificado como muito alterada. A avaliação após sete dias de congelamento evidenciou que 10 (62,5%) permaneciam inalteradas enquanto 6 (37,5%) foram classificadas com alteração. Novamente, nenhuma amostra apresentava características de muita alteração o que também não foi observado após 14 dias de criopreservação. Neste momento, 5 (33,3%) encontravam-se inalteradas e 10 (66,6%) alteradas (**Gráfico 3**).

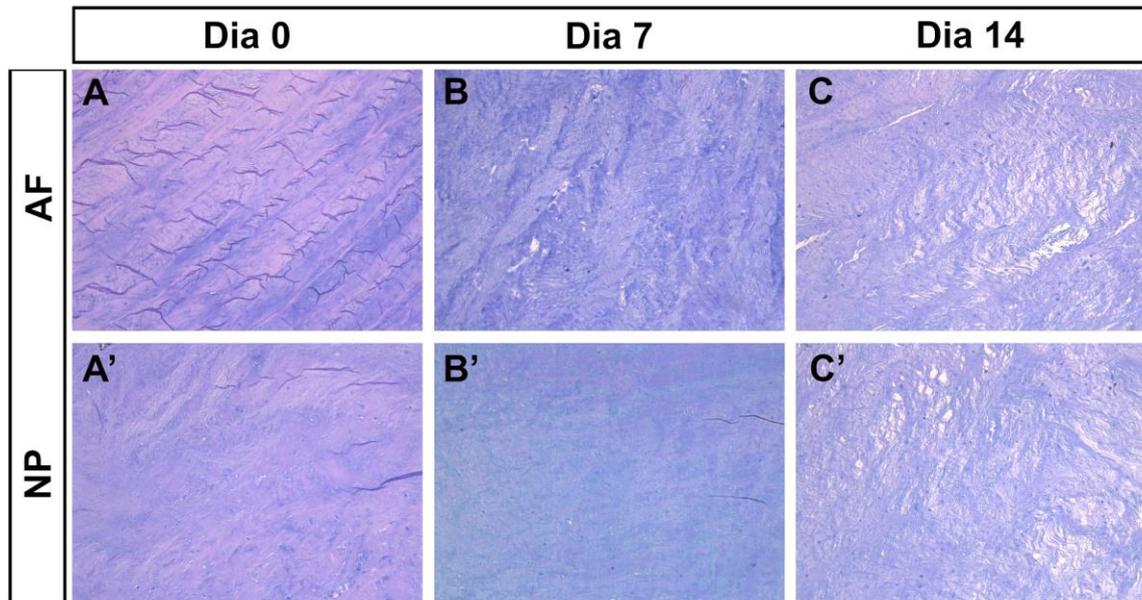


**Gráfico 3. Celularidade do ânulo fibroso**

Quando avaliada a celularidade do núcleo pulposo no grupo controle, não foram observadas alterações em 4 (22,2%) das amostras enquanto 11 (61.1%) estavam alteradas e 3 (16.6%) muito alteradas. O número de não alteradas após sete dias de congelamento correspondeu à 4 (19%) amostras. Foram observadas 15 (71.4%) alteradas e 2 (9.5%) muito alteradas. Os discos submetidos ao descongelamento após o 14º dia não apresentavam alteração em 3 (21.4%), 10 (71.4%) estavam alterados e 1 (7.1%) muito alterado (**Gráfico 4**).



**Gráfico 4. Celularidade do núcleo pulposo**



**Figura 30. Histologia do ânulo fibroso (A, B e C) e núcleo pulposo (A', B' e C') nos grupos controle (A), após 7 e 14 dias (B e C) de congelamento: Alterações foram observadas de acordo com maior tempo de criopreservação.**

## 6. Discussão

A doença degenerativa da coluna vertebral é frequente na população mundial e acomete, sobretudo, indivíduos acima dos 50 anos de idade. Com o envelhecimento populacional, sua prevalência tenderá a aumentar (TERAGUCHI *et al.*, 2014). A maioria dos pacientes sintomáticos respondem ao tratamento conservador. Entretanto, aqueles que apresentam persistência dos sintomas, a despeito das medidas conservadoras empregadas no tratamento inicial, tornam-se candidatos à abordagem cirúrgica (DI FERREIRA *et al.*, 2008).

É reconhecido como padrão-ouro para o tratamento da doença discal a artrodese (fusão) do segmento vertebral (LEE, 2016). Após a remoção do disco intervertebral degenerado, o espaço interssomático é preenchido com enxerto ósseo, autólogo ou homólogo, inserido em suportes estruturais metálicos (cestas em titânio) ou polímeros (poli-éter-cetona). Para o sucesso da fusão e estabilização do segmento, instrumentação vertebral com parafusos em titânio são posicionados nos pedículos vertebrais e então, unidos através de hastes compostas do mesmo material.

Embora a artrodese seja o procedimento de escolha nos casos de tratamento operatório, são conhecidas suas alterações na biomecânica local (OLVERA *et al.*, 2015). As cargas impostas à coluna vertebral são distribuídas nas unidades vertebrais funcionais, as quais são móveis, de forma harmoniosa. A fusão intervertebral elimina determinado arco de movimento de um segmento vertebral. Consequentemente, o estresse mecânico gerado naquele local é transferido para as unidades funcionais vertebrais supra e subjacentes submetendo, aos mesmos,

a possibilidade de desenvolvimento ou aceleração de alterações degenerativas que caracterizam a DNA (SAAVEDRA-POZO, 2014).

O maior interesse na manutenção das propriedades biomecânicas locais e preservação da mobilidade do segmento tem proporcionado desenvolvimento de novas técnicas e materiais com objetivo de evitar a DNA, também denominada síndrome juncional ou de transição. A estabilização dinâmica utiliza o conceito de banda de tensão através da ação de um espaçador elástico posicionado entre os parafusos inseridos nos pedículos vertebrais. Embora estudos de longo prazo sejam necessários para determinar a real eficácia desta técnica na prevenção da DNA, a utilização deste dispositivo tem demonstrado a recuperação da estabilidade local e conseqüente diminuição da pressão discal sem, entretanto, eliminar o movimento da UFV (CHOU *et al.*, 2011).

As artroplastias discais consistem na substituição completa do disco degenerado por uma prótese móvel a qual busca mimetizar o arco de movimento local e, portanto, manter a função do nível intervertebral acometido e evitar a síndrome juncional (SZPALSKI, 2002). Apresenta indicação restrita e tem uso mais frequente na coluna cervical. Com o início de seu desenvolvimento no final da década de 70, permanece em constante evolução no que tange obter o material ideal capaz de proporcionar a manutenção das propriedades locais e que possa garantir a fixação e integração no sítio receptor (BAO *et al.*, 1996).

Atualmente, observamos desenvolvimento de pesquisas que envolvem a transplantação de disco intervertebral obtido de doador cadáver (LUK e RUAN, 2008). Esta opção de tratamento compartilha os mesmos objetivos e princípios da artroplastia discal: proporcionar uma biomecânica próxima à fisiologia local e

impedir a ocorrência da DNA. Apresenta como vantagem a diminuição de custos, uma vez que, não há necessidade da utilização de implantes metálicos e a obtenção do tecido é realizada por processo de doação. Estudos em animais utilizando o transplante de disco intervertebral observaram preservação da estabilidade e movimento locais (OLSON *et al.*, 1991). Luk e outros (2003) realizaram transplante de disco intervertebral à fresco em 12 macacos e analisaram, após seguimento de 2 anos, modificações histológicas e radiográficas. Degeneração grave do tecido foi identificada aos 24 meses pós-transplantação enquanto que diminuição de altura do disco homólogo foi observada após 2 meses (LUK *et al.*, 2003). O mesmo autor, ao utilizar espécimes também não criopreservados em 14 macacos, relatou osteointegração e consequente estabilização do sítio receptor após 4 meses do procedimento. Entretanto, diminuição da altura discal e perda de hidratação do núcleo pulposo e ânulo fibroso estiveram presentes. Em humanos com doença degenerativa cervical tratados através desta técnica, Ruan e outros (2007) identificaram, durante o seguimento, a integração ao espaço intervertebral e aumento da altura do disco intervertebral transplantado (RUAN *et al.*, 2007).

Embora o transplante de disco intervertebral tenha surgido como interessante alternativa à artroplastia artificial, a utilização de espécimes não criopreservados permite o surgimento de alterações histológicas, metabólicas e biomecânicas que podem comprometer, a longo prazo, seus resultados (LAM *et al.*, 2011). A criopreservação é definida como a manutenção das propriedades biológicas quando um tecido é submetido a temperaturas negativas interrompendo seus processos biológicos, reações químicas e atividades nos meios intra e extracelulares. Quando descongelados, ocorre o retorno de suas funções

(CASTRO *et al.*, 2011). Para esse efeito, a utilização de agentes preservantes é necessária. Utilizamos o DMSO a 10% como crioprotetor na medida que, quando associado ao congelamento lento, atua de forma a reduzir o estresse térmico na transição do estado líquido para o sólido além de proporcionar uma desidratação gradual das células com intuito de evitar a formação de cristais de gelo. Pesquisas têm sido realizadas para determinar os efeitos da criopreservação em cartilagem hialina. Foi identificado que o simples congelamento tem como consequência dano aos condrócitos o que não ocorreu quando o espécime foi submetido ao decréscimo gradual da temperatura e imerso em agente criopreservante como o DMSO (TOMFORD, 1984). Katsuura (1994) avaliou o dano morfológico e biológico em discos intervertebrais criopreservados de cães. Identificou redução em 44% na atividade metabólica celular em relação ao grupo controle e manutenção das características histológicas, principalmente no ânulo fibroso, após o período de 4 semanas de armazenamento (KATSUURA, 1994). A preservação em baixas temperaturas pode acarretar deterioração irreversível às propriedades biomecânicas do disco intervertebral tornando-o mais rígido. Tal fato não foi observado quando utilizada solução criopreservante (LAM, 2011).

O desenvolvimento desta nova tecnologia exige a existência de um centro especializado com capacidade técnica e logística para obtenção de órgãos a partir de doadores cadáveres. No Brasil, o INTO promove, através da ATMIT, a prática de captação a partir de doadores cadáveres no âmbito do estado do Rio de Janeiro. Como órgão do Ministério da Saúde, atua como auxiliar ao Sistema Nacional de Transplantes na regulamentação e desenvolvimento de normas e ações voltadas para o binômio doação-transplante no que tange ao aparelho musculoesquelético.

A partir das funções do instituto e utilizando sua estrutura, propusemos o desenvolvimento da técnica cirúrgica de captação do bloco de coluna lombar com o objetivo de obter material tanto para reconstruções ósseas quanto para contribuir com o desenvolvimento do protocolo de preservação do disco intervertebral e, conseqüentemente, avaliar sua possível utilização como futuro substituto biológico. Embora tecnicamente demandante, a ressecção do bloco de coluna lombar é factível e foi reproduzida em todos os doadores cadáveres incluídos no estudo. Os procedimentos foram realizados por médico ortopedista com conhecimento em cirurgia da coluna vertebral e de acordo os protocolos propostos de captação deste tecido.

A captação prévia do fígado e dos rins permite uma exposição ampla da cavidade abdominal e do retroperitônio na medida que o afastamento das alças intestinais torna mais fácil a visualização desta região. Quando essa abordagem não é realizada, o acesso à coluna vertebral pode se tornar desafiador tornando possível a lesão intestinal inadvertida e conseqüente contaminação da cavidade. Neste caso, todo o material deverá ser descartado. Após a remoção do espécime, a reconstrução do cadáver finaliza o processo de captação.

A partir de cada doador, foram obtidos 3 discos intervertebrais e 4 corpos vertebrais. Um dos benefícios da obtenção do bloco de coluna é obtermos excelente material ósseo utilizado nas reconstruções ortopédicas. Cada corpo vertebral gera entre 30g a 40g de osso córtico-esponjoso, sendo o material de eleição e mais frequentemente utilizado nos transplantes musculoesqueléticos com outras finalidades. O processo de preservação das vértebras segue o estabelecido para tecido ósseo do esqueleto apendicular: são armazenados em embalagem

tripla, seladas e congeladas à – 80° C, além de serem submetidas ao controle biológico e processamento.

Devido ao sucesso da sua execução, a técnica cirúrgica desenvolvida por nós foi incorporada ao manual que estabelece as rotinas de captação de tecido musculoesquelético.

Para o desenvolvimento do protocolo de preservação do disco intervertebral utilizamos, como base, parâmetros determinados para captação, transporte e processamento de tecido osteocondral já estabelecidos e, também, por suas similaridades teciduais. A literatura é escassa quanto à técnica de preservação do disco intervertebral, uma estrutura fibrocartilaginosa e com baixa celularidade. Além disso, alterações degenerativas incipientes podem ser encontradas em pacientes entre 21 e 30 anos de idade (ONG *et al.*, 2003). A obtenção de imagem por ressonância magnética previamente à captação seria uma opção para esta avaliação. Entretanto, a baixa disponibilidade deste dispositivo nos hospitais, a logística necessária para sua realização e as questões éticas e legais são empecilhos à sua utilização. Além disso, seu uso após a captação não gera imagens com qualidade para serem avaliadas devido aos artefatos produzidos pelas embalagens de armazenamento. Desta forma, estabelecemos a faixa etária de doadores ideais entre 15 e 55 anos. Essa proposta apresentou como desvantagem tornar ainda mais seletiva a determinação de doadores cadáveres aptos, o que justifica nosso número de espécimes obtidos neste estudo.

A preservação das características histológicas do disco intervertebral pode ser considerada um indicador de sua viabilidade. Os escores descritos na literatura avaliam aspectos degenerativos presentes em sua estrutura (RUTGES *et al.*,

2013). De acordo com a cascata de degeneração de Kirkaldy-Willis, as alterações podem estar presentes já no adulto jovem (CHOI, 2009). Neste sentido, é possível que os espécimes coletados para nossa pesquisa apresentassem modificações teciduais. Embora seja, de fato, um fator limitante para nosso estudo, a observação inicial do grupo controle e das amostras após os processos de criopreservação puderam inferir sobre os efeitos do congelamento em meio específico e sua relação temporal.

O núcleo pulposo apresentou, quanto à morfologia e estrutura da matriz e à celularidade, comportamento semelhante ao ânulo fibroso: aumento de sinais de degeneração quanto maior o tempo submetido ao congelamento. Entretanto, as análises iniciais evidenciaram mais modificações no grupo controle quando comparado, no mesmo período, ao anel fibroso. As lâminas consideradas como alteradas em sua morfologia/estrutura corresponderam a 40% e em relação à celularidade, 61.1%. A partir destes dados, podemos pressupor que o núcleo pulposo seja uma estrutura mais sensível às condições impostas e menos exposta ao agente criopreservante. Esta observação é compatível com os resultados de Katsuura que identificou maior preservação de células na periferia do ânulo fibroso em detrimento ao núcleo pulposo (KATSUURA, 1994). Chan e colaboradores (2010), através de análises de secções de discos intervertebrais criopreservados, também observaram que a estrutura do ânulo fibroso permaneceu organizada quando congelada em meio específico (CHAN *et al.*, 2010). Em relação ao núcleo pulposo, sabe-se que o processo degenerativo da doença discal tem início a partir modificações bioquímicas nesta região. Com base em nossas observações, podemos pressupor que em determinados espécimes captados para a pesquisa, estas alterações possivelmente já estavam presentes.

De acordo com nossos resultados, identificamos a existência de viabilidade tecidual nas amostras criopreservadas pelo período de 7 dias. Esta informação nos permitiu, no âmbito da histologia, considerar o disco intervertebral como uma estrutura passível de ser utilizada como substituto nas doenças discais.

O transplante de disco intervertebral obtido de doador cadáver em humanos tem permitido observar, aos exames de imagem, ganho de altura discal e reidratação do núcleo pulposo (RUAN *et al.*, 2007). Embora a transplantação de disco intervertebral humano seja promissora, a reprodutibilidade destes resultados dependerá de novas pesquisas. Em nosso estudo, identificamos que aos 14 dias de congelamento em meio criopreservante, modificações mais importantes estão presentes e, portanto, este fator poderá determinar um limite à sua utilização.

## **7. Conclusão**

Em nosso estudo, observamos que a proposta de obtenção do espécime por nós desenvolvida, embora seja tecnicamente demandante e necessite de conhecimentos em cirurgia da coluna vertebral, é factível e reproduzível, assim como, os protocolos de captação, preservação e processamento, os quais são semelhantes ao estabelecido para tecido osteocondral. Em relação à viabilidade do disco intervertebral, pudemos observar que alterações histológicas mais significativas foram observadas em espécimes preservados em meio protetor por 14 dias, sendo o núcleo pulposo a região mais sensível às condições impostas.

A partir destes resultados, identificamos que a criopreservação do disco intervertebral por 7 dias apresenta viabilidade e, portanto, sua utilização através de uma verdadeira artroplastia biológica poderá se tornar uma opção terapêutica valiosa.

## 8. Referências Bibliográficas

ADAMS, M. A.; DOLAN, P.; HUTTON, W. C. The stages of disc degeneration as revealed by discograms. **J Bone Joint Surg**, v. 68-B, p.36-41, janeiro 1986.

ATLAS, S. J.; KELLER, R. B.; CHANG, Y.; DEYO, R. A. SINGER, D. E. Surgical and non surgical management of sciatica secondary to a lumbar disc herniation. **Spine**, v.26, p.1179-87, maio 2001.

BAO, Q. B.; MCCULLEN, G. M.; HIGHAM, P. A. The artificial disc: theory, design and materials. **Biomaterials**, v.17, p. 1157-1167, junho 1996.

BARREY, C.; JUND, J.; NOSEDA, O.; ROUSSOULY, P. Sagittal balance of the pelvis-spine and lumbar degenerative diseases. A comparative study about 85 cases. **Eur Spine J**, n.16, p.1459-67, janeiro 2007.

BENZEL, E.C. Biomechanics of Spine Stabilization. **New York: Thieme**, 2001.

BISHOP, P. Patophysiology of the intervertebral disc. Principles and Practice of Chiropractic. East Norwalk: Appleton and Lange, 1992.

BOOS, N.; WEISSBACH, S.; ROHRBACH, H.; WEILER, C.; SPRATT, K. F.; NERLICH, A. G. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs. **Spine**, n. 27, p.2631-44, dezembro 2002.

BRUEHLMANN, S. B.; RATTNER, J. B.; MATYAS J. R.; DUNCAN, N. A. Regional variations in the cellular matrix of the annulus fibrosus of the intervertebral disc. **J Anat**, v. 201, n. 2, p.159-71, agosto 2002.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIRREDO J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação do tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.957, janeiro 2011.

CHAN, S. C. W; LAM, S. K. L.; LEUNG, D. C.; LUK, K. D. K.; CHEUNG, K. M. C. Minimizing cryopreservation-induced loss of disc cell activity for storage of whole intervertebral discs. **European Cells and Materials**, v.19, p.273-283, janeiro 2010.

CHENG, J.S.; SONG, J. K. Anatomy of the sacrum. **Neurosurg Focus**, v.15, n.15, E3, agosto 2003.

CHOI, Y. S. Pathophysiology of Degenerative Disc Disease. **Asian Spine J**, v.3, n.1, p.39-44, junho 2009.

CHOU, D.; LAU, D.; SKELLY, A.; ECKER, E. Dynamic stabilization versus fusion for treatment of degenerative spine conditions. **Evid Based Spine Care J**, v.2, n. 3, p.33-42, agosto 2011.

CISZKIEWICS, A.; MILEWSKI G. A novel kinematic model for a functional spinal

unit and a lumbar spine. **Acta of Bioengineering and Biomechanics**, v.18, n.1, p.87-95, junho 2016.

CS-SZABO, G.; RAGASA-SAN JUAN, D.; TURUMELLA, V.; MASUDA, K.; THONAR, E. J.; AN, H.S. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration. **Spine**, v.27, p.2212-19, outubro 2002.

DEFINO, H. L. A.; PUDLES, E. **Coluna Vertebral: Conceitos Básicos**. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap 2, p. 23-31.

DI FERREIRA, R. B.; DAHER, S.; CARDOSO, A. L. P.; JÚNIOR, W. E. P.; JÚNIOR, Z. A. S.; TRISTÃO, N. A. Tratamento cirúrgico da doença degenerativa discal com estabilização dinâmica. **Coluna/Columna**, v.7, n.8, p.217-222, julho 2008.

DUVAL-BEAUPÈRE, G; SCHMIDT, C; COSSON, P. A barycentremetric study of the sagittal shape of spine and pelvis: the conditions required for an economic standing position. **Annals of biomedical engineering**, v. 20, p.451-462, fevereiro 1992.

ELFERING, A.; SEMMER, N.; BIRKHOFFER, D.; ZANETTI, M.; HODLER, J.; BOOS, N. Risk factors for lumbar disc degeneration: a 5-year prospective MRI study in asymptomatic individuals. **Spine**, n.27, v.2, p. 125-134, janeiro 2002.

ERRINGTON, R. J.; PUUSTJARVI, K.; WHITE, J. R.; ROBERT, S.; URBAN, J.P. Characterisation of cytoplasm-filled processes in cells of intervertebral disc. **J ANAT**, n. 192, p.369-78, abril 1998.

FENG, H.; DANFELTER, M.; STRÖMQVIST, B.; HEINEGÅRD, D. Extracellular matrix in disc degeneration. **The Journal of Bone and Joint Surgery (American)**, v. 88, n. suppl\_2, p. 25, 1 abril 2006.

FRANÇA, F. J. R.; BURKE, T. N.; CLARET, D. C.; MARQUES, A. P. Estabilização segmentar da coluna lombar nas lombalgias: uma revisão bibliográfica e um programa de exercícios. **Fisioter. Pesqui.**, v. 15, n. 2, p.200-6, junho 2008.

FRITZEL, P.; HAGG, O. Chronic low back pain and fusion: A comparison of three surgical techniques: a prospective multicenter randomized study from the Swedish lumbar spine study group. **Spine**, v.26, p.2561-2567, junho 2001.

GEIGER, IV; MULLER, O; NIEMEYER, T; KLUBA, T. Adjustamento of pelvispinal parameters preserves the constant gravity line position. **International Orthopaedics**, p.253-258, abril 2007.

GIGLIO, C. A.; VOLPON, J. B. Development and evaluation of thoracic kyphosis and lumbar lordosis during growth. **J Child Orthop**, n.1, p 187-193, julho 2007.

GILCHRIST, R. V.; SLIPMAN C. W.; BHAGIA, S. M. Anatomy of intervertebral foramen. **Pain Phisician**, v.5, n.4, p.372-78, outubro 2002.

GOFFIN, J.; GEUSENS E.; VANTOMME, N. Long-term follow-up after interbody fusion of the cervical spine. **J Spinal Disord Tech**, v.17, p.79-85, abril 2004.

GRANGE, L.; GAUDUN, P.; TROCME, C.; PHELIP, X.; MOREL, F.; JUVIN, R. Intervertebral disk degeneration and herniation: the role of metalloproteinase production and cytokines. **Joint Bone Spine**, v. 68, p.547-53, dezembro 2001.

HAYASHI, K.; YABUKI, T.; KUROKAWA, T.; SEKI, H.; HOGAKI, M.; MINOURA, S. The anterior and the posterior longitudinal ligaments of the lower cervical spine. **J Anat**, n.124, p.633-636, dezembro 1977.

KATSUURA, A.; HUKUDA, S. Experimental study of intervertebral disc allografting in the dog. **Spine**, v.19, n.21, p.2426-32, novembro 1994.

KOWALSKI, R. J.; FERRARA, L. A.; BENZEL, E.C. Biomechanics of the spine. **Neurosurg Q**, v. 15, n.1, março 2015.

KURRA, S.; METKER, U.; YIRENKYI, H.; TALLARICO, R. A.; LAVELLE, W. F. Assessment of Coronal Spinal Alignment for Adult Spine Deformity Cases After Intraoperative T Square Shaped Use. **Spine Deform**, v.6, n. 3, p.267-72, junho 2018.

LAM, S. K. L.; CHAN, S. C. W.; LEUNG, V. Y. L.; LU, W. W.; CHEUNG, K. M. C.; LUK, K. D. K. The role of cryopreservation in the biomechanical properties of the intervertebral disc. **European cells & materials**, v. 22, p. 393–402, dezembro 2011.

LANGER, F.; CZITROM, A.; PRITZKER K. P.; GROSS, A.E. The immunogenicity of fresh and frozen allogenic bone. **J Bone Joint Surg Am**, v. 57, p. 216-20, março 1975.

LEE, Y. C.; ZOTTI, M. G. T.; OSTI, O. L. Operative Management of lumbar degenerative disc disease. **Asian Spine J**, v.10, n. 4, p.801-819, agosto 2016.

LEGAYE J; DURVAL-BEAUPÈRE G; HECQUET J; MARTY C. Pelvic incidence: a fundamental pelvic parameter for three-dimensional regulation of of spinal sagittal curves. **Eur Spine J**, p.99-103, maio 1998.

LORAM, ID; LAKIE, M. Human balancing of an inverted pendulum: position control by small, ballistic-like, throw and catch movements. **Journal of physiology**, p.1111-1124, maio 2002.

LOTZ, J. C.; CHIN, J. R. Intervertebral Disc Cell Death Is Dependent on the Magnitude and Duration of Spinal Loading. **Spine**, v.25, n.12, p.1477-83, junho 2000.

LUK, K. D. K.; RUAN, D. K. Intervertebral disc transplantation: a biological approach to motion preservation. **Eur Spine J**, v.17, suppl\_4, p.504-510, novembro 2008.

LUK, K. D. K.; RUAN, D. K.; LU, D. S.; FEI, Z. Q. Fresh frozen intervertebral disc allografting in a bipedal animal model. **Spine**, v.28, n.9, p.864-870, maio 2003.

MARCHAND, F.; AHMED, A. M. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus. **Spine**, v. 15, n. 5, p. 402–10, maio 1990.

MELROSE, J.; SMITH, S. M.; APPELYARD, R. C.; LITTLE, C. B. Aggrecan, versican, and type VI collagen are components of annular translamellar crossbridges in the intervertebral disc. **Eur Spine J Heidelberg**, v.17, p. 314-324, outubro 2007.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; ARGUR, A. M. R. **Anatomia Orientada Para A Clínica**: 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

NOTOUR, J. **A coluna vertebral: conhecimentos básicos**. São Paulo: Etcetera, 2004.

OFFIAH, C. E.; DAY, E. The craniocervical junction: embryology, anatomy, biomechanics and imaging in blunt trauma. **Insights Imaging**, v. 8, n.1, p.29-47, novembro 2016.

OLSON, E. J.; HANLEY, E. N.; RUDERT, M. J.; BARATZ, M. E. Vertebral column allografts for the treatment of segmental spine defects. An experimental investigation in dogs. **Spine**, v.16, n.9, p.1081-1088, setembro 1991.

OLVERA, A. G. R.; ARROYO, M. V.; MARTÍNEZ, L. M. H.; PÉREZ, H. M.; HINOJOSA, L. R. R. Adjacent segment disease in degenerative pathologies with posterior instrumentation. **Coluna/Columna**, v.14, n.1, p. 23-26, março 2015.

ONG, A.; ANDERSON, J.; ROCHE, J. A pilot study of prevalence of lumbar disc degeneration in elite athletes with lower back pain at the Sidney 2000 Olympic Games. **Br J Sports Med**, v.37, n. 3, p.263-266, junho 2003.

PINTAR, F.; YOGANANDAN, N.; MYERS, T.; ELHAGEDIAB, A.; SANCES, A. Biomechanical properties of human lumbar spine ligaments. **J Biomech**, v.25, n.11, p.1351-6, novembro 1992.

PNEUMATICOS, S. C.; REITHMAN, C. A.; LINDSEI, R. W. Discography in the evaluation of low back pain. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 14, janeiro 2006.

RAOUL, S.; FAURE, A.; ROBERT, R.; ROGEZ, J. M.; HAMEL, O.; CUIILLÈRE, P.; LE BORGNE, J. Role of sinu-vertebral nerve in low back pain and anatomical basis of therapeutic implications. **Surg Radiol Anat**, v.24, n.6, p.366-371, fevereiro 2003.

RIGHESSE, O.; FALAVIGNA, A.; AVANZI, O. Comparison of open discectomy with microendoscopy for lumbar disc herniation. **Neurosurgery**, v. 61, p.545-9, setembro 2007.

ROBERTS, S.; EVANS, H.; TRIVEDI, J.; MANAGE, J. Histology and anatomy of human intervertebral disc. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 88-A, suppl\_2, p.10-14, junho 2006.

ROUGHLEY, P. J. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. **Spine**, v. 29, n. 23, p. 2691-9, dezembro 2004.

RUAN, D. K.; HE, Q.; DING, Y.; HOU, L.; LI, J.; LUK, K. D. Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease: a preliminary study. **The Lancet**, v. 369, n. 9566, p. 993–999, março 2007.

RUTGES, J. P. H. J.; DUIT, R. A.; KUMMER, J. A.; BEKKERS J. E. J.; ONER, F. C.; CASTELEIN, R. M.; DHERT, W. J. A; CREEMERS, L. B. A validated new histological classification for intervertebral disc degeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.21, p.2039-2047, outubro 2013.

SAAVEDRA-POZO, F. M.; DEUSDARA, R. M.; BENZEL, E. C. Adjacent Segment Disease Perspective and Review of the Literature. **The Ochsner Journal**, v. 14, n. 78-83, maio 2014.

SHERMAN, J.; CAUTHEN, J.; SCHOENBERG, D.; BURNS, M.; REAVEN, N. L.; GRIFFITH, S. L. Economic impact of improving outcomes of lumbar discectomy. **The Spine Journal**, v. 10, n. 2, p. 108–116, fevereiro 2010.

SILBER, J. S.; ANDERSON, D. G.; DAFFNER, S. D. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. **Spine**, v.28, p.134-139, dezembro 2003.

SMIT, T. H.; ODGAARD, A.; SCHNEIDER, E. Structure and function of vertebral trabecular bone. **Spine**, v.15, n. 22, p. 2823-33, dezembro 1997.

SZPALSKI, M.; GUNZBURG, R.; MAYER, M. Spine arthroplasty: a historical review. **Eur Spine J**, v.11, suppl.2, S65-S84, agosto 2002.

TERAGUCHI, M.; YOSHIMURA, N.; HASHIZUME, H.; MURAKI, S.; YAMADA, H.; MINAMIDE, A.; OKA, H.; ISHIMOTO, Y.; NAGATA, K.; KAGOTANI, R.; TAKIGUCHI, N.; AKUNE, T.; KAWAGUCHI, H.; NAKAMURA, K.; YOSHIDA, M. Prevalence and distribution of intervertebral disc degeneration over the entire spine in a population-based cohort: the Wakayama Spine Study. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.22, n.1, p.104-110, janeiro 2014.

TOMFORD, W. W.; Investigation in cryopreservation of articular cartilage. **Trans Orthop Res Soc**, v. 32, p.11, junho 1986.

TOMFORD, W.W.; FREDERICKS G. R.; MANKIN, H. J. Studies on cryopreservation of articular cartilage chondrocytes. **J Bone Joint Surg Am**, v.66, p.253-259, junho 1984.

TOYONE, T.; OSAWA, T.; KAMIKAWA, K.; WATANABE, A.; MATSUKI, K.; YAMASHITA, T.; WADA, Y. Facet joint orientation difference between cephalad and caudad portions: a possible cause of degenerative spondylolisthesis. **Spine**, v.34, n.21, p. 2259-62, outubro 2009.

VACCARO, A. R.; BETZ R. R.; ZEIDMANN, S. M. Cirurgia da Coluna: Princípios e Prática. Rio de Janeiro: Dilivros; 2007.

WALTER, B. A.; TORRE, O. M.; LAUDIER, D.; NAIDICIH, T. P.; HECHT, H. C.; IATRIDIS, J. C. Form and function of the intervertebral disc in health and disease:

a morphological and stain comparison study. **J Anat**, v.227, n.6, p.707-16, dezembro 2015.

WEILER, C.; LOPEZ-RAMOS, M.; MEYER, H. M.; KORGE, A.; SIEPE C. J.; WUERTZ, K.; WEILER, V.; BOOS, N.; NERLICH A. G. Histological analysis of surgical intervertebral disc tissue provides evidence for an association between disc degeneration and increased body mass index. **BMC Res Notes**, v.4, p. 497, novembro 2011.

WHITE, A. A.; PANJABI, M. M. **Clinical biomechanics of the spine**, 2 ed. Philadelphia: Lipponcott Company, 1990.

XU, R.; EBRAHEIM, N. A.; GOVE, N. K. Surgical anatomy of the sacrum. **Am J Orthop**, v.37, n.10, E177-81, outubro 2008.

ZIGLER, J.; DELAMARTER, R.; SPIVAK, J. M. Result of the Prospective , Randomized, Multicenter Food and Durg Admnistration Investigational Device exemption Study of the ProDisc-L Total Disc Replacement versus Circumferential fusion for the treatment of 1 a 2 level degenerative disc disease. **Spine**, v.32, n.11,p.1155-62, maio 2007.

## ANEXOS

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

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

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

Presidente, determino a sua publicação:

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

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

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

## **ANEXO B - PORTARIA Nº 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009**

Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Seção IX Módulo de Tecido Musculoesquelético**

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

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

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

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

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

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

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

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

III - instruções especiais sobre sua utilização;

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

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

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

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

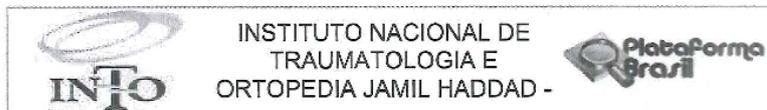
Art. 134. É de responsabilidade do profissional transplantador utilizar o tecido de acordo com as orientações fornecidas pelo Banco de Tecidos, de forma a garantir a integridade e a segurança biológica do enxerto.

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

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

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

## ANEXO C - FOLHA DE ROSTO PLATAFORMA BRASIL



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Preservação de Disco intervertebral humano em banco de tecidos

**Pesquisador:** Luis Antônio Medeiros Moliterno

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 71921317.2.0000.5273

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.216.676

#### Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto está adequada.

#### Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão claros e bem definidos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para o paciente uma vez que os mesmos foram selecionados após o óbito conforme orientação de captação de órgão e legislação vigente.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante pois possibilitará a formação de uma rotina de captação a nível nacional.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados pois a captação de órgão será feita respeitando orientação do sistema nacional de transplantes.

#### Recomendações:

Publicação dos dados e posteriormente publicar rotina nacional de captação de disco vertebral.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

**Endereço:** Avenida Brasil, nº 500  
**Bairro:** São Cristóvão **CEP:** 20.940-070  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2134-5000 **Fax:** (21)2134-5228 **E-mail:** cep.into@into.saude.gov.br

Página 01 de 03

*Prot. 032/2017*



INSTITUTO NACIONAL DE  
TRAUMATOLOGIA E  
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -



Continuação do Parecer: 2.216.676

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Senhor pesquisador, de acordo com o constante da Resolução CNS nº 466 de 2012, faz-se necessário apresentar ao CEP/INTO, através da Plataforma Brasil, a cada 06 (seis) meses o relatório de acompanhamento de sua pesquisa. Além disso, após a conclusão da pesquisa, deverá ser submetido na Plataforma Brasil, através da Notificação, o Relatório Final e a pesquisa concluída para apreciação do CEP/INTO.

Informamos que qualquer alteração realizada no protocolo de pesquisa aprovado deverá ser submetida à apreciação do CEP/INTO através do envio de uma emenda utilizando a Plataforma Brasil.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_967561.pdf	26/07/2017 12:01:01		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensamolitermo.pdf	26/07/2017 12:00:09	Luis Antônio Medeiros Moliterno	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromissomoliterno.pdf	26/07/2017 11:53:20	Luis Antônio Medeiros Moliterno	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	moliternoprojeto.docx	26/07/2017 11:41:01	Luis Antônio Medeiros Moliterno	Aceito
Folha de Rosto	Folhadestomoliterno.pdf	26/07/2017 11:39:19	Luis Antônio Medeiros Moliterno	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 14 de Agosto de 2017

Assinado por:  
Marisa Peter Silva  
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil, nº 500  
Bairro: São Cristóvão CEP: 20.940-070  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)2134-5000 Fax: (21)2134-5228 E-mail: cep,into@into.saude.gov.br

Página 02 de 03

## ANEXO D - Definição de sala limpa

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

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

### Inorganic Salts (g/liter)

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

### Amino Acids (g/liter)

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

### Vitamins (g/liter)

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

### Other (g/liter)

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

## ANEXO F – Rotina de Captação de Tecidos de Doador Cadáver

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE – SAS INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEdia JAMIL HADDAD</p>	 <p>BANCO MULTITECIDOS- P-03</p>			
			<p>PROCESSO</p>	
			<p>Assistencial</p>	
<p>ROTINA DE CAPTAÇÃO DE TECIDOS DE DOADOR CADÁVER</p>	<p>REVISÃO</p>		<p>FOLHA</p>	
	<p>Nº</p>	<p>MÊS/ANO</p>		<p>7 / 44</p>
	<p>04</p>	<p>OUT/16</p>		

- Para Coluna Lombar:

- Realizar acesso xifopúbiano ou utilizar acesso prévio realizado pela equipe da cirurgia geral.
- Isolar a região da coluna vertebral com compressa estéreis, superior, inferior e lateralmente na cavidade abdominal.
- Seccionar com bisturi o disco intervertebral L5-S1 e o ligamento longitudinal anterior de forma transversal e curetar o espaço intervertebral. Realizar o mesmo no nível L1-L2.
- Com serra sagital, identificar a transição do corpo vertebral e o processo transversal e, bilateralmente, realizar osteotomia até o pedículo. Poderá ser necessária complementação com osteótomo.
- Seccionar o saco dural e ligamentos posteriores com bisturi.
- Reconstruir com cabo de madeira e fixação cruzada com fios de Steiner nos corpos vertebrais de L1 e S1.

- Para captação de tecido osteocondral:

- manter a cápsula articular íntegra. Realizar osteotomia ao nível do terço distal do fêmur (acima da linha supracondilar) e no terço proximal da tibia abaixo da tuberosidade tibial. Seccionar a cápsula e ligamentos tibiofibulares proximais separando a fibula da peça final.
- 7.3.11 Cada peça captada deverá ser acondicionada em embalagens plásticas estéreis triplas, seladas adequadamente e contendo etiqueta de identificação dos enxertos captados, onde estão discriminados no mínimo: o número de identificação do doador, iniciais do doador, identificação do tecido com lateralidade e data da captação, e armazenado em container contendo gelo reciclável especial para transporte. No caso do tecido osteocondral, deve-se colocar ringer lactado na embalagem mais interna, juntamente com o tecido em questão, e finalizar as selagens como de rotina.
- 7.3.12 Em caso de dúvida quanto à contaminação do tecido captado durante a retirada, a peça em questão deverá ser marcada na etiqueta de identificação como possivelmente contaminada, e deverá ser processada separadamente. Nesse caso, o médico captador deverá descrever o fato no Relatório de Ocorrências (Anexo 4).
- 7.3.13 A temperatura interna do container deverá ser medida no momento da colocação das peças no container, utilizando termômetro apropriado, e anotada no Formulário de Doador de Tecidos pelo técnico de captação circulante (Anexo 5). A temperatura do container para o tecido ósseo e tendinoso deverá estar igual ou abaixo de 4°C. No caso do tecido osteocondral, o armazenamento do mesmo deverá ser em container com temperatura entre 4 a 8°C, não podendo ser congelado. Caso esteja a temperatura fora dos padrões determinados, o fato deverá ser descrito no Relatório de Ocorrências (Anexo 4).
- 7.3.14 Após a coleta, a recomposição do cadáver deverá ser feita da maneira mais próxima da anatomia possível. Após a recomposição, o doador cadáver deverá ser envolto em ataduras no segmento onde ocorreu a coleta dos tecidos musculoesqueléticos, cobrindo as incisões da pele.
- 7.3.15 O médico captador deverá preencher, em duas vias, o Relato Cirúrgico da Captação de Tecido Musculoesquelético (Anexo 6). Uma via deverá ser anexada ao prontuário médico do

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO - INTO