

Ministério da Saúde
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**PROPOSTA DE UM PROTOCOLO DE CAPTAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
CARTILAGEM DE SEPTO NASAL HUMANO PARA ESTOQUE EM UM BANCO
DE TECIDOS**

Carlos Barone Junior

Rio de Janeiro
2022

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**PROPOSTA DE UM PROTOCOLO DE CAPTAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
CARTILAGEM DE SEPTO NASAL HUMANO PARA ESTOQUE EM UM BANCO
DE TECIDOS**

Carlos Barone Junior

Qualificação 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

Orientadores: Prof. Dr. Diego Pinheiro Aguiar
Prof. Dr. Eduardo Branco de Sousa

Rio de Janeiro
Fevereiro
2022

B265p Barone Junior, Carlos.

Proposta de um protocolo de captação e criopreservação de cartilagem de septo nasal humano para estoque em um banco de tecidos / Carlos Borone Junior. — 2022.

00f.

Orientadores: Diego Pinheiro Aguiar e Eduardo Branco de Sousa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2022.

1. Cartilagem Septal. 2. Septoplastia. 3. Criopreservação. 4. Banco de Tecidos. 5. Ortopedia. I. Aguiar, Diego Pinheiro; Sousa, Eduardo Branco de, orient. II. Título.

NLM WV 320

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**PROPOSTA DE UM PROTOCOLO DE CAPTAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
CARTILAGEM DE SEPTO NASAL HUMANO PARA ESTOQUE EM UM BANCO
DE TECIDOS**

Carlos Barone Junior

Banca examinadora:

Prof. Dr. Felipe Felix (UFRJ)

Prof. Dra. Jamila Alessandra Perine Machado (INTO)

Prof. Dr. Sidnei Cavalcante da Silva (INTO)

Rio de Janeiro
Fevereiro
2022

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me ajudou e tornou todos os meus sonhos possíveis, e ao meu falecido pai, que todas as noites peço que esteja orgulhoso do ser humano que me tornei.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Diego Aguiar, que me apoiou neste projeto inovador e tornou tudo isto possível.

Ao chefe do Banco de Multitecidos do INTO, Dr. Rafael Prinz, que permitiu que este projeto acontecesse e depositou a sua confiança em nós.

À maravilhosa equipe do Banco Multitecidos do INTO, que me ajudou em incontáveis momentos, fosse dia ou noite, ou até mesmo de madrugada, em um apoio sem igual: Maira, Cida, Micheli, Sergio, Tatiana, Evlin, Wagner e Daniella.

À minha amiga, Jacqueline Coelho, que teve a ideia do projeto e me estimulou para que ele fosse realizado! Ele realmente não teria acontecido, sem você! Muito obrigado!

Aos meus amigos, Márcio, Conceição, Cristianne e Fernanda, pelos tantos momentos vividos juntos nesses anos de mestrado, nos apoiando e dando suporte um ao outro.

Aos meus filhos de quatro patas, Chronos e Potter, que sempre estiveram ali me dando apenas amor, em todos os momentos.

E, finalmente, à minha família, sendo a base de tudo que sou e do que construí.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”.

Thomas Edison

RESUMO

BARONE, Carlos Junior. PROPOSTA DE UM PROTOCOLO DE CAPTAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CARTILAGEM DE SEPTO NASAL HUMANO PARA ESTOQUE EM UM BANCO DE TECIDOS. Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Ministério da Saúde, 2021.

Diversas doenças são capazes de acometer a estrutura nasal com grande prejuízo de sua função e arquitetura, necessitando de complexa abordagem cirúrgica para reconstrução. Nas técnicas de rinoplastia reparadora são utilizados enxertos de cartilagem para correção, com destaque para a cartilagem septal. Entretanto, esta nem sempre está disponível e é preciso considerar outros sítios doadores de cartilagem para enxerto, como a de concha auricular e a de costela. Tais sítios, entretanto, geram morbidade local, aumentando o tempo de cirurgia e, especialmente, no caso do enxerto de costela, pode ocasionar complicações maiores em pacientes com comorbidades mais graves, além de, com o tempo, tenderem a apresentar deformação morfológica. O objetivo deste estudo foi criar uma proposta de protocolo para captação, transporte e criopreservação de cartilagem do septo nasal humano. Foram incluídos no estudo doadores cadáveres conforme diretrizes do Sistema Nacional de Transplantes para captação do tecido, assim como o consentimento familiar para doação do tecido. Cada amostra de tecido foi dividida em 4 segmentos, sendo um para análise microbiológica, e os outros três para análise histológica em momentos distintos: análise no dia da coleta, e após 7 e 14 dias de ultracongelamento à temperatura de -80°C . Foram avaliados os aspectos morfofisiológicos e estruturais teciduais de sete doadores, e não houve nenhuma modificação na qualidade do padrão histológico dos espécimes congelados durante 7 ou 14 dias com o meio de criopreservação. Desta forma, considera-se satisfatório para um possível transplante as cartilagens criopreservadas até 14 dias. Assim, pode se concluir que o protocolo de coleta e criopreservação à -80°C permite o armazenamento da cartilagem do septo nasal de doador cadáver por até 14 dias até o transplante.

Palavras-chave: Cartilagem septal; Septoplastia; Criopreservação; Banco de tecidos.

ABSTRACT

BARONE, CARLOS JUNIOR. PROTOCOL PROPOSAL FOR CAPTURE AND CRYOPRESERVATION OF HUMAN NASAL SEPTUM CARTILAGE FOR A TISSUE BANK STORAGE. Rio de Janeiro, 2021. Master Thesis. (Master's Degree in Applied Sciences to the Musculoskeletal System) - National Institute of Traumatology and Orthopedics Jamil Haddad, Ministry of Health, 2021.

Several diseases are capable of affecting the nasal structure. They can lead to extensive damage of its function and architecture, as well as require a complex surgical approach for reconstruction. In reconstructive rhinoplasty techniques, cartilage grafts are used for correction, with an emphasis on septal cartilage. However, this is not always available and it is necessary to consider other cartilage donor sites for grafting, such as the ear shell and rib. These other sites generate local morbidity, increasing the time of surgery and, in the case of the rib area, especially, can origin greater complications in patients with more severe comorbidities. Moreover, over time, these patients tend to present morphological deformation. The objective of this study was to develop a protocol proposal for the capture, transport and cryopreservation of human nasal septum cartilage. Cadaveric donors were included in the study according to the guidelines of the National Transplant System for tissue capture, as well as family consent for tissue donation. Each tissue sample was divided into 4 segments; one for microbiological analysis and the other three for histological analysis at different times: analysis on the day of collection and after 7 and 14 days of deep freezing at a temperature of -80°C. The morphophysiological and tissue structural aspects of seven donors were evaluated, and there was no change in the quality of the histological pattern of specimens frozen for 7 or 14 days with the cryopreservation medium. Thus, cartilage cryopreserved for up to 14 days is considered satisfactory for a possible transplant. Consequently, it can be concluded that the collection and cryopreservation process at -80°C allows the storage of nasal septum cartilage from cadaveric donors for up to 14 days until transplantation.

Keywords: Septal cartilage; Septoplasty; Cryopreservation; Tissue bank.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	XIII
LISTA DE ANEXOS	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Anatomia do septo nasal	1
1.1.2 Histologia da cartilagem septal nasal	3
1.2 Imunogenecidade da cartilagem septal	4
1.3 Técnicas atuais de septoplastia	4
1.4 Rinosseptoplastias e possibilidades de enxertos	6
1.5 Doenças de acometimento de dorso e septo nasal	7
1.6 Criopreservação.....	10
1.7 O Banco de Multitecidos	12
2 JUSTIFICATIVA.....	13
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Secundários.....	14
4 METODOLOGIA	15
4.1 Seleção do Doador Cadáver	15
4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão de doadores cadáveres	16
4.1.1.1 Análise do possível doador	16
4.1.1.2 Análise epidemiológica	16
4.1.1.3 Análise sorológica	18
4.1.1.4 Análise clínica do doador.....	18
4.1.1.5 Critérios de exclusão.....	18
4.2 Equipe de Captação.....	18
4.3 Fluxograma do protocolo de captação e processamento	19
4.4 Material necessário para ressecção da cartilagem septal nasal	19
4.5 Técnica de captação	20
4.6 Transporte do tecido	22
4.7 Processamento e armazenamento do tecido	23
4.8 Fixação e parafinização.....	24

4.9 Desparafinização e hidratação	25
4.10 Coloração das lâminas com hematoxilina-eosina (H&E)	25
4.11 Método de avaliação dos cortes histológicos	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 Resultados Epidemiológicos	27
5.2 Resultado Microbiológico	28
5.3 Resultado Histológico	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
9 ANEXOS	46
ANEXO A - Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 220, DE 27 DE Dezembro de 2006.	46
ANEXO B - PORTARIA Nº 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009	48
ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	51
ANEXO D – Folder entregue aos familiares para evidenciar que não existe nenhuma alteração estética com a técnica cirúrgica empregada.	52
ANEXO E - Termo de Autorização da Doação de Órgãos e Tecidos (maior de 18 anos)	53
ANEXO F – Folha de Rosto da Plataforma Brasil.....	54
ANEXO G – Exames Sorológicos	58
ANEXO H – Formulário de Anamnese do Possível Doador (frente)	59
ANEXO H – Formulário de Anamnese do Possível Doador (verso)	60
ANEXO I – Formulário de Exame Físico do Doador de Tecidos	61
ANEXO J - Definição de Sala Limpa.....	62
ANEXO K - Composição do meio Iscove's (<i>Modified Dulbecco's Medium</i>)....	63
ANEXO L – Protocolo Captação, Processamento e Criopreservação da Cartilagem de Septo Nasal.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATMIT	Área de Transplante Multitecidos
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética Óssea)
BMT	Banco Multitecidos
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CIHDOTT	Comissão Intra-Hospitalar de Doação de Órgãos e Tecidos para Transplante
CPA	Agente Crioprotetor
DC	Doador Cadáver
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
H&E	Hematoxilina-Eosina
HGV	Hospital Getúlio Vargas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMSF	Hospital Municipal Salgado Filho
HSA	Hemorragia Subaracnóidea
HTO	Hospital de Traumatologia e Ortopedia
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
N/A	Não Aplicável
PA	Para Análise
PAF	Projétil de Arma de Fogo
PCR	Parada Cardiorrespiratória
PDL	<i>Programmed Cell Death Ligand</i>
PET	Programa Estadual de Transplantes
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SARS-Cov-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
TCE	Traumatismo Cranioencefálico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Anatomia do septo nasal.....	2
Figura 2 Representação esquemática da região anatômica a ser coletada durante a captação.....	4
Figura 3 Logística do protocolo de captação, transporte e processamento da cartilagem nasal.....	14
Figura 4 Material utilizado para a captação do espécime.....	15
Figura 5 Técnica de captação do tecido septal.....	17
Figura 6 Processamento e armazenamento do tecido captado.....	19
Figura 7 Fotomicrografia da coloração histológica com H&E da cartilagem do septo nasal criopreservada.....	24

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 Classificação de acordo com as alterações morfo-estruturais à análise histológica.....	21
Quadro 1. Perfil epidemiológico dos doadores cadáveres.....	22
Quadro 2. Resultado da avaliação microbiológica dos espécimes na data de coleta.....	23

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº. 220, DE 27 DE Dezembro de 2006.....	34
ANEXO B - PORTARIA Nº 2.600, DE 21 DE OUTUBRO DE 2009.....	36
ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	39
ANEXO D – Folder entregue aos familiares para evidenciar que não existe nenhuma alteração estética com a técnica cirúrgica empregada.....	40
ANEXO E - Termo de Autorização da Doação de Órgãos e Tecidos (maior de 18 anos).....	41
ANEXO F – Folha de Rosto da Plataforma Brasil.....	42
ANEXO G – Exames Sorológicos.....	43
ANEXO H – Formulário de Anamnese do Possível Doador (frente).....	44
ANEXO H – Formulário de Anamnese do Possível Doador (verso).....	45
ANEXO I – Formulário de Exame Físico do Doador de Tecidos.....	46
ANEXO J- Definição de Sala Limpa.....	47
ANEXO K - Composição do meio Iscove's (<i>Modified Dulbecco's Medium</i>).....	48
ANEXO L – Protocolo Captação, Processamento e Criopreservação da Cartilagem de Septo Nasal.....	49

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças e situações são capazes de acometer a estrutura nasal com grande prejuízo de sua função e arquitetura, necessitando de complexa abordagem cirúrgica para reconstrução. Além de ocasionar alteração funcional significativa, gerando principalmente obstrução nasal fixa, podem ocorrer mudanças estéticas importantes, em uma região que se encontra na região central da face do ser humano.

Algumas técnicas de rinoplastia reparadora são utilizadas para os casos mais complexos e a grande maioria delas se utiliza de enxertos para correção, especialmente, de cartilagem do próprio indivíduo com destaque para a cartilagem septal (Von Mangoldt, 1970). Entretanto, a cartilagem septal nem sempre está disponível e é preciso considerar outros sítios doadores para enxerto, como a cartilagem conchal auricular e a cartilagem de costela (Von Mangoldt, 1970), que são tecidos com maleabilidades diferentes. Esses outros sítios geram morbidade local, aumentando o tempo de cirurgia e, especialmente no caso da costela, podem inferir complicações maiores em pacientes com comorbidades mais graves (Von Mangoldt, 1970), com destaque para o pneumotórax.

1.1 Anatomia do septo nasal

O septo nasal é ósseo e cartilaginoso. O septo ósseo é constituído pela lâmina perpendicular do etmoide e pelo vômer (Navarro et al., 2011). A crista nasal e a espinha nasal anterior são formadas pela fusão medial dos processos palatinos dos maxilares e constituem reforço ósseo (Navarro et al., 2011). O vômer é a base do plano ósseo e se articula superiormente com a lâmina perpendicular do etmoide, inferiormente com a crista maxilar, posteriormente com a crista esfenoidal e anteriormente com a cartilagem quadrangular, com uma borda côncava livre que forma a coana (Navarro et al., 2011). A lâmina perpendicular do

etmoide se articula superiormente com a lâmina cribiforme, inferiormente com o vômer, posteriormente com a crista esfenoidal. Anteriormente, funde-se ao processo nasal do osso frontal e compõe uma parte importante do septo ósseo, mas não é relevante para a sustentação do nariz (Navarro et al., 2011). O septo cartilaginoso é formado pela cartilagem quadrangular com associação das cartilagens laterais inferiores para formação do ápice nasal. A cartilagem quadrangular constitui a parte mais importante do septo (Navarro et al., 2011). A cartilagem caudal tem apoio na espinha nasal anterior e crista maxilar, mantendo-se próximas pelo entrelaçar das fibras colágenas, formando uma cápsula. Esta porção se estende além desse limite com a espinha nasal e forma três ângulos: anterior, médio e posterior. Essas relações vão definir a projeção da columela e, junto com o tamanho da espinha nasal, a projeção do lábio superior. Posteriormente, a cartilagem quadrangular se relaciona com o vômer e a lâmina perpendicular do etmoide (Sampaio et al., 2011) (**Figura 1**). Existe um ponto de fusão das cartilagens laterais superiores, dos ossos próprios nasais, da cartilagem septal e da lâmina perpendicular do etmoide chamado de área K (área de Keystone), onde se tem a sustentação da pirâmide nasal que deve ser preservado nas ressecções para evitar selamento de dorso nasal (Pasinato et al., 2011).

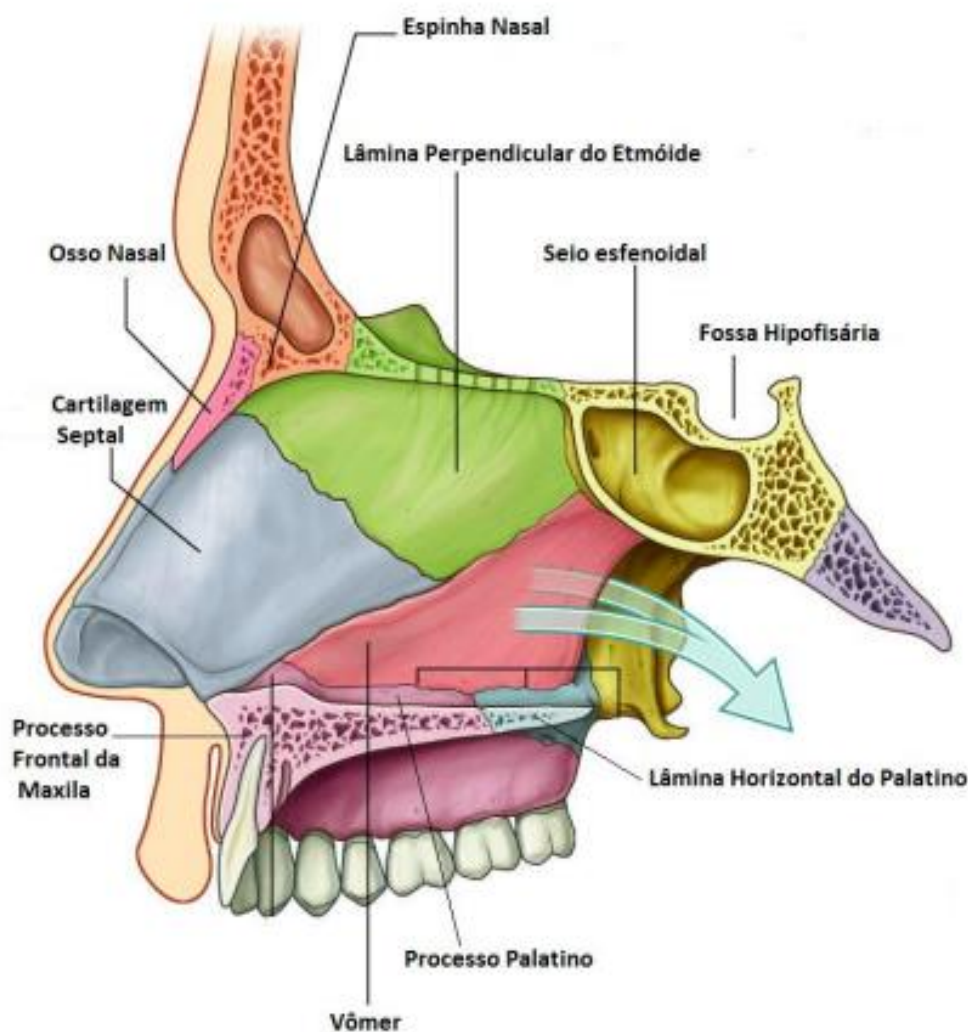


Figura 1. Anatomia do septo nasal (Netter, F. H. Atlas de anatomia humana. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019).

1.1.2 Histologia da cartilagem septal nasal

A cartilagem septal nasal é uma cartilagem hialina composta basicamente por dois componentes, os condrócitos e a matriz extracelular (MEC). A MEC é formada 80% por água e, dentre os 20% restantes, por colágeno (tipos II, IX e XI), proteoglicanos e proteínas não colágenas. (Popko et al., 2007). Sendo assim, os condrócitos são as únicas células presentes na cartilagem, sendo os responsáveis por sintetizar a MEC. Esta é dividida em duas regiões: zona periférica (rica em colágeno tipo II – mais jovem) e zona central, composta por colágeno mais maduro. (Popko et al., 2007). Cabe ressaltar que a cartilagem septal é pobre em suprimento

vascular e nervoso, e apresenta um baixo metabolismo, sendo, portanto, incapaz de se regenerar em casos de lesão.

1.2 Imunogenecidade da cartilagem septal

Existem duas formas de resposta imunológica envolvidas na rejeição de enxertos, que são a resposta humoral, que leva a produção de anticorpos e efeito citotóxico, culminando na morte celular, e a resposta imune, definida como uma reação de hipersensibilidade tardia, com ativação, sensibilização e proliferação de linfócitos, e ataque celular (Elves, 1976). A resposta imune alogênica pós-transplante depende do nível de expressão de moléculas coestimulatórias e de complexo de histocompatibilidade (MHC) I e II. No caso dos condrócitos, é sabido que apesar de expressarem altos níveis de MHC I, eles expressam baixos níveis de moléculas coestimulatórias e não expressam MHC II (Griffin et al., 2013; Osiecka-Iwan et al., 2018). Deste modo, apesar de expressarem o MHC I, não é evidenciada resposta imune ao tecido, provavelmente porque as características histológicas da cartilagem desempenham um papel protetor, como uma MEC espessa, avascular e alinfática (Lim et al., 2017). Além disso, foi visto que os condrócitos humanos primários conseguem suprimir os linfócitos T alorreativos, ao expressar moléculas coinibitórias, como o PDL-1 e o PDL-2, que regulam a resposta imune (del Rio et al., 2008). Sendo assim, as células do tecido cartilaginoso são antigênicas, porém não são imunogênicas, o que torna o enxerto de cartilagem puro um tecido não rejeitado (Elves, 1976).

1.3 Técnicas atuais de septoplastia

A secção submucosa do septo nasal, que corrige o desvio septal nas porções ósseas e cartilaginosas, na expectativa de maior ressecção possível da cartilagem septal será priorizada

neste trabalho ao invés de técnicas de septoplastia que visam corrigir o desvio através do reposicionamento da cartilagem septal e remoção mínima de osso e cartilagem. A técnica de Killian tem incisão realizada após a região septal caudal com preservação de 1 cm de septo anterior. Realiza-se o descolamento mucopericondrial bilateral com acesso a lâmina perpendicular do etmoide e vômer, sendo possível remover boa quantidade da cartilagem septal, mas não expõe a porção mais caudal (Goanță et al., 2017). Pela técnica de Cottle é realizada uma incisão caudal hemitransfixante, para descolamento mucopericondrial bilateral, assim como mucoperiosteal, considerando que há fibras cruzadas que unem a porção cartilaginosa ao sulco da pré-maxila e maxila. Assim, é importante isolar a porção cartilaginosa e óssea, abrindo os túneis superiores e inferiores (mucopericondrial e mucoperiosteal) para ter uma visão mais completa de todo o espaço septal. Na técnica, é possível remover somente a porção desviada septal, mas com acesso a todo o septo nasal é possível fazer uma remoção mais ampla para se obter o enxerto cartilaginoso (Pasinato et al., 2011). A ideia de remoção para se obter um bom enxerto de cartilagem septal, seja pela técnica de Killian ou de Cottle, é removê-lo em sua maior quantidade possível, preservando as regiões de sustentação do nariz – a região caudal e a região do dorso nasal que se estende até a zona K, o “L” nasal, quando o enxerto é autólogo (Pasinato et al., 2011) (**Figura 2**). Vale ressaltar que existem outras técnicas de septoplastia, porém as mais utilizadas atualmente são as acima descritas.

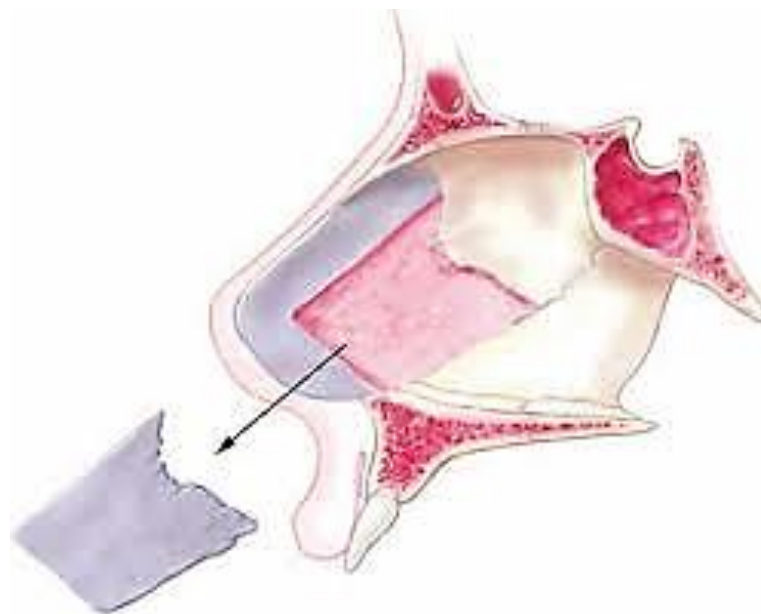


Figura 2. Representação esquemática da região anatômica a ser coletada durante a captação. (Ilustração modificada de Myers EN. *Septoplasty and Turbinate Surgery*. *Aesthetic Surg J*, 2003; 23:393-403).

1.4 Rinosseptoplastias e possibilidades de enxertos

Na rinosseptoplastia é comum a utilização de enxertos para a realização de diversas técnicas cirúrgicas em diferentes formatos nasais, tanto para fins estético-funcionais, quanto para reestruturação completa de um nariz acometido por doença. Neste último caso, costumam ser cirurgias mais complexas e, geralmente, necessitam de uma maior disponibilidade de material para enxertia (Pochat et al., 2011). Os enxertos podem ser classificados em autólogos, quando advém do mesmo indivíduo, homólogos, quando advém da mesma espécie, e sintéticos ou aloplásticos. Neste último caso, há o silicone sólido como exemplo nas reconstruções de dorso nasal ou outras áreas para aumento de volume, mas parece existir uma maior chance de extrusão e infecção, por não ser tão biocompatível quanto um enxerto autólogo ou homólogo, além do maior custo do procedimento cirúrgico (Pochat et al., 2011). Assim, as opções de enxertos cartilagosos mais utilizadas para reconstrução nasal são de cartilagem septal, cartilagem de concha auricular e cartilagem de costela. Também podem ser utilizados tecido subcutâneo para camuflagem de espaços livres, fragmentos ósseos e fáscia, mas para

estruturação nasal, o tecido cartilaginoso é preferido (Pochat et al., 2011). A cartilagem septal é a primeira opção por ser da própria fonte doadora da cirurgia nasal, indicando menor morbidade, menor tempo cirúrgico e excelente biocompatibilidade. Costuma ser mais reto, o que, na maior parte das vezes, é desejável para a estruturação local, mas nem sempre está presente em quantidade suficiente, pelo paciente ter dorso nasal baixo, ou doença preexistente, como perfuração septal ampla (Pochat et al., 2011).

A cartilagem da concha auricular é uma opção, pois se adapta muito bem à reconstrução de estruturação nasal, porém apresenta maior curvatura e quantidade limitada, além de ser uma cartilagem elástica e se tratar de um sítio extra-cirúrgico, podendo gerar morbidade local, como uma possível cicatriz hipertrófica, quelóide ou hematoma retroauricular, embora tenha baixas taxas de complicações de uma forma geral (Pochat et al., 2011). A cartilagem costal é bastante utilizada em narizes com baixo dorso nasal e pouca estruturação por doença por ser obtida em grandes quantidades e gerar mais opções de formatos. (Hwan et al., 2007). No entanto, a coleta desse material pode conferir uma morbidade local indesejada e, em casos mais graves, até um pneumotórax, além de maior tempo cirúrgico, maior dor pós-operatória e de um potencial para mudança do contorno nasal ao longo do tempo (Peled et al., 2008; Malone et al., 2015). Além disso, as cartilagens costais, com o tempo, tendem a apresentar deformação morfológica significativa, alterando o resultado estético e funcional a longo prazo (Bilen et al., 2007).

1.5 Doenças de acometimento de dorso e septo nasal

Há muitas doenças com acometimento nasal capazes de resultar não apenas em disfunção mecânico-fisiológica, como também em um desarranjo de toda arquitetura externa do nariz e gerar sequelas nasais. A leishmaniose, parasitose onde o hospedeiro acidental do protozoário é o homem, especialmente na sua forma cutâneo-mucosa, tem como acometimento

mais frequente o nariz, com destaque para a perfuração septal. Em casos mais graves, há comprometimento de todo o nariz, além de lábio superior, palato e faringe, gerando deformidades e mutilações que comprometem a respiração, fonação e alimentação (Lessa et al., 2007). O Brasil é o país do continente americano com mais casos da doença registrados (Maia-Elkhoury et al., 2019). A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, representando sério problema de saúde pública, onde o Brasil apresenta a uma das maiores áreas de endemicidade do mundo (Penna et al., 2013). Embora seja uma doença conhecida por lesões cutâneas e nervosas, a infecção inicial da doença ocorre na mucosa nasal, sendo a via respiratória superior o principal meio de transmissão do bacilo entre pessoas com a doença não tratadas, através do muco nasal (Naves et al., 2009). As deformidades nasais mais comuns são o nariz em sela e a perfuração septal (Patrocinio et al., 2001).

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica com subnotificação no país por não constituir doença de notificação compulsória, mas é frequente entre trabalhadores do campo e meio agrícola. O acometimento respiratório é frequente, podendo gerar lesões de dorso e mucosa nasal (Yasuda et al., 2017). Dentre outros casos mais raros de acometimento nasal por doenças infecto-contagiosas há a rinosporidiose e a entomoftromicose, que podem evoluir para deformidade nasal, assim como a mucormicose. Esta última mais fulminante e agressiva, de característica oportunista, comumente vinculada a imunocomprometidos e acidóticos, sendo comum em diabéticos (Santana et al., 2001). A forma rinocerebral da mucormicose é a mais comum e bastante grave, com elevado índice de mortalidade, muito associada à necrose das conchas e mucosa nasal, podendo evoluir com amputação de dorso nasal (Santana et al., 2001). Além disso, os casos de septicemia, nos quais há necrose de extremidades, com acometimento nasal significativo, especialmente, em infecções estafilocócicas e estreptocócicas do grupo A (Stevens et al., 2016). Cabe ressaltar que pacientes imunossuprimidos estão mais suscetíveis a estas situações mais extremas. A sífilis é uma doença infecto-contagiosa, transmitida pela via

sexual e verticalmente durante a gestação (Avelleira et al., 2006), causada pela bactéria *Treponema pallidum*. Caracteriza-se por períodos de atividade e latência, pelo acometimento sistêmico disseminado, e pela evolução para complicações graves em parte dos pacientes que não trataram ou que foram tratados inadequadamente (Avelleira et al., 2006). Apesar da prevenção e de tratamento acessível, ainda é de alta prevalência no Brasil, constituindo um problema de saúde pública (Avelleira et al., 2006). Na sua forma terciária, forma lesões granulomatosas (goma) que podem lesionar a base óssea do septo nasal com alteração morfofuncional do nariz (Avelleira et al., 2006). Na sua forma congênita, pode gerar rinite mucossanguinolenta e até mesmo evoluir com nariz em sela (Avelleira et al., 2006).

Doenças granulomatosas, como a Granulomatose de Wegener, podem acometer mucosa e dorso nasal (Antunes et al., 2005). Nesta doença, o acometimento é praticamente imperativo, pois se trata de uma vasculite necrosante que costuma afetar vias aéreas superiores e inferiores, e os rins (Antunes et al., 2005). São frequentes: sinusite, rinorréia purulenta, úlceras mucosas, crostas nasais, epistaxe, obstrução nasal e nariz em sela, manifestações comuns da doença (Antunes et al., 2005).

O nariz em sela constitui em deformação nasal com achatamento do dorso, depressão da pirâmide nasal, perda de definição e suporte nasal, comprimento nasal encurtado, e retrusão da espinha nasal e do septo caudal, gerando alterações morfofuncionais, muitas vezes, incapacitantes. Além das doenças infectocontagiosas citadas, uma das maiores causas é a ressecção excessiva de cartilagem em uma cirurgia nasal prévia (Pribitkin et al., 2009). Além disso, o nariz é o local mais acometido em pacientes com câncer de pele na face (cerca de 36%), e a ressecção cirúrgica pode exigir a remoção de cartilagens nasais para estabelecer margens livres de tumor (Andrews, 2017). O carcinoma epidermóide é menos comum, porém mais agressivo, sendo relacionado com maior prejuízo de função, atingindo mais facilmente o septo nasal (de Souza Filho et al., 2002). O carcinoma basocelular é o mais frequente e menos

agressivo, sendo mais localizado na pele do dorso nasal, se estendendo em menor proporção para estruturas nasais mais internas (de Souza Filho et al., 2002).

As perfurações do septo nasal podem ser bastante limitantes e gerar crostas, sangramentos, rinorreias, sensação de obstrução nasal, alterações do olfato, dor nasal, cefaleia e cacosmia (Fornazier et al., 2010). A causa mais comum é a de origem iatrogênica por laceração do mucopericôndrio bilateralmente durante uma cirurgia de septoplastia, ou por formação de hematoma pós-cirúrgico comprometendo a nutrição da cartilagem quadrangular do septo nasal. Além das doenças já citadas, a cauterização química para epistaxes, o uso de entorpecentes, principalmente a cocaína, potente vasoconstritor, além de drogas utilizadas para tratamento de patologias nasais como corticosteróides e vasoconstritores nasais, podem gerar perfuração septal (Fornazier et al., 2010). Em todas estas situações relatadas, quando há acometimento nasal importante, não existe tratamento clínico ou medicamentoso que possibilite a recuperação nasal, estando a cirurgia indicada.

1.6 Criopreservação

A criopreservação é um processo de preservação celular por resfriamento das amostras a temperaturas muito baixas, reduzindo intensamente as reações biológicas e químicas de células vivas, cujo sucesso tem aumentado paulatinamente nos últimos anos, com o uso de agentes crioprotetores e de equipamentos de controle de temperatura (Jang et al., 2017). Contudo, o congelamento é fatal para a maioria dos organismos vivos, uma vez que ocorre a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, resultando em diversas lesões celulares (Karlsson et al., 1996). Neste contexto, o principal obstáculo a ser superado é a transição da fase de água para gelo (Pegg, 2007).

Nesta linha, o resfriamento pode ocorrer de maneira rápida ou de maneira lenta e progressiva, e em ambos os casos podemos observar um tipo de lesão celular (Yong et al., 2015). O comportamento de congelamento das células pode ser alterado na presença de um agente crioprotetor (CPA), que deve penetrar nas células, ter baixa toxicidade, e influenciar nas taxas de transporte de água, na nucleação e no crescimento de cristais de gelo (Jang et al., 2017). E, assim, conseguir realizar uma proteção celular, contra os efeitos danosos causados pelo congelamento.

No caso de resfriamento rápido, também chamado de vitrificação, o processo de congelamento ocorre em menos de 10 minutos, e envolve a solidificação do meio aquoso da célula em uma fase vítrea não cristalina, sendo a formação de gelo intracelular o principal responsável pelo dano celular (Zeron et al., 1999). Ocorre uma transformação direta da fase aquosa para o estado de vidro após exposição direta ao nitrogênio líquido, substância fundamental para o processo acontecer (Rall et al., 1985). Sendo assim, apesar da formação de gelo extracelular ser muito baixa, utiliza-se de um alto volume de CPA, o que aumenta consideravelmente o risco de toxicidade celular, além de ser um processo que requer um importante treinamento para ser bem executado (Yavin et al., 2007).

Já no resfriamento lento, mudanças osmóticas ocorrem devido aos efeitos da exposição a soluções intra e extracelulares altamente concentradas, gerando importante desidratação celular, além de interações entre as células e o gelo extracelular, também causando lesão (Jang et al., 2017). Neste caso, as células conseguem eliminar água, evitando o super-resfriamento, e substituir pelo CPA, evitando a formação do gelo intracelular (Gao et al., 2000). Além disso, este é um processo de fácil manipulação e que necessita de baixa quantidade de CPA, porém, é indispensável possuir um freezer de alto custo, onde se consiga esta taxa de redução gradativa de temperatura (Mandawala et al., 2016).

1.7 O Banco de Multitecidos

O Banco de Multitecidos do INTO foi inaugurado em 1989, sendo responsável tanto pela captação, quanto pelo processamento e distribuição de tecido osteocartilaginoso, de pele e de córnea para utilização em diversas cirurgias no Brasil. O banco contém equipe capacitada para realizar as captações teciduais 24 horas por dia, em todos os dias do ano, e integralmente ligado ao Sistema Único de Saúde (SUS) (<https://www.into.saude.gov.br/>).

Inicialmente chamado de Hospital de Traumatologia e Ortopedia – HTO, quando inaugurado em 1973, foi denominado como instituto em 1994, após ser reconhecida como referência nacional nas áreas de assistência, ensino e pesquisa, assim como na prevenção e na articulação de políticas públicas em Traumatologia, Ortopedia e Reabilitação. Em 2011, o INTO foi novamente renomeado, sendo atualmente o Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, em homenagem ao ex-ministro da Saúde, falecido em 2009.

Vale frisar que o INTO, através da Área de Transplante Multitecidos (ATMIT), é o principal banco fornecedor de tecido musculoesquelético público para a realização de transplante de tecidos musculoesqueléticos no Brasil. Além de auxiliar como órgão regulador, 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**).

2 JUSTIFICATIVA

Diversas doenças infectocontagiosas, autoimunes, síndromes, traumas e neoplasias podem afetar a morfofisiologia da região nasal, atingindo principalmente a cartilagem septal nasal, o que pode gerar deformidades importantes que cursam com alterações funcionais e estéticas. Na grande maioria dos casos, o tratamento preconizado tem indicação cirúrgica, sendo necessária reconstrução nasal, com substituição da cartilagem septal por outra cartilagem, como a de concha auricular ou de costela. Entretanto, além de prolongar o tempo cirúrgico, a cartilagem obtida de outro sítio não possui a mesma maleabilidade, formato e dimensões que a própria cartilagem septal.

Diante de um desafio sociocultural da magnitude do Brasil, precisamos criar alternativas que permitam realizar um tratamento digno para os pacientes que sofrem com a perda de sua identidade visual. Desse modo, é de extrema relevância desenvolver uma técnica de captação e criopreservação de cartilagem septal de cadáveres doadores de órgãos para formação de um banco de tecidos, para posterior uso em cirurgias de reconstrução nasal em pacientes com deformidades nasais, algo não ainda estudado em âmbito nacional ou internacional. Cabe ressaltar que o tecido de cartilagem septal nasal não apresenta imunogenicidade. Portanto, não há reação imunológica cruzada entre receptor e tecido doado, reduzindo drasticamente as complicações pós-operatórias no paciente receptor, além de não ser necessário o uso de medicamentos imunossupressores. Há também a perspectiva de utilização deste possível fragmento cartilaginoso para reconstrução facial após trauma, como bio-preenchedor de mais longa duração, bem como a assistência de pacientes com afundamentos importantes de face.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Propor a criação de um protocolo de preservação de tecido cartilaginoso do septo nasal de doador cadáver em um banco de tecidos.

3.2 Objetivos Secundários

3.2.1 Descrever as etapas de captação de tecido cartilaginoso do septo nasal em doadores cadáveres.

3.2.2 Elaborar uma proposta de protocolo de armazenamento em criopreservação do tecido cartilaginoso de septo nasal no banco de tecidos do INTO.

3.2.3 Avaliar histologicamente as características morfoestruturais do tecido cartilaginoso de septo nasal após criopreservação.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção do Doador Cadáver

Seguindo a orientação do Sistema Nacional de Transplantes (SNT), todo doador de tecido musculoesquelético deve ser selecionado de acordo com a Portaria nº 2600 de 21 de outubro de 2009 do Ministério da Saúde (**Anexo B**). Este processo foi realizado pelos responsáveis-técnicos do Banco Multitecidos do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad-INTO/MS em conjunto com o Programa Estadual de Transplantes (PET), 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. Esta etapa foi realizada com abordagem familiar pela Comissão Intra-Hospitalar de Doação de Órgãos e Tecidos para Transplante (CIHDOTT) do hospital em questão através de um termo de assentimento livre e esclarecido (**Anexo C**), além de um folder informativo evidenciando que não há alteração estética em quem for submetido à técnica cirúrgica empregada neste estudo (**Anexo D**). Além disso, a autorização foi documentada através da assinatura de Termo de Autorização de Doação de Órgãos e tecidos (**Anexo E**), em três vias, sendo uma anexada ao prontuário do paciente do hospital de origem, uma entregue à família e uma enviada à CIHDOTT, ficando uma cópia no BMT. Esse Termo de Autorização foi preenchido com um documento de identificação com foto do doador, devendo ser assinado pelo profissional que abordou e por mais duas testemunhas.

Os critérios de inclusão para o estudo foram aplicados aos espécimes obtidos de doadores cadáveres (DC) de ambos os sexos, que preencheram os requisitos de acordo com a referida Portaria e cujo processo de captação e processamento estivesse 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 para a realização do processamento no Banco Multitecidos (BMT) do INTO/MS. O estudo foi realizado após ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em nossa instituição, conforme o protocolo CAAE (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética) número 56634616.4.0000.5273 (**Anexo F**).

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão de doadores cadáveres

4.1.1.1 Análise do possível doador

Após a autorização do familiar responsável, foram iniciadas as etapas de triagem epidemiológica, clínica e sorológica do possível DC.

4.1.1.2 Análise epidemiológica

A Triagem Epidemiológica foi realizada pelo PET com o familiar mais próximo do possível doador cadáver e deve ser realizada segundo os critérios de exclusão de doação, que são divididos em cinco grupos. O primeiro grupo está relacionado a doenças com diagnóstico estabelecido ou suscitado pré-avaliação da doação, como grandes queimaduras; neoplasia malignas com potencial de metástase; tuberculose ativa; doenças sexualmente transmissíveis; malária; síndrome da imunodeficiência humana adquirida; infecção bacteriana sistêmica ou fúngica diagnosticada no curso da internação hospitalar, e sepse. O segundo grupo avalia comportamentos ou situações nos doze meses precedentes à doação, como contaminação por substância tóxica; uso de drogas injetáveis ilícitas ou sem indicação terapêutica; realização de retoque de acupuntura, tatuagens, maquiagem definitiva e adereços corporais sem condições de

avaliação quanto à esterilidade das agulhas empregadas; submeter-se à diálise; parceiros sexuais de dialisados; relações sexuais em troca de dinheiro ou de drogas; múltiplos parceiros sexuais; homens que tiveram relações sexuais com outros homens e/ou com as parceiras sexuais destes; relação sexuais com alguém com testes positivos para HIV, hepatite B, hepatite C ou outra infecção transmissível pelo sangue; detenção por mais de 24 horas em instituição carcerária ou policial.

O terceiro grupo abrange indivíduos com inaptidão para a doação por vacinação/imunoterapia, sendo avaliado o tipo de vacina e o tempo decorrido entre a vacinação e a data da doação. Neste caso, o intervalo mínimo de 48 horas é necessário em casos de vacinação para brucelose, cólera, coqueluche, difteria, febre tifoide (injetável), *Haemophilus influenzae*, hepatite A, hepatite B recombinante, leptospirose, meningite, peste, poliomielite (Salk), tétano. Já um intervalo mínimo de três semanas é imprescindível quando a vacinação é para BCG, caxumba, febre amarela, febre tifoide oral, poliomielite oral (Sabin), e sarampo; e de de quatro semanas quando for para rubéola, varicela, influenza e antirrábica profilática, e em caso de uso de soro anti-tétano. Por fim, um intervalo de um ano é preciso nos casos de antirrábica após exposição animal, hepatite B (derivada do plasma), imunoterapia passiva e vacinas em fase experimental. O quarto grupo compreende as doenças ou as terapêuticas de risco, como o uso de imunossupressores; tratamento com hormônio de crescimento; transplante de órgãos e tecidos em prazo inferior a 12 meses, exceto transplante de dura-máter ou quimioterapia; tratamento com radioterapia ou quimioterapia, exceto para tratamento de patologias benignas; desconhecimento do resultado de cirurgia, biópsia prévia devido a lesão cutânea; pessoas com história de transfusão de hemocomponentes ou hemoderivados no prazo inferior a 12 meses, exceto quando a origem do sangue ou hemoderivados for controlado.

4.1.1.3 Análise sorológica

As amostras de sangue foram coletadas entre 72 horas antes a até doze horas após a parada da circulação sanguínea. Caso o cadáver esteja refrigerado em temperatura de 2° a 8° C, o exame pode ser realizado com até 24 horas após a parada de circulação. Para os doadores com parada cardíaca, a equipe do banco tecidos deve providenciar a entrega das amostras para realização do exame sorológico nos laboratórios pré-acordados (**Anexo G**).

4.1.1.4 Análise clínica do doador

A triagem clínica do possível doador foi realizada inicialmente pelo profissional de enfermagem do BMT através do preenchimento do formulário de anamnese do doador (**Anexo H**), e pelo médico captador do BMT, que realizou o exame físico e preencheu o formulário de correspondente (**Anexo I**). Havendo qualquer contraindicação, o responsável técnico realizava o cancelamento da captação

4.1.1.5 Critérios de exclusão

Como critério de exclusão específico para este projeto, foram excluídos pacientes com trauma maciço da face, os quais poderiam apresentar deformidade da cartilagem a ser captada, e infecções cutâneas da região nasal.

4. 2 Equipe de Captação

O projeto foi realizado por um médico captador especialista em cirurgia otorrinolaringológica, por um enfermeiro e por um técnico em enfermagem, membros da Área

de Transplante Multitecidos (ATMIT) do INTO. A captação de tecido musculoesquelético foi realizada após a retirada de órgãos como fígado, rins e coração, por equipes específicas.

4.3 Fluxograma do processo de captação e processamento

Os processos de seleção do doador, captação, processamento dos espécimes estão demonstrados no fluxograma a seguir, (**Figura 3**).

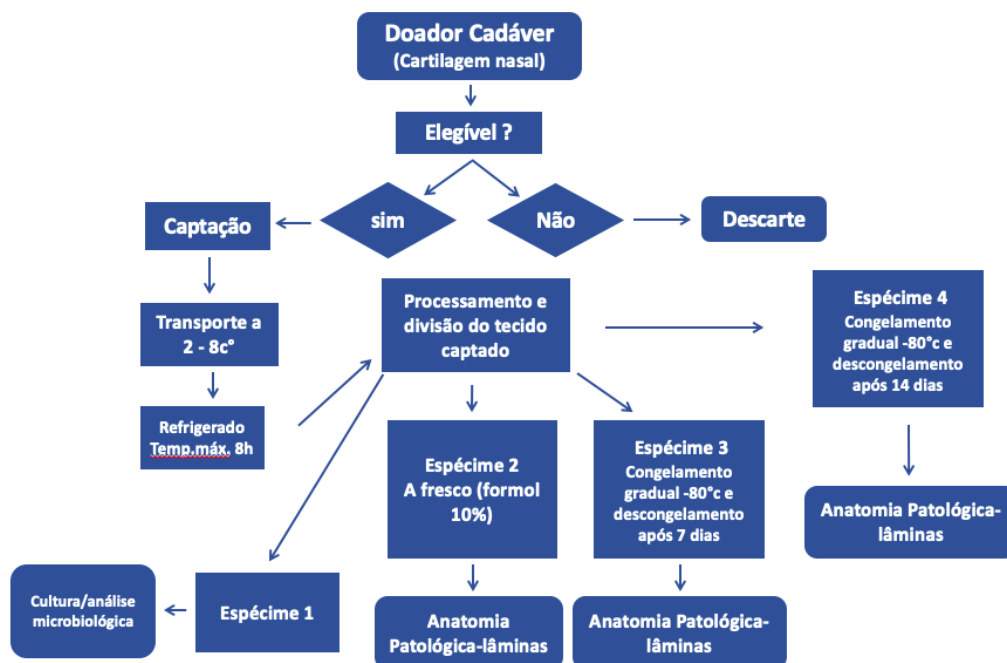


Figura 3. Logística do protocolo de captação, transporte e processamento da cartilagem nasal.

4.4 Material necessário para ressecção da cartilagem septal nasal

Dentre os materiais necessários para ressecção da cartilagem septal nasal estão: porta agulhas, pinça *Takahashi* reta delicada, para apreensão da cartilagem, espéculo nasal, descolador *Neves Pinto* reto, pinça *Adson* com dente, aspirador descolador metálico e bisturi número 23 (**Figura 4**), sendo todo material esterilizado previamente. No cenário da captação,

o espécime obtido será imerso em soro fisiológico a 0,9 % e armazenado em tripla embalagem com dupla selagem estéril.



Figura 4. Material utilizado para a captação do espécime. (A) porta agulha, (B) pinça *Takahashi* reta delicada, (C) espéculo nasal, (D) deslocador *Neves Pinto* reto, (E) pinça *Adson* com dente, (F) aspirador descolador, (G) Bisturi número 23.

4.5 Técnica de captação

O desenvolvimento e proposição do procedimento de ressecção da cartilagem septal nasal teve como base conhecimento da anatomia local e de técnicas em cirurgia de septoplastia, e todas as captações foram realizadas por apenas um único médico, otorrinolaringologista, sendo fundamental que este processo fosse feito pelo especialista. Nenhum outro profissional da saúde possui o conhecimento sobre esta técnica cirúrgica em sua formação.

Após colocação de campos estéreis (**Figura 5A**) e assepsia com gluconato de clorexidina a 4% e gluconato alcoólico a 0,5%, para visualização da cavidade nasal, foi utilizado espéculo nasal de metal, que promovia uma plena abertura da fossa nasal e, assim, a possibilidade de realização de toda técnica cirúrgica através dela (**Figura 5B**).

Em sequência, era realizada uma única incisão longitudinal utilizando um bisturi tamanho 23 e uma lâmina tamanho 15, em mucosa septal caudal nasal na sua porção mais anterior, até o assoalho nasal, não sendo necessária qualquer incisão cutânea, e, portanto, não interferindo na estética do cadáver (**Figura 5C**). Com esta incisão, identificava-se o plano entre a cartilagem e o mucopericôndrio, permitindo a introdução de um aspirador descolador, objetivando o descolamento e a separação completa entre estas estruturas, assim como em região inferior, para a separação entre o mucoperiósteo e o vômer.

Em continuidade, seguia-se com esse plano de descolamento até a região posterior do septo nasal, separando agora o mucoperiósteo da lâmina perpendicular do osso etmoide. Assim, no final, conseguíamos ter completamente toda a cartilagem septal de um lado, e a mucosa septal, com mucopericôndrio e mucoperiósteo, do outro (**Figura 5D**).

Utilizando um descolador *Neves Pinto* reto, era realizada a condrotomia posterior, separando a cartilagem septal do osso etmoidal. Com este mesmo instrumento, era realizada uma incisão na cartilagem, no sentido posteroanterior, em uma altura que fosse mantido cerca de 0,5cm de cartilagem na sua região mais superior. Esta incisão terminava a cerca de 0,5 cm da região mais anterior. Estes cuidados são necessários para não haver nenhuma alteração estética no doador, como o desabamento do dorso nasal. Então, esta incisão seguia em direção ao assoalho nasal, formando um ângulo de 90° com a incisão superior.

Por fim, separava-se a cartilagem do vômer, com o mesmo instrumento. Neste momento, o tecido doador já estava completamente descolado e solto, sendo retirado com uma pinça *Takahashi* (**Figura 5E**). A seguir, utilizando um porta-agulhas e uma pinça *Adson* com dente, realizava-se dois pontos de sutura com fio catgut simples 4.0, para aproximação da incisão original em mucosa, ficando ambos na região interna de fossa nasal, não podendo ser visualizados externamente. A quantidade de 1 – 2 cm² de tecido foi obtida por doador, sendo suficiente para análise histológica (**Figura 5F**).

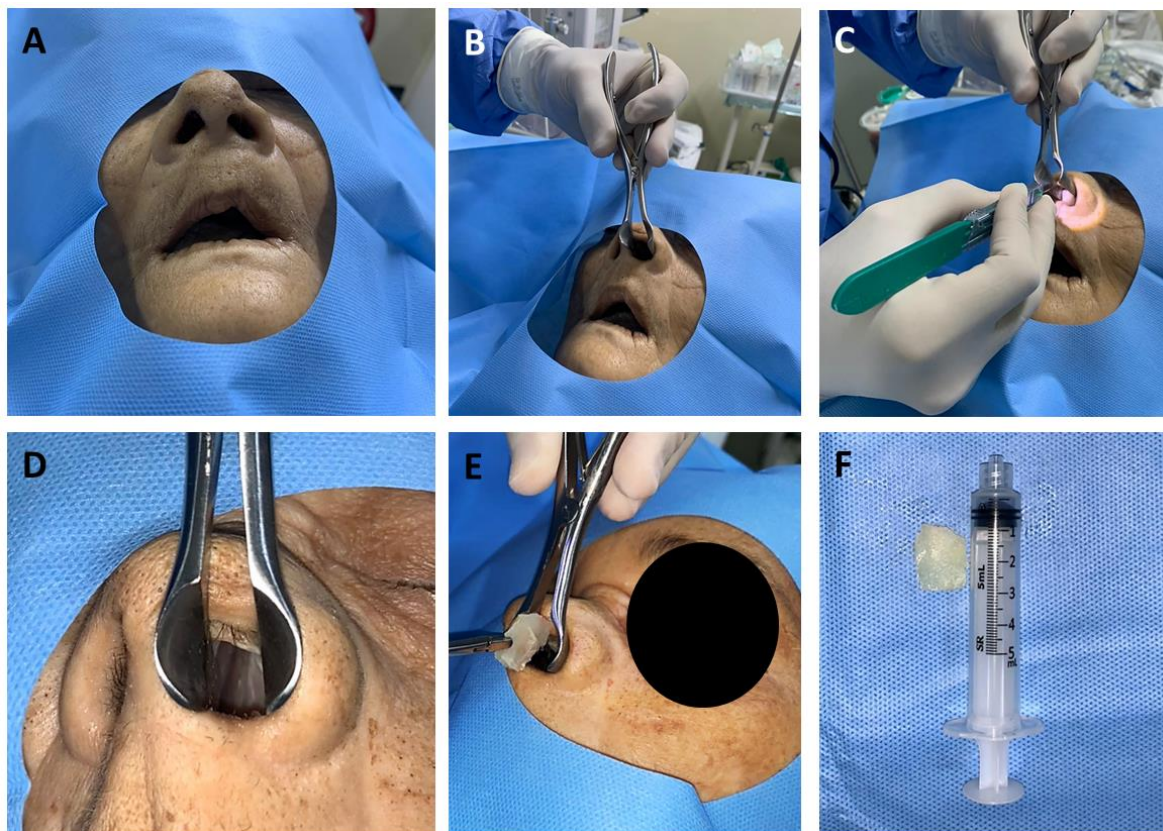


Figura 5. Técnica de captação do tecido septal. (A) Colocação de campo estéril e assepsia realizada com gluconato de clorexidina 4% e alcoólica 0,5%. (B) Visualização de cavidade nasal esquerda com espéculo nasal. (C) Incisão em mucosa septal com bisturi e lâmina 15. (D) Visualização de cartilagem septal após descolamento de mucosa e mucopericôndrio. (E) Ressecção de segmento de cartilagem septal. (F) Tecido coletado com comprimento aproximado de 17mm, sendo utilizado seringa de volume de 5ml para comparação de proporcionalidade.

4.6 Transporte do tecido

Imediatamente após término da embalagem, o tecido cartilagenoso coletado era mantido em temperatura média de 4°C em contêiner térmico controlado por termostato, sendo transportado para o Banco Multitecidos do INTO/MS, onde permaneceu refrigerado (4°C) até o início do processamento.

4.7 Processamento e armazenamento do tecido

O processamento do tecido foi realizado em sala limpa com classificação – ISO 5 (**Anexo J**) no BMT com tempo médio de até 3 horas após captação.

Nesta etapa, a equipe era formada pelo médico captador e por um técnico de enfermagem, ambos devidamente paramentados com vestimenta de área limpa, máscara, touca, capote e luvas estéreis.

Dentro da capela, o processamento era iniciado removendo-se qualquer camada de mucopericôndrio que estivesse aderida ao tecido obtido, utilizando uma pinça Adson sem dente. Então, o tecido era cortado com uma tesoura em quatro espécimes de tamanhos semelhantes.

Um espécime era colocado em soro fisiológico 0,9% e enviado para cultura e análise microbiológica. Outro espécime representava o tempo zero, sendo submetido à fixação em formol à 10%, e enviado para análise histológica. Os outros dois eram armazenados em criotubos com meio específico de preservação composto por 30% de Iscove's® (Thermo Fischer Brasil) (**Anexo K**), 60% de soro fetal bovino e 10% dimetilsulfóxido e então, submetidos a congelamento gradual até -80°C (**Figura 6 A-F**).

Posteriormente aos períodos de 7 e 14 dias, os espécimes eram descongelados em banho-maria e fixados em recipiente de plástico embebido em formol à 10%, e enviados para análise histológica.

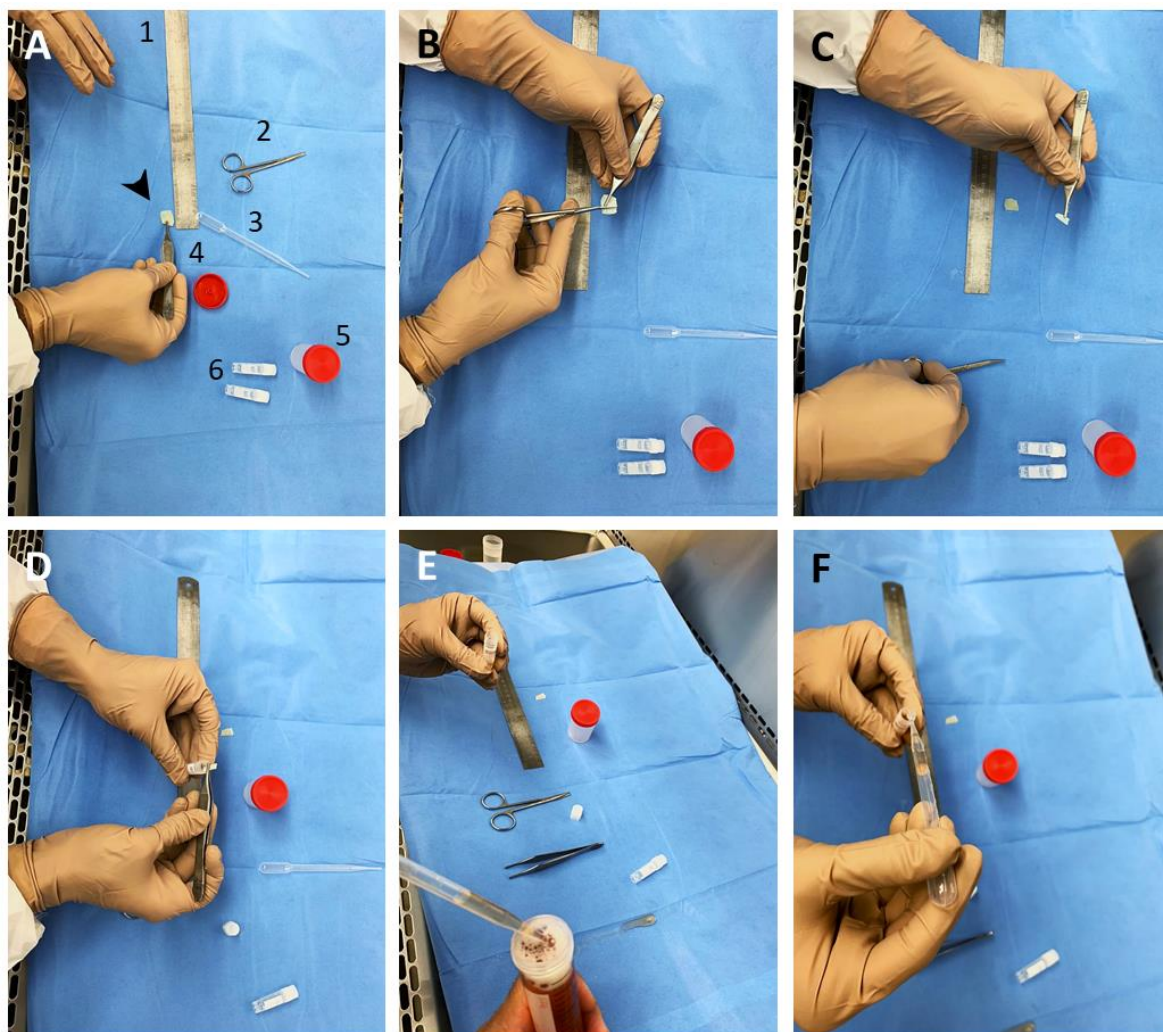


Figura 6. Processamento e armazenamento do tecido captado. (A) Mensuração da amostra para divisão em 4 espécimes. (B) Corte do tecido. (C) Separação do espécime. (D) Verificação do tamanho. (E) Coleta da quantidade necessária de meio de preservação em volume estimado para 10 vezes o volume da amostra. (F) Armazenamento em criotubo.

4.8 Fixação e parafinização

Cada amostra, após a fixação de 24 horas em formaldeído 10%, passou pelo processo de desidratação seriada, composta por 4 banhos de 40 minutos em álcool absoluto seguidos por 3 banhos, de mesma duração, com xileno P.A. (Para Análise). No processo de desidratação, as amostras eram envolvidas em gaze e colocadas em um cassete histológico tradicional, sendo submetidas a 2 banhos de 60 minutos cada, em parafina líquida, à temperatura de 65°C, com o objetivo de remover o excesso de xileno P.A. Em sequência, as amostras eram posicionadas em

um molde metálico e parafinizadas até a solidificação. Após a remoção do bloco de parafina, este era cortado com micrótomo, em fitas de espessura de 4 µm e, subsequentemente, sobrepostos em lâmina histológica dispostas em molas ou berços.

4.9 Desparafinização e hidratação

As lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida em temperatura de 65° C por 30 a 40 minutos para remoção da parafina com maior facilidade. Após o aquecimento, as lâminas passaram por 2 cubas contendo xileno P.A. e, em sequência, por 10 banhos em cada cuba contendo 4 álcoois. Então, colocou-se as lâminas em água em fluxo contínuo e deixadas por 5 minutos.

4.10 Coloração das lâminas com hematoxilina-eosina (H&E)

Nesta etapa, os cortes eram submetidos à coloração em hematoxilina 1%, com cada lâmina sendo 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 para remoção do excesso de álcool. Para a desidratação, era realizado um mergulho em álcool a 70%, e exposição por 1 minuto à eosina a 1%, finalizando com banho de 4 álcoois e 3 xilóis. Por fim, foram montadas em lamínulas de vidro e bálsamo do Canadá (Merck®).

4.11 Método de avaliação dos cortes histológicos

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico EVOS® M5000 (invitrogen by Thermo Fisher Scientific®) em aumento de 4x, 10x e 20x, e fotografadas com câmera do próprio microscópio, para registro dos resultados.

Para a análise histológica, criamos uma classificação de acordo com as mudanças encontradas no tecido. Dentre as características morfo-estruturais no tecido considerado moderadamente alterado destacam-se a presença de lise celular, o núcleo picnótico e as lacunas encontradas em quantidade $\leq 50\%$ na área do tecido avaliado em objetiva de 20x. Já para o tecido considerado muito alterado destacam-se a presença dos mesmos critérios estruturais elencados acima em quantidade $\geq 50\%$ no tecido visualizado na mesma objetiva de 20x. Por fim, o tecido considerado como ausente de alterações não deve possuir nenhuma das características apontadas acima. As amostras foram classificadas conforme a **Tabela 1**. A avaliação das alterações morfo-estruturais levaram em conta diversas características, tais como presença de núcleo picnótico, núcleo fragmentado, tecido conjuntivo fibrilado, tecido conjuntivo acelularizado e perda de basofilia.

Tabela 1. Classificação de acordo com as alterações morfo-estruturais à análise histológica.

Classificação	Alterações encontradas
Muito alterada	Presentes e ocupam área $\geq 50\%$ do tecido
Moderadamente alterada	Presentes e ocupam área $< 50\%$ do tecido
Ausência de alterações	Não se encontram presentes

5 RESULTADOS

Foram coletadas sete amostras de tecido cartilaginoso de sete doadores cadáveres da cidade do Rio de Janeiro no período de 01 de Outubro de 2020 a 03 de Agosto de 2021.

Durante este período, ocorreram outras cento e uma captações de tecidos e órgãos, porém, não foi realizada a captação do tecido nasal. Na grande maioria das vezes por negativa da família em autorizar a captação, mas em alguns momentos também pela indisponibilidade do médico responsável para realizar a captação.

Os resultados estão apresentados em uma tabela evidenciando a quantidade de amostras correspondente com cada pontuação, e de acordo com o período de análise (a fresco, após 7 dias de congelamento e após 14 dias de congelamento).

5.1 Resultados Epidemiológicos

Dos sete doadores, três (43 %) eram do sexo masculino e quatro (57%) do sexo feminino. A faixa etária variou de 20 a 79 anos, e foram considerados os protocolos de morte encefálica (ME) ou de parada cardiorrespiratória (PCR) (**Quadro 1**).

Quadro 1. Perfil epidemiológico dos doadores cadáveres.

Doador cadáver	Sexo	Idade	Causa Mortis	Hospital	Data	Protocolo
982	Masculino	79 anos	TCE	HC Mario Lioni	01/10/2020	ME
1037	Feminino	62 anos	HSA	HMSF	10/04/2021	ME
1047	Masculino	20 anos	PAF crânio	HGV	29/04/2021	ME
1055	Masculino	63 anos	AVEi	HMSF	26/05/2021	ME
1072	Feminino	47 anos	AVEh	HMSF	01/07/2021	ME
1085	Feminino	54 anos	AVEh	Hospital Vital	25/07/2021	ME
1090	Feminino	63 anos	AVEh	SEMIU	03/08/2021	PCR

Legenda: Traumatismo cranioencefálico (TCE); Hemorragia subaracnóide (HSA); Projétil de arma de fogo (PAF); Acidente vascular cerebral isquêmico (AVEi); Acidente vascular cerebral hemorrágico (AVEh); Hospital de Clínicas (HC); Hospital Municipal Salgado Filho (HMSF); Hospital Getúlio Vargas (HGV); Morte encefálica (ME); Parada cardiorrespiratória (PCR).

5.2 Resultado Microbiológico

Das sete amostras coletadas, obtivemos o resultado de cultura do espécime de seis delas, pois a primeira amostra foi utilizada por inteiro apenas para avaliação histológica inicial, como controle tecidual. Em todos os casos houve crescimento positivo para uma ou duas bactérias, causadoras de infecção predominantemente hospitalar, sendo a *Acinetobacter baumannii* e a *Pseudomonas aeruginosa*, as mais presentes, estando ambas positivas em 1/3 das amostras. Todas as demais cresceram em 1/6 dos espécimes. **(Quadro 2).**

Quadro 2. Resultado da avaliação microbiológica dos espécimes na data de coleta.

Doador cadáver	Idade	Cultura	Microorganismo 1	Microorganismo 2	Data
982	79 anos	N/A			01/10/2020
1037	62 anos	Positiva	<i>Serratia marcescens</i>	-----	10/04/2021
1047	20 anos	Positiva	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>	29/04/2021
1055	63 anos	Positiva	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterobacter coclae</i>	26/05/2021
1072	47 anos	Positiva	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-----	01/07/2021
1085	54 anos	Positiva	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-----	25/07/2021
1090	63 anos	Positiva	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-----	03/08/2021

Legenda: Não aplicável (N/A).

5.3 Resultado Histológico

Após análise histológica dos espécimes, pelo setor da anatomia patológica do INTO, foi possível observar ausência de alteração na qualidade tecidual dos fragmentos após 7 e após 14 dias de ultracongelamento a -80°C, quando comparado ao tecido fresco, fixado logo após coleta. Deste modo, não houve modificação representativa do tecido em nenhuma das condições analisadas. Foi observada boa manutenção das características morfoestruturais do tecido, com núcleos intactos e membranas celulares preservadas, bem como boa intensidade de impregnação com o corante, tanto nos condrócitos, como na matriz extracelular. Cabe ressaltar que este fato foi observado igualmente em todas as condições de criopreservação, assim como nos diferentes doadores (**Figura 7 A-I**).

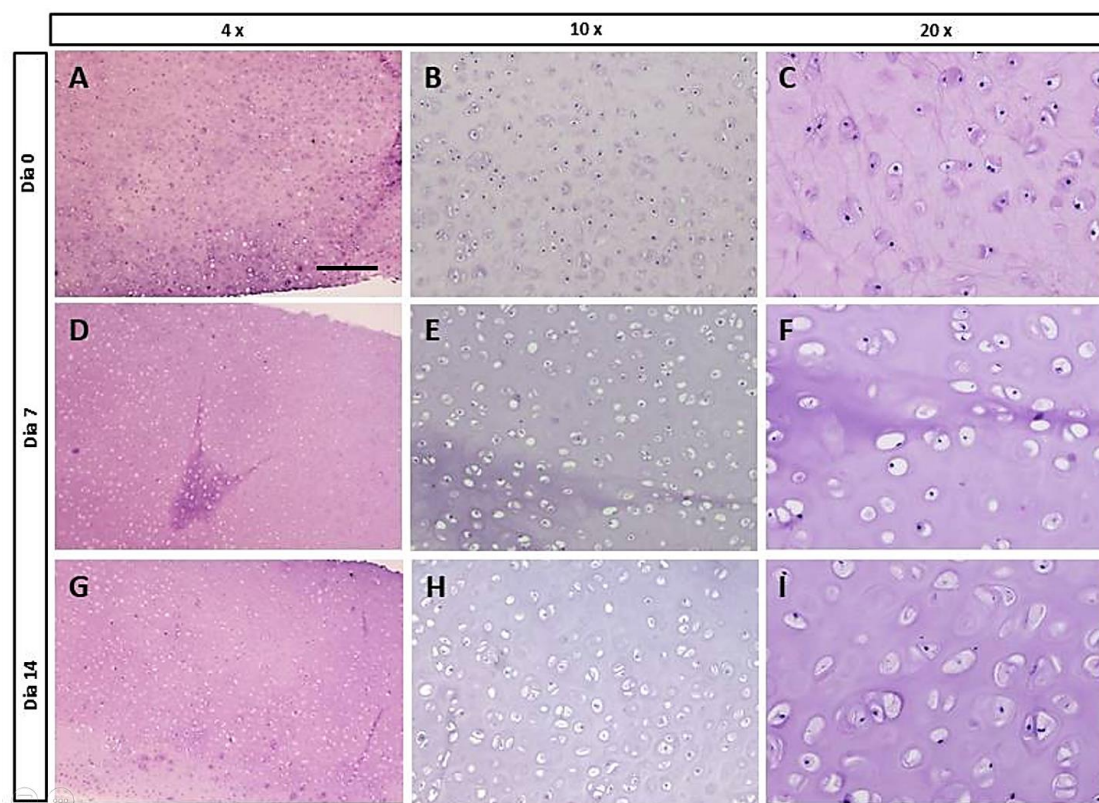


Figura 7. Fotomicrografia da coloração histológica com H&E da cartilagem do septo nasal criopreservada. (A-C) Fotomicrografia da avaliação histológica da cartilagem do septo nasal do tecido fresco sem criopreservação, nos aumentos de 4x, 10x e 20x. (D-F) Fotomicrografia da avaliação histológica da cartilagem septo nasal após 7 dias de criopreservação, nos aumentos de 4x, 10x e 20x. (E-F) Fotomicrografia da avaliação histológica da cartilagem do septo nasal após 14 dias de criopreservação, nos aumentos de 4x, 10x e 20x. (Barra de escala de 100 μ m).

5.4 Elaboração do Protocolo

Baseado nos bons resultados histológicos encontrados, foi possível elaborar um protocolo que descreve desde a seleção do doador cadáver, seguindo pela captação, transporte e processamento do tecido septal nasal, até os critérios para análise microbiológica e histológica (ANEXO L).

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com o intuito de criar um protocolo de captação e criopreservação da cartilagem do septo nasal com qualidade tissular que permita a realização de implantação deste tecido em pacientes com indicação de reconstrução nasal. O tecido nasal só é considerado adequado para o transplante quando o resultado do processamento, planejado neste projeto, permitir que o tecido não tenha alterações morfo-estruturais representativas.

O nariz é a parte inicial do trato respiratório, sendo uma estrutura formada por ossos e pelas cartilagens nasais, que sustentam a pele e os tecidos moles, e fornecem a sua projeção tridimensional (Hahn, 2017). Pode ser acometido negativamente por traumas, doenças infectocontagiosas, neoplasias, anomalias congênitas, doenças autoimunes e, também, por cirurgias malsucedidas (Hahn, 2017). Desse modo, deformidades complexas podem ocorrer, todas gerando perda funcional e/ou estética da região nasal.

Na grande maioria dos casos, o tratamento preconizado é cirúrgico, e uma rinosseptoplastia deve ser realizada, em uma tentativa de reconstruir a região acometida. Neste contexto, uma avaliação pré-operatória minuciosa deve ser efetuada, individualizando caso a caso, para se planejar qual a melhor maneira que esta abordagem deve ser executada. Não somente deve-se olhar para as áreas que foram prejudicadas e o impacto na respiração e na estética do paciente, mas também para as regiões que permaneceram normais, projetando como a cicatrização pode ser mais bem sucedida para uma nova estruturação nasal (Hahn, 2017). E, para esta finalidade, a necessidade de enxertos cartilagosos é fundamental para uma boa construção de uma nova unidade anatômica nasal e manutenção de sua funcionalidade. Estes enxertos podem ter finalidades diferentes, como serem novas peças de suporte da estrutura

nasal, tanto quanto para corrigirem assimetrias e imperfeições estéticas. O uso da própria cartilagem septal como fonte de enxerto é o que melhor se adequa para esta cirurgia, devido às suas características estruturais, de forma e de maleabilidade. Contudo, nos pacientes que necessitam deste procedimento, usualmente a cartilagem septal não se encontra mais disponível.

Os aloenxertos são usados em rinoplastia quando uma quantidade suficiente de tecido de enxerto autólogo não está disponível, e a cartilagem, em geral, exibe baixa antigenicidade (Lavernia, et al., 2019). Contudo, para eliminar qualquer resposta imunológica do receptor, os enxertos podem ser irradiados com radiação gama para matar células residuais (Lavernia et al., 2019).

Na tentativa de utilizar os enxertos homólogos, a cartilagem costal irradiada é a mais utilizada para reconstrução nasal estrutural, sendo semelhante à cartilagem nasal em relação à integridade estrutural e plasticidade (Hahn, 2017). Entretanto, apresenta maiores taxas de reabsorção, de ocorrência de infecções e de mudança de forma e tendência de arqueamento, quando comparado com as cartilagens costais autólogas, não sendo, portanto, uma boa fonte de enxertia (Adams, et al., 1999). Isto, somado ao fato de já ter sido evidenciado por experiência clínica durante décadas de que aloenxertos osteocondrais não despertavam uma resposta imune (Bugbee, 2002; Gross et al., 2005).

Sendo assim, a melhor opção parece ser a utilização de enxerto de cartilagem septal homólogo, quando não há tecido septal autólogo disponível. Atualmente, não existe nenhum protocolo nacional ou internacional que possibilite a utilização de enxertos deste tecido, e o presente estudo busca promover uma opção para a resolução desta questão, através da criação de uma proposta de protocolo de captação e criopreservação do fragmento da cartilagem septal sendo algo inovador e com boa viabilidade técnica para ser executado. Este é o primeiro

trabalho realizado com análise deste tecido provindo de cadáveres de doadores de órgãos, avaliando suas características morfoestruturais após ultracongelamento, além da microbiota presente após ressecção.

No presente estudo foram coletados sete espécimes e os testes microbiológicos foram realizados logo após a coleta. Apesar da realização de assepsia com gluconato de clorexidina a 4% e gluconato alcoólico a 0,5%, observamos o crescimento de bactérias responsáveis por infecção hospitalar em todas as amostras estudadas. De modo geral, são todas bactérias oportunistas, que acometem pacientes imunocomprometidos de alguma maneira, causando infecções de mais difícil tratamento, sendo importante relatar que todos os doadores apresentavam pelo menos 5 dias (cento e vinte horas) de internação hospitalar em unidade de tratamento intensivo. O *Acinetobacter baumannii* afeta principalmente o trato respiratório, sangue, urina e, menos comumente, a pele (Nielsen et al., 2021). A *Pseudomonas aeruginosa* é uma fonte comum de infecção nos pacientes em uso de ventilação mecânica, apresentando um desafio do banco de tecidos para gestão da qualidade do espécime a ser captado, dado a possibilidade de formação de biofilme em tecido cartilaginoso (Röhner et al., 2020). A *Serratia marcescens* é uma enterobactéria gram-negativa encontrada como agente causal de infecções principalmente do trato urinário, porém também pode infectar com severidade clínica o tecido articular (Pérusseau-Lambert et al., 2021). O enterobacter é fonte de infecções hospitalares diversas, mas raramente afeta alguma região osteocartilaginosa (Yazidi et al., 2018), e a *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria gram-negativa, que pode causar infecções dos tratos respiratório e urinário, e de pele, principalmente quando existem feridas (Wang et al., 2020). Desta maneira, podemos observar que provavelmente é necessária a utilização de antibiótico no meio de preservação, para garantir uma maior proteção tecidual antimicrobiana, além da fornecida pela própria congelação.

No armazenamento dos espécimes, foi optado pelo resfriamento lento no processo de criopreservação, em vista que no INTO há disponível freezers de ultracongelamento gradual. Sendo assim, um baixo volume de CPA foi necessário, evitando uma maior toxicidade celular, além de ser um processo de fácil execução, com pouca exigência técnica para a equipe. Existem diversos tipos de CPA, porém o escolhido para este estudo foi o DMSO (dimetilsulfóxido), que apresenta baixo custo e baixo nível de toxicidade (Slichter et al., 2014), e atua reduzindo a concentração de eletrólitos na solução residual descongelada no meio extra e intracelular, em qualquer temperatura (Jang et al., 2017). E, como optamos pela resfrição lenta, baixa quantidade de DMSO foi necessária. Contudo, já foram observados efeitos negativos em casos de uso em alta quantidade, como uma queda na taxa de sobrevivência celular, além de relatos de indução da diferenciação celular causada pela metilação do DNA (ácido desoxirribonucleico) e por alteração das histonas, as principais proteínas presentes nos nucleossomos (Miyagi-Shiohira et al., 2015). Sendo assim, este crioprotetor pode causar uma instabilidade cromossômica com tendência a formação de tumores (Jenkins et al., 2012). Logo, esses efeitos do DMSO na criopreservação geram algumas dificuldades para seu uso em aplicações clínicas de rotina.

Associado ao crioprotetor, o meio de preservação apresenta soro fetal bovino em sua formulação, utilizado universalmente como suplemento de crescimento celular em um meio de cultura, contendo hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, ácidos graxos, dentre outras substâncias que auxiliam na proliferação e manutenção da atividade celular (Gstraunthaler et al., 2013).

Quanto à análise histológica, foi evidenciada uma boa qualidade morfoestrutural do tecido após a criopreservação, sendo este um excelente resultado. Apesar de até o momento não serem encontrados na literatura estudos que avaliem o ultracongelamento da cartilagem septal

nasal, podemos encontrar informações sobre este tipo de preservação em outras cartilagens, como a osteocondral de joelho. Ball e colaboradores (2004) evidenciaram uma queda importante na viabilidade dos condrócitos desta articulação, após o congelamento a -80 °C. Outro estudo, realizado no INTO, evidenciou que enxertos osteocondrais poderiam ser preservados com boa viabilidade celular por até 14 dias a 4°C ou a -70°C por um ano, em meio suplementado com albumina (de Sousa et al., 2014). Da mesma forma, também em pesquisa desenvolvida no INTO, Vivacqua e colaboradores (2020) verificaram que enxertos osteocondrais poderiam ser armazenados a 4°C por até 15 dias em meio Iscove's suplementado com albumina e vancomicina.

Quanto às dificuldades encontradas, é de suma importância relatar que o presente estudo foi planejado em 2019, porém se iniciou em 2020, concomitante com a pandemia causada pelo SARS-CoV-2. Sendo assim, em um mundo tomado por incertezas, as doações de órgãos e tecidos foram suspensas por alguns meses, o que atrasou o início da captação do projeto. Além disso, a doação de um tecido presente na face, gera incertezas nas famílias quanto à possibilidade de alterações estéticas. Logo, mesmo sendo relatado veementemente que isto não aconteceria, além do folder que era entregue na abordagem familiar, muitos se negavam a autorizar a captação.

Também é de suma importância ressaltar que o fragmento tecidual captado é muito pequeno, o que dificulta uma múltipla divisão deste em espécimes para diferentes análises, como para avaliação de períodos mais longos de ultracongelamento, com o objetivo de tentar se determinar um tempo mais preciso de viabilidade tecidual. Assim como, por este mesmo motivo, cabe lembrar que foi realizada análise microbiológica apenas antes da criopreservação, e não após, o que seria muito importante para avaliar se as bactérias encontradas sobrevivem ao ultracongelamento.

Nosso estudo se limitou a analisar o tecido cartilaginoso septal nasal após criopreservação, mas não foram realizados ainda avaliações após uso deste enxerto in vivo. Logo, mais estudos são necessários para garantir o uso deste material em cirurgias reconstrutoras nasais sem prejuízo estético ou funcional ao paciente receptor.

A obtenção de órgãos a partir de doadores cadáveres, e sua posterior utilização através da transplantação, constitui importante alternativa de tratamento de diversas doenças. E, cada vez mais observamos avanços, tanto nas técnicas de obtenção dos tecidos musculoesqueléticos, quanto em sua aplicação nas diversas patologias que acometem este sistema. Assim, novos estudos devem continuar a explorar esse tema de modo a possibilitar o desenvolvimento do uso de aloenxertos de cartilagem do septo nasal para o tratamento de pacientes com doenças que afetam a região do nariz.

7 CONCLUSÃO

Concluimos este estudo conseguindo descrever o processo de captação do tecido septal nasal de doadores cadáveres, assim como a sua criopreservação e análise histológica. Foi possível observar que existe uma boa qualidade morfoestrutural deste tecido após 14 dias de congelamento a -80°C , sendo construída uma proposta de um protocolo adequado de captação, armazenamento e criopreservação, com o objetivo de futuro uso deste material em cirurgias reconstrutoras nasais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, W. P.; Rohrich, R. J.; Gunter, J. P.; Clark, C. P.; Robinson, J. B. The rate of warping in irradiated and nonirradiated homograft rib cartilage: a controlled comparison and clinical implications. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.103, n.1, p. 265-270, jan. 1999.

Andrews, S. H. J.; Kunze, M.; Mulet-Sierra, A.; Willians, L.; Ansari, K.; Osswald, M.; Adesida, A. B. Strategies to Mitigate Variability in Engineering Human Nasal Cartilage. **Scientific Reports**, v. 7, n. 6490, jul. 2017.

Antunes, T.; Barbas, C. S. V. Wegener's granulomatosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 21-26, jul. 2005.

Avelleira J. C. R.; Bottino, G. Syphilis: diagnosis, treatment and control. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n.2, p. 111-124, mar. 2006.

Ball, S. T.; Amiel, D.; Williams, S. K.; Tontz, W.; Chen, A. C.; Sah, R. L.; Bugbee, W. D. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 418, p. 246–252, jan. 2004.

Bilen, B. T; Kilinc, H. Reconstruction of saddle nose deformity with three-dimensional costal cartilage graft. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 18, n. 3, p. 511-515, mai. 2007.

Bugbee, W. D. Fresh osteochondral allografts. **The Journal of Knee Surgery**, v.15, n.3, p. 191-195, summer. 2002.

De Sousa, E. B.; Aguiar, D. P.; Barcelos, J. F. M.; Duarte, M. E. L; Olej, B. Approaches to preserve human osteochondral allografts. **Cell Tissue Bank**, v. 16, n.3, p. 425-431, dez. 2014.

Del Rio, M. L.; Buhler, L.; Gibbons, C. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation. **Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 21, n.11, p. 1015-1028, nov. 2008.

Elves, M. E. Newer Knowledge of the Immunology of Bone and Cartilage. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 120, p. 232-259, out, 1976.

Fornazieri, M. A.; Moreira, J. H.; Pilan, R.; Voegels, R. L. Perforation of nasal septum: etiology and diagnosis. **Arquivos Int. Otorrinolaringologia**, v. 14, n. 4, p. 467 – 471, out. 2010.

Gao, D.; Critser, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR Journal**, v. 41, n. 4, p. 187–196, out. 2000.

Goanță, C. M.; Cîrpaciu, D.; Tușaliu, M.; Budu, V. A. Actual Septoplasty Techniques. **Archives of the Balkan Medical Union**, v. 52, n. 4, p. 445-448, dez. 2017.

Griffin, M. D.; Ryan, A. E.; Alagesan, S.; Lohan, P.; Treacy, O.; Ritter, T. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: What have we learned so far? **Immunology Cell Biology**, v. 91, n. 1, p. 40-51, jan. 2013.

Gross, A. E.; Shasha, N.; Aubin, P. Long-term follow up of the use of fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 435, p. 79-87, jun. 2005.

Gstraunthaler, G.; Lindl, T.; van der Valk, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. **Cytotechnology**, v. 65, n.5, p. 791-793, out. 2013.

Hahn, S. Osseous and Cartilaginous Nasal Reconstruction. **Facial Plastic Surgery**, v. 33, n. 1, p. 43-51, fev. 2017.

Jang, T. H.; Park, S. C.; Yang, J. H.; Kima, J. Y.; Seok, J. H.; Park, U. S.; Choi, C. W.; Lee, R. S.; Han, J. Cryopreservation and its clinical applications. **Integrative Medicine Research**, v. 6, n. 1, p. 12-18, mar. 2017.

Jenkins, E. C.; Lingling, Y.; Silverman, W. P. Does the cryogenic freezing process cause shorter telomeres? **Criobiology**, v. 65, n. 1, p. 72–73, ago. 2012.

Karlsson, J. O.; Toner, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. **Biomaterials**, v. 17, n. 3, p. 243–256, fev. 1996.

Lavernia, L.; Brown, W. E.; Wong, B. J. F.; Hu, J. C.; Athanasiou, K. A. Toward tissue-engineering of nasal cartilages. **Acta Biomaterialia**, v. 88, n. 1, p. 42-56, abr. 2019.

Lessa, M. M.; Lessa, H. A.; Castro, T. W.; et al. Mucosal leishmaniosis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

Lim, C.; Lee, Y.; Cho, J.; Choi, H.; Lee, B.; Lee, M. C.; Kim, S. Immunogenicity and immunomodulatory effects of the human chondrocytes, hChonJ. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.18, p. 1999, Mai. 2017.

Maia-Elkhoury, A. N. S.; Valadas, S. Y. O. B.; Nicholls, S.; Buzanovsky, L. P. Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas. Washington: **Organização Pan-Americana da Saúde**, v. 7, mar. 2019.

Mandawala, A. A.; Harvey, S. C.; Roy, T. K.; Fowler, K. E. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1637–1644, out. 2016.

Miyagi-Shiohira, C.; Kurima, K.; Kobayashi, N.; Saitoh, I.; Watanabe, M.; Noguchi, Y.; Matsushita, M.; Noguchi, H. Cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stem cells. **Cell Medicine**, v. 8, n. 1-2, p. 3–7, ago. 2015.

Mota, L. A. A.; Miranda, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Intl. Arch. Otorhinolaryngol.**, São Paulo - Brazil, v.15, n.3, p. 376-381, ago. 2011.

Navarro, J. A. C; Navarro P. L.; Navarro, L. M. Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial, 2.ed. Roca, 2011. v. 1, p. 614-620.

Naves, M. M.; Patrocinio, L. G.; Patrocinio, J. A; Mota, F. M. N.; de Souza, A. D.; Fleury, R. N; Goulart, I. M. B. Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. **American journal of rhinology & allergy**, v. 23, n. 2, p. 177-180, mar. 2009.

Nielsen, T. B.; Yan, J.; Slarve, M.; Lu, P.; Li, R.; Ruiz, J; Lee, B.; Burk, E.; Talyansky, Y.; Oelschlaeger, P.; Hurth, K.; Win, W.; Luna, B. M.; Bonomo, R. A.; Spellberg, B. Monoclonal Antibody Therapy against *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Immunity*, v. 89, n.10, set. 2021.

Osiecka-Iwan, A.; Hyc, A.; Radomska-Lesniewska, D. M.; Rymarczyk, A.; Skopinski, P. Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases. **Central-European Journal of Immunology**, v. 43, n.2, p. 209–219, jun. 2018.

Pasinato, R.; Paes, V. M. C.; dos Santos, R. F. **Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial**, 2.ed. Roca, 2011. v. 3, p. 74-84.

Patrocinio, L. G.; Patrocinio, J. A. Atualização em enxertos na rinoplastia. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, n. 3, p. 394-402, 2001.

Pegg, D. E. Principles of cryopreservation. **Methods in Molecular Biology**, v. 368, p. 39–57, 2007.

Penna, M. L. F.; Grossi, M. A. F.; Penna, G. O. Country Profile: Leprosy in Brazil. **Leprosy Review**, v. 84, n. 4, p. 308–315, dez. 2013.

Pérusse-Lambert, A.; Gouda, J. J.; Fareed, H. Infection of the hip joint by *Serratia marcescens*. **BMJ Case Reports**, v. 14, n. 3, mar. 2021.

Pochat, V. D.; Alonso, N.; Figueredo, A.; Emilie, B.; Mendes, R. R. S.; Meneses, J. V. L. The Role of Septal Cartilage in Rhinoplasty: Cadaveric Analysis and Assessment of Graft Selection. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 31, n. 8, p. 891–896, nov. 2011.

Popko, M.; Bleys, R. L. A. W.; De Groot, J.; Huizing, E. H. Histological structure of the nasal cartilages and their perichondrial envelope. I. The septal and lobular cartilage. **Rhinology**, v. 45, n. 2, p. 148-152, jun. 2007.

Pribitkin, E. A.; Ezzat, W. H. Classification and treatment of the saddle nose deformity. **Otolaryngologic clinics of North America**, v. 42, n. 3, p. 437-461, jun. 2009.

Rall, W. F.; Fahy, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**, v. 313, n. 6003, p. 573–575, fev. 1985.

Röhner, E.; Jacob, B.; Böhle, S.; Rohe, S.; Löffler, B.; Matziolis, G.; Zippelius, T. Sodium hypochlorite is more effective than chlorhexidine for eradication of bacterial biofilm of staphylococci and *Pseudomonas aeruginosa*. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: official journal of the ESSKA**, v. 28, n. 12, p. 3912–3918, dez. 2020.

Sampaio, P. L.; Caropreso, C. A.; Neto, W. C.; Dolci, J. E. L.; Ferreira, N. G. M. **Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial**, 2.ed. Roca, 2011. v. 3, p. 469-475.

Santana, N. O. R.; Pinheiro, G. B.; Kehrle, H. M.; de Faria, I. P.; Estrella, C. N. Mucormycosis of the paranasal sinuses and orbit in a immunocompetent patient: A case report and review of the literature. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 67, n.5, set. 2001.

Shikanai-Yasuda, M. A.; Mendes, R. P.; Colombo, A. L.; Telles, F. Q.; Kono, A.; Paniago, A. M. M.; Nathan, A.; do Valle, A. C. F.; Bagagli, E.; Benard, G.; Ferreira, M. S.; Teixeira, M. M.; Vergara, M. L. S.; Pereira, R. M.; Cavalcante, R. S.; Hahn, R.; Durlacher, R. R.; Khoury, Z.; Camargo, Z. P.; Moretti, M. L.; Martinez, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose – 2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. spe, ago. 2018.

Slichter, S. J.; Jones, M.; Ransom, J.; Gettinger, I.; Jones, M. K.; Christoffel, T.; Pellhan, E.; Bailey, S. L.; Corson, J.; Bolgiano, D. Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 28, n. 4, p.212–25, out. 2014.

Souza Filho, M. V. P.; Kobig, R. N.; de Barros, P. B.; Dibe, M. J. A. Leal, P. R. A. Nasal Reconstruction at the Brazilian National Cancer Institute: experience in 253 cases. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 2, p.239-245, jun. 2002.

Stevens, D. L.; Bryant, A. E.; Ferretyi, J. J.; Stevens, D. L.; Fischetti, V. A. Severe Group A Streptococcal Infections. **Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations [Internet]**, fev. 2016.

Stoker, A. M.; Stannard, J. P.; Kuroki, K.; Bozynski, C. C.; Pfeiffer, F. M.; Cook, J. L. Validation of the missouri osteochondral allograft preservation system for the maintenance of

osteochondral allograft quality during prolonged storage. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 1, p. 58–65, jan. 2018.

Vivacqua, T. A.; Prinz, R. D.; Cavanellas, N.; Barretto, J. M.; de Souza, E. B.; Aguiar, D. P. Protocolo para captação, transporte e preservação de tecido osteocondral humano. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.55, n.2, p. 163-169, jan. 2020.

Von Mangoldt, F. Reconstruction of saddlenose by cartilage overlay. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 46, n. 5, p. 498-501, nov. 1970.

Wang, G.; Zhao, G.; Chao, X.; Xie, L.; Wang, H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n.17, p. 6278, ago. 2020.

William Win,

Yavin, S.; Arav, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 81–89, out. 2007.

Yazidi, L. S. A; Hameed, H.; Isaacs, D.; Axt, M.; Kesson, A. Enterobacter cloacae osteoarticular infection without risk factors: Case report and review of the literature. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 54, n. 8, p. 915-917, ago. 2018.

Yong, K. W.; Safwani, W. K. Z. W.; Xu, F.; Abas, W. A. B. W.; Choi, J. R.; Pingguan-Murphy, B. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. **Biopreserv Biobanc**, v. 13, n. 4, p. 231–239, ago. 2015.

Yuli Talyansky,

Zeron, Y.; Pearl, M.; Borochoy, A.; Arav, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Criobiology**, v. 38, n. 1, p. 35–42, fev. 1999.

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 LH&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) sepse refratária; e
- f) infecções virais e fúngicas graves, ou potencialmente graves na presença de imunossupressão, exceto as Hepatites 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. 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 conservação 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.

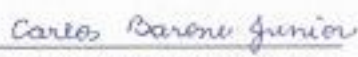
Art. 135. O profissional transplantador deve encaminhar ao Banco de Tecido Músculo Esquelético e à CNCDO as informações sobre os receptores no prazo máximo de 15 (quinze) dias após a realização do transplante, cabendo o não-encaminhamento das informações no prazo

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 – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

	MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA JAMIL HADDAD
TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	
(De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466 de 12/12/2012)	
O seu familiar está sendo convidado a participar da pesquisa "CRIAÇÃO DE PROTOCOLO DE CAPTAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CARTILAGEM DE SEPTO NASAL HUMANO PARA ESTOQUE EM BANCO DE TECIDOS" realizada no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO). Ele foi selecionado a partir dos critérios estabelecidos pelo Sistema Nacional de Transplantes. A qualquer momento você pode desistir desta participação e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador e a instituição. O objetivo deste estudo é captar um segmento de cartilagem do septo nasal e avaliar se esta cartilagem poderá ser utilizada em pacientes que necessitem realizar uma cirurgia de reconstrução nasal. Este procedimento será realizado por um profissional especializado, otorrinolaringologista, e de maneira alguma haverá qualquer mudança estética do doador. O benefício relacionado esta participação será de poder estudar melhores formas de tratar pacientes com deformidades nasais. Cabe ressaltar que nenhum tipo de benefício é concedido à nenhuma família dos participantes. Esta é uma participação inteiramente voluntária. As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do doador. Este Termo foi redigido em duas vias, sendo uma para o familiar do doador e outra para o pesquisador, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP.	
Rio de Janeiro, ____ de ____ de ____	
Pesquisador responsável: Carlos Barone Junior Contato com o pesquisador responsável: Endereço: Telefone: 21 2134-5000 e-mail: carlosbaronejunior@gmail.com	
Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do INTO. Endereço: Avenida Brasil nº 500, 9º andar – sala nº 4 – São Cristóvão – Rio de Janeiro – RJ – CEP: Telefone: 21 2134-5000 e-mail: cep.info@into.saude.gov.br	
Eu, _____, data de nascimento _____, portador de documento de identidade nº _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com um membro da equipe de pesquisa para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Diante do exposto expresse minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.	
Assinatura do voluntário ou de seu representante legal	 Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE Carlos Barone Otorrinolaringologista CRM 52.926/2-5
	Folha 1 de 1 Via 1 – Pesquisador Via 2 – Participante

ANEXO D – Folder entregue aos familiares para evidenciar que não existe nenhuma alteração estética com a técnica cirúrgica empregada.

Você sabia que é possível Doar a Cartilagem Nasal?

Perguntas frequentes:

A captação da cartilagem de septo nasal pode causar alguma deformidade no rosto do doador?

Não. A coleta é realizada através de corte feito dentro do nariz, sem alterar a estética nasal e sem deixar marcas na pele.

Qual a importância de permitir esta captação?

Este projeto de pesquisa visa buscar uma maneira de auxiliar pessoas que tenham seus rostos alterados por qualquer doença ou síndrome, e que necessitem de uma cirurgia de reconstrução do nariz.

Quanto tempo demora para ser captado o tecido?

Cerca de 10 a 15 minutos.

Antes



Depois



ANEXO E - Termo de Autorização da Doação de Órgãos e Tecidos (maior de 18 anos)




TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DOAÇÃO DE ÓRGÃOS E TECIDOS (MAIOR DE 18 ANOS)

1-Doador:
Nome legível: _____
Sexo: () F () M Data de nascimento: ____/____/____ Estado Civil: _____
RG: _____ Órgão Expedidor: _____ CPF: _____
Nome da mãe ou pai: _____
Hospital: _____
Data do Óbito: ____/____/____ Horário do Óbito: ____:____:____
Número do caso: _____ RGCT: _____

2-Responsável pela doação: () Pai () Mãe () Irmão/a () Cônjuge () Filho/a () Neto/a () Avô/Avó
() Curador comprovado () Autorização Judicial Comprovada *LEI Nº10.211 de 23 de março /2001
Nome legível: _____
Idade: _____ anos Sexo: () F () M Profissão: _____
CPF: _____ RG: _____ Estado: _____
Endereço: _____
Telefone: () _____ Celular: () _____
Data da entrevista: ____/____/____ Hora da entrevista : ____:____:____
Assinatura do responsável: _____

3- Autorizo de livre espontânea vontade a remoção dos seguintes órgãos e tecidos para transplante a seguir discriminados:
* NR: ÓRGÃOS NÃO REALIZADOS NO RIO DE JANEIRO

CORAÇÃO	Sim ()	Não ()	N/R ()
FÍGADO	Sim ()	Não ()	N/R ()
RINS	Sim ()	Não ()	N/R ()
CÓRNEAS	Sim ()	Não ()	N/R ()
TECIDOS MÚSCULO-ESQUELÉTICOS	Sim ()	Não ()	N/R ()
PULMÃO	Sim ()	Não ()	N/R ()
PÂNCREAS	Sim ()	Não ()	N/R ()
INTESTINO	Sim ()	Não ()	N/R ()
VÁLVULAS CARDÍACAS	Sim ()	Não ()	N/R ()
PELE	Sim ()	Não ()	N/R ()

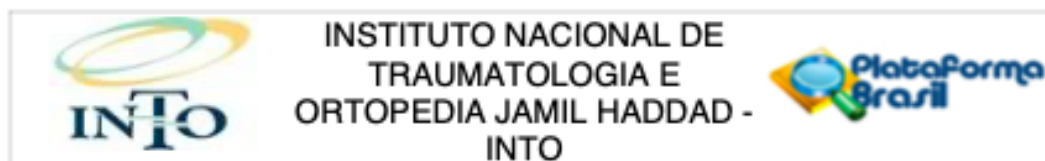
4- Testemunhas:
A- Nome: _____
Endereço: _____
Bairro: _____ **Cidade/Estado:** _____
RG: _____ **CPF:** _____
Assinatura: _____

B- Nome: _____
Endereço: _____
Bairro: _____ **Cidade/Estado:** _____
RG: _____ **CPF:** _____
Assinatura: _____

Entrevistador: _____

R. Elpidio Boamorte, s/ n° – Praça da Bandeira - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20270-170
Disque Transplante: 155 - site: www.transplante.rj.gov.br

ANEXO F – Folha de Rosto da Plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: CRIAÇÃO DE PROTOCOLO DE CAPTAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CARTILAGEM DE SEPTO NASAL HUMANA PARA ESTOQUE EM BANCO DE

Pesquisador: Diego Aguiar

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 21116519.3.0000.5273

Instituição Proponente: MINISTERIO DA SAUDE

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA SAUDE
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.425.981

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores resumem o projeto:

"Diversas doenças são capazes de acometer a estrutura nasal com grande prejuízo de sua função e arquitetura, necessitando de complexa abordagem cirúrgica para reconstrução. Nas técnicas de rinoplastia reparadora são utilizadas enxertos de cartilagem para correção, com destaque para a cartilagem septal. Entretanto, esta nem sempre está disponível e é preciso considerar outros sítios doadores de cartilagem para enxerto, como a de concha auricular e a de costela. Esses outros sítios geram morbidade local, aumentando o tempo de cirurgia e, especialmente a de costela, pode inferir complicações maiores em pacientes com comorbidades mais graves, além de, com o tempo, tenderem a apresentar deformação morfológica. Este projeto destina-se a criar uma técnica de captação e protocolo de transporte e criopreservação no banco de tecidos musculoesquelético do INTO."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

"Criar um protocolo de captação e criopreservação em banco de tecidos de tecido cartilaginoso do septo nasal de doador cadáver."

Objetivos Secundários:

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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 4.425.981

"Construir um protocolo de captação de tecido cartilaginoso do septo nasal;

Elaborar um meio de criopreservação do tecido cartilaginoso do septo nasal a -80 °C no banco de tecidos do INTO.

Realizar teste de viabilidade celular no tecido criopreservado.

Projetar a implantação deste tecido em reconstrução do septo nasal de pacientes com acometimento deste tecido."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

"Não há riscos para os doadores cadáveres."

Quanto aos riscos, os pesquisadores poderiam incluir como no termo de assentimento a ser aplicado a família: "Este procedimento será realizado por um profissional especializado, otorrinolaringologista, e de maneira alguma haverá qualquer mudança estética do doador, não havendo riscos para o doador."

Benefícios:

"Os benefícios estão atrelados ao desenvolvimento da técnica de captação e criação do protocolo de transporte criopreservação do tecido de cartilagem septal, e que este tecido possa ser implantado em pacientes que necessitem de cirurgia de reconstrução nasal".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer anterior deste CEP, trata-se de uma pesquisa relevante, especialmente para os pacientes acometidos por patologias que necessitem de rinoplastia, pois aponta para uma outra possibilidade de tratamento aparentemente mais segura.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão presentes:

Folha de rosto - ok

Informações básicas do projeto - OK

Termo de responsabilidade do pesquisador - ok

TCLE- Ok

Recomendações:

Sugere-se que os pesquisadores incluam na sessão de riscos a existência de um profissional

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



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 4.425.981

especializado, otorrinolaringologista, para a realização do procedimento e de maneira alguma haverá qualquer mudança estética do doador, não havendo riscos para o doador e para a família.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se da inclusão de um pesquisador: Eduardo Branco de Souza. O pesquisador responsável apresenta justificativa para esta inclusão, sendo a mesma aceita.

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_BÁSICAS_1658115_E1.pdf	03/11/2020 11:34:54		Aceito
Outros	InclusaodeEdu.pdf	03/11/2020 11:30:55	Diego Aguiar	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Barone_16_12_2019.docx	16/12/2019 10:07:08	Barone Junior	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Barone.docx	08/10/2019 18:03:32	Barone Junior	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidade.pdf	17/09/2019 16:53:09	Barone Junior	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_BARONE.pdf	09/09/2019 13:48:48	Barone Junior	Aceito

Situação do Parecer:

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.int@into.saude.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
TRAUMATOLOGIA E
ORTOPEDIA JAMIL HADDAD -
INTO



Continuação do Parecer: 4.425.981

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 27 de Novembro de 2020

Assinado por:

Maria Clete dos Reis Amora Ramos
(Coordenador(a))

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: csp.into@into.saude.gov.br

ANEXO G – Exames Sorológicos

Os exames sorológicos devem ser feitos para identificação das seguintes doenças transmissíveis pelo sangue, seguindo os algoritmos para triagem de doadores de sangue:

- Hepatite B (HBsAg e anti-HBc total)
- Hepatite C (anti-HCV)
- HIV-1 e HIV-2 (anti-HIV1 e 2)
- Doença de Chagas (anti-T. cruzi)
- Sífilis (um teste treponêmico ou não treponêmico)
- HTLV-I e HTLV-II (anti-HTLV I e II)
- Toxoplasmose (anti-ToxoplasmaIgG e IgM)
- Citomegalovírus (Anti-CMV IgG e IgM)

Em caso de doador cadáver, quando os exames de pesquisa para HIV e HCV tiverem resultados negativos, deve-se realizar teste complementar tipo:

- Biologia molecular para detecção RNA do HIV
- Biologia molecular para detecção RNA do HCV

ANEXO H – Formulário de Anamnese do Possível Doador (frente)

BANCO MULTITECIDOS ANAMNESE DE POSSIVEL DOADOR

IDENTIFICAÇÃO		
NOME:		Nº CASO CNCDO/RJ:
PRONTUÁRIO:	IDADE:	SEXO: () F () M
HOSPITAL		
DIAGNÓSTICO:	CAUSA MORTIS:	
FONTE DE COLETA DE DADOS:	DATA: ____/____/____	

DADOS PARA AVALIAÇÃO

SINAIS VITAIS:					
DATA	TEMPERATURA >38°C OU <36°C	FC >90BPM	FR >20IRPM	PACO ² <32MMHG	OBS

AVALIAÇÃO LABORATORIAL

DATA	LEUC. >12.000 OU <4000MM ³	BASTÕES 10%	HT	HB	PLAQ.	SOROLOGIA

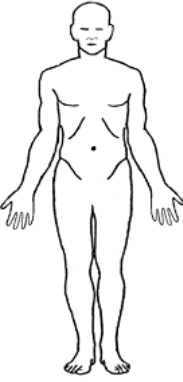
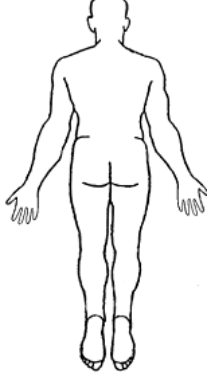
OUTROS FATORES:

HEMOTRANSFUSÃO. QUAL BANCO DE SANGUE? NºHEMOCOMPONENTES?	DATA:
ANTIBIOTICOTERAPIA. QUAL? QUANTOS DIAS?	DATA INICIO:
DIALISE. QUANDO? TIPO?	

EXAME OCULAR

OLHO DIREITO			OLHO ESQUERDO		
Refrigeração tópica	() Sim	() Não	Refrigeração tópica	() Sim	() Não
Pálpebras fechadas	() Sim	() Não	Pálpebras fechadas	() Sim	() Não
Pálpebras sup.	() Normal	Obs. _____	Pálpebras sup.	() Normal	Obs. _____
Pálpebras inf.	() Normal	Obs. _____	Pálpebras inf.	() Normal	Obs. _____
Conjuntiva	() Normal	Obs. _____	Conjuntiva	() Normal	Obs. _____
Córnea	() Normal	Obs. _____	Córnea	() Normal	Obs. _____

ANEXO H – Formulário de Anamnese do Possível Doador (verso)

EXAME FÍSICO	
	A – Abrasão CO – Contusão OP – Órteses/próteses C – Curativos IN – Intubação FR – Fratura PV – Punções venosas (profunda ou periférica) H – Hematomas L – Laceração I – Incisões P – Piercings T – Tatuagens CI – Cicatrizes R – Rash CU – Cateter uretral LP – Lesões pele O – Outros () - _____ () - _____ () - _____ () - _____
	
EVOLUÇÃO	

ANEXO I – Formulário de Exame Físico do Doador de Tecidos

 MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA BANCO MULTITECIDOS																																					
<u>EXAME FÍSICO DO DOADOR DE TECIDOS</u>																																					
NOME: _____																																					
PRONTUÁRIO: _____ DC/DV: _____																																					
RESPONSÁVEL PELO EXAME FÍSICO: _____																																					
<table border="1"><tr><td>Presença de lesões de pele ou genitais que sugiram doenças sexualmente transmissíveis, tais como: doença genital ulcerativa, herpes simples, sífilis, cancro. Lesões perianais como lesões condilomatosas.</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Tatuagens, sinais de uso de adereços corporais, maquiagem definitiva.</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Lesões puntiformes causadas por agulhas e/ou sugestivas de uso de drogas ilícitas. Caso tenha tatuagem, observar se estas lesões estão ocultas.</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Lesões orais sugestivas de candidíase</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Lesões cutâneas violáceas sugestivas de Sarcoma de Kaposi.</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Linfadenopatia disseminada</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Presença de icterícia</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Presença de hepatomegalia</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Cicatriz cirúrgica prévia</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td>Presença de fraturas expostas/fechadas</td><td>() Sim</td><td>() Não</td></tr><tr><td colspan="3">Aparência Geral do Doador: () Boa () Razoável (Se razoável, descrever motivos)</td></tr><tr><td colspan="3">Observações: </td></tr></table>		Presença de lesões de pele ou genitais que sugiram doenças sexualmente transmissíveis, tais como: doença genital ulcerativa, herpes simples, sífilis, cancro. Lesões perianais como lesões condilomatosas.	() Sim	() Não	Tatuagens, sinais de uso de adereços corporais, maquiagem definitiva.	() Sim	() Não	Lesões puntiformes causadas por agulhas e/ou sugestivas de uso de drogas ilícitas. Caso tenha tatuagem, observar se estas lesões estão ocultas.	() Sim	() Não	Lesões orais sugestivas de candidíase	() Sim	() Não	Lesões cutâneas violáceas sugestivas de Sarcoma de Kaposi.	() Sim	() Não	Linfadenopatia disseminada	() Sim	() Não	Presença de icterícia	() Sim	() Não	Presença de hepatomegalia	() Sim	() Não	Cicatriz cirúrgica prévia	() Sim	() Não	Presença de fraturas expostas/fechadas	() Sim	() Não	Aparência Geral do Doador: () Boa () Razoável (Se razoável, descrever motivos)			Observações: 		
Presença de lesões de pele ou genitais que sugiram doenças sexualmente transmissíveis, tais como: doença genital ulcerativa, herpes simples, sífilis, cancro. Lesões perianais como lesões condilomatosas.	() Sim	() Não																																			
Tatuagens, sinais de uso de adereços corporais, maquiagem definitiva.	() Sim	() Não																																			
Lesões puntiformes causadas por agulhas e/ou sugestivas de uso de drogas ilícitas. Caso tenha tatuagem, observar se estas lesões estão ocultas.	() Sim	() Não																																			
Lesões orais sugestivas de candidíase	() Sim	() Não																																			
Lesões cutâneas violáceas sugestivas de Sarcoma de Kaposi.	() Sim	() Não																																			
Linfadenopatia disseminada	() Sim	() Não																																			
Presença de icterícia	() Sim	() Não																																			
Presença de hepatomegalia	() Sim	() Não																																			
Cicatriz cirúrgica prévia	() Sim	() Não																																			
Presença de fraturas expostas/fechadas	() Sim	() Não																																			
Aparência Geral do Doador: () Boa () Razoável (Se razoável, descrever motivos)																																					
Observações: 																																					
_____ Assinatura e Carimbo do Responsável pelo Exame Físico																																					

ANEXO J - 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

Projeto Básico De Salas Limpas – Parte 1
J. Fernando B. Britto

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

Inorganic Salts (g/liter)

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

Amino Acids (g/liter)

L-Alanine	0.02500
L-Arginine·HCl	0.08400
L-Asparagine·H ₂ 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 ₂ 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 ₂ 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 L – Protocolo Captação, Processamento e Criopreservação da Cartilagem de Septo Nasal.

SUMÁRIO

- 1 INDICAÇÃO**
- 2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**
- 3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**
- 4 PROCESSO DE COLETA, TRANSPORTE E PROCESSAMENTO**
- 5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA**
- 6 EXAMES**
- 7 MEDICAMENTOS**
- 8 BIBLIOGRAFIA**

1 INDICAÇÃO

Captação de tecido cartilaginoso de septo nasal de doadores de órgãos cadáveres, para estoque no Banco Multitecidos do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad-INTO/MS.

2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todo doador de tecido musculoesquelético é selecionado de acordo com a Portaria nº 2600 de 21 de outubro de 2009 do Ministério da Saúde, seguindo a orientação do Sistema Nacional de Transplantes (SNT).

3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Trauma de face e infecções cutâneas da região nasal.

4 Processo de coleta, transporte e processamento

- 4.1 Equipe composta por um médico captador especialista em cirurgia otorrinolaringológica, por um enfermeiro e por um técnico em enfermagem, membros da Área de Transplante Multitecidos (ATMIT) do INTO.

- 4.2 O procedimento de ressecção de cartilagem septal nasal tem como base o conhecimento da anatomia local e de técnicas em cirurgia de septoplastia, com captação uma peça por doador.
- 4.3 Transporte é realizado em temperatura de 2 a 8°C, pelo período máximo de 8 horas.
- 4.4 Processamento do tecido em sala limpa com classificação - ISO 5, com divisão em 4 espécimes:
- Espécime 1: enviado para análise microbiológica.
 - Espécime 2: fixado em formol 10% e enviado para análise histológica.
 - Espécime 3: colocado em meio específico de preservação composto por 30% de Iscove's® (Thermo Fischer Brasil), 60% de soro fetal bovino e 10% dimetilsulfóxido e então, submetido a congelamento gradual até -80°C. Realizado descongelamento em banho maria após 7 dias, fixação em formol 10% e enviado para análise histológica.
 - Espécime 4: colocado em meio específico de preservação composto por 30% de Iscove's® (Thermo Fischer Brasil), 60% de soro fetal bovino e 10% dimetilsulfóxido e então, submetido a congelamento gradual até -80°C. Realizado descongelamento em banho maria após 14 dias, fixação em formol 10% e enviado para análise histológica.

5 Avaliação histológica

Realizada avaliação histológica através de uma classificação que analisa as alterações morfo-estruturais teciduais encontradas, como núcleo picnótico, núcleo fragmentado, tecido conjuntivo fibrilado, tecido conjuntivo acelularizado e perda de basofilia.

6 Exigências

- 6.1 Que o processamento seja realizado dentro do Banco de Tecidos do INTO, em ambiente apropriado, seguindo estritamente o conteúdo desta rotina.
- 6.2 Os processamentos deverão acontecer em Sala Limpa ISO 5 e/ou em Sala Limpa ISO 7 dentro de uma Cabine de Segurança Biológica Classe 2A (ISO 5).
- 6.3 A equipe para processamento de tecido musculoesquelético, deverá ser composta no mínimo por um responsável pelo processamento e 2 técnicos em processamento, sendo 1 como circulante interno ISO 7-corredor (para atendimento a todas as salas em processamento) e 1 como circulante interno ISO 5-sala limpa.

7 MEDICAMENTOS

Não se aplica.

8 BIBLIOGRAFIA

- *MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.*
- *MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.109, de 26 de fevereiro de 1998. Aprova o Regulamento Estabelece normas para credenciamento das Centrais de Notificações, Captação e Distribuição de Órgãos e autorização para estabelecimentos e equipes especializadas promovem retiradas, transplantes ou enxertos de tecidos e órgãos.*
- *MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 3.407 de 05 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre as atividades de transplantes e dispõe sobre a Coordenação Nacional de Transplantes.*
- *Cristina M., Goanță; Daniela Cîrpaciu; Mihail Tușaliu; Vlad A. Budu - Actual Septoplasty Techniques - Archives of the Balkan Medical Union; vol. 52, no. 4, p. 445-448, 2017.*
- *Pasinato R; Vania Maria da Cunha Paes; Rafael Francisco dos Santos - Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico Facial, v. 3, p. 74-84.*