INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Estudo dos efeitos da radiação ionizante em cartilagem costal humana por meio de Termogravimetria e Tomografia por Coerência Óptica

ANTONIO CARLOS MARTINHO JUNIOR

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora: Dra. Monica Beatriz Mathor

Co-Orientador: Dr. Anderson Zanardi de Freitas

SÃO PAULO

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Théo, que na sua existência surge a esperança de que pequenas contribuições como esta possam ajudar a alterar o rumo da humanidade.

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, gostaria de agradecer ao pedacinho de gente, chamado Théo, que acaba de chegar ao mundo para torná-lo mais inspirador, cheio de novos e deliciosos desafios.

Gostaria de lembrar que a presente tese é fruto de quase uma década de trabalho, o qual envolveu direta e indiretamente dezenas de pessoas, as quais sou eternamente grato.

Agradeço ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e a Comissão Nacional de Energia Nuclear pela oportunidade concedida.

À Dra. Monica Beatriz Mathor, pela confiança e dedicação durante todos esses anos de convivência, anos nos quais muito aprendi.

Ao Dr. Anderson Zanardi de Freitas, por toda amizade, paciência e profissionalismo na coorientação deste trabalho.

À Pós-graduação do IPEN, pela confiança e pela oportunidade.

Ao Centro de Tecnologia das Radiações, em nome de Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo, pelo carinho, confiança e acolhimento que recebi durante esses anos de trabalho conjunto.

À Divisão de Ensino do IPEN, nas figuras de Ilze Puglia, Vera Lúcia Garcia e Ana Maria Benassi, pela ajuda em todos os momentos necessários.

À Dra. Marisa Roma Herson, pela oportunidade de trabalharmos em conjunto.

À Dra. Luci B. Machado, pela confiança no trabalho compartilhado e pela disposição em ajudar sempre que necessário.

Ao Dr. Eddy Segura Pino, pelas colaborações construtivas para esse trabalho.

Ao Mestre Djalma Dias, por toda ajuda e ensinamentos, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado.

Ao Mestre Hiroshi, pela ajuda e aula sobre o funcionamento do infravermelho.

Aos amigos do IPEN Tiago Luis, Fernando Augusto, Rodrigo Mosca, Daniele Yoshito, Bianca Sufi, Nathália Mencacci, Maria Fátima Klingbell, Eduardo e Marcelo pela ajuda e troca de conhecimentos e em especial a Stefany Plumeri Santin, menina que vi crescer como pessoa e profissional, e que hoje está no início de um longo, mas belo caminho.

Aos amigos de São Paulo, Ricardo Almeida, João Gustavo, Rodolfo,

Priscila Caprini e Janaína Baptista.

A todos meus amigos de trabalho, em especial a Fabrício Cruz, Thiago dos Santos, Mirella Lucchessi, Lucas Lamosa e Ulysses Diegues.

Ao SVO, em especial ao Prof. Dr. Carlos Alberto G. Pasqualucci que confiou em nosso trabalho e ao Nilton, o qual sempre esteve disponível com extrema dedicação e carinho.

Ao técnico Prado e toda sua equipe, pela ajuda na coleta do material.

À Dra. Yasko Kodama, pela irradiação de todo o material alvo de estudo.

Ao Eng. José Jorge Ambiel pelo projeto do dispositivo para corte das amostras de cartilagem.

À todo pessoal da mecânica do IPEN, em especial ao mecânico José Carlos Sabino, pela confecção do dispositivo de corte.

À todos os meus amigos que cresceram comigo e fazem parte da minha vida, em especial a Jairo Campos, Ricardo Nowak, Thiago Licastro, Tiago Gomes, Victor Licastro, Marco Gandra, Marcus Matoso, Lucas De Pretto, Thiago, Sabrina, Débora, Fernanda, Nathália e Carolina Ferreira.

Aos novos professores que encontrei pelo caminho, mestres na arte de ensinar e exemplo de amor pela profissão, André Vizine e Jorge Chiara

À todos aqueles que ajudaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

À Luiz Cláudio Sabanay, Maria Lúcia Coffani, Maria Ignez Coffani, Luiz Fernando Sabanay, Leonardo Sabanay, Frederico Sabanay, José Vitor Sabany, Lucas Sabanay e na Carla por toda amizade e compreensão nesses tempos.

Ao meu irmão, que mesmo morando tão longe, sempre se faz presente.

Aos meus sobrinhos Lucas Joseph e Bella-Nicole, que não tem nem ideia do que se trata por serem muito novos e não entender nada de português.

À minha avó Genny, minha segunda mãe, pelo eterno amor e carinho.

À minha mãe, pessoa que sempre me incentivou a seguir nos estudos e me tornar a pessoa que sou hoje.

E, por fim, à mulher amada, Isadora Coffani, amiga, namorada e esposa, que meu deu o mais belo de todos os presentes que alguém pode ganhar.

O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem - mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.

Albert Einstein

Estudo dos efeitos da radiação ionizante em cartilagem costal humana por meio de Termogravimetria e Tomografia por Coerência Óptica

Antonio Carlos Martinho Junior

RESUMO

Bancos de Tecidos de diversas regiões do mundo têm estocado cartilagens humanas obtidas de doadores *post mortem* para uso em diversos tipos de cirurgias reconstrutivas. Para garantir que tais tecidos não estejam contaminados, estes têm sido esterilizados com radiação ionizante. Entretanto, altas doses de radiação gama podem causar efeitos indesejáveis nos tecidos. No presente trabalho, avaliamos a viabilidade de utilizar duas técnicas, Tomografia por Coerência Óptica (OCT) e Termogravimetria (TGA), para identificar possíveis modificações estruturais causadas na cartilagem costal humana em decorrência dos métodos de preservação e doses de radiação ionizante utilizadas. As cartilagens obtidas de doadores cadavéricos foram congeladas a -70 °C ou preservadas em glicerol. A seguir, as amostras foram irradiadas por fontes de ^{60}Co com doses de 15, 25 e 50 kGy. Nos resultados de TGA verificamos que as cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com diferentes doses de radiação não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparadas ao grupo controle, no que tange a taxa de desidratação do tecido, sendo que o mesmo não ocorre com cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com doses de 15 kGy. Em relação ao uso da técnica de OCT, por meio do cálculo do coeficiente de atenuação óptica total, verificamos que doses de 15 kGy promovem a criação de ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno, corroborando os resultados de TGA. Ainda, os valores do coeficiente de atenuação óptica total são diretamente proporcionais à tensão de ruptura das cartilagens, o que nos possibilitará, em um futuro próximo, predizer a qualidade de um enxerto sem a necessidade de perda de material biológico, visto ser o OCT um método não destrutivo. Por meio das imagens de PS-OCT podemos verificar que as doses de radiação utilizadas para esterilizar as amostras não provocam danos à rede de colágeno a ponto de que sua birrefringência seja perdida. Assim, o TGA e OCT são técnicas que podem ser utilizadas por bancos de tecidos de forma a verificar a qualidade dos tecidos antes de serem transplantados em pacientes.

Study of ionizing radiation effects in human costal cartilage by Termogravimetry and Optical Coherence Tomography

Antonio Carlos Martinho Junior

ABSTRACT

Tissue Banks around the world have stored human cartilages obtained from *post mortem* donors for use in several kinds of reconstructive surgeries. To ensure that such tissues are not contaminated, they have been sterilized with ionizing radiation. However, high doses of gamma radiation may cause undesirable changes in the tissues. In this work, we evaluated the possibility of use Optical Coherence Tomography (OCT) and Thermogravimetric Analysis (TGA) to identify possible structural modifications caused by both preservation methods of cartilage and gamma irradiation doses. Cartilages were obtained from cadaveric donors and were frozen at -70 °C or preserved in glycerol. Irradiation was performed by ⁶⁰Co source with doses of 15, 25 and 50 kGy. Our TGA results showed that glycerolized cartilages irradiated with different doses of radiation does not presented statistical differences when compared to the control group for the dehydration rate. However, the same was not observed for deep-frozen cartilages irradiated with 15 kGy. The results of OCT associated to total optical attenuation coefficient showed that doses of 15 kGy promote cross-link between collagen fibrils, corroborating the results obtained from TGA. Moreover, total optical attenuation coefficient values are proportionals to stress at break of cartilages, what will be very useful in a near future to predict the quality of the allografts, without unnecessary loss of biological tissue, once OCT is a non-destructive technique. By PS-OCT images, we found that high doses of ionizing radiation does not promote sufficient impairments to promote complete loss of tissue birefringence. Thus, TGA and OCT are techniques that can be used for tissue banks to verify tissue quality before its transplant.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	17
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
3.1 BANCO DE TECIDOS.....	19
3.2 PRESERVAÇÃO DOS TECIDOS.....	26
3.2.1 Preservação a -70 °C.....	27
3.2.2 Glicerol.....	27
3.3 FÍSICA DAS RADIAÇÕES.....	31
3.3.1 Interação da radiação γ com a matéria.....	34
3.3.1.1 Efeito Fotoelétrico.....	34
3.3.1.2 Efeito Compton.....	35
3.3.1.3 Produção de pares.....	35
3.3.2 Raios γ e sua absorção pelos materiais.....	35
3.4 ESTERILIZAÇÃO.....	39
3.4.1 Esterilização por Radiação Ionizante.....	45
3.4.2 Doses apropriadas para esterilização de tecidos biológicos.....	47
3.4.3 Mecanismos envolvidos na inativação de micro-organismos por radiação ionizante.....	50
3.4.4 Esterilização da cartilagem por radiação ionizante.....	51
3.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CARTILAGEM.....	54
3.5.1 Ultraestrutura da cartilagem hialina.....	59
3.5.1.1 Zona superficial.....	61
3.5.1.2 Zona de transição.....	61
3.5.1.3 Zona radial.....	61
3.5.1.4 Zona calcificada.....	62
3.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	62
3.6.1 Colágeno.....	64
3.6.2 Glicosaminoglicanas.....	71
3.6.2.1 Ácido hialurônico.....	73
3.6.2.2 Condroitin-sulfato.....	74
3.6.2.3 Dermatan-sulfato.....	74
3.6.2.4 Queratan-sulfato.....	75
3.6.2.5 Heparan-sulfato.....	75
3.6.2.6 Heparina.....	76

3.6.3 Proteoglicanas.....	76
3.6.4 Fibras elásticas.....	80
3.6.5 Glicoproteínas estruturais.....	81
3.7 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS.....	83
3.7.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	83
3.7.2 Termogravimetria.....	84
3.7.2.1 Termogravimetria da cartilagem.....	87
3.7.3 Introdução à Fotônica e Biofotônica.....	89
3.7.3.1 Luz e ondas eletromagnéticas.....	89
3.7.3.2 Fenômenos ondulatórios.....	90
3.7.3.2.1 Coerência.....	90
3.7.3.2.2 Refração.....	91
3.7.3.2.3 Reflexão.....	92
3.7.3.2.4 Polarização.....	94
3.7.3.3 Propriedades Ópticas.....	95
3.7.3.3.1 Dispersão.....	96
3.7.3.3.2 Absorção.....	96
3.7.3.3.3 Espalhamento.....	97
3.7.3.3.4 Birrefringência.....	99
3.7.3.4 Tomografia por Coerência Óptica (OCT).....	99
3.7.3.5 Tomografia por Coerência Óptica Sensível à Polarização (PS-OCT).....	104
3.7.3.6 Estudos sobre cartilagem utilizando OCT e PS-OCT.....	105
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	109
4.1 Obtenção e processamento das amostras.....	109
4.2 Irradiação das amostras.....	110
4.3 Intumescência das cartilagens congeladas a -70 °C.....	111
4.4 Detecção de resíduos de glicerol por espectrometria no infravermelho.....	111
4.5 Análise Térmica – Termogravimetria.....	112
4.6 Análise estrutural por OCT.....	114
4.7 Análise da orientação das fibras colágenas por meio de Tomografia por Coerência Óptica sensível a Polarização (PS-OCT).....	115
4.8 Análise morfológica por microscopia óptica.....	116
4.9 Análise Estatística.....	121
5. RESULTADOS.....	123

5.1 Intumescência das cartilagens congeladas a -70 °C.....	123
5.2 Detecção de resíduos de glicerol por espectrometria no infravermelho	126
5.2.1 Cartilagem congelada a -70 °C.....	126
5.2.2 Cartilagem preservada em glicerol.....	129
5.2.3 Comparação do espectro de absorção de infravermelho entre a cartilagem congelada a -70 °C e cartilagem preservada em glicerol.....	132
5.3 Análise Térmica – Termogravimetria.....	134
5.3.1 Região superficial da cartilagem.....	134
5.3.1.1 Taxa de desidratação.....	134
5.3.1.2 Umidade total.....	137
5.3.1.3 Curvas termogravimétricas médias.....	138
5.3.2 Região interna da cartilagem.....	141
5.3.2.1 Taxa de desidratação.....	141
5.3.2.2 Umidade total.....	144
5.3.2.3 Curvas termogravimétricas médias.....	145
5.4 Análise estrutural por OCT	148
5.4.1 Imagens das cartilagens congeladas a -70 °C.....	148
5.4.2 Imagens das cartilagens preservadas em glicerol.....	150
5.4.3 Cálculo do coeficiente de atenuação óptico total.....	152
5.4.4 Comparação entre os valores médios do coeficiente de atenuação óptica total e os valores médios da tensão de ruptura.....	154
5.4.5 Comparação entre os valores médios do coeficiente de atenuação óptica total e os valores médios da taxa de desidratação.....	157
5.5 Análise da orientação das fibras colágenas por meio de Tomografia por Coerência Óptica sensível a Polarização (PS-OCT).....	159
5.6 Análise morfológica por microscopia óptica.....	176
5.7 Comparação entre imagens de OCT, PS-OCT e técnicas convencionais de Microscopia óptica.....	180
6. DISCUSSÃO.....	189
7. CONCLUSÃO.....	206
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	209
9. APÊNDICES.....	227

1. INTRODUÇÃO

A energia nuclear foi apresentada para o mundo pela sua face mais devastadora, quando duas ogivas nucleares foram lançadas sobre o Japão em 1945, deixando milhares de vítimas. Décadas mais tarde, a explosão da usina nuclear de Chernobyl - o mais grave acidente da era nuclear - impôs ainda mais insegurança sobre a manipulação e controle de núcleos radioativos. Recentemente, em março de 2011, a ciência nuclear sofreu outro grande impacto, o qual ecoou por diversos segmentos da sociedade produzindo vários efeitos sobre a mesma. O terremoto que abalou o Japão, seguido por um *tsunami* de proporções nunca imaginadas pela humanidade, causou graves danos aos reatores nucleares de Fukushima, culminando com a liberação de material radioativo para o meio ambiente.

Contudo, mesmo marcada na memória da sociedade por produzir mortes e danos ambientais, a tecnologia nuclear, por meio dos usos pacíficos da energia nuclear, se desenvolveu nas últimas décadas e assume hoje um papel importante na área médica, bem como em outros segmentos das ciências e da economia. Caso a energia nuclear tivesse sido apresentada à sociedade por meio do uso de radioterapia para o tratamento e cura de cânceres, ou no diagnóstico precoce de doenças até então letais, na esterilização de alimentos e insumos médico-hospitalares ou até mesmo na esterilização de tecidos biológicos utilizados como enxertos em diversos tipos de tratamentos, sua imagem não estaria ligada de forma tão intensa ao seu lado negativo (Camargo, 2006).

A Medicina vem sofrendo uma rápida evolução devido ao avanço de diversas áreas da tecnologia que dão suporte a descobertas diárias. A prática do

uso de enxertos é constante nessa área e existe há muitas décadas. Entretanto, com o surgimento de novas doenças, como por exemplo a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, AIDS, em inglês), e a descoberta dos meios de transmissão de doenças já conhecidas, passou a existir uma maior preocupação com a transmissão dessas doenças por meio do uso de enxertos contaminados, seja esta contaminação originária do próprio doador, seja por meio dos procedimentos de retirada e processamento desses tecidos. Assim, ao se trabalhar com materiais para a área de saúde, uma das principais considerações é evitar possíveis contaminações, dada a natureza da sua aplicação (Rutala & Weber, 2004; Yim & Carlson, 2000). Para tanto, com o objetivo de se evitar tais ocorrências, inúmeras técnicas que visam diminuir ou eliminar as mesmas foram desenvolvidas, com a eficácia dos resultados obtidos variando muito, dependendo do material a ser tratado e o objetivo da aplicação (Block, 1991).

Em se tratando de materiais de origem humana, tais como sangue e outros tecidos, a problemática da contaminação atinge um novo patamar: como a maioria destes produtos tem acesso direto à corrente sanguínea e órgãos vitais, a tolerância frente à contaminação deve ser inexistente (Rutala & Weber, 2004). As consequências da esterilização ineficaz são inúmeras e podem variar desde a inutilização e consequente perda do material, até o desenvolvimento de um grave quadro infeccioso no paciente que pode conduzi-lo a óbito.

A aplicação da radiação ionizante para esterilização de materiais biológicos tem garantido a segurança do seu uso como enxertos, em diversos países. Cada vez mais os bancos de tecidos, que são instalações que processam e armazenam tecidos biológicos para transplantes, vêm utilizando a radiação ionizante como forma eficaz de esterilização final, face às diversas complicações já enfrentadas

pela medicina no uso de enxertos contaminados (Kuehnert et al. 1998; Kainer et al., 2004).

A preferência pela utilização da radiação ionizante como forma de esterilização está relacionada a diversos fatores, os quais incluem: a facilidade dos procedimentos, desde que se tenha acesso às instalações necessárias; não causar danos significativos no material e possibilidade de ser realizada em sua embalagem final (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

Para garantir o sucesso dessa técnica, os procedimentos devem ser padronizados, desde a logística de manuseio do tecido, incluindo a sua melhor forma de preservação, até a padronização da dose que garanta a sua esterilização¹. Uma vez que os danos estruturais nos tecidos esterilizados por radiação ionizante ocorrem em função da dose, a padronização de uma dose que garanta a esterilidade do tecido com os menores danos estruturais possíveis é um dos focos centrais dos responsáveis pelos bancos de tecidos.

Diversos trabalhos têm sido realizados buscando-se avaliar os danos causados nos tecidos biológicos esterilizados por radiação ionizante (Bourroul, 2004; Dziedzic-Goclawska et al., 2005, Kosmiskas, 2007, Martinho Junior, 2008). Em particular, o grupo de Irradiação de Tecidos Biológicos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - CNEN/SP), em conjunto com o Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (IHC-FMUSP), vêm desenvolvendo, desde 2000, estudos que visam relacionar os efeitos da radiação ionizante nos tecidos biológicos esterilizados por essa técnica (Bourroul, 2004; Kosmiskas, 2007, Martinho Junior, 2008).

A necessidade de se esterilizar a cartilagem decorre do fato desta não

¹ A dose para a efetiva esterilização do tecido depende da sua carga microbiana inicial.

existir com disponibilidade suficiente para se realizar um transplante autólogo² e, assim, a obtenção desse tecido se dá a partir de doadores cadavéricos ou multi órgãos (Herson & Mathor, 2006). Assim, quando se quer reconstruir um nariz ou orelha com emprego de cartilagem como tecido de sustentação, não se encontra material disponível para enxertos autólogos. Isso levou às tentativas de empregar cartilagem obtida de cadáveres para enxerto em pessoas que necessitassem de cirurgias reconstrutivas (Ham, 1969).

Somando-se o fato de não existir uma alta disponibilidade de cartilagem para uso clínico com o fato das modificações estruturais induzidas pela ação da radiação ionizante nos tecidos esterilizados por essa técnica, faz-se necessário estudar as alterações causadas na cartilagem após o procedimento de esterilização por radiação ionizante em diferentes doses, de modo a determinar a dose ótima para esterilização desse tecido, na qual se obtenha segurança na esterilidade e na estrutura material do enxerto a ser transplantado. Contudo, a análise da qualidade final do tecido a ser utilizado não pode demandar grandes quantidades de amostras do mesmo e, se possível, deve usar métodos não destrutivos para que assegure uma maior disponibilidade de um tecido que não apresenta naturalmente essa disponibilidade.

Os métodos de esterilização físicos mais comuns, como por exemplo, a autoclavagem, elevam muito a temperatura do material, causando danos estruturais inadmissíveis aos produtos expostos e, os métodos químicos mais comuns, como o óxido de etileno (ETO), peróxido de hidrogênio, ácido peracético e glutaraldeído deixam resíduos tóxicos no material (Mordiffi & Nather, 2001). Já a esterilização por radiação é um método em que há um aumento mínimo da

2 Tipo de transplante onde o tecido é retirado do próprio paciente.

temperatura e não deixa resíduos tóxicos, o que a torna passível de ser usada, além de ser uma esterilização final.

Por outro lado, não se pode aplicar altas doses de radiação sobre os tecidos de forma arbitrária, uma vez que essas altas doses de radiação podem causar alterações indesejáveis nos mesmos, como por exemplo a degradação do arcabouço estrutural do tecido, o qual provocará diminuição nas propriedades mecânicas dos enxertos, bem como a diminuição da sua taxa de reabsorção *in vivo* (Dziedzic-Goclawska, 2000).

Devemos ainda levar em consideração que a escolha do método de preservação pode influenciar na dose necessária para a esterilização do tecido, como por exemplo quando se utiliza o glicerol, o qual possui propriedades descontaminantes, reduzindo a carga microbiológica inicial. Além disso, o glicerol possui propriedades radioprotetoras que poderiam preservar as estruturas dos tecidos biológicos humanos. Contudo, a ação da radiação ionizante combinada a diferentes métodos de preservação dos tecidos biológicos ainda não foi totalmente elucidada.

No presente trabalho apresentamos duas novas formas de avaliação do tecido cartilaginoso irradiado de forma a identificar com maior precisão as alterações induzidas pela radiação ionizante. A Termogravimetria (TG), técnica consagrada há décadas na caracterização de diversos materiais, é utilizada pela primeira vez para verificar o comportamento da dinâmica do fluxo hídrico no tecido cartilaginoso após a radioesterilização dos mesmos. Embora seja uma técnica destrutiva, a quantidade de material necessária para a avaliação é extremamente pequena, sendo da ordem de poucos miligramas de tecido. Ainda, utilizamos a técnica de Tomografia por Coerência Óptica (OCT), na qual imagens

em alta resolução são produzidas sem a necessidade de preparação prévia do material de estudo e sem contato entre o equipamento e o material, sendo, portanto, uma técnica não destrutiva.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais da presente tese são:

- Identificar as modificações na estrutura da cartilagem costal humana causadas pelas formas de preservação (glicerol e congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), bem como pelo uso de radiação ionizante;
- Avaliar a capacidade das técnicas de OCT, PS-OCT e TG em identificar e quantificar as modificações causadas nos tecidos decorrente tanto dos métodos de preservação citados acima como pela radioesterilização desses tecidos;

Mais especificamente, a presente tese tem como objetivos:

- Comparar a hidratação final da cartilagem após os diferentes procedimentos de preservação;
- Mensurar a taxa de desidratação das cartilagem costal humana de acordo com as formas de preservação do tecido e dose de radiação utilizada, de forma a identificar possíveis alterações em sua estrutura;
- Verificar o comportamento térmico das diferentes regiões da cartilagem costal humana, visto haver nelas diferenças estruturais e no conteúdo de água;
- Mensurar o coeficiente de atenuação óptica total da cartilagem costal humana após o processo de preservação e radioesterilização, bem como verificar se tal grandeza pode ser utilizada para prever a qualidade

mecânica do tecido, evitando a perda desnecessária de material biológico, visto que a Tomografia por Coerência Óptica é uma técnica não destrutiva e que não exige contato com o material, o que seria de grande interesse aos bancos de tecidos;

- Avaliar o estado da rede de colágeno nas diferentes formas de preservação e doses de radiação ionizante por meio da técnica de Tomografia por Coerência óptica Sensível à Polarização;
- Identificar a influência individual da preservação do tecido e da radioesterilização na qualidade dos enxertos a serem utilizados por bancos de tecidos;

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 BANCO DE TECIDOS

Bancos de Tecidos são definidos como organizações que promovem a classificação de doadores, retirada, processamento, estoque e distribuição do enxerto. Os Bancos de Tecidos podem ser dedicados a um único tipo de tecido, como Banco de Olhos, Banco de Esperma, Bancos Cardiovasculares, Banco de Embriões, Bancos Músculo esqueléticos ou Banco de Pele. Existem também bancos gerais ou multi tecidos que suprem diversos tecidos (Vangsness Jr et al., 2003).

O primeiro caso reportado de transplante de enxerto em humanos ocorreu em 1881 (Vangsness Jr et al., 2003). Somente anos depois, surgiram na literatura os primeiros métodos de estoque desses enxertos (Haas, 1923; Inclan, 1942).

A radiação ionizante passou a ser utilizada em Bancos de Tecidos em 1983, em um Banco de Tecidos em Mianmar, concomitantemente ao início do Programa de Radiação e Banco de Tecidos da IAEA. Logo em seguida, a IAEA deu suporte ao desenvolvimento de outros 17 Bancos de Tecidos naquela região, onde hoje existem 66 bancos de tecidos associados ao programa. Na América Latina, o primeiro Banco de Tecidos associado ao programa foi desenvolvido em 1993, na Argentina, e hoje existem 37 Bancos de Tecidos em 7 países dessa região que participam do programa (The IAEA Radiation & Tissue Banking Program i), entre eles o Brasil, que em 1998, desenvolveu seu primeiro Banco de Tecidos de referência envolvido no Programa de Radiação e Banco de Tecidos, o qual foi inaugurado em outubro de 2000 e passou a ser tornar totalmente

operacional em janeiro de 2001 (Herson et al., 2008). Atualmente, o país conta com 5 novos bancos desenvolvidos a partir deste (The IAEA Radiation e Tissue Banking Program ii).

A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) relata que, até o final de 2000, cerca de 223.000 enxertos foram produzidos e usados clinicamente em países envolvidos com o seu Programa de Radiação e Banco de Tecidos (Pedraza, 2003).

De acordo com o relatório do *Office of the Inspector General Department of Health and Human Services* (Yessian, 2001), somente nos Estados Unidos, até janeiro de 2001 existiam um total de 154 Bancos de Tecidos e, em 1999 mais de 20.000 doadores forneceram tecidos cadavéricos, o que representa um aumento de aproximadamente 6000 tecidos, quando comparado ao ano de 1994. O mesmo relatório também estimou que mais de 750.000 enxertos músculo-esqueléticos foram distribuídos para transplante em 1999. Entretanto, de acordo com um relatório de 1998 da IAEA, os Estados Unidos da América utilizavam cerca de 400.000 enxertos heterólogos anualmente (IAEA, 1998). No Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas de São Paulo, entre 2001 e 2002 foram realizados 49 transplantes de pele. Nesse mesmo período, houve a doação de pele por 75 indivíduos, gerando aproximadamente 90.000 cm² de enxertos para transplante, os quais foram utilizados em pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP), e até mesmo em outros locais do Brasil, os quais apresentavam queimaduras extensas ou outros tipos de traumas (Herson et al., 2008).

No Brasil, a disponibilização de tecidos humanos para transplante passou a ser regulamentada em fevereiro de 1997 pela Lei nº 9.434, que estabelece

critérios para a retirada de tecidos de doadores para transplante ou tratamento *in vivo* ou *post mortem*. Essa lei prevê que a retirada de tecidos, órgãos ou partes do corpo humano *post mortem* para transplante ou tratamento deve ser precedida de diagnóstico de morte encefálica, que deve ser realizado por dois médicos não participantes da equipe de remoção e transplante, baseado em critérios clínicos e tecnológicos predefinidos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Sistema nacional de Transplantes (SNT) fiscaliza e controla o funcionamento dos bancos assim como o uso de tecidos em transplantes, como determinado pelas seguintes legislações (Herson et al, 2002):

- Lei nº 9.434 de 04 de fevereiro de 1997 que “Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências” (Brasil, Lei nº 9.434, 1997).

- Decreto nº 2.268 de 30 de junho de 1997, que “Regulamenta a Lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento, e dá outras providências” (Brasil, Decreto nº 2.268, 1997).

- Portaria nº 3407 de 05 de agosto de 1998, que “Aprova o Regulamento Técnico sobre as atividades de transplantes e dispõe sobre a Coordenação Nacional de Transplantes” (Brasil, Portaria nº 3407, 1998).

- Lei nº 10.211 de 23 de março de 2001 que “Altera dispositivos da Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997, que “dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento” (Brasil, Lei nº 10.211, 2001).

- Portaria nº 1686 de 20 de setembro de 2002, que “Aprova, na forma do

Anexo I desta Portaria, as Normas para Autorização de Funcionamento e Cadastramento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos pelo Sistema Único de Saúde” (Brasil, Portaria nº1686, 2002).

- Portaria nº 2.600 de 21 de outubro de 2009, que “Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes” (Brasil, Portaria nº 2.600, 2009).

- Resolução RDC nº 220 de 29 de dezembro de 2006, que “Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana” (Brasil, RDC nº 220, 2006).

Nos últimos anos, várias áreas de aplicação clínica e de cirurgia reconstrutiva têm utilizado enxertos de tecidos alógenos preservados, como cartilagem, ossos, tendões, dura mater, válvulas cardíacas, âmnion e pele (Pruss et al., 2002). Em particular, a cartilagem costal tem sido utilizada para a reconstrução de pênis e nariz (Vajaradul, 2000; Strauch & Wallach, 2003), no reparo dos brônquios (Oguzkaya & Akçali, 2003), em cirurgias oculares (Haviko & Laasik, 2001; Herson & Mathor, 2006), reconstrução do pavilhão auricular (Herson & Mathor, 2006) e para a reconstrução da parede peitoral em crianças com Síndrome de Poland (Akai & Kara, 2002).

De acordo com Komender et al. (1997), o sucesso no uso de aloenxertos de cartilagem costal humana esterilizada por radiação ionizante está diretamente ligado a idade dos pacientes, origem do problema a ser tratado e localização do transplante. Segundo os autores, pacientes com idade variando entre 1 a 17 anos demonstraram resultados positivos em 75% dos casos. Por outro lado, malformações congênitas ou pós-traumáticas somam aproximadamente 49% dos

casos de resultados insatisfatórios. Já em relação a localização do transplante, a região da orelha é a que mais demonstra resultados insatisfatórios, perfazendo aproximadamente 35% dos casos de resultados insatisfatórios.

O uso de enxertos músculo-esqueléticos alógenos tem se tornado largamente popular. Estudos demonstram que enxertos músculo-esqueléticos apresentam resultados comparáveis a enxertos autógenos para a reconstrução do ligamento crucial anterior (Harner et al., 1996; Lephart, et al., 1993; Saddemi et al., 1993; Shelton et al., 1998), para a reconstrução orbital e periorbital (Linberg et al., 1980) e para o uso em tratamentos de tumores ósseos (Dion & Sim, 2002). A Academia Americana de Cirurgiões Ortopedistas (AAOS) acredita que enxertos músculo-esqueléticos representam uma alternativa terapêutica para determinados pacientes (AAOS Advisory Statement, 2001). Segundo levantamento realizado por Vangsness Jr (1996), em 36 Bancos de Tecidos houve um aumento de 46% na distribuição de tecidos conjuntivos nos Estados Unidos nos anos entre 1990 a 1992.

De acordo com a AAOS (2001), existem diversas vantagens no uso de enxertos alógenos na reconstrução do joelho. Estas estão relacionadas ao tempo curto de cirurgia, pequenas incisões cirúrgicas e baixos índices de artrofibrose. Por outro lado, de acordo com Harner et al. (1996), existem diversas desvantagens potenciais, que incluem o risco de transmissão de doenças virais e bacterianas, potencial para rejeição por histocompatibilidade e longo período de incorporação do enxerto.

Segundo Kumarasinghe (2001), apesar da queda a baixos níveis da transmissão de doenças em países desenvolvidos, nos países em desenvolvimento as infecções ainda continuam causando considerável morbidade

e mortalidade. Segundo o mesmo autor, os patógenos que causam doenças transmissíveis de particular importância não só para pacientes imunocomprometidos, mas também para receptores de transplante, são: Vírus da hepatite, Vírus da família herpes (Vírus Varicela-zoster, Citomegalovírus, Vírus Epstein-Barr, Vírus da Herpes humana 6, 7 e 8), Micobactérias, agentes causadores de Tuberculose, HIV, Príons (Mal de Creutzfeldt-Jakob) e fungos.

Devido à possibilidade de contaminação dos tecidos bovinos por príons, os quais são extremamente resistentes à esterilização, incluindo a esterilização por radiação ionizante, e os tecidos suínos, os quais podem estar infectados com vírus PERV, alguns Bancos de Tecidos, como por exemplo o de Warsaw, Polônia, cessou a preparação de xenotransplantes para evitar a transmissão dessas doenças para a população humana (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

Há na literatura científica diversos artigos que relacionam o uso de aloenxertos em transplantes com várias complicações, entre elas septicemia e óbito do paciente que recebeu o enxerto. Kuehnert et al. (1998) descreveram o caso de um paciente que desenvolveu endocardite por *Candida albicans* e fungemia após sofrer uma substituição da válvula aórtica. De acordo com o autor, durante o processamento do tecido foi verificado que o biomaterial estava contaminado por *C. albicans*, mas após o procedimento de descontaminação com solução anti-fúngica e anti-microbiana o enxerto apresentou cultura-negativa para *C. albicans*. Uma comparação entre *C. albicans* isoladas pré-implantação e pós-implantação revelou notável similaridade genética entre elas, entretanto, testes de susceptibilidade antifúngica mostraram que os isolados pós-implantação foram mais resistentes a fluconazol e anfotericina B do que os isolados pré-implantação, sugerindo aparecimento de resistência após a descontaminação. Os autores

concluíram que a contaminação de um paciente após receber o implante de uma válvula cardíaca contaminada pode ocorrer mesmo após o processo de descontaminação, o que resultou em endocardite no receptor.

Segundo Kainer et al. (2004), a morte de um homem de 23 anos ocorreu por septicemia causada por *Clostridium sordelli* depois que o mesmo recebeu um enxerto músculo-esquelético. Um estudo realizado no banco de tecidos responsável pela liberação do enxerto mostrou que, provavelmente, alguns dos seus testes anti-microbianos resultaram em falsos negativos, uma vez que os tecidos eram cultivados somente depois do tratamento com solução anti-fúngica e anti-microbiana. Assim, os tecidos dos doadores implicados com a infecção foram liberados apesar de estarem contaminados, o que provocou infecção em outros pacientes.

Entre todos patógenos que podem ser transmitidos através de aloenxertos contaminados, o que mais causa preocupação é o HIV, causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS, em inglês). O primeiro caso de transmissão do vírus HIV por um aloenxerto foi descrito em 1988 (Center of Disease Control, 1988), em uma mulher portadora de escoliose idiopática progressiva e que recebeu um aloenxerto ósseo contaminado (Simonds et al., 1988; Center of Disease Control, 1988; Bethesda, 1988; Li, 2001). Três outros casos foram relatados em 1992 por Simonds et al., todos eles relacionados a um mesmo doador. Segundo Li et al. (2001), oito casos de transplantes ósseos associados a infecção por HIV foram relatados, desde 1988.

Em 2006, a norma ISO 11.137 passou por uma revisão onde, entre outros itens, passou a ser preconizada uma dose mínima de 15 kGy a ser utilizada em casos específicos (ISO 11.137-2:2006).

3.2 PRESERVAÇÃO DE TECIDOS

A utilização de enxertos alógenos apresenta um potencial risco de transmissão de doenças ao receptor. De forma a contornar esse problema, diversos protocolos internacionais de triagem e captação de tecidos foram criados, seguindo regras rígidas de seleção. Dentro desse contexto, essas normatizações exigem maior tempo de conservação do material até que todas as etapas de avaliação estejam cumpridas.

Como o uso de aloenxertos na forma fresca é inviável, não somente em relação ao tempo necessário para realizar as avaliações microbiológicas, mas também em razão da pouca durabilidade biológica do tecido, torna-se necessária a utilização de métodos de preservação que permitam a estocagem dos tecidos por longos prazos (Paggiaro, 2011).

De forma geral, os métodos de preservação de tecidos podem ser classificados de duas maneiras distintas: métodos que mantêm a viabilidade celular, como por exemplo a criopreservação (Colocho et al., 1974; Burman et al., 2004) e métodos que não mantêm a viabilidade celular, mas que mantêm a arquitetura tecidual íntegra, como por exemplo a liofilização (Gajiwala & Lobo Gajiwala, 2004), o ultracongelamento a fresco e a impregnação dos tecidos por glicerol em altas concentrações (Rejzek et al., 2001).

De acordo com Herson e Mathor (2006), devido ao baixo custo e simplicidade das técnicas, grande parte dos tecidos biológicos têm sido preservados por duas principais maneiras: congeladas a -70°C e em altas concentrações de glicerol.

3.2.1 Preservação a -70 °C

O congelamento a baixas temperaturas (-70 °C a -80 °C) de tecidos músculo esqueléticos é uma técnica simples e que envolve baixos riscos de transmissão de doença, uma vez que permite que os tecidos possam ser esterilizados posteriormente. Ainda, esta forma de preservação destrói completamente as células viáveis, mas mantém a rede de colágeno intacta (Fabbriciani et al., 1997; Schmid et al., 1988). Estudos anteriores já demonstraram que ossos e tendões, mesmo na ausência de células viáveis, mantêm suas propriedades mecânicas (Johnson et al., 1974; Tapper et al., 1969).

Por manter a rede de colágeno intacta, o tempo de preservação não influencia nas propriedades mecânicas dos tecidos (Arnoczky et al., 1992), permitindo que os mesmos sejam preservados por longos períodos.

3.2.2 Glicerol

O glicerol é um poliálcool presente em diversos tecidos animais, sendo também produzido no trato gastrointestinal pela hidrólise de lipídeos (Tao et al., 1983). De acordo com Hoesktra et al. (1994), o glicerol foi isolado pela primeira vez por Scheele em 1779 e, décadas depois, em 1823, Chevreuil manufaturou a primeira patente do glicerol a 85%. Nessa concentração, a solução apresenta-se quase transparente, de aspecto licoroso e higroscópico, sendo útil à indústria farmacêutica como solvente.

Até pouco tempo acreditava-se que as altas concentrações de glicerol preservavam o tecido por meio do processo de desidratação. Contudo, Ross &

Kearney, (2004) demonstraram que na realidade a água é mantida no tecido, sequestrada pelo glicerol e, assim, as reações celulares são reduzidas significativamente. Até o momento, este é o único trabalho que defende essa tese e ainda precisa ser melhor estudado para verificar sua real validade.

As primeiras evidências de que o glicerol em altas concentrações poderia possuir efeitos antimicrobianos foram obtidas em 1971 por Pigossi et al.. Os autores descreveram o uso de dura-máter armazenada em glicerol com concentração de 98% em cirurgias reconstrutoras de assoalho pélvico, parede abdominal e neurocirurgia.

O tratamento de queimaduras utilizando pele porcina glicerolada como curativo temporário foi descrito por Basile (1982). Dois anos mais tarde, em 1984, a glicerolização foi adotada oficialmente pelo Banco Nacional da Holanda (Euro Skin Bank) como método de preservação de enxertos de pele humana, passando a distribuir aloenxertos preservados em glicerol para os centros de queimadura de toda Europa (Koekstra et al., 1994).

O glicerol tem sido utilizado com sucesso para preservar outros tecidos como veias (Cunha et al., 2007; Lemos et al., 2008) e âmnio (Maral et al., 1999). Além da propriedade antimicrobiana, outra vantagem na utilização de glicerol para preservação de tecidos parece ser a redução da sua carga antigênica. Em estudos com pele alógena preservada em glicerol, verifica-se que com a eliminação do componente celular ocorre a interrupção do processo de rejeição mediado pelas células T (Richters et al., 1997). Dentro desse contexto, resta apenas a formação de um processo inflamatório mediado por monócitos. Esse processo é muito mais lento em sua capacidade de destruir o aloenxerto, o que possibilita que em pacientes imunossuprimidos a estrutura proteica seja invadida

por células autógenas e acabe sendo conseqüentemente incorporada ao indivíduo, mesmo que parcialmente (Wenst et al., 2001).

No que tange ao efeito antimicrobiano, ainda é possível isolar alguns tipos de bactérias e vírus após meses de incubação de tecidos em solução concentrada de glicerol (Van Baare et al., 1998; Van Baare et al., 1994). Cameron et al. (2000) verificaram o crescimento de bactérias como *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus sanguis* e *Bacillus sp* em peles preservadas em glicerol sem nenhum outro tipo de esterilização. Ainda, de acordo com os mesmos autores, o glicerol é capaz de inativar o vírus do HIV tipo I.

A glicerolação dos tecidos não pode ser tratada como uma forma de esterilização, pois, na realidade, ela provoca uma descontaminação, a qual possui uma letalidade reduzida quando comparada à esterilização. Na prática, a descontaminação é um processo que reduz o número de micro-organismos, cujo objetivo é evitar a disseminação de agentes patogênicos. Assim, a descontaminação inativa virtualmente todos os micro-organismos patogênicos reconhecidos, mas não necessariamente as formas microbianas vegetativas, como por exemplo os esporos (Karam, 2000).

A eficiência de um processo de descontaminação depende de alguns fatores como: número e natureza de micro-organismos contaminantes, concentração do agente químico utilizado, tempo de exposição ao agente químico, quantidade de matéria orgânica presente, tipo e condição do material a ser descontaminado e temperatura (Karam, 2000). Sendo assim, a glicerolação só pode ser considerada um método de preservação de tecidos com poder descontaminante, havendo a necessidade de um mecanismo complementar de esterilização, de forma a garantir a inativação de todo tipo de micro-organismo

(Paggiaro, 2011).

3.3 FÍSICA DAS RADIAÇÕES

Em 1896 Becquerel descobriu que cristais de sais de urânio emitiam raios que eram semelhantes aos raios X; pelo fato de que eram altamente penetrantes, podiam afetar uma chapa fotográfica e induziam condutividade elétrica em gases. A descoberta de Becquerel foi seguida pela identificação por Pierre e Marie Curie, em 1898, de dois elementos radioativos, o polônio e o rádio. Descobriu-se que a atividade do rádio medida, pela intensidade dos raios emitidos, era mais de um milhão de vezes maior que a do urânio.

Pode ser demonstrado, por meio de experiências em campos magnéticos, que existem três tipos de radiações vindas das substâncias radioativas que ocorrem naturalmente. Essas radiações receberam os nomes de radiação α (alfa), radiação β (beta) e radiação γ (gama) (Kaplan, 1983).

A radiação α consiste de dois prótons e dois nêutrons, sendo igual a um núcleo de hélio. Quando se aplica um campo eletromagnético, essas partículas são desviadas para o pólo negativo, denotando sua carga positiva. Já a radiação β é um elétron e é desviada para o pólo positivo, o que demonstra que esta possui carga negativa. A radiação γ não é desviada pelo campo eletromagnético por não possuir carga elétrica. Desta maneira, as radiações α e β são chamadas de corpusculares e a radiação γ é dita eletromagnética.

Mostrou-se que as três radiações não são emitidas simultaneamente por todas as substâncias radioativas. Alguns elementos emitem partículas α , outros emitem partículas β , enquanto que os raios γ acompanham algumas vezes uma e algumas vezes a outra.

O estudo químico detalhado das substâncias radioativas mostrou que cada

substância é um elemento, e que sua radioatividade é causada por uma desintegração espontânea dos átomos radioativos em outros átomos (Kaplan, 1983).

Radiação ionizante é definida como uma forma de radiação que tem energia suficiente para expulsar elétrons dos átomos e moléculas de forma a convertê-los em íons. Promover reações desse tipo conduz à formação de radicais livres, que são, normalmente, altamente reativos, e que eventualmente levam a reações químicas.

Existem dois tipos de radiação ionizantes (FIG. 3.3.1):

- a) partículas de alta energia, tais como partículas α (alfa) e β (beta), pósitrons e nêutrons, sendo estas obtidas pela desintegração radioativa de isótopos ou, no caso específico de partículas β e pósitrons. De todas estas, os nêutrons possuem a capacidade extra de induzir radioatividade (Silverman, 1991).
- b) ondas eletromagnéticas com pequeno comprimento de onda e grande energia, como radiação γ (gama), obtida de radioisótopos, e raios X, gerados por aceleradores (Dahlan, 2001).

Figura 3.3.1- Série de radiações eletromagnéticas. Observar o comprimento de onda de cada tipo de radiação eletromagnética. Adaptado de Dahlan, 2001.

A radiação ionizante pode ser obtida a partir de duas diferentes fontes: a)

radioisótopos e b) aceleradores. Os mais comuns radioisótopos usados comercialmente são o cobalto-60 (^{60}Co) e o célio-137 (^{137}Cs).

Radioisótopos, os quais são conhecidos como isótopos radioativos ou radionuclídeos, ocorrem naturalmente, mas também podem ser produzidos artificialmente em um reator nuclear. Os radioisótopos são elementos instáveis que tem excesso de nêutrons ou prótons em seu núcleo e emitem radiações (α , β , γ) como forma de desintegração espontânea ou decaimento a um estado estável. O tempo que um radioisótopo leva para decair para a metade do nível de radioatividade original é conhecido como meia-vida do radioisótopo, e é específica para cada radioisótopo.

O ^{60}Co e o ^{137}Cs são fontes industriais de radiação γ , os quais possuem diferentes meias-vidas, como mostrado na TAB. 3.3.1.

O ^{60}Co é a mais popular fonte industrial de radiação γ devido a sua alta energia quando comparada a do ^{137}Cs . É usado para a esterilização de produtos médicos, fitoterápicos, cosméticos e itens farmacêuticos, descontaminação de esgotos, vulcanização da borracha (Dahlan, 2001), para a irradiação de alimentos (Villavicencio, 1998; Araújo, 2004; Araújo, 2007; Fanaro, 2007).

Tabela 3.3.1 – Meia-vida e energia de radiação dos isótopos ^{60}Co e ^{137}Cs .

Fonte	Meia-vida (anos)	Tipo de radiação	Energia (Mev)
^{60}Co	5,27	β	0,341
		γ	1,332
		γ	1,173
^{137}Cs	30	β	0,520
		γ	0,662

fonte: Dahlan, 2001.

3.3.1 Interação da radiação γ com a matéria

A interação da radiação com a matéria é essencial para a compreensão das mudanças químicas radio-induzidas, que são consequências diretas da absorção da energia pela matéria.

O coeficiente de absorção total é a soma de três coeficientes representando os três principais processos de interação de raios γ . Esses processos são chamados de: a) Efeito fotoelétrico, b) Efeito Compton e c) Produção de pares.

3.3.1.1 Efeito Fotoelétrico

Nesse processo, o fóton ou a radiação eletromagnética é absorvida pelo átomo. A energia do fóton é transferida a um elétron que está em um orbital interno (normalmente na camada K) que é ejetado do átomo. Esse elétron ejetado viajará com energia equivalente à energia do fóton menos a energia de ligação do

elétron ao átomo.

3.3.1.2 Efeito Compton

A interação entre um fóton de alta energia ou radiação eletromagnética e um elétron livre ou ligado fracamente irá causar o desvio de direção do fóton e perda de energia. A energia perdida é transferida ao elétron que viajará com uma energia equivalente a energia perdida pelo fóton. O fóton espalhado pode então sofrer, subsequentemente, absorção pelo efeito fotoelétrico ou efeito Compton.

3.3.1.3 Produção de pares

A produção de pares é a formação simultânea de um elétron positivo (pósitron) e um elétron, como resultado da interação da radiação eletromagnética de energia suficiente ($\geq 1,02$ MeV) com o campo atômico do núcleo. O elétron e o pósitron, após serem desacelerados, recombina-se, resultando na produção de dois raios γ de 0,51 MeV, processo que é conhecido como aniquilação.

3.3.2 Raios γ e sua absorção pelos materiais

Existem raios γ emitidos por muitos núcleos das séries radioativas. Os raios γ são fótons de radiação eletromagnética que liberam a energia excedente quando os núcleos efetuam transições, por decaimento γ , de estados excitados

para estados de energia mais baixa. Como as diferenças de energia entre os estados nucleares excitados é muito superior a 10^{-3} MeV, as energias dos raios γ são superiores a essa energia. Frequentemente, o decaimento γ ocorre quando um decaimento β anterior produziu alguns núcleos filhos em estados de energia de excitação de vários MeV; esta situação ocorre quando as regras de seleção do decaimento β impedem o decaimento direto ao estado fundamental. Existem também outras maneiras de produzir núcleos em estados excitados que, em seguida, passam ao estado fundamental por decaimento γ . Por exemplo, estados de energia de excitação da ordem de 7 ou 8 MeV são produzidos quando essa quantidade de energia é liberada por ocasião de uma captura pelo núcleo de um nêutron de baixa energia (Eisberg & Resnick, 1986).

As propriedades das substâncias radioativas têm sido cuidadosamente estudadas desde a descoberta da radioatividade. O interesse inicial nestas radiações estava relacionado com as séries de transformações do urânio, tório e actínio. Este interesse foi estendido às informações que as radiações dão sobre o núcleo e às mudanças de energia em suas transformações. Medidas precisas das energias das radiações emitidas por radionuclídeos naturais levaram à ideia de estados nucleares de energia análogos aos estados atômicos de energia e o estudo das radiações emitidas, tanto pelos radionuclídeos naturais como artificiais, resultou no acúmulo de uma grande quantidade de informações sobre níveis nucleares. Teorias da emissão α , β e γ foram desenvolvidas, e a combinação de conhecimentos experimentais e teóricos destes processos forma um grande ramo da física nuclear.

A propriedade básica da absorção de raios γ é o decréscimo exponencial na intensidade da radiação quando um feixe de raios γ homogêneo passa através

de uma placa fina de matéria. Quando um feixe de raios γ de intensidade I incide sobre uma placa de espessura Δx , a mudança na intensidade do feixe ao passar através da placa é proporcional à espessura e à intensidade incidente

$$\Delta I = -\mu I \cdot \Delta x \quad [1]$$

onde a constante de proporcionalidade μ é chamada de coeficiente de absorção. Se os fótons dos raios γ têm todos a mesma energia, μ é independente de x e a integração da equação acima fornece

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu x} \quad [2]$$

A última equação dá a intensidade de radiação I depois que um feixe de intensidade I_0 atravessou uma espessura x de um dado material. A intensidade é dada:

$$I = Bh\nu \quad [3]$$

onde B é o número de fótons atravessando uma unidade de área por unidade de tempo, e $h\nu$ é a energia por fóton; B é frequentemente chamado de fluxo, definido como o número de fótons por centímetro quadrado por segundo, e I é o fluxo de energia correspondente. Portanto, a equação acima pode ser escrita como:

$$\frac{B}{B_0} = e^{-\mu x} \quad [4]$$

As equações que descrevem a absorção dos raios γ são as mesmas que para os raios X. Este resultado não é surpreendente porque os ambos são

radiações eletromagnéticas.

A interação da radiação eletromagnética com a matéria é diferente daquela para partículas, tais como as partículas α e β . A diferença se torna aparente pelo poder de penetração muito maior dos raios γ nas leis de absorção devido ao fato de não possuir carga elétrica. Raios γ e raios X mostram a absorção exponencial característica na matéria e não têm alcance definido como se encontra nas partículas carregadas. Partículas carregadas, especialmente as pesadas, perdem sua energia durante o curso devido a um grande número de colisões com elétrons do átomo. A perda de energia ocorre em inúmeros pequenos degraus e a partícula gradualmente diminui de velocidade até parar e ser absorvida. Entretanto, quando um feixe de fótons de raios γ incide sobre um absorvedor fino, cada fóton que é absorvido do feixe é removido individualmente. O evento pode ser um processo de absorção real, caso no qual o fóton desaparece, ou em que pode ser espalhado para fora do feixe. A característica do processo de remoção é responsável pela absorção exponencial. Por isso, o número de fótons que pode ser removido na passagem através de uma espessura Δx do absorvedor é proporcional a Δx e ao número de fótons que alcança Δx ; este tipo de dependência conduz diretamente à lei de absorção exponencial (Kaplan, 1983).

3.4 ESTERILIZAÇÃO

Durante a retirada, processamento ou armazenamento do enxerto, micro-organismos, podem infectar o tecido, e, mesmo em situações em que estes procedimentos sejam executados sob condições de assepsia, a possibilidade de transmissão de doença viral, fúngica ou bacteriana originária do doador não pode ser descartada, e, portanto, os aloenxertos de tecidos devem ser esterilizados (Dziedzic-Goclawska, 2000).

Esterilização tem sido definida como o processo ou ato de inativar ou matar todas as formas de vida, em especial os micro-organismos (Block, 1991). A cinética de inativação microbiana é de natureza exponencial, o que significa que sempre existe a probabilidade de sobrevivência de alguns micro-organismos, independentemente da magnitude do tratamento empregado.

Cada método possui características próprias, as quais definem o espectro de ação e aplicação (Russel, 1991). Isto implica que, dependendo dos micro-organismos a serem eliminados e/ou da aplicação do produto a ser esterilizado, os diversos métodos darão resultados variados e, assim, deve-se ter em mente qual o objetivo final do processo para escolher o método mais adequado (Rutala & Weber, 2004). Outro ponto importante a considerar é se o produto a ser esterilizado não será afetado adversamente, seja direta ou indiretamente, durante o processo de esterilização. Este tipo de consideração evita desperdício de material, perda de rendimento em procedimentos e, mais importante para produtos da área de saúde, várias complicações para o paciente.

Os métodos de esterilização mais utilizados são: calor, filtração, óxido de etileno (ETO), vapor de formaldeído, plasma de peróxido de hidrogênio, radiação

ultravioleta e radiação ionizante, os quais têm suas vantagens e desvantagens relacionadas na TAB. 3.4.1 e são resumidos logo a seguir:

Tabela 3.4.1- Vantagens e desvantagens dos principais métodos e esterilização.

Tipo	Vantagens	Desvantagens
Calor	Rápido, eficaz e barato	As altas temperaturas alteram as propriedades dos materiais
Filtração	Retém bactérias, fungos e leveduras	Não eliminam vírus. São utilizadas somente para gases e líquidos
Óxido de Etileno (EtO)	Alto poder de penetração e emprego à baixas temperaturas	Tóxico, cancerígeno. Necessita de quarentena.
Vapor de Formaldeído	Empregado em baixas temperaturas	Alta absorção pelos materiais
Plasma de Peróxido de Hidrogênio	Empregado em baixas temperaturas	Penetração não é ideal
Radiação Ultravioleta	Eficiente contra bactéria e (oo)cistos	Baixa penetrabilidade
Radiação Ionizante (gama)	Alta penetração na matéria, não altera a temperatura e a pressão do material, alta eficiência em inativar micro-organismos e possibilidade de esterilização final	Necessidade de equipamentos especiais e pessoal técnico qualificado. Necessidade de altas doses de radiação para inativação viral.

a) Calor:

O emprego do calor como método de esterilização já foi consagrado. Dentre as formas possíveis estão o calor úmido, associado com vapor de água ou apenas água em ebulição, e o calor seco, onde há transferência térmica direta

para o material. Ambas as formas veem largo emprego na área da saúde. O calor úmido atua nas interfaces onde ocorre contato do material com o vapor/líquido e assim sua eficácia está diretamente relacionada com o acesso ao material. Uma vez que se tenha acesso, a esterilização ocorre de maneira rápida, eficaz e relativamente barata. Já a eficácia do calor seco depende apenas da garantia que o material a ser esterilizado tenha atingido a temperatura correta, uma vez que a transferência de energia é direta. Isto torna o método demorado de maneira geral, além do fato de serem necessárias temperaturas mais elevadas do que as do calor úmido. A principal desvantagem em ambos os casos se dá pelo próprio mecanismo de ação: o calor pode danificar ou alterar as propriedades de alguns produtos, como por exemplo, alguns suplementos alimentares (Joslyn, 1991). No caso de tecidos biológicos, o uso do calor não é recomendado, tendo em vista que as temperaturas envolvidas são suficientes para causar alterações nestes (Philips, 1997).

b) Filtração:

A filtração é empregada, como método de separação, desde a antiguidade, porém os primeiros filtros desenhados para remoção de bactérias datam de 1884 e eram fabricados em vidro. Com o desenvolvimento dos conhecimentos técnicos sobre fabricação e sobre os micro-organismos, houve também um desenvolvimento na qualidade e eficácia dos filtros. Atualmente se utilizam membranas de celulose de porosidade conhecida, que usualmente variam de 0,22-0,45 μm . A dimensão dos poros é importante na filtração, pois a separação dos micro-organismos se dá por uma barreira física que retém partículas maiores que o tamanho do poro (Levy & Leahy, 1991). As dimensões dos poros acima são

suficientes para reter bactérias, fungos e leveduras e tem aplicação corrente nas indústrias. Contudo a eliminação de vírus requer filtros de 15-40 nm e é extremamente importante para produtos derivados de plasma humano (Klein, 2005). A filtração é normalmente uma técnica barata e simples, porém a aplicação está limitada àqueles produtos passíveis de serem filtrados tais como soluções, líquidos ou gases (Levy & Leahy, 1991).

c) Óxido de Etileno (EtO):

Agente químico descoberto em 1859, muito eficiente na esterilização de produtos, tem sido empregado, na forma de vapor, na área médica devido a seu alto poder de penetração, não ser corrosivo para maioria dos materiais e de ser aplicado a baixas temperaturas. O mecanismo de ação do EtO se dá pela alquilação de compostos no interior dos micro-organismos, principalmente a guanina e a adenina presente no DNA. Por esta razão, o EtO é extremamente eficiente na eliminação da maioria dos micro-organismos, seja na forma vegetativa ou de esporos. Existem, porém, limitações quanto ao uso do EtO: inicialmente o vapor de EtO é explosivo quando atinge a concentração de 3% no ar, além disso, o composto é tóxico, potencialmente cancerígeno, teratogênico, mutagênico e neurotóxico. Tendo em vista tais limitações, a utilização de materiais esterilizados por EtO requer uma série de passos de segurança. Já embutida no processo de esterilização, há uma etapa de aeração que visa retirar o vapor e seus possíveis subprodutos presentes no material. Tal etapa pode consistir apenas na circulação de ar estéril ou na combinação de ciclos de vácuo. A duração da aeração pode variar de algumas horas a um dia, dependendo das características dos materiais esterilizados. Além dessa etapa é imprescindível que

o vapor já utilizado de EtO seja tratado antes de ser eliminado para o ambiente. O tratamento muitas vezes consiste na reação do vapor com água para formação de etileno glicol. O uso de EPI (Equipamento de Proteção Individual) por todos os envolvidos no processo de esterilização é obrigatório para evitar ao máximo a exposição ao EtO. Durante o processo de esterilização, podem ser formados subprodutos na presença de íons cloro (etileno cloridrina) ou de água (etileno glicol), tais compostos também são tóxicos e de difícil remoção. Tendo em vista o contato direto que certos produtos médicos e tecidos transplantados têm com a corrente sangüínea e os órgãos dos pacientes, ambos não devem ser esterilizados com EtO, já que os resíduos deixados por tal processo, mesmo com os cuidados para redução e diminuição destes, apresentam riscos ao paciente devido a seus possíveis efeitos tóxicos (Possari, 2003i).

d) Vapor de Formaldeído:

O emprego do vapor de formaldeído surgiu como uma das alternativas ao uso do EtO. A ação deste composto sobre micro-organismos é conhecida desde 1888 e os primeiros estudos sobre a eficácia na forma de vapor datam de 1906. Porém apenas em 1966 foi desenvolvida uma técnica que permitisse o uso do vapor de formaldeído em baixas temperaturas. A técnica, conhecida por LTSFS (do inglês *Low Temperature Steam and Folmaldehyde Sterilization*) permite o uso do vapor de formaldeído a 2%, na faixa de temperatura de 56-60°C. A atuação sobre micro-organismos é semelhante à do EtO, alquilando proteínas e ácidos nucléicos no interior dos micro-organismos. De maneira geral, o LTSFS é superior ao EtO, sendo mais econômico, de mais fácil utilização e mais saudável para o meio ambiente e para a equipe que o utiliza. A principal limitação, contudo, se

encontra no fato de materiais que absorvam o formaldeído em grandes quantidades não poderem ser esterilizados por esta técnica já que há uma enorme dificuldade em eliminar o produto impregnado (Possari, 2003ii).

e) Plasma de Peróxido de Hidrogênio:

Como descrito pelo próprio nome, esta técnica se baseia na associação de vapor de peróxido de hidrogênio com plasma de baixa temperatura. Tal tecnologia data dos anos 80 tendo sido aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration, USA*³) apenas em 1993. O mecanismo de ação de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio se dá pela formação de radicais livres, os quais reagem inespecificamente com inúmeros compostos celulares e levam a uma inativação eficiente de esporos, bactérias e vírus. Em comparação com o EtO, este método não é tóxico já que os subprodutos principais são água e oxigênio. Porém, há a necessidade de se investir em embalagens especiais para os produtos, sendo que estas não podem conter compostos que absorvam o peróxido, tais como celulose e derivados e a penetração não é ideal (Possari, 2005).

f) Radiação Ultravioleta:

A radiação UV (ultravioleta) é a parte do espectro eletromagnético que se encontra entre 15 nm e 400 nm, porém a região de interesse nos processos de esterilização vai de 220 até 300 nm (Shechmeister, 1991). Tal radiação tem sido amplamente utilizada como agente para esterilização de água, sendo eficiente contra bactérias e (oo)cistos (Anderson et al, 2003). O mecanismo de ação da radiação UV envolve, principalmente, a formação de dímeros de timina no DNA, os quais tem efeito letal sobre o microrganismo.

3 Órgão regulador norte-americano equivalente à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Outros eventos também estão associados com a irradiação UV, porém seus efeitos sobre o microrganismo ainda não são claros. Tal radiação tem uma aplicação maior na esterilização de ar, água ou superfícies, dada sua baixa penetrabilidade. Uma limitação do uso é que pode ocorrer uma recuperação do microrganismo quando este é exposto à luz visível ou próxima ao visível, pois ocorre uma fotoreativação dos produtos danificados, levando à recuperação dos micro-organismos (Shechmeister, 1991).

Por ser tema central deste trabalho, o uso da radiação ionizante como técnica de esterilização será citado no próximo sub-item com maiores detalhes.

3.4.1 Esterilização por radiação ionizante

A eficácia da radiação ionizante para inativar micro-organismos é conhecida desde 1886, quando Röntgen, por meio de suas experiências, comprovou esta propriedade com os raios X. A ação das partículas beta e raios gama originados de isótopos radioativos foram estudados em diversos materiais e tecidos por Pierre e Marie Curie em 1899 (Dziedzic-Goclawska, 2000). Em 1929 (apud Herson & Mathor, 2006) Marie Curie publicou um trabalho teórico sobre a inativação de bactérias por radiação.

A eficácia da utilização da radiação como método de esterilização é decorrente da sua grande capacidade de penetração na matéria e de sua alta eficiência em inativar micro-organismos sem a ocorrência de grandes variações da temperatura, nenhuma diferença de pressão ou atrasos por barreiras de difusão, além de permitir a esterilização de materiais que estejam em pacotes previamente fechados, que desta forma previne uma re-contaminação posterior. A

pequena variação de temperatura permite que materiais biológicos sensíveis sejam esterilizados e é eficiente tanto à temperatura ambiente como em temperaturas abaixo de zero (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

Existem diversos tipos de radiação eletromagnética, como por exemplo a radiação ultravioleta, raios X, e raios γ . De acordo com a equação de Einstein

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad [5]$$

onde E é a energia de radiação, h é a constante de Planck, λ é o comprimento de onda, e c é a velocidade da luz, podemos concluir que para baixos comprimentos de onda a energia é extremamente alta (Phillips, 1997).

O termo radiação ionizante é usado para todas as radiações com excesso de energia e capazes de produzir cascatas de ionização na matéria. A variação da energia característica da radiação ionizante começa com cerca de 10^3 eV e alcança seu limite superior com cerca de 30 MeV. Entretanto, para evitar qualquer indução de radioatividade, a qual pode ocorrer se a energia de radiação incidente ultrapassar 12 MeV, o uso de energias de radiação acima de 10 MeV é proibido para esterilização. Na prática, somente raios gama produzidos por ^{60}Co , os quais possuem níveis de energia de 1,17 MeV e 1,33 MeV, e feixes de elétrons acelerados (8-10 MeV) são usados.

Não possuindo massa e carga elétrica, os fótons de alta energia não possuem afinidade com elétrons e núcleos atômicos, e passarão, relativamente, a uma grande distância do centro da matéria. A absorção de raios X e gama em materiais irradiados ocorrem quase que exclusivamente por interações casuais de fótons de alta energia com os elétrons de um átomo. Isto resulta no espalhamento

de elétrons e fótons com energias muito menores do que os fótons incidentes, mas ainda capazes de iniciar outros processos de mesma característica.

Quando um elétron de 1 MeV passa através de uma amostra de líquido ele pode produzir cerca de 40.000 ionizações. As moléculas ionizadas são neutralizadas em um curto espaço de tempo, com os elétrons em excesso tornando-se entidades altamente excitadas. Somente alguns deles decompõem-se em radicais livres, os quais atacam suas adjacências (Dziedzic-Goclawska, 2000).

A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) promove e incentiva o uso da radiação ionizante com o propósito de esterilização. O apoio da agência resultou no desenvolvimento de programas nacionais e internacionais em bancos de tecidos com o objetivo de realizar aplicação de radiação ionizante para a esterilização de tecidos para aloenxertos (Dziedzic-Goclawska, 2000).

3.4.2 Doses apropriadas para esterilização de tecidos biológicos

De maneira geral, o valor da dose de esterilização depende da carga microbiana inicial, resistência dos micro-organismos ao método de esterilização e do nível de garantia de esterilidade (SAL – *Security Assurance Level*) necessário (International Atomic Energy Agency – IAEA, 2004). Alguns patógenos, especialmente os príons e os vírus são muito resistentes aos métodos de esterilização mais comuns, incluindo a esterilização por radiação.

O termo D_{10} descreve a quantidade de energia transferida, número de micro-organismos contaminantes e sua resistência à radiação ionizante. O valor D_{10} , usualmente expresso em kGy, é a dose de radiação necessária para reduzir a

população microbiana inicial de um $\log_{10}$, ou seja, reduzi-la em 90%.

O conceito de Nível de Garantia de Esterilidade (do inglês SAL – *sterility assurance level*) é derivado de estudos sobre a cinética de inativação microbiana, ou seja, a probabilidade de micro-organismos (patógenos ativos) estarem presentes em contato ou dentro do produto após o procedimento de esterilização. Por exemplo, um SAL de 10^{-6} garante que menos de 1 em 1.000.000 de micro-organismos irão sobreviver em contato ou dentro do produto após a esterilização (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

A maioria dos estudos a respeito de esterilização, em relação à inativação viral, tem sido conduzidos para HIV-1 e HIV-2. As doses de irradiação necessária para reduzir a carga viral de HIV-1 de 1 $\log_{10}$ (valor D_{10}) variam de 4 kGy (Conway et al., 1991) a 5,6 kGy (Conway & Tomford, 1992). Levando-se em consideração a necessidade de um SAL igual a 10^{-6} , assumindo-se um *bioburden* (contagem microbiana) médio de 10^3 virions/ml, com um valor D_{10} de 4 kGy, a redução de 9 $\log_{10}$, será necessária uma dose de 36 kGy, e com um D_{10} de 5 kGy será necessária uma dose maior que 50 kGy (Conway & Tomford, 1992).

Pruss et al. (2002) descobriram que após irradiação realizada a -30°C o valor D_{10} para HIV-2 foi de 7,1 kGy e para o parvovirus bovino mais resistente foi de 7,3 kGy. Assim, eles calcularam que para alcançar a redução em 4 $\log_{10}$ uma dose de aproximadamente 34 kGy seria necessária, passando a recomendar essa dose para a esterilização de enxertos ósseos congelados. Fidler et al. (1994), usando a reação da cadeia polimerase (PCR), encontraram que uma dose de 30-40 kGy é necessária para parar a seqüência de amplificação do HIV-1 em enxertos frescos congelados em ligamentos patelares.

Existem muitos fatores que podem modificar a resistência à radiação dos

micro-organismos, como por exemplo o emprego de protetores, como o álcool, glicerol, agentes redutores e dimetil sulfóxido (DMSO), os quais aumentam a resistência à radiação. Por outro lado, a presença de água e oxigênio aumentam os danos devido à radiação, entretanto, alguns esporos e leveduras são mais sensíveis se forem irradiados em estado seco.

A resistência de micro-organismos à radiação é geneticamente determinada. Normalmente esporos são mais radioresistentes do que bactérias em forma vegetativa, o fungo mais resistente pode ser tão resistente quanto um esporo bacteriano, enquanto os vírus são, geralmente, mais resistente do que bactérias (Dziedzic-Goclawska, 2000). Assim, de forma geral, o grau de resistência dos micróbios à radiação ionizante é inversamente proporcional ao seu tamanho, ou seja, quanto menor é o micróbio (ou vírus) maior é a sua resistência à radiação ionizante (Hilmy & Lina, 2001).

A eficiência da radiação ionizante em inativar vírus em tecidos coletados a partir de doadores cadavéricos não é bem documentada, os resultados são freqüentemente confusos e o mecanismo de reação viral é incerto (Dziedzic-Goclawska, 2000).

A dose atualmente recomendada é de 25 kGy para esterilização de tecidos biológicos. Entretanto, o Banco de Tecidos Central em Warsaw usa, desde 1963, doses de 33 kGy $\pm$ 10% para a esterilização dos tecidos, incluindo ossos. Essa mesma dose é usada em outras unidades regionais de Bancos de Tecidos na Polônia (Dziedzic-Goclawska, 2005).

Pelo fato de os contaminantes poderem variar largamente de um doador para outro, torna-se muito difícil, senão impossível, determinar a resistência e quantidade inicial dos micro-organismos no tecido coletado. Quando a resistência

e a densidade de micro-organismos são desconhecidos e não puderem ser medidos diretamente, recomenda-se que um alto valor D_{10} para organismos resistentes consistentes com as condições físicas e químicas que sejam usadas para a avaliação.

Levando-se em consideração que altas doses de radiação ionizante (acima de 40-50 kGy) podem provocar numerosas alterações físicas e químicas, podendo diminuir as propriedades biomecânicas, uma estratégia alternativa deve ser considerada para minimizar o risco de transmissão de infecções bacterianas e virais, como por exemplo cuidado na seleção de potenciais doadores (Dziedzic-Goclawska, 2000).

3.4.3 Mecanismos envolvidos na inativação de micro-organismos por radiação ionizante

As principais estruturas sensíveis à radiação ionizante nos micro-organismos são os ácidos nucleicos (DNA – ácido desoxirribonucleico e RNA – ácido ribonucleico). O dano pode ser causado diretamente ou indiretamente, por meio da radiólise da água e pela produção de radicais hidróxidos ($\cdot\text{OH}$), que são altamente reativos e possuem vida curta. Na presença de água predomina o mecanismo indireto. A presença de oxigênio potencializa o dano. Peróxidos, assim como seus radicais, são produzidos pela reação do oxigênio com os radicais hidróxidos, provocando diversos danos no DNA. Podem ocorrer também entrecruzamentos entre as fitas e danos nas bases ou nas moléculas de açúcar do DNA, o que inibe sua síntese e gera erro na síntese das proteínas, levando à morte celular (Dziedzic-Goclawska, 2000).

Por outro lado, baixas doses de radiação geram danos que diversas bactérias têm capacidade de reparar. A reparação de quebras em uma ou nas duas fitas do DNA produzem mutantes radio-resistentes, semelhante ao *Deinococcus radiodurans* (*Micrococcus radiodurans*) (Christensen et al., 1992; Yusof, 2001).

De acordo com a norma iso 11.137-2:2006, mesmo um tecido apresentando *bioburden* igual a zero, exige-se que este venha a ser esterilizado com a dose mínima para garantir a real esterilidade, a qual é igual a 15 kGy.

3.4.4 Esterilização da cartilagem por radiação ionizante

Sabe-se pouco sobre os efeitos da radiação ionizante sobre a cartilagem. Segundo Cornelissen et al. (1996), a literatura que descreve os efeitos da radiação ionizante sobre a cartilagem é vaga e contraditória, pois frequentemente os experimentos são realizados sob diferentes condições. Yahia et al. (1993) relataram que os efeitos da radiação gama, em relação às doses normalmente utilizadas para a esterilização de enxerto, provocam alterações significativamente adversas sobre a elasticidade e viscosidade destes enxertos, concluindo que a esterilização por radiação ionizante não é um método apropriado para o uso clínico. Bumann et al. (1989) avaliando a estabilidade conformacional dos enxertos de cartilagem costal esterilizados por diferentes métodos, observaram que os enxertos esterilizados por Raios-X e Raios Beta não eram apropriados na reconstrução de defeitos ósseos faciais, uma vez que os enxertos perderam completamente sua configuração após 125 e 230 dias, respectivamente. Já os que foram preservados com óxido de etileno perderam sua configuração somente

após 328 dias, concluindo que outros métodos de esterilização de biomateriais devem ser reconsiderados. Em contrapartida, Linberg et al. (1980) utilizando cartilagem costal irradiada em seus estudos de reconstrução orbital e periorbital relatam que este método de esterilização permite a utilização desta cartilagem, uma vez que os transplantes não sofrem reações de rejeição, resistem a infecções e raramente sofrem absorção.

Mais recentemente, Martinho Junior (2008) avaliou o efeito da radiação ionizante sobre as propriedades mecânicas de cartilagem costal humana (Fig. 3.4.4.1). De forma geral, doses de 15 kGy elevam a resistência à tração, sendo que tanto para cartilagens congeladas a -70°C como para cartilagens preservadas em altas concentrações de glicerol pode-se verificar um aumento de aproximadamente 24% em relação ao seus respectivos controles. Doses de 25 kGy elevam a resistência a tração em 19% quando as cartilagens são congeladas a -70°C , mas por outro lado, quando as cartilagens são preservadas em altas concentrações de glicerol, observou-se uma redução de aproximadamente 40% de sua resistência. Doses de 50 kGy diminuem a resistência da cartilagem para tração para ambas as formas de preservação, sendo que cartilagens congeladas a -70°C apresentaram uma redução de 22% e cartilagens preservadas em altas concentrações de glicerol apresentaram uma redução de sua resistência a tração de 65%.

Figura 3.4.4.1 – Relação entre a pressão média de ruptura e a dose de radiação ionizante para amostras de cartilagem humana congeladas a -70 °C e amostras preservadas em altas concentrações de glicerol (Martinho Junior, 2008).

Quando se leva em consideração a resistência à compressão, tanto cartilagens congeladas a -70 °C como cartilagens preservadas em altas concentrações de glicerol apresentaram reduções proporcionais a dose recebida (Fig. 3.4.4.2).

Figura 3.4.4.2 - Relação entre a carga compressiva média e a dose de radiação ionizante para amostras de cartilagem humana congeladas a -70 °C e amostras preservadas em altas concentrações de glicerol (Martinho Junior, 2008).

3.5 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CARTILAGEM

A cartilagem é uma forma especializada de tecido conjuntivo que suporta fadiga mecânica sem sofrer distorção permanente, devido à firme consistência da matriz extracelular (MEC) (Dziedzic-Goclawska, 2000) e das interações entre os condrócitos com a MEC (Buckewalter, J.A. & Mankin, H.J., 1998). Desempenha a função de suporte de tecidos moles e reveste superfícies articulares, absorvendo choques e facilitando o deslizamento dos ossos nas articulações (Alberts et al., 1997; Dziedzic-Goclawska, 2000; Junqueira & Carneiro, 2004). A cartilagem não possui vasos sanguíneos, linfáticos ou nervos, sendo que suas células obtêm nutrientes que se difundem pela matriz, provenientes de vasos sanguíneos presentes nos tecidos conjuntivos que a envolvem (Cormack, 2003; Gartner & Hiatt, 2003), embora possam existir vasos sanguíneos que atravessem a cartilagem indo nutrir outros tecidos. As funções do tecido cartilaginoso dependem principalmente da estrutura da matriz extracelular, que é constituída principalmente por colágeno tipo II ou colágeno tipo II mais elastina, em associação com macromoléculas de proteoglicanas, ácido hialurônico e diversas glicoproteínas (Junqueira & Carneiro, 2004; Kaur, 2001).

A cartilagem é originada de grupos de células mesenquimais, que retraem seus prolongamentos assumindo uma forma arredondada e que passam a secretar os componentes líquidos e fibrosos da matriz extracelular, formando os primeiros centros de condrificação, ou centros formadores de cartilagem, em uma etapa muito inicial da vida embrionária (Di Fiore, 2003; Gartner & Hiatt, 2003).

Essas células se diferenciam tornando-se condroblastos e, a partir desse

momento, começam a secretar matriz em torno de si, o que as afastam uma das outras. Assim, a diferenciação das cartilagens dá-se do centro para a periferia (Junqueira & Carneiro, 2004). Com a continuação desse processo, os condroblastos ficam envolvidos pela matriz secretada por eles e acabam contidos dentro de pequenos compartimentos individuais denominados lacunas. No momento em que os condroblastos ficam envoltos pela matriz eles passam a ser denominados condrócitos. Ainda capazes de divisão celular, os condrócitos podem formar grupos isogênicos de duas a quatro células dentro de uma mesma lacuna, separadas por um septo de matriz fibrosa (FIG. 3.5.1) (Cormack, 2003; Gartner & Hiatt, 2003).

Figura 3.5.1- Esquema representativo do processo de histogênese da cartilagem. a) multiplicação das células mesenquimatosas com seus prolongamentos; b) retração dos prolongamentos das células mesenquimatosas e rápida multiplicação, formando agregados; c) secreção de matriz extracelular com o consequente afastamento das células e, d) as células passam a se reproduzir formando grupos isógenos, presos em suas lacunas (Junqueira & Carneiro, 2004).

As células mesenquimatosas situadas na periferia da cartilagem em desenvolvimento diferenciam-se formando fibroblastos. Essas células produzem um tecido conjuntivo denso, de fibras colágenas, não modelado, chamado pericôndrio, que é responsável pelo crescimento e manutenção da cartilagem (Gartner & Hiatt, 2003). Além de ser uma fonte de novos condrócitos para o crescimento, o pericôndrio é responsável pela nutrição, oxigenação e eliminação de refugos metabólicos da cartilagem, uma vez que nele estão localizados vasos sanguíneos e linfáticos (Junqueira & Carneiro, 2004).

O desenvolvimento da cartilagem e do pericôndrio é controlado por várias moléculas sinalizadoras. A via sinalizadora conhecida como *Indian hedgehog* (Ihh) é um exemplo de regulação molecular entre cartilagem e pericôndrio. O Ihh é uma molécula produzida e secretada por condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos, que pode controlar direta ou indiretamente a maturação da cartilagem e do pericôndrio, pode regular a proliferação e a diferenciação dos condrócitos pelo receptor *Patched* (Ptch) diretamente e, indiretamente, pode regular o desenvolvimento dos condrócitos pela indução de moléculas intermediárias do pericôndrio (Colnot, 2005). Além disso, a diferenciação celular das células da cartilagem é estimulada em vários estágios por proteínas BMPs (*Bone Morphogenetic proteins*) como demonstrado por Kobayashi et al. (2005).

Outras moléculas, como por exemplo o Fator Transformador de Crescimento β (TGF β), atuam como um retransmissor de sinal entre Ihh e PTHrP (*parathyroid hormone related peptide*) no processo de regulação da hipertrofia dos condrócitos (Alvarez et al., 2001, 2002).

O pericôndrio é formado por duas camadas, sendo uma camada fibrosa externa, que é composta por colágeno tipo I, fibroblastos e os vasos sanguíneos e

uma camada interna, composta principalmente pelas células condrogênicas (Gartner & Hiatt, 2003). Exceto a cartilagem articular das diartroses, todas as demais cartilagens possuem pericôndrio (Gartner & Hiatt, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004). As cartilagens articulares, que são desprovidas de pericôndrio, nutrem-se de substâncias fornecidas pelo líquido sinovial (Di Fiore, 2003).

Durante algum tempo, o esqueleto cartilaginoso em formação cresce por um processo conhecido como crescimento intersticial ou endógeno, o qual se dá pela proliferação de suas células. Posteriormente, as cartilagens se expandem pela multiplicação e diferenciação das células do pericôndrio por um processo conhecido como crescimento por aposição ou exógeno, ou ainda, pericondrial (Di Fiore, 2003).

Em ambos os casos, os condrócitos recém formados logo passam a sintetizar fibrilas de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas, de forma que o crescimento real é muito maior do que o produzido apenas pelo aumento do número de células. O crescimento intersticial é menos importante e quase só ocorre nas primeiras fases de vida da cartilagem. À medida que a matriz se torna cada vez mais rígida, o crescimento intersticial deixa de ser viável e a cartilagem passa a crescer somente por aposição. Células da parte profunda do pericôndrio multiplicam-se e diferenciam-se em condrócitos, que são adicionados à cartilagem (Junqueira & Carneiro, 2004).

Pelo fato de ainda não apresentar quantidade de proteoglicanas como na cartilagem madura, as áreas de crescimento recém-formadas apresentam-se acidófilas. Além disso, com a idade, a cartilagem antiga reduz sua basofilia, tornando-se, em alguns locais, acidófila, uma vez que os condrócitos perdem gradualmente a capacidade de produzir proteoglicanas (Di Fiore, 2003). Com um

aumento maior da idade, a cartilagem degenera e se depositam minerais na matriz (Dziedzic-Goclawska, 2000), o que é acompanhado pela diminuição do conteúdo de água, afetando a difusão das substâncias nutritivas pela matriz, fazendo com que os condrócitos passem a consumir suas reservas de lipídeos e de glicogênio, processo esse que logo em seguida conduz os condrócitos à morte (Di Fiore, 2003).

Segundo Hall (1983) e Kaur (2001), exceto em crianças de pouca idade, as cartilagens que sofrem lesão regeneram-se com dificuldade, e quando regeneram, frequentemente regeneram de modo lento e incompleto. No adulto, a regeneração se dá por atividade do pericôndrio. Quando a área lesionada é extensa, ou até mesmo em lesões pequenas, o pericôndrio forma uma cicatriz de tecido conjuntivo denso, em vez de formar novo tecido cartilaginoso.

Conforme as diversas necessidades funcionais do organismo, as cartilagens se diferenciam em três tipos: a) cartilagem hialina, que é a mais comum e cuja matriz possui delicadas fibrilas constituídas principalmente de colágeno tipo II. A fresco, a cartilagem hialina é branco azulada, semitransparente e flexível. É encontrada no nariz, na laringe, nas extremidades ventrais das costelas, onde se articulam com o esterno, nos anéis da traqueia e dos brônquios e nas superfícies articulares das articulações móveis do corpo. Durante o desenvolvimento embrionário, essa cartilagem forma o molde cartilaginoso de vários ossos e constitui as placas epifisárias dos ossos em desenvolvimento; b) cartilagem elástica, que possui poucas fibrilas de colágeno tipo II e abundantes fibras elásticas. Está presente no pavilhão da orelha, nas tubas auditivas interna e externa, epiglote e laringe (cartilagem cuneiforme). A fresco, a cartilagem elástica é amarelada e mais opaca do que a cartilagem hialina devido a presença de fibras

elásticas. De forma geral, a cartilagem elástica é idêntica a cartilagem hialina e, frequentemente, está associada a esta; e c) cartilagem fibrosa, que apresenta matriz constituída preponderantemente por fibras de colágeno tipo I e se encontra em diversas articulações, em particular nos discos das articulações temporomandibulares, esternocostoclavicular e acromioclavicular, nos discos intervertebrais, na sínfise pubiana, no bordo cotiloideo do acetábulo do osso da coxa e nos discos da articulação do joelho, além do que em muitos locais de fixação de tendões às cartilagens. Por ser formada por feixes de fibras colágenas paralelos entre si e muito apertados, entre os quais se encontram grupos ou fileiras de condrócitos imersos em uma matriz extracelular similar a da cartilagem hialina, a cartilagem fibrosa é considerada um tecido de transição entre a cartilagem hialina e o tecido conjuntivo denso regular ou modelado. (Cormack, 2003; Di Fiore, 2003; Gartner & Hiatt, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004; Kaur, 2001).

3.5.1 Ultraestrutura da cartilagem hialina

A cartilagem madura apresenta-se como um material anisotrópico (as propriedades físicas variam de acordo com a direção e o sentido considerados) formada por quatro zonas distintas em sua secção vertical (FIG. 3.5.1.1), além de regiões de matriz distintas ao redor dos condrócitos. A estrutura, composição e as propriedades mecânicas variam dentro dessas quatro diferentes zonas (TAB. 3.5.1.1). Assim, temos uma grande variação de formas, tamanhos e atividades celulares, diâmetro das fibrilas de colágeno, bem como sua orientação, conteúdo

de água da matriz e conteúdo de proteoglicanas (Hunziker et al., 1997).

Figura 3.5.1.1- Esquema de corte transversal da cartilagem evidenciando as quatro diferentes zonas. Modificado de Hasler et al. (1999).

Tabela 3.5.1.1- Distribuição dos principais componentes da cartilagem hialina.

Parâmetros	Zona Superficial	Zona de Transição	Zona Radial	Zona Calcificada
Conteúdo de água	85%	→	60%	
Colágeno tipo II				
Conteúdo	Alto	→	diminuição de 15%	
Tamanho das Fibrila	20-50 nm	→	200-300 nm	
Organização das Fibrilas	Paralelas à superfície	Aleatória	Perpendiculares ao osso subcondral	
Proteoglicanas				
Densidade	Baixa	Alta	Alta	Ausente
Agregados de Agrecana	Pequenos	Médios	Grandes	
Conteúdo de Decorina + Biglican	Máximo	→	Baixo	
Função Mecânica	Resistência à cisalhamento		Resistência à compressão	Ancorar a cartilagem ao osso

Fonte – Hasler et al. (1999)

3.5.1.1 Zona superficial

É a zona mais fina da cartilagem, possuindo o maior conteúdo de água de toda a cartilagem, podendo alcançar aproximadamente 85% de sua massa. As fibrilas de colágeno estão densamente empacotadas, tendo um pequeno diâmetro, e estando arranjadas paralelamente com a superfície articular (Muir et al., 1970). Nessa zona as proteoglicanas estão fortemente ligadas às fibrilas de colágeno (Buckwalter et al., 1991).

3.5.1.2 Zona de transição

A zona de transição ocupa um volume diversas vezes maior do que a zona superficial. As fibrilas de colágeno possuem um diâmetro maior e estão arranjados de forma mais aleatória, quando comparado à zona superficial. O conteúdo de proteoglicanas é alto nessa zona, sendo que os agregados de proteoglicanas são maiores quando comparados à zona superficial (Buckwalter et al., 1991).

3.5.1.3 Zona radial

Frequentemente, a zona radial é dividida em zona radial superior e zona radial inferior (Huzinker et al., 1997). Nesta zona as fibrilas de colágeno apresentam seu maior diâmetro e aparecem orientadas de maneira a ficar perpendiculares ao osso subcondral e o seu conteúdo de proteoglicanas é alto

(Wong et al., 1997). Estudos de Microscopia Eletrônica demonstraram que as fibrilas de colágeno formam lâminas que se estendem do osso subcondral até a superfície da cartilagem (Nötzli & Clark, 1997).

3.5.1.4 Zona calcificada

A zona calcificada da cartilagem possui um baixo conteúdo de proteoglicanas. Sua mineralização se dá pela deposição de sais de cálcio. Esta zona atua na integração estrutural e mecânica além de influenciar na nutrição da cartilagem articular (Hasler et al., 1999).

3.6 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA MATRIZ EXTRACELULAR

Segundo Hay (1999), a última década testemunhou um rápido aumento em nosso conhecimento acerca da matriz extracelular (MEC). Este conhecimento é devido aos avanços na biologia molecular, o que nos fornece um maior entendimento sobre a função e a composição da matriz. As variações nas quantidades relativas dos diversos tipos de macromoléculas e o modo como estão organizadas na matriz, gera uma diversidade espantosa de formas, cada uma adaptada às necessidades funcionais particulares de cada tecido (Alberts et al., 1997).

Em células mesenquimatosas, a MEC pode ser dividida em dois tipos: a) matriz pericelular, que está próxima ou adjacente à superfície celular e b) matriz intercelular, a qual está mais distante e circunda a célula. A matriz intercelular

pode formar estruturas especializadas, como o tendão, a cartilagem e, com uma deposição secundária de fosfato de cálcio, ossos e dentes (Thomas & Davies, 2001). Segundo Timpl (1996), a matriz na qual estão apoiados todos os endotélios e epitélios possui uma composição química e organização diferente da matriz mesenquimal, sendo referida como membrana basal.

Antes do conhecimento mais profundo da natureza molecular da MEC, esta era considerada como um local inerte de desenvolvimento de células e tecidos. Hoje é reconhecido que a MEC é um pré-requisito para a existência de organismos multicelulares, pois atua na manutenção da forma dos tecidos e polarização das células, tem um papel central em diferentes processos celulares, os quais incluem a migração celular, diferenciação e cicatrização de ferimentos. Muitos componentes da MEC tem também mostrado atuar como antígenos em certos processos imunopatológicos e, ainda, como componentes anormais em certas condições patológicas (Thomas & Davies, 2001).

A MEC dos tecidos conjuntivos representa um complexo molecular constituído por fibras insolúveis, microfibrilas e uma grande quantidade de proteínas e glicoproteínas solúveis (Hay, 1993). De acordo com Jenkins (1990), a MEC da cartilagem representa 95% do seu peso total. Estudos de biologia molecular e bioquímica têm identificado quatro classes de macromoléculas que formam a MEC, a quais são chamadas de colágenos, proteoglicanas e glicosaminoglicanas, glicoproteínas estruturais e elastina (Ayad et al., 1996). Todos esses componentes estão dissolvidos no fluído extracelular, o qual é formado por água (60 a 85% do peso total) (Mankin & Thrasher, 1975). Os múltiplos componentes da matriz são secretados por células do próprio tecido conjuntivo, nas quais a orientação do seu citoesqueleto influencia o padrão da

MEC por elas sintetizadas. Esses múltiplos componentes dividem-se em dois grupos: 1) aqueles constituídos por molécula proteicas alongadas, que se agregam formando estruturas fibrilares ou fibrosas, como o colágeno e a elastina; e 2) os constituintes que se agregam mas não formam fibrilas ou fibras, e que, por sua vez, podem ter dois subtipos: a) glicoproteínas alongadas, como a fibronectina e a laminina, cuja função principal é realizar a adesão entre a matriz e as células; e b) glicosaminoglicanas e proteoglicanas, que formam um gel hidratado no qual estão imersos os outros componentes da matriz. O colágeno e a elastina são responsáveis pelo arcabouço estrutural e elástico de vários tecidos. A fibronectina é responsável pela adesão das células não epiteliais à matriz, e a laminina, por sua vez, é responsável pela adesão das células epiteliais à lâmina basal. Já as glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um gel hidrófilo, semifluido, que permite a circulação, nos tecidos conjuntivos, de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos. Nas cartilagens, as moléculas de glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um complexo de pontes moleculares unindo as fibrilas de colágeno entre si, emprestando a este tecido a sua importante característica de rigidez e discreta compressibilidade (Alberts et al., 1997; Junqueira & Carneiro, 2000).

3.6.1 Colágeno

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas altamente características, encontradas em todos os animais multicelulares (Alberts et al., 1997). Essa família de proteínas foi selecionada durante a evolução para exercer diferentes funções, entre elas, principalmente, estrutural (Junqueira & Carneiro,

2004). Segundo Fratzl (2003), o colágeno é o maior constituinte dos tecidos biológicos. De acordo com Alberts et al. (1997), o colágeno constitui 25% da massa proteica total de um mamífero. Os colágenos podem ser divididos em quatro subfamílias: a) colágenos formadores de fibras, b) colágenos associados a fibras, c) não fibrilares e d) um grupo de colágenos detectados a partir do cDNA e sequenciamento genético (Thomas & Davies, 2001). Outros autores classificam os colágenos em: a) colágenos formadores de fibrilas, b) colágenos associados às fibrilas (FACIT, do inglês *fibril-associated collagens*), c) colágenos formadores de redes, d) fibrilas de ancoragem, e) colágenos transmembrana, f) colágenos de membrana basal e g) outros tipos de colágenos com funções únicas (Gelse et al., 2003).

A família dos colágenos é composta por mais de 26 tipos geneticamente diferentes (Gelse et al., 2003), sendo que os colágenos mais encontrados nos tecidos conjuntivos são os tipos I, II, III, V e XI. O colágeno tipo I é encontrado na pele e nos ossos e, portanto, é o mais comum. A cartilagem hialina, como já mencionada anteriormente, é composta principalmente por colágeno tipo II, que apenas forma fibrilas, não formando fibras (Junqueira & Carneiro, 2004). Estudos têm demonstrado que o colágeno tipo VI, que é encontrado envolvendo os condrócitos, pode ajudá-los a se ligar à armação macromolecular da MEC (Buckewalter & Mankin, 1998).

A estrutura longa, rígida, de tripla hélice é a característica principal de uma molécula de colágeno (FIG. 3.6.1.1) (Alberts et al., 1997). Sua tripla hélice tem um comprimento de aproximadamente 300 nm, o que corresponde a cerca de 1000 aminoácidos, e é formada por duas cadeias chamadas α_1 associadas com uma terceira cadeia, do tipo α_2 , que são similares, mas não são idênticas. Cada uma

das três cadeias α forma uma hélice voltada para a esquerda, que segundo Thomas & Davies (2001) é específica para colágeno, não sendo encontrada em nenhuma outra proteína, e cada volta é composta por cerca de 18 aminoácidos (Gelse et al., 2003). As moléculas são reunidas em fibrilas de colágeno, as quais, quando observadas ao microscópio eletrônico, revelam estriações transversais com uma periodicidade de 67 nm, o que reflete uma alternância regular das moléculas de colágeno que compõem essas fibrilas (FIG. 3.6.1.2) (Alberts et al., 1997; Fratzl, 2003).

Figura 3.6.1.1- Molécula de colágeno. A imagem evidencia a formação do colágeno por duas cadeias α_1 associadas com uma terceira cadeia, do tipo α_2 . Cada cadeia alfa é enrolada em alfa hélice com passo à direita, sendo mantidas unidas por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Cada volta completa da hélice percorre uma distância de 8,6 nm (Junqueira & Carneiro, 2004).

Figura 3.6.1.2- Esquema de reunião de moléculas de colágeno para a formação de fibrilas de colágeno (1 a 3) e fibras de colágeno (4 e 5) (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os principais aminoácidos que compõem o colágeno são: glicina (35%), alanina (11%), prolina (12%) e hidroxiprolina (10%) (Nelson & Cox, 2000; Junqueira & Carneiro, 2004). A sequência de aminoácidos no colágeno é geralmente uma repetição de unidades do tripeptídeos glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxiprolina, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido. Apesar da hidroxiprolina ser encontrada nas proteínas da parede celular de plantas, resíduos de hidroxiprolina e hidroxilisina são raramente encontrados em proteínas animais.

Um pré-requisito estrutural essencial para a reunião das fibrilas em uma tripla hélice é um resíduo de glicina em toda terceira posição das cadeias polipeptídicas, resultando na sequência exposta acima. As cadeia α reúnem-se em torno de um eixo central de forma que todos os resíduos de glicina estejam

posicionados na região central da tripla hélice, enquanto as cadeias laterais dos outros aminoácidos ocupam as regiões mais externas da tripla hélice (Gelse et al., 2003).

No colágeno os grupos hidroxila desses aminoácidos parecem formar pontes de hidrogênio entre as cadeias, auxiliando na estabilização da tripla hélice (Nelson & Cox, 2000; Gelse et al., 2003) além de servirem como pontos de ancoragem para açúcares (Thomas & Davies, 2001). A sequência Glicina-X-Prolina está intimamente relacionada com a conformação tridimensional da molécula de colágeno e, algumas mutações genéticas estão relacionadas à doenças (Nelson & Cox, 2000), como Osteogênese Imperfeita, que é caracterizada pela formação óssea anormal em bebês (Cabral et al., 2005), Síndrome Ehlers-Danlos, que consiste na perda das articulações (De Coster et al., 2005), Hiperostose Cortical Infantil, também conhecida como Doença de Caffey, a qual é caracterizada por hiperirritabilidade, inflamação aguda dos tecidos conjuntivos e alterações profunda na forma e estrutura de determinados ossos, particularmente em ossos longos (Glorieux, 2005).

A síntese das cadeias polipeptídicas do colágenos (FIG. 3.6.1.3) ocorre nos ribossomos aderidos à membrana do retículo endoplasmático rugoso, uma vez que essa proteína deve ser exocitada como um dos componentes da MEC. Inicialmente, as cadeias alfa do pró-colágeno são sintetizadas com peptídeos de registro em suas extremidades.

Já no interior do retículo endoplasmático rugoso, esses peptídeos de registros são clivados por proteases específicas. A seguir, resíduos de prolil e lisil são hidroxilados, em um processo onde a vitamina C atua como co-fator, dando então origem a resíduos de hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente. Alguns

resíduos de hidroxilisina específicos recebem a adição de moléculas de galactosil e glicosil solúveis.

Ainda no interior do retículo endoplasmático rugoso, os peptídeos das cadeias alfa do pró-colágeno são alinhadas, formando então uma molécula de pró-colágeno, a qual é formada pela união de três cadeias alfa, assumindo a configuração de uma tripla hélice e é uma molécula solúvel. A seguir, as moléculas de pró-colágeno solúveis recém-sintetizadas são transportadas até o Complexo de Golgi por meio de vesículas. Do Complexo de Golgi, as moléculas de pró-colágeno solúveis são transportadas para a superfície da célula por meio de vesículas de secreção, processo este dependente dos microtúbulos. Ao atingir a superfície celular, as moléculas de pró-colágeno solúveis são descarregadas no espaço extracelular.

No espaço extracelular, grande parte dos peptídeos de registro da molécula de pró-colágeno são clivados pela enzima *procolágeno peptidase*. Essa clivagem transforma o pró-colágeno solúvel em tropocolágeno insolúvel, o qual se agrega formando fibrilas. Por final, a enzima *lisil oxidase* forma pontes covalentes entre as moléculas de tropocolágeno, reforçando a estrutura fibrilar da molécula (Di Fiore, 2003; Gartner & Hiatt, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004).

Tanto a biossíntese como a supressão de colágeno são reguladas por fatores externos e por fatores internos. Goldring et al. (1988), em seus estudos sobre artrite reumatoide, mostraram que os colágenos tipo II e IX tem sua expressão suprimida na cartilagem na presença de Interleucina 1, mas que, concomitantemente, há um aumento na expressão de colágeno tipo I e III pelos condrócitos humanos.

A expressão de colágeno tipo I está associada a expressão do mRNA para

o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) (Fukunaga et al., 2003), o qual pertence a família CCN (Cyr61/Cef10, CTGF/fisp-12) (Bork, 1993). O ácido ascórbico (vitamina C) é um cofator para a hidroxilação dos resíduos de prolina, que estabiliza a tripla hélice do colágeno. A deficiência de vitamina C no organismos, i.e., escorbuto, produz cadeias pró- α defeituosas, não formando uma hélice estável (Alberts et al., 1997).

Triplas hélices de colágeno nativas são caracterizadas pela sua resistência a proteases semelhantes a pepsina, tripsina ou quimotripsina, mas podem ser degradadas por diferentes tipos de collagenases, entre elas a MMP-1, MMP-8 e MMP-13, sendo esta última expressa por condrócitos hipertróficos, bem como em osteoblastos e osteoclastos, o que nos mostra sua importância no processo de remodelação do osso e da cartilagem (Gelse et al., 2003).

O colágeno tipo II, quando comparado ao colágeno tipo I, mostra cadeias com um maior conteúdo de hidroxilisina, bem como resíduos glicosil e galactosil, os quais medeiam as interações com proteoglicanos (Gelse et al., 2003).

Figura 3.6.1.3- A imagem mostra as principais etapas da biossíntese de colágeno (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.6.2 Glicosaminoglicanas

As glicosaminoglicanas (GAGs) são cadeias heteropolissacarídicas, lineares, não ramificadas, compostas por unidades dissacarídicas não repetitivas.

Um dos dois açúcares do dissacarídeo sempre é um açúcar aminado (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina), normalmente sulfatado. O segundo açúcar normalmente é um ácido urônico (D-glicurônico ou L-idurônico), sendo que a galactose pode substituir o ácido urônico, como no caso da GAG queratan-sulfato.

Pelo fato de apresentarem grupos sulfato e carboxila, presentes na hexosamina e no ácido urônico, respectivamente, as GAGs são carregadas negativamente, o que lhe confere sua polianicidade. A alta densidade de cargas negativas atrai uma nuvem de cátions, i.e., Na^+ , que são osmoticamente ativos, resultando na grande incorporação de água pela MEC. A quantidade de GAGs no tecido conjuntivo é normalmente inferior a 10% do peso da quantidade de proteínas fibrosas, mas pelo fato de formarem géis hidratados, estas cadeias preenchem a maior parte do espaço extracelular, conferindo suporte mecânico aos tecidos e também permitindo a rápida difusão de moléculas hidrossolúveis e a migração celular (Alberts et al., 1997; Greca, 1996; Junqueira & Carneiro, 2004).

De acordo com a molécula de açúcar, o tipo de ligação entre eles, o número e a localização dos grupos sulfatos, as GAGs podem ser divididas em quatro grupos:

- a) ácido hialurônico;
- b) condrotin-sulfato ou dermatan sulfato;
- c) queratan-sulfato;
- d) heparan-sulfato e heparina

3.6.2.1 Ácido hialurônico

O ácido hialurônico representa a mais precoce forma evolucionária dentre todas as GAGs, não apresentando grupos sulfatos e não interagindo com um eixo proteico para formar moléculas de proteoglicanas (Iozzo, 1985). Ele consiste da repetição de sequências regulares de até 25.000 unidades de dissacarídeo não sulfatados e é encontrado em quantidades variáveis em todos os tecidos e fluidos de animais adultos, sendo especialmente abundante no estágio inicial do desenvolvimento de embriões (Alberts et al., 1997). Em vertebrados, três genes que controlam a síntese de ácido hialurônico são conhecidos (HAS 1, HAS 2 e HAS 3), mas a inter-relação entre eles ainda não está bem compreendida. Estudos iniciais sugerem claras diferenças entre as três enzimas, indicando a síntese de três polímeros de ácido hialurônico de diferentes tamanhos (Thomas & Davies, 2001).

A função básica do ácido hialurônico é reter e regular o fluxo de água no tecido. Atua também como lubrificante nas articulações sinoviais, participa da reorganização das células e da MEC durante o crescimento normal e na reparação de lesões nos tecidos (Toole, 1991). Segundo McDonald & Camenisch (2002), matrizes hidratadas ricas em ácido hialurônico expandem o seu espaço extracelular, facilitando a migração celular (FIG. 3.6.2.1.1).

Toole et al. (1972) estudaram o papel do ácido hialurônico na condrogênese *in vitro*, sugerindo que o ácido hialurônico atua como um regulador ou inibidor da agregação das células mesenquimais, uma vez que a remoção de ácido hialurônico por hialuronidases permitia a agregação e diferenciação das células mesenquimais em condrócitos, ao passo que a sua adição, mesmo que

em pequenas quantidades, inibia o processo de agregação e, conseqüentemente, inibia o processo de diferenciação dessas células em condrócitos.

Figura 3.6.2.1.1- Atuação do ácido hialurônico na matriz extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.6.2.2 Condroitin-sulfato

Os condroitin-sulfato são encontrados em uma grande variedade de tecidos, principalmente na cartilagem, onde podem chegar a alcançar uma concentração de mais de 10% do peso total (Iozzo, 1985). As cadeias de condroitin-sulfato podem ser formadas por dissacarídeos sulfatados e não sulfatados, sendo que as mais comuns são aquelas em que o grupo sulfato predomina na posição 4 da hexosamina (condroitin 4-sulfato) e onde o sulfato predomina na posição 6 do açúcar (condroitin 6-sulfato) (Greca, 1996).

3.6.2.3 Dermatan-sulfato

O dermatan-sulfato pode ser considerado um isômero do condroitin-sulfato, no qual uma porção variável de ácido D-glicurônico é convertida, pela ação de

uma epimerase, para ácido L-idurônico (Wight et al., 1991). Proteoglicanas que contêm dermatan-sulfato em sua estrutura são largamente distribuídas na MEC da pele, tendão, cartilagem entre outros tipos de tecidos conjuntivos, onde estão intimamente ligados a fibrilas de colágeno. Recentemente dois tipos de dermatan-sulfato foram isolados de cartilagens bovinas maduras e são conhecidas como DS-PGI e DS-PGII. Juntos, possuem forte efeito nas funções biológicas da célula, inibindo a capacidade dos fibroblastos se aderirem a substratos de fibronectina (Rosenberg et al., 1986). Em cartilagens adultas, a associação do DS-PGII está limitada principalmente nos estreitos arranjos paralelos das fibrilas de colágeno, os quais são encontrados na zona superficial da cartilagem articular, parecendo ter um papel importante na determinação do tamanho e das propriedades tensionais das fibrilas de colágeno e pode estar também envolvida na calcificação do osteoide, mas não da cartilagem (Poole et al., 1986).

3.6.2.4 Queratan-sulfato

O queratan-sulfato é a única glicosaminoglicana que possui dissacarídeos com uma hexose (D-galactose) no lugar do ácido urônico. Os grupos sulfatados estão na posição 6 da D-galactose e da hexosamina. Interage com resíduos de serina ou treonina no eixo proteico para formar as proteoglicanas queratan-sulfato (Iozzo, 1985).

3.6.2.5 Heparan-sulfato

A maior quantidade de grupos sulfatados por dissacarídeo está

representada nessa classe. Por exemplo, o heparan-sulfato apresenta grupos N-sulfatados além dos O-sulfato (ou éster-sulfato), os quais são também encontrados em condrotin e dermatan-sulfato. O heparan-sulfato é sintetizado por uma grande variedade de células, constituindo uma proteoglicana com alto peso molecular, que se associa com superfícies celulares e membranas basais de tecidos epiteliais (Iozzo, 1985).

3.6.2.6 Heparina

A heparina é uma GAG encontrada em grânulos citoplasmáticos de mastócitos e está relacionada a atividade anticoagulante (Alberts et al., 1997). Uma de suas principais características é um alto nível de sulfatação das hexosaminas e ácidos urônicos.

3.6.3 Proteoglicanas

O termo proteoglicana (PG) foi originalmente introduzido na década de 60 para definir qualquer molécula constituída por um núcleo ou eixo proteico que interage covalentemente com ao menos uma molécula de GAG (FIG. 3.6.3.1) (Hascall & Kimura, 1982; Muir, 1983). Entretanto, hoje caracteriza-se proteoglicana como uma super família de proteínas encontradas na superfície celular, membranas basais e incorporadas à MEC (Alberts et al., 1997; Jackson et al., 1991). Os agregados de proteoglicanas são o maior componente estrutural da MEC da cartilagem. Esses agregados fornecem à cartilagem uma propriedade de gel, dando resistência a deformação pela absorção de água. As PGs estão

relacionadas também a outros eventos, como no caso da proteoglicana heparan-sulfato, a qual está envolvida no desenvolvimento da cartilagem, o que inclui regulação da expressão gênica, apresentação de fatores de crescimento, estabelecimento de gradientes morfogênicos e modulação da homeostase sanguínea (Farach-Carson et al., 2005; Watanabe, 2004). Hoje sabe-se também que a PG heparan-sulfato Syndecan-3 atua como co-receptor para fatores de crescimento e citocinas (Pacifici et al., 2005). Duas anomalias genéticas letais, a nanomelia em galináceos e a deficiência de matriz na cartilagem em ratos estão relacionadas a conteúdos inferiores a 5% do seu conteúdo normal de proteoglicanas, embora apresente quantidades normais de colágeno tipo II. Na ausência de proteoglicanas a matriz da cartilagem se reduz grandemente (Hascall et al., 1991).

A principal proteoglicana encontrada nas cartilagens é a agrecana, que dá a este tecido a capacidade de suportar cargas, resistindo à compressão. Todas as metaloproteinases (MMPs) da MEC funcionam como agrecanases, mas não parecem ser essenciais no *turnover* da agrecana durante o desenvolvimento normal e crescimento do esqueleto (Little et al., 2005).

A constituição molecular dos eixos proteicos das PGs no que se refere ao peso molecular, a sequência de aminoácidos, e o tipo de aminoácidos com os quais as GAGs interagem só foram descobertos recentemente, graças aos avanços das técnicas de biologia molecular, em especial, nos métodos de sequenciamento de aminoácidos e obtenção de clones de cDNA. Desta forma, os pesquisadores já isolaram e nomearam pelo menos 6 tipos de eixos proteicos (Wight et al., 1991), dentre eles o eixo da agrecana, que consiste de 2316 aminoácidos e tem aproximadamente 220 kDa de peso molecular. A comparação

da agrecana humana com a de ratos revelou 75% de similaridade entre elas (Doege et al., 1991).

Figura 3.6.3.1- Esquema representativo de uma molécula de proteoglicana. Observar a ligação das glicosaminoglicanas no cerne proteico (Nelson & Cox, 2000).

Os eixos proteicos das PGs são sintetizados nos ribossomos aderidos à membrana do retículo endoplasmático e, em sua luz, são empacotados. As cadeias de polissacarídeos são montadas principalmente no Complexo de Golgi. Primeiramente, um tetrassacarídeo de ligação interage com o aminoácido serina no núcleo proteico, servindo como um iniciador para o crescimento do polissacarídeo e, subsequentemente, uma molécula de açúcar é adicionada de cada vez, por enzimas glicosil-transferases específicas. Ainda no Complexo de Golgi, uma série de reações sequenciais e coordenadas de epimerização, que alteram a configuração dos substituintes ao redor dos átomos de carbono na molécula de açúcar e de sulfatação, que aumentam as cargas negativas das PGs, modificam covalentemente as unidades de açúcar. A sua síntese depende de um balanço hormonal adequado. Hormônios como a tiroxina e a testosterona

aceleram a sua síntese e os hormônios cortisona, hidrocortisona e estradiol retardam-na (Junqueira & Carneiro, 2004).

Nas PGs, o núcleo proteico pode variar de 10.000 a mais de 600.000 dáltons e o número e os tipos de cadeias de GAGs variam enormemente, o que confere, a princípio, uma enorme heterogeneidade. Esta heterogeneidade dificulta a identificação e classificação das PGs (Alberts et al., 1997). Até a década de 80, a literatura classificava as PGs baseando-se praticamente na composição dos tipos de GAGs (Hay, 1993). Essa descrição foi adotada pela falta de uma característica básica das proteínas do eixo, como acontece com a tripa hélice do colágeno, que é voltada para a esquerda (Thomas & Davies, 2001). Entretanto, sabe-se que a variedade de proteoglicanas é dada pela presença de diferentes eixos proteicos e de diferentes grupos, número e tamanho de GAGs (Hay, 1993).

A partir dos anos 90, a classificação foi feita levando-se em consideração a composição do seu eixo proteico, seu peso molecular e distribuição nos tecidos. Alguns autores (Jackson et al., 1991; Wight et al., 1991) classificam as PGs em 4 grandes grupos: Proteoglicanas Intersticiais de Agregação, Pequenas Proteoglicanas Intersticiais não Agregantes, Proteoglicanas de Superfície Celular e Proteoglicanas Estocadas em Grânulos Citoplasmáticos.

Como já mencionado anteriormente, a agrecana é a principal macromolécula encontrada na cartilagem. É dividida em números de domínios, os quais incluem três domínios globulares e regiões separadoras, nas quais os oligossacarídeos e cadeias GAG se ligam aos proteoglicanos maduros. Aparentemente, esses quatro núcleos proteicos não estão geneticamente relacionados, embora cada um deles possa ser um membro de sua própria família gênica. A agrecana pertence a família dos proteoglicanos que possuem

hialuronato ligado ao seu eixo proteico. Os membros dessa família normalmente possuem cadeias laterais como condroitin ou dermatan-sulfato, mas a agrecana é também frequentemente sintetizada com cadeias laterais de queratan sulfato (Wight et al., 1991).

3.6.4 Fibras elásticas

Com o desenvolvimento de organismos maiores surgiu a necessidade de flexibilidade dos tecidos e a necessidade de opor-se a distração. Diversas proteínas não relacionadas evoluíram satisfatoriamente nesse sentido, incluindo a resilina em artrópodes, abductina em moluscos e a elastina em vertebrados (Sage & Gray, 1979). Estudos filogenéticos têm mostrado que a elastina ocorre somente em vertebrados e surgiu primeiramente em peixes cartilaginosos, onde seu surgimento coincide com o desenvolvimento de um sistema circulatório totalmente fechado (Sage, 1983).

Na discussão de tecidos elásticos é importante distinguir “fibras elásticas” de “elastina”. Fibras elásticas são um complexo estrutural encontrados na MEC que contém elastina, proteínas microfibrilares e lisil oxidase (Mecham & Heuser, 1991). Elastina é a proteína predominante das fibras elásticas maduras e favorece a fibra com sua propriedade característica de recuo elástico (FIG. 3.6.4.1).

Figura 3.6.4.1- As moléculas de elastina são unidas por pontes covalentes que geram uma rede interconectadas e extensível. Como cada uma das moléculas de elastina contida na rede pode expandir-se em qualquer direção, resulta que a rede inteira pode esticar-se e encolher-se como um fio elástico (Junqueira & Carneiro, 2004).

A elastina, em contraste com as outras famílias de componentes da MEC, é composta por apenas um produto gênico, a tropoelastina, que é codificada por um gene localizado no cromossomo 7. As moléculas de elastina nas fibras elásticas são altamente insolúveis. A elastina possui um similar, mas não idêntico, conteúdo de aminoácidos com o colágeno, o qual é de cerca de 33% glicina, 10-13% prolina e 24% alanina. Entretanto, é distinguido pela ausência de hidroxiprolina, metionina e outros aminoácidos (Wight et al., 1991).

3.6.5 Glicoproteínas estruturais

Fibronectina, laminina e outras proteínas extracelulares não colagenosas tem um importante papel em muitas interações da superfície celular. Por exemplo, a fibronectina ajuda a mediar a adesão celular, migração celular durante o desenvolvimento embrionário e cicatrização de feridas, enquanto a laminina pode

promover processos tão diversos quanto crescimento axonal, manutenção da polarização, diferenciação fenotípica das células epiteliais sobre a membrana basal e metástase. Cada uma dessas glicoproteínas pode participar de uma variedade de funções pelo uso de diferentes domínios especializados ou reconhecimento de sequências peptídicas para a ligação de receptores de superfície específicos, a colágenos, proteoglicanos ou a outras moléculas extracelulares (Yamada, 1991).

3.7 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Nos próximos itens, as fundamentações teóricas das técnicas utilizadas no presente trabalho serão descritas detalhadamente.

3.7.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho baseia-se no fato de que cada molécula absorve frequências específicas que são características de sua estrutura. Essa absorção se dá pela igualdade da frequência de vibração entre a radiação absorvida e a vibração apresentada pela ligação ou molécula. De maneira simples, a frequência ressonante está relacionada com a força da ligação e, assim, cada frequência de vibração está relacionada a um tipo de ligação.

Uma molécula pode vibrar de diversas maneiras distintas, sendo cada maneira conhecida como modo vibracional. Moléculas lineares com n átomos possuem $3n-5$ modos vibracionais e moléculas não-lineares possuem $3n-6$ modos vibracionais.

A medida do espectro infravermelho de uma amostra é realizado fazendo-se um feixe de luz infravermelha atravessar a amostra. O exame da luz transmitida nos fornece a informação de quanta energia foi absorvida em cada comprimento de onda. Contudo, pode-se utilizar um feixe de luz monocromático, sendo então necessário obter as mudanças no comprimento de onda em relação ao tempo ou, ainda, utilizando as transformadas de Fourier. A análise das absorções específicas revelam as características sobre a estrutura molecular da amostra (Harwood e Moody, 1989).

3.7.2 Termogravimetria

A análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera específica (Ionashiro *apud* Matos & Machado, 2003). Sua aplicação abrange grande variedade de materiais, permitindo uma enorme variabilidade de estudos. Dificilmente se encontra uma área da ciência e tecnologia em que as técnicas termoanalíticas não foram ou não podem ser aplicadas. A definição de análise térmica implica que três critérios devem ser satisfeitos para que seja considerada termoanalítica:

- a) uma propriedade física deve ser medida;
- b) a medida deve ser expressa direta ou indiretamente em função da temperatura;
- c) a medida deve ser executada sob um programa controlado de temperatura.

A Análise Termogravimétrica ou Termogravimetria é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química fixa, definida e constante, a temperatura em que começam a decompor, acompanhar o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre outras. Três modos de termogravimetria são comumente

usados: a) termogravimetria isotérmica, b) termogravimetria quasi-isotérmica e c) termogravimetria dinâmica ou convencional (Matos & Machado, 2003).

a) Termogravimetria isotérmica: a massa da amostra é registrada em função do tempo à temperatura constante;

b) Termogravimetria quasi-isotérmica: a amostra é aquecida a uma razão de aquecimento linear enquanto não ocorre variação da massa; a partir do momento em que a balança detecta a variação de massa, a temperatura é mantida constante até se obter um novo patamar, o qual é característico de massa constante para a amostra, e assim sucessivamente;

c) Termogravimetria dinâmica ou convencional: a amostra é aquecida ou resfriada num ambiente cuja temperatura varia de maneira pré-determinada, de preferência, à razão de aquecimento ou resfriamento linear.

Todos os equipamentos de análise térmica têm características em comum. De maneira geral, o que os diferencia é o tipo de transdutor empregado em sua configuração, o qual tem a função de converter as propriedades físicas avaliadas em sinais elétricos. O instrumental básico de um analisador termogravimétrico consiste de uma balança de precisão acoplada a um forno que permite programar de diferentes maneiras o seu comportamento térmico. A amostra é colocada numa pequena plataforma ligada à balança. Os dados da massa da amostra gerados são captados pela saída serial do equipamento, a qual está acoplada a um microcomputador equipado com software específico para análise dos dados. Um forno elétrico envolve a plataforma onde se encontra a amostra de forma que, ao aumentar sua potência, aumenta-se a temperatura do forno (Cienfuegos & Vaitsman, 2000). O transdutor gera um sinal elétrico que é amplificado e transferido para a unidade controladora, mantendo a comunicação permanente

com a célula de medida. Esta unidade, além de receber os dados da célula de medidas, transfere as informações necessárias para colocar o equipamento em operação de acordo com os parâmetros (faixa de temperatura, razão de aquecimento, tipo de atmosfera) previamente estabelecidos (Matos & Machado, 2003). Os resultados obtidos são apresentados sob a forma de uma curva termogravimétrica (Fig. 3.7.2.1), em que a massa é registrada em função da temperatura e/ou do tempo (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

Figura 3.7.2.1 – Curva termogravimétrica de uma amostra de cartilagem costal humana (linha vermelha). Observe que ocorre uma redução da massa (eixo y) em função da temperatura (eixo x). Essa redução se dá pela evaporação da água presente no tecido. Observe também a presença de eixos-guia utilizados na determinação das coordenadas para a regressão linear.

3.7.2.1 Termogravimetria da cartilagem

Pouco se conhece sobre o comportamento termogravimétrico da cartilagem como constatado pelo próprio autor desse trabalho. Basicamente, os trabalhos publicados referem-se a análises termogravimétricas de cartilagens de portadores de osteoartrite, uma doença caracterizada pela degeneração da cartilagem e dos ossos que elas recobrem, visto que a primeira alteração percebida após a desestabilização das articulações é um aumento no conteúdo de água da cartilagem decorrente da perda da rede de colágeno. Após o aumento do conteúdo de água na cartilagem ocorre um alta síntese de proteoglicanas caracterizadas por uma alta proporção de condroitina sulfato e uma baixa proporção de queratan sulfato, prejudicando a agregação das proteoglicanas. Ao atingir um limiar crítico, o conteúdo de água que inicialmente encontrou-se anormalmente elevado acaba por diminuir até alcançar níveis abaixo do normal (Mankin & Brandt, 1992; Sohár et al., 2007, Tóth et al., 2010).

De acordo com Sohár (2007), Than et al. (2000) publicaram o primeiro trabalho sobre o uso de análise térmica no estudo da cartilagem humana. Seu estudo demonstrou a capacidade dos termogramas em provar e avaliar continuamente a estrutura da cartilagem em diferentes estágios da osteoartrite.

Assim, Sohár et al. (2007) propuseram um novo protocolo termogravimétrico para investigar a cartilagem humana sadia e afetada por lesões semelhantes à osteoartrite. Seu trabalho utilizou uma rampa linear de aquecimento de 25 °C a 150 °C e uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. obtendo o seguinte gráfico (Fig. 3.7.2.1.1) para cartilagens humanas sadias, cartilagens afetadas por osteoartrite e cartilagens necróticas:

Figura 3.7.2.1.1 – curvas obtidas por TGA e DTA de cartilagens humanas saudáveis, cartilagens afetadas por osteoartrite e cartilagens necróticas. Sohár et al. (2007).

Como a radiação ionizante provoca modificações sensíveis na estrutura dos tecidos biológicos, torna-se necessário saber como essas modificações estruturais afetam o processo de difusão de água no tecido, uma vez que muitos bancos de tecidos utilizam glicerol como forma de preservação, o que desidrata o tecidos (Paggiaro, 2011), embora esse fato seja questionado, como já mencionado no item 3.2.2 do presente trabalho. De qualquer forma, a preservação por glicerol provoca o trânsito de moléculas entre a rede de colágeno da cartilagem e, assim, as modificações provocadas pela radiação ionizante poderiam alterar esse fluxo.

De forma a avaliar como o uso de radiação ionizante altera o fluxo de água no interior da cartilagem, a utilização da técnica de termogravimetria se torna relevante para se compreender mais a fundo a influência dessa forma de esterilização e das formas de preservação dos tecidos.

3.7.3 Introdução à Fotônica e Biofotônica

A biofotônica estuda as interações da luz com a matéria e integra quatro grandes tecnologias amplamente desenvolvidas no século XXI: lasers, fotônica, nanotecnologia e biotecnologia. A fusão dessas quatro tecnologias nos oferece uma nova dimensão para diagnósticos e terapias, visto seu grande número de aplicações práticas.

Emboras as aplicações mais conhecidas da biofotônica sejam na área médica, a biologia também tem evoluído, uma vez que biomateriais têm se mostrados promissores no desenvolvimento de novos meios fotônicos para aplicações tecnológicas (Prasad, 2003).

A seguir, será mostrada uma visão geral dos princípios básicos necessários para compreender o funcionamento básico de um sistema OCT.

3.7.3.1 Luz e ondas eletromagnéticas

Por muitos séculos a natureza da luz foi fonte de debate. A princípio, os experimentos sugeriam que a luz era uma onda ou uma partícula. Contudo, hoje sabemos que a luz comporta-se tanto como uma partícula quanto como uma onda, dependendo de como ela é medida.

Enquanto a luz se comporta como uma onda, a sua característica eletromagnética é essencial para compreendermos seu comportamento. A teoria eletromagnética, que unificou os fenômenos elétricos e magnéticos, foi proposta em 1860 por James Clark Maxwell e estabelece as relações matemáticas de equações de ondas. Já quando analisamos a luz do ponto de vista corpuscular,

cada partícula (fóton) possui uma energia igual a $E=h.f$, em que h é a constante de Planck ($h=6,63 \times 10^{-34}$ J.s ou $4,14 \cdot 10^{-15}$ eV.s) e f é frequência da luz. Quando um grande número de fótons está envolvido, o que é significativo para a maior parte da luz, eles se comportam de maneira semelhante a uma onda, podendo ser tratados como uma onda clássica.

Se considerarmos uma onda eletromagnética no vácuo, tanto a sua frequência quanto o seu comprimento estão diretamente relacionados à sua velocidade de propagação, sendo a equação que descreve essa característica dada por $c=\lambda f$, em que c é a velocidade da luz no vácuo (3×10^8 m/s), λ é o comprimento de onda e f , a frequência. É exatamente por meio de sua frequência (ou comprimento de onda) que uma onda eletromagnética é classificada (FIG. 3.3.1).

3.7.3.2 Fenômenos ondulatórios

3.7.3.2.1 Coerência

De acordo com Brezinski (2006), a coerência da luz é um tópico complexo, sem uma definição muito clara. A amplitude e a fase da luz sofrem flutuações muito rápidas tanto para o olho humano quanto para detectores físicos seguirem. Se dois feixes de luz se originarem da mesma fonte, as flutuações dos dois feixes estarão de forma geral correlacionadas, sendo então os feixes total ou parcialmente coerentes, dependendo se esta correlação é completa ou parcial (Born e Wolf, 1999 **apud** Brezinski, 2006). Assim, mesmo que de forma menos acurada, o fenômeno de coerência pode ser imaginado como o grau de

correlações existentes entre as flutuações da luz de dois feixes que sofreram interferência (Brezinski, 2006).

As propriedades da coerência são definidas por duas características (Prasad, 2003):

1. Coerência temporal – esta propriedade é definida pelo espalhamento da frequência do conjunto de ondas. Caso todas as ondas provenientes de uma mesma fonte possuam a mesma frequência ou frequências muito próximas, dizemos que essas ondas possuem coerência temporal. Nesse caso, a luz é chamada “monocromática”. Por outro lado, caso haja um grande espalhamento das frequências, a luz é chamada “policromática” e não possui coerência temporal.
2. Coerência espacial – essa coerência é definida pela relação espacial entre as fases de diferentes ondas provenientes de uma fonte de luz. Uma luz é espacialmente coerente quando existe uma relação de fase constante e mantida pelo conjunto de ondas que se propagam pelo espaço, como ocorre em lasers.

3.7.3.2 Refração

Refração é o fenômeno de passagem da luz de um meio para outro em que a velocidade de propagação da luz é diferente nos dois meios (Brezinski, 2006). O índice de refração de um meio será maior quanto menor for a velocidade de propagação da luz nesse meio e, do contrário, quanto menor o índice de refração do meio, maior será a velocidade de propagação da luz nesse meio. Essa diferença de velocidades de propagação entre os diferentes meios resulta em

uma alteração no ângulo de propagação da luz, como ilustrado na FIG. 3.7.3.2.2.1.

Figura 3.7.3.2.2.1 – Esquema ilustrativo do fenômeno de refração.

O fenômeno de refração é governado pela lei de Snell (eq. 06):

$$\eta_1 \cdot \sin \theta_1 = \eta_2 \cdot \sin \theta_2 \quad [6]$$

em que η é o índice de refração e θ é o ângulo de incidência da luz em relação ao eixo perpendicular à superfície (normal) (Brezinski, 2006).

3.7.3.2.3 Reflexão

O processo de reflexão ocorre quando existem regiões cujo índice de refração é diferente. Como demonstrado no item anterior, a luz propaga-se com maior velocidade em meios com menores índices de refração. Assim, como pode ser observado na FIG. 3.7.3.2.3.1, a reflexão externa ocorre quando a luz

proveniente de um meio com alto índice de refração atinge a superfície de um meio com índice de refração menor do que o primeiro (Brezinski, 2006).

Figura 3.7.3.2.3.1 – Diagrama de raios luminosos no qual podemos identificar o processo de reflexão. Adaptado de Brezinski (2006).

As leis que governam o fenômeno de reflexão são (FIG 3.7.3.2.3.2) :

- (1) o ângulo de incidência de um feixe luminoso (θ_i) é igual ao ângulo de reflexão (θ_r);
- (2) os raios luminosos incidentes e refletidos devem estar no mesmo plano.

Figura 3.7.3.2.3.2 – Diagrama de raios luminosos indicando o ângulo de incidência e reflexão, bem como o plano de incidência e reflexão.

3.7.3.2.4 Polarização

Uma importante consequência do fato da radiação eletromagnética ser polarizada é a utilização dessa característica por meio de espectroscopia de polarização, a qual é uma importante técnica utilizada em OCT.

Como a luz é representada pela oscilação de campos elétricos e magnéticos transversais, podemos considerar que para a luz se propagando na direção do eixo z e o campo elétrico transversal exclusivamente na direção do eixo x, o campo elétrico pode ser descrito por:

$$\mathbf{E}_x(z, t) = iE_{0x}\cos(kz - \omega t) \quad [7]$$

Se considerarmos uma onda similar, com seu campo elétrico exclusivamente na direção do eixo y, com mesma frequência, mas não necessariamente na mesma fase, o campo elétrico pode ser descrito por:

$$\mathbf{E}_y(z, t) = jE_{0y}\cos(kz - \omega t + \varepsilon) \quad [8]$$

Se assumirmos que ε é igual a zero, ou um múltiplo inteiro de 2π , então a soma dos dois campos é dada por:

$$\mathbf{E}(z, t) = \mathbf{E}_x(z, t) + \mathbf{E}_y(z, t) = iE_{0x}\cos(kz - \omega t) + jE_{0y}\cos(kz - \omega t + \varepsilon) = (iE_{0x} + jE_{0y})\cos(kz - \omega t) \quad [9]$$

O campo elétrico é, portanto, constante em orientação com o ângulo relativo ao eixo x. Por geometria simples, o ângulo é dado por:

$$\frac{\sin \phi}{\cos \phi} = \tan \phi = \frac{(E_{0y})}{(E_{0x})} \quad [10]$$

Se $E_{0y} = E_{0x}$, temos como resultado uma luz linearmente polarizada, cuja

posição em relação ao eixo x é constante e igual a 45 graus.

Por outro lado, se assumirmos que ε é igual a um múltiplo de $-\pi$, em que $E_{0y} = E_{0x}$, desde que o segundo cosseno seja igual a -1, $\mathbf{E}(z, t)$ será dado por:

$$\mathbf{E}(z, t) = (iE_{0x} - jE_{0y})\cos(kz - \omega t) \quad [11]$$

o que resulta novamente em uma luz linearmente polarizada com um eixo diferente daquele da eq. 10, e seu ângulo será dado por:

$$\tan \phi = -\frac{E_{0y}}{E_{0x}} \quad [12]$$

Assim, temos novamente uma luz polarizada, embora esta possua um ângulo de - 45 graus em relação ao eixo x. Portanto, uma luz está linearmente polarizada quando a relação de fase ε entre duas ondas está entre zero ou um múltiplo de $\pm n\pi$. Ainda, se os valores de E_{0y} e E_{0x} não são iguais, a luz ainda está polarizada, mas o ângulo em relação ao eixo x não é maior do que 45 ou -45 graus.

3.7.3.3 Propriedades Ópticas

A luz, ao interagir com a matéria, e mais especificamente com tecidos biológicos, nos possibilita estudar algumas propriedades dos materiais como dispersão, absorção, espalhamento e birrefringência. Dessa forma, os próximos sub tópicos são dedicados ao detalhamento dessas propriedades dos materiais.

3.7.3.3.1 Dispersão

Dispersão é o fenômeno que ocorre quando a luz atravessa um meio e diferentes comprimentos de onda passam a apresentar velocidades de propagação diferentes devido ao fato de que o índice de refração do referido material é dependente da frequência. Por exemplo, um prisma é um dispositivo que atua produzindo dispersão.

O efeito da dispersão da luz em um material pode ter tanto um significado bom como ruim. A dispersão pode ser utilizada intencionalmente para separar a luz em seus componentes relativos a sua frequência, como no caso já mencionado anteriormente, ou seja, em um prisma. Por outro lado, a dispersão possui efeitos negativos como por exemplo a dispersão de grupos de velocidade, a qual ocorre, por exemplo, quando a luz penetra em um tecido ao invés de ser refletida por um espelho. Nesse caso, diferentes comprimentos de onda retornam em intervalos de tempo diferentes e, dessa forma, ela precisa ser compensada em sistemas OCT (Brezinski, 2006).

3.7.3.3.2 Absorção

A partir dos princípios básicos da mecânica quântica, um elétron só interage com a luz ao absorver um fóton de frequência específica, ou seja, o elétron de um dado átomo ou molécula não consegue interagir com energia de qualquer frequência. Ao absorver um fóton, o elétron excitado salta para um estado de maior energia, podendo ser ejetado do átomo caso a energia seja suficiente para que isso ocorra.

De forma geral, os elétrons que absorvem luz da região do espectro visível são os mais distantes do núcleo. Como as imagens de OCT são feitas na região do infravermelho, geralmente acabam envolvendo elétrons e ligações. Essas ligações químicas possuem vibrações mecânicas quânticas ou estados rotacionais em que a absorção de fótons resulta em uma passagem para um nível de energia mais alto. Pelo fato de que a absorção, dispersão e o índice de refração estão intimamente relacionados, e como o pico de absorção da água ocorre perto dos 1380 nm, os dispositivos OCT utilizam fontes que geram feixes de luz com comprimento de onda abaixo dos 1300 nm para minimizar a dispersão (Brezinski, 2006).

3.7.3.3.3 Espalhamento

Por ser um fenômeno complexo, o espalhamento será tratado nesse item sem equações e desprezando o efeito de polarização da luz, uma vez que foge ao escopo desse trabalho detalhar com rigor matemático as propriedades das técnicas utilizadas.

De forma a possibilitar uma melhor compreensão do fenômeno de espalhamento, vamos tomar como exemplo (Brezinski, 2006) um gás que consiste em um grupo de átomos que estão separados entre si por uma distância significativa, mais de 5 vezes o seu próprio raio. Os átomos oscilam como dipolos e, como não existe nenhum tipo de padrão de organização e os átomos estão distantes entre si, as ondas eletromagnéticas que atingem os átomos são espalhadas em todas as direções (FIG. 3.7.3.3.3.1).

Figura 3.7.3.3.1 – Imagem ilustrativa do espalhamento da luz ao atingir um átomo. Uma vez que não existe nenhum padrão de organização e os átomos estão afastados, as fases da luz que atinge os átomos serão aleatórias, ou seja, incoerentes. (Adaptado de Brezinski, 2006)

Contudo, quando os átomos estão próximos uns dos outros, como por exemplo a uma distância igual à metade do comprimento de onda da luz incidente, a luz de um átomo interfere destrutivamente na luz proveniente de outro átomo. O espalhamento começa a predominar desde que a única luz incidente esteja em fase e possua interferência construtiva.

De maneira geral, imagens de OCT são feitas em meios heterogêneos que são constituídos de diferentes átomos e moléculas. O espalhamento ocorre, em geral, com partículas muito maiores do que o comprimento de onda da luz incidente, o que significa que o mesmo é composto por uma grande quantidade de osciladores. O espalhamento originado de diferentes seções de uma mesma partícula interfere na luz de uma outra seção. Assim, como o OCT mede a intensidade da luz espalhada, esse fato significa que a maior parte do sinal não estará disponível para a geração de imagens por OCT, o que prejudica a técnica (Brezinski, 2006).

3.7.3.3.4 Birrefringência

Em meios isotrópicos não existe uma direção preferencial no alinhamento das moléculas que compõem esse meio. Dessa forma, tais meios apresentam apenas um índice de refração, o qual é independente da direção de polarização de uma luz polarizada e, conseqüentemente, a propagação da luz é independente da direção do meio. Contudo, meios anisotrópicos são completa ou parcialmente ordenados e, portanto, exibem diferentes índices de refração para diferentes polarizações da luz incidente.

Pelo fato da velocidade de uma onda ser dependente do índice de refração, a luz incidente sobre um meio birrefringente será dividida em feixes normais e extraordinários e podem se propagar por diferentes trajetórias com velocidades diferentes devido à diferença nos índices de refração (Prasad, 2003).

3.7.3.4 Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

Nas últimas décadas, a Tomografia por Coerência Óptica (do inglês *Optical Coherence Tomography* – OCT) vem despertando um aumento na atenção médica, principalmente na área oftalmológica. Contudo, outras áreas da medicina como ortopedia, cardiologia, reumatologia, neurologia, oncologia, dermatologia e cirurgia têm utilizado a técnica de OCT para diversos tipos de investigação científica e clínica (Fig. 3.7.3.4.1). Além disso, novos estudos vêm sendo publicados na área de odontologia (Braz et al., 2009, Freitas et al., 2009) O sucesso do OCT na medicina deve-se principalmente ao fato dessa técnica não

ser destrutiva e produzir imagens de estruturas internas *in vivo* em alta resolução, em tempo real e sem contato com o tecido (Freitas et al., 2010; Wiesauer et al., 2006, Fugimoto, 2002).

O OCT é uma técnica que vem preencher uma lacuna deixada por outros métodos de diagnóstico por imagem (Fig. 3.7.3.4.2). Essa técnica atua numa região em que técnicas como o ultrassom e a microscopia confocal não conseguem atuar (Raele, 2009).

Figura 3.7.3.4.1 - levantamento realizado na base de dados Web of Science em 13 de março de 2011 utilizando as palavras-chave “Optical AND Coherence AND Tomography”, destacando as áreas da medicina que vêm utilizando a técnica de OCT.

Figura 3.7.3.4.2 – Região de atuação, resolução e profundidade de penetração das técnicas de OCT, microscopia confocal e ultrassom (Raele, 2009).

Por ser uma técnica óptica, o OCT consegue uma resolução espacial de 10 μm ou menos, o que representa uma resolução cerca de 10 vezes maior do que o ultrassom convencional. Pelo fato da luz sofrer forte espalhamento na maioria dos tecidos, a profundidade de obtenção de imagens é limitada a poucos milímetros (Fujimoto et al., 1995).

O sistema OCT utiliza fibras ópticas e uma fonte compacta de luz. A luz proveniente da fonte é dividida por uma via óptica divisora, a qual atua como um interferômetro. Uma das fibras dirige a luz para o tecido a ser estudado e a outra dirige a luz para um espelho referência em movimento, onde a posição de referência do espelho é precisamente controlada por um sistema eletrônico e um computador. Tanto a luz refletida pelo tecido quanto a luz refletida pelo espelho são recombinadas e a interferência entre os dois sinais ocorre somente quando os seus comprimentos correspondem ao comprimento de coerência da luz (Fig. 3.7.3.4.3). Isto permite uma precisa determinação tanto da distância dentro do tecido no qual a luz foi refletida quanto da sua magnitude (Fujimoto et al., 1995). A resolução axial das imagens geradas por OCT é determinada pelo comprimento de coerência da luz que foi utilizado na obtenção das imagens. Em um sistema OCT típico, que utiliza uma fonte de luz super luminescente compacta, a resolução axial é de 10 a 20 μm . Se fontes alternativas, como pulsos ultracurtos de *laser*, são utilizados, a resolução axial pode chegar até 2 a 4 μm (Clivaz et al., 1994).

A medição realizada com um feixe luminoso incidente em um único ponto do tecido produz uma medida de variação da reflexão óptica ao longo do eixo do feixe. Uma imagem da secção transversal de uma amostra é produzida de maneira similar ao radar: um feixe de luz é lançado no tecido e os perfis de

reflexão de diversas posições transversas são gravados no computador. O resultado é uma representação bidimensional da secção transversal do tecido. Esta representação pode então ser mostrada em uma escala da cor cinza ou, ainda, por cores falsas⁴ (padrão RGB), onde as diferentes cores indicam o grau de espalhamento dos fótons no qual a cor branca indica um estouro de escala, ou seja, representa um espalhamento acima do limiar superior, a cor preta representa regiões onde não há sinal (limiar inferior) e as outras cores seguem o padrão RGB (*Red, Green, Blue*), em que temos o vermelho como maior sinal, seguido pelas cores laranja, amarelo, azul, verde e violeta (menor sinal). (Fujimoto et al., 1995).

Figura 3.7.3.4.3 – Esquema básico de um sistema OCT. (Adaptado de Raelle, 2009).

⁴ Aqui, o termo “cores falsas” é utilizado no sentido de que não representa as cores reais do tecido.

3.7.3.5 Tomografia por Coerência Óptica Sensível à Polarização (PS-OCT)

Recentemente, novas técnicas de OCT vêm auxiliando o estudo da ultraestrutura da cartilagem. A principal delas é a Tomografia por Coerência Óptica Sensível à Polarização (PS-OCT; *Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography*), a qual consiste na variação do ângulo de incidência da iluminação⁵ (Xie et al., 2006i). Assim, com a variação do ângulo de incidência da luz, pode-se mapear a orientação de estruturas biológicas birrefringentes, como o colágeno (Ugryumova et al., 2006).

De acordo com Wiesauer et al. (2006), até a data de publicação de seu artigo, as aplicações da técnica de PS-OCT eram muito pequenas, embora alguns trabalhos demonstrassem claramente o alto potencial dessa técnica.

Os resultados experimentais obtidos por Xie et al. (2006i) demonstraram que quando a incidência da luz é perpendicular à superfície do tecido, a cartilagem articular demonstra uma pequena polarização sensível, enquanto o uso de PS-OCT pode avaliar a orientação e organização da matriz de colágeno no tecido. Em outro artigo (Xie et al., 2006ii), os mesmos autores utilizaram o PS-OCT para determinar as características do tecido cartilaginoso normal e anormal em bovinos de forma a determinar se esta tecnologia pode ser capaz de diferenciar vários estágios da doença degenerativa articular. Nesse estudo, os autores concluíram que o uso de PS-OCT pode demonstrar e discriminar características de estágios muito iniciais de irregularidade da superfície articular que não foram capazes de ser verificadas pelo estudo prévio somente com a utilização de OCT.

5 Variação do ângulo de incidência entre 0 e 90°.

3.7.3.6 Estudos sobre cartilagem utilizando OCT e PS-OCT

Particularmente, a cartilagem tem sido estudada por OCT de forma a identificar prematuramente doenças degenerativas como osteoartrite e bons resultados têm sido publicados (Roberts et al., 2003; Li et al., 2005; Xie et al., 2006). Mais recentemente, a técnica de OCT vem sendo utilizada em estudos de engenharia de tecidos (Mason et al., 2004; Matcher, 2011; Veksler et al., 2008). Além disso, cirurgias de reconstrução de discos espinhais (Sobol et al., 2007) e de remodelagem do septo nasal (Sobol et al., 2009) tem utilizado com sucesso o OCT para avaliar as mudanças provocadas nos tecidos após as cirurgias.

Ainda, estudos têm demonstrado que alterações microestruturais nos tecidos biológicos como fibrose, inflamação e câncer podem resultar em alterações no retardo de fase, fazendo com que o PS-OCT seja uma técnica valiosa para identificar precocemente essas modificações (Brezinski et al, 2006).

Com a ampliação do uso da técnica de PS-OCT, novos estudos vêm sendo publicados, em especial os que utilizam cartilagem, visto ser este tecido um material birrefringente. Os resultados experimentais obtidos por Xie et al. (2006i) demonstraram que quando a incidência da luz é perpendicular à superfície do tecido, a cartilagem articular demonstra uma pequena sensibilidade à polarização, enquanto o uso de PS-OCT pode avaliar a orientação e organização da matriz de colágeno no tecido. Em outro artigo (Xie et al., 2006ii), os mesmos autores utilizaram o PS-OCT para determinar as características do tecido cartilaginoso normal e anormal em bovinos de forma a determinar se esta tecnologia pode ser capaz de diferenciar vários estágios da doença degenerativa articular. Nesse estudo, os autores concluíram que o uso de PS-OCT pode demonstrar e

discriminar características de estágios muito iniciais de irregularidade da superfície articular que não foram capazes de ser verificadas pelo estudo prévio somente com a utilização de OCT.

Em humanos, Xingde et al. (2006) demonstraram que o uso do PS-OCT é capaz de identificar a desorganização da rede de colágeno pela perda da propriedade de birrefringência em cartilagens do joelho de portadores de osteoartrite (FIG. 3.7.3.6.1 e FIG. 3.7.3.6.2).

Figura 3.7.3.6.1 – a) imagem de PS-OCT de uma região de cartilagem do joelho sadia, evidenciando (setas vermelhas) a birrefringência do colágenos. b) corte histológico da mesma região.

Figura 3.7.3.6.2 – a) imagem de PS-OCT de uma região da cartilagem do joelho afetada por osteoartrite. Note a perda da propriedade de birrefringência do tecido (setas vermelhas). b) corte histológico da mesma região. As regiões identificadas pelas setas vermelhas se referem às mesmas regiões da imagem a.

Na área cirúrgica, o PS-OCT vem sendo utilizado para estudar a remodelação do tecido cartilaginoso por meio do uso de lasers (Youn et al., 2005). Segundo os autores, a principal causa das alterações no retardo de fase obtidas pelo uso da técnica de PS-OCT é a desidratação, a qual foi obtida por meio do uso de glicerol, que também é utilizado por bancos de tecidos como um método de preservação e descontaminação de materiais biológicos como pele e cartilagem. Em seu estudo, os autores demonstraram que o uso de radiação por laser provoca uma diminuição do retardo de fase que não pode ser visualmente verificada, mas quando analisada graficamente mostra a alteração da estrutura provocada pela ação da radiação laser (FIG. 3.7.3.6.3).

Figura 3.7.3.6.3 – a) imagem de PS-OCT de uma região da cartilagem antes do processo de irradiação por laser em que podemos notar a birrefringência do tecido. b) imagem de PS-OCT da mesma região da cartilagem mostrada em a após o processo de irradiação por laser. c) gráfico comparativo do retardo de fase antes e após o processo de irradiação por laser. Note a diminuição do retardo de fase nas cartilagens irradiadas (Youn et al., 2005). Adaptada pelo autor.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e processamento das amostras

As amostras de cartilagem costal humana utilizadas no presente trabalho foram obtidas por meio de uma parceria com o Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O projeto inicial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, o qual é a atual responsável pela avaliação de projetos do IPEN, sob número 1820 em 21 de agosto de 2008 (Apêndice A).

Um total de 15 doadores cadavéricos com idade variando entre 18 e 55 anos, ambos os sexos, tiveram suas cartilagens costais direita e esquerda removidas para pesquisa durante o processo de necrópsia. As cartilagens costais direita foram preservadas em glicerol a 50% (1:1 soro fisiológico) dentro de tubos Falcon de 50 ml previamente preparados e mantidas em geladeira a 4 °C por 24 horas. As cartilagens costais esquerdas foram mantidas congeladas a -20 °C por 24 horas dentro de sacos plásticos utilizados por Bancos de Tecidos (Nylon-poli 5 camadas). Após esse período, as cartilagens preservadas em glicerol a 50% foram transferidas para um novo tubo Falcon de 50 mL contendo glicerol em alta concentração (98%) e foram mantidas em geladeira a 4 °C. Da mesma forma, decorridas as 24 horas, as cartilagens congeladas a -20 °C passaram a ser mantidas a -70 °C.

Após duas semanas, todas as amostras tiveram o procedimento de limpeza realizado dentro de fluxo laminar previamente esterilizado. A limpeza constou da remoção completa de todo tecido adjacente bem como do seu pericôndrio, por

meio de cuidadosa raspagem com o auxílio de um bisturi. Após o processo de limpeza, todas as amostras foram acondicionadas de forma definitiva em embalagens plásticas estéreis. Ao final do processo, foram gerados 300 fragmentos de cartilagem costal humana embalados individualmente e devidamente identificados. As cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ voltaram ao ultracongelador e, da mesma forma, as amostras preservadas em glicerol foram mantidas em geladeira a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. Irradiação das amostras

O processo de irradiação das amostras de cartilagem costal foi realizado no Irradiador Multipropósito localizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) sob a supervisão da Dra. Yasko Kodama.

Cada amostra de cartilagem costal foi dividida em 6 fragmentos de tamanhos aproximadamente iguais, sendo que 5 dos quais foram irradiados com diferentes doses de radiação gama proveniente de fontes de ^{60}Co , a saber: 15 kGy, 25 kGy, 50 kGy, 75 kGy e 100 kGy, e um deles foi mantido como controle negativo (não irradiado).

De forma a evitar a variação da temperatura pelo tempo decorrido durante a irradiação, as amostras de cartilagem preservadas em glicerol foram irradiadas na presença de elementos refrigerantes e as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram irradiadas na presença de gelo seco.

Como controle de dose foram utilizados dosímetros Red Perspex, os quais possuem um intervalo de 5 a 50 kGy. Como foram utilizadas doses de 75 e 100

kGy, essas amostras tiveram seus dosímetros trocados após a dose atingir os primeiros 50 kGy.

4.3. Intumescência das cartilagens congeladas a -70 °C

Para testar a capacidade de intumescência das cartilagens, um fragmento congelado de cada doador (n=15) foi descongelado à temperatura ambiente e teve sua massa inicial aferida em uma balança de precisão (Libron AEL-40 SM - Shimadzu) e, a seguir, foi colocado em tubo de ensaio contendo 10 ml de soro fisiológico (0,9% NaCl) por 10 minutos. Decorrido este tempo, uma nova aferição de massa das amostras foi realizada, após absorver o excesso de soro fisiológico da superfície com papel filtro. Para verificar a capacidade de hidratação das amostras o valor da massa final foi subtraído do valor da massa inicial da mesma, determinando-se, assim, a diferença de massa existente entre as amostras antes e após o processo de hidratação. Os valores obtidos foram então divididos pelas respectivas massas iniciais e multiplicado por 100 para que fosse expresso em porcentagem.

O procedimento acima descrito foi também executado com tempo de incubação das amostras em soro fisiológico igual a 6 horas, assim como realizado por Sóhar et al. (2007) e Tóth et al. (2010).

4.4 Detecção de resíduos de glicerol por espectrometria no infravermelho

O experimento foi conduzido no equipamento Spectrum 10 FT-IR Spectrometer (PerkinElmer®) localizado no Centro de Tecnologia das Radiações

(CTR) do Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP). As amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (grupo controle) foram previamente descongeladas a temperatura ambiente por 30 minutos e as amostras preservadas em glicerol foram reidratadas em soro fisiológico por 3 passagens de 10 minutos para facilitar a difusão do mesmo, totalizando 30 minutos de reidratação e, antes de analisadas, as amostras foram secas com papel filtro para remover o excesso de soro em sua superfície, o qual poderia conter vestígios de glicerol.

Além disso, utilizamos como controle positivo de glicerol uma amostra dessa substância utilizada no procedimento de preservação.

4.5 Análise Térmica - Termogravimetria

A termogravimetria foi realizada na termobalança Shimadzu TGA-50 localizada no Laboratório de Caracterização dos Materiais (CTR/IPEN/CNEN-SP).

Para os experimentos termogravimétricos, a balança foi configurada para aquecer a amostra a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até alcançar $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, após atingir essa temperatura, a mesma foi mantida constante por 60 minutos. Essa configuração é determinada pela Norma NBR 7190 para ensaios de verificação de umidade residual.

De modo a diminuir a margem de erro do ensaio, o primeiro ensaio do dia era realizado com a balança vazia (“branco”). A variação da massa encontrada nesse primeiro ensaio era reduzida dos ensaios posteriores.

De forma a comparar o comportamento termogravimétrico das diferentes regiões da cartilagem, as amostras a serem analisadas foram obtidas das regiões superficial e interna da cartilagem e possuíam massa variando entre 3 e 12 mg.

Antes de analisadas, as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongeladas em temperatura ambiente e as amostras preservadas em glicerol foram reidratadas em 2 passagens de 15 minutos em soro fisiológico.

A partir dos gráficos gerados pelo software TA-60 (Shimadzu®) (Fig. 4.5.1) foram selecionados 5 pontos da região linear da curva para o cálculo do valor da taxa de desidratação de cada amostra, o qual foi obtido por meio do cálculo de regressão linear dos pontos, utilizando o software Microsoft Excell 2010®, em que o módulo do coeficiente angular ($|m|$) é o equivalente geométrico da taxa de desidratação (σ), o qual é representado graficamente pela tangente do ângulo θ .

Figura 4.5.1 – gráfico gerado pelo software de análise térmica TA-60 com reta referência indicando a região linear da curva termogravimétrica e a inclinação desta reta (ângulo θ).

Como podemos observar nas equações a seguir, a taxa de desidratação (σ) é a relação entre a variação na porcentagem de massa e a variação de tempo para que essa variação tenha ocorrido. Assim, podemos expressar essa relação como:

$$\sigma = \frac{\Delta m}{\Delta t} \quad [13]$$

Ainda, podemos obter o mesmo valor de σ pelo cálculo da tangente do ângulo θ :

$$\operatorname{tg} \theta = \frac{\Delta m}{\Delta t} = \sigma \quad [14]$$

O valor da umidade residual foi obtido pela subtração do valor da massa ao final do experimento de sua massa inicial, a qual é 100%, ou seja, $100\% - m_i(\%)$.

Para obter as curvas médias de cada forma de preservação e doses de radiação, bem como de cada região da cartilagem, os dados obtidos pelo software TA-60 foram exportados em formato ASCII e plotados em uma planilha eletrônica (Microsoft Excell 2010 ®) na qual os valores de tempo e massa foram ajustados. Após o ajuste, os valores médios do sinal de termogravimetria foram obtidos e plotados em gráficos, para os quais foram calculadas as equações das retas ($y=ax+b$) da porção linear e suas respectivas correlações (R^2).

4.6 Análise estrutural por OCT

As amostras foram analisadas no Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares sob supervisão do Dr. Anderson Zanardi Freitas no equipamento OCP930SR (Thorlabs). O sistema de OCT utiliza como fonte óptica um led superluminescente (SLD), com largura espectral de 100 ± 5 nm e centrado em 930 nm, com potência de 2 mW na amostra. As

imagens com resolução lateral e longitudinal de 6,2 microns são geradas pelo deslocamento do ponto focal na amostra por espelhos acoplados a um galvanômetro. A luz é focalizada na amostra com uma lente de 5 cm de distância focal. Os dados são adquiridos e armazenados num microcomputador para posterior processamento.

Antes de analisadas, as amostras congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente e as amostras preservadas em glicerol foram reidratadas em soro fisiológico.

Para uma melhor análise estatística, de cada amostra foram realizadas 5 medições, contabilizando um total de 75 medições por dose de radiação. Os arquivos contendo os dados obtidos nas medições foram analisados por um software desenvolvido pelo Dr. Anderson Zanardi de Freitas, por meio do qual foram obtidos os valores dos coeficientes de atenuação total dos fótons, os quais foram plotados em uma planilha do software Microsoft Excell 2010 para posterior análise estatística.

4.7 Análise da orientação das fibras colágenas por meio de Tomografia por Coerência Óptica sensível a Polarização (PS-OCT)

O PS-OCT foi realizado utilizando-se o aparelho recém adquirido OCT 1300 SS com um módulo de polarização PSOCT 1300. O sistema OCT 1300 SS possui comprimento de onda centrado em 1325 nm com 10 mW de potência na amostra.

Após a análise das amostras descritas no item 4.6, procedeu-se à análise

das mesmas por meio de PS-OCT. Assim como no caso anterior, foram realizadas 5 medições de regiões distintas de uma mesma amostra. Os resultados apresentados no item 5.6 são imagens selecionadas de diferentes amostras, sendo que cada par de imagens (OCT/PS-OCT) é proveniente da mesma amostras e da mesma região.

A sensibilidade à polarização é verificada pela presença de “franjas” nas imagens, as quais são originadas pela translação completa (2π) do vetor resultante do campo elétrico, transformado em espectro de cores usando como referência o padrão da FIG. 4.7.1.

Figura 4.7.1 – Padrão de cores utilizado para representar o retardo de fase.

4.8 Análise morfológica por microscopia óptica

Com o intuito de comparar as imagens obtidas pelas técnicas de OCT e PS-OCT com as imagens obtidas por microscopia óptica, uma amostra de cada grupo experimental foi processada para a obtenção de cortes histológicos e corada de três maneiras diferentes, a saber: Hematoxilina de Harris e Eosina (HE), Tricrômio de Masson e Picro Sirius.

A preparação de lâminas histológicas para visualização do aspecto microscópico das cartilagens preservadas e irradiadas seguiu o seguinte protocolo:

a) Processamento, inclusão e obtenção dos cortes:

Após a fixação dos fragmentos, feita em formol 10%, as amostras foram

colocadas em ácido fórmico (10% em água) por 4 horas e, a seguir, foram desidratadas em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70-100%) e diafanizadas em xilol. Três banhos de 2 horas em parafina precederam a inclusão em bloco no mesmo material. No quadro 4.8.1 podemos verificar o tempo de desidratação e parafinização:

Quadro 4.8.1 – Processo de desidratação e parafinização das amostras de cartilagem:

Solução	Tempo (horas)
Álcool 70%	1
Álcool 95%	1
Álcool absoluto	6
Xilol	3
Parafina	6

b) Cortes, coloração e montagem:

Após o procedimento de desidratação e parafinização foram obtidos cortes com 5 µm de espessura, em micrótomo manual (Leica – RM 2145).

Os cortes uma vez coletados em lâminas foram desparafinizados, as lâminas foram coradas pelos métodos Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) (Quadro 4.8.2), Tricrômio de Masson (Quadro 4.8.3) e Picro Sirius (Quadro 4.8.4). Após cada procedimento de coloração, as lâminas foram montadas em bálsamo de Fisher.

Quadro 4.8.2 – Procedimento para corar as lâminas histológicas pelo método HE

Solução	Tempo
Xilol I	10 min.
Xilol II	10 min.
Álcool absoluto	5 min.
Álcool 95%	5 min.
Álcool 70%	5 min.
Lavagem em água corrente	3 min.
Hematoxilina	5 min.
Diferenciador	rápido
Eosina	1 min.
Lavagem rápida	
Álcool 70%	30 seg.
Álcool 95%	30 seg.
Álcool absoluto	3 min.
Álcool absoluto	5 min.
Álcool/Xilol (1:1)	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.

Quadro 4.8.3 – Procedimento para corar as lâminas histológicas pelo método Tricrômio de Masson.

Solução	Tempo
Xilol I	10 min.
Xilol II	10 min.
Álcool absoluto	5 min.
Álcool 95%	5 min.
Álcool 70%	5 min.
Lavagem em água corrente	3 min.
Solução A - Fucsina	2 min.
Lavagem em água corrente	5 min.
Solução B – Azul de anilina aquosa e ácido fosforo molibdico	20 min.
Solução C – Azul de anilina aquosa	10 min.
Lavagem rápida	
Álcool 70%	30 seg.
Álcool 95%	30 seg.
Álcool absoluto	3 min.
Álcool absoluto	5 min.
Álcool/Xilol (1:1)	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.

Quadro 4.8.4 – Procedimento para corar as lâminas histológicas pelo método Picro Sirius.

Solução	Tempo
Xilol I	10 min.
Xilol II	10 min.
Álcool absoluto	5 min.
Álcool 95%	5 min.
Álcool 70%	5 min.
Lavagem em água corrente	3 min.
Solução de Picro Sirius Red a 0,2% em solução saturada de ácido pícrico	1 hora
Lavagem rápida em água corrente	5 min.
Hematoxilina de Harris	8 min.
Lavagem rápida em água corrente	5 min.
Álcool 70%	30 seg.
Álcool 95%	30 seg.
Álcool absoluto	3 min.
Álcool absoluto	5 min.
Álcool/Xilol (1:1)	5 min.
Xilol	5 min.
Xilol	5 min.

c) Visualização e documentação fotográfica:

As lâminas foram visualizadas no microscópio óptico da Linha Pró com aumento de 100x. A documentação fotográfica foi realizada por meio de uma câmera digital SAMSUNG acoplada ao microscópio.

4.9 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média dos valores ($\bar{X}$) $\pm$ erro padrão (E). Após a verificação da distribuição normal dos dados, os resultados foram comparados estatisticamente, em relação ao grupo controle, por meio de

One-way ANOVA, sendo que os resultados que apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) são marcados nos gráficos com o símbolo “*” ou múltiplos desse símbolo.

5. RESULTADOS

5.1 Intumescência das cartilagens congeladas a -70 °C

De forma a compreender melhor a dinâmica de hidratação e desidratação das cartilagens, testamos a capacidade de intumescência das cartilagens congeladas, uma vez que a quantidade de água nesse tecido se manteve praticamente inalterada após sua ablação do doador e, assim, podemos verificar se a hidratação do tecido é máxima, o que poderia explicar possíveis diferenças na quantidade de água após o processo de preservação das amostras em glicerol e sua reidratação.

O gráfico da FIG. 5.1.1 foi plotado com os valores mostrados na tabela 5.1.1 nos quais podemos verificar a intumescência nas cartilagens congeladas a -70 °C. Como podemos notar, a quantidade de água nas cartilagens congeladas não é máxima, sendo que as mesmas ainda conseguem aumentar sua massa em aproximadamente 9%.

Tabela 5.1.1 – Intumescência das cartilagens congeladas a -70 °C após sua hidratação por 10 minutos

Amostra	Massa inicial (m ₀)	Massa final (m)	Varição da massa (Δm)	Varição da massa (%)
1	0,23078	0,25442	0,02364	10,24
2	0,23742	0,25126	0,01384	5,83
3	0,17072	0,18313	0,01241	7,27
4	0,24977	0,27746	0,02769	11,09
5	0,23906	0,26087	0,02181	9,12
6	0,24077	0,26094	0,02017	8,38
7	0,20966	0,22974	0,02008	9,58
8	0,14257	0,15806	0,01549	10,86
9	0,16381	0,17762	0,01381	8,43
10	0,13565	0,14545	0,00980	7,22
11	0,11140	0,11568	0,00428	3,84
12	0,09952	0,11465	0,01513	15,2
13	0,10555	0,11184	0,00629	5,96
14	0,16423	0,17532	0,01109	6,75
15	0,19634	0,21655	0,02021	10,29
			$\bar{x}$	8,67
			<i>E</i>	0,71

Figura 5.1.1 – Intumescência em amostras congeladas a -70 °C promovida pela hidratação em soro fisiológico por 10 minutos.

Na TAB. 5.1.2 e no gráfico da FIG. 5.1.2 podemos verificar o acréscimo de massa quando as amostras são hidratadas por um período de 6 horas.

Tabela 5.1.2 – Intumescência das cartilagens congeladas a -70 °C após sua hidratação por um período de 6 horas

Amostra	Massa inicial (m ₀)	Massa final (m)	Varição da massa (Δm)	Varição da massa (%)
1	0,18585	0,21054	0,02469	13,28
2	0,19757	0,22042	0,02285	11,57
3	0,17987	0,20843	0,02856	15,88
4	0,21974	0,23874	0,01900	8,65
5	0,24098	0,26847	0,02749	11,41
			$\bar{x}$	12,16
			E	0,68

Figura 5.1.2 – Intumescência em amostras congeladas a -70 °C promovida pela hidratação em soro fisiológico por 6 horas.

O teste ANOVA mostrou que existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de hidratação das amostras.

5.2 Detecção de resíduos de glicerol por espectrometria no infravermelho

Como as amostras preservadas em glicerol são reidratadas antes dos procedimentos experimentais, surge a dúvida se existem vestígios de glicerol nos tecidos ou se este é completamente removido durante a reidratação. De forma a compreender melhor esse evento, foi realizado um experimento de infravermelho para detectar a possível presença de glicerol nas amostras de cartilagem costal humana.

5.2.1 Cartilagem congelada a -70 °C

Na FIG. 5.2.1.1 podemos ver a absorção no espectro infravermelho pela cartilagem congelada a -70 °C e na FIG. 5.2.1.2 podemos ver a comparação entre a absorção dessa mesma amostra comparada com a absorção do glicerol.

Figura 5.2.1.1 – Espectro de absorção infravermelho da cartilagem congelada a -70 °C.

Figura 5.2.1.2 - Espectro de absorção infravermelho da cartilagem congelada a -70 °C (linha preta) e espectro de absorção do glicerol (linha verde).

5.2.2 Cartilagem preservada em glicerol

Na FIG. 5.2.2.1 podemos ver a absorção no espectro infravermelho pela cartilagem preservada em glicerol e na FIG. 5.2.2.2 podemos ver a comparação entre a absorção dessa mesma amostra comparada com a absorção do glicerol.

Como podemos observar na FIG. 5.2.2.2, mesmo após o processo de reidratação por 3 passagens de 10 minutos cada, ainda existem vestígios de glicerol na amostra (setas vermelhas).

Figura 5.2.2.1 - Espectro de absorção no infravermelho da cartilagem reidratada após preservação em glicerol.

Figura 5.2.2.2 - Espectro de absorção no infravermelho da cartilagem preservada em glicerol (linha verde) e espectro de absorção do glicerol (linha preta). Setas em vermelho indicam a presença de picos correspondentes ao glicerol.

5.2.3 Comparação do espectro de absorção de infravermelho entre a cartilagem congelada a -70 °C e cartilagem preservada em glicerol.

Na FIG. 5.2.3.1 podemos observar a absorção em infravermelho para a cartilagem congelada a -70 °C e para cartilagem preservada em glicerol e reidratada.

Figura 5.2.3.1 – Comparação entre o espectro de absorção no infravermelho da cartilagem congelada a -70 °C e da cartilagem preservada em glicerol e reidratada.

5.3 Análise Térmica - Termogravimetria

5.3.1 Região superficial da cartilagem

5.3.1.1 Taxa de desidratação

Na TAB. 5.3.1.1.1 podemos identificar os valores obtidos pela regressão linear de cinco pontos colineares da curva termogravimétrica (região supostamente constante) das amostras congeladas a -70 °C e na TAB 5.3.2.1.2 podemos identificar os mesmos resultados das amostras preservadas em glicerol e reidratada.

Tabela 5.3.1.1.1 – Resultado da regressão linear das curvas termogravimétricas da região superficial das cartilagens congeladas a -70 °C

Amostra	Controle		15 kGy		25 kGy		50 kGy	
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²
1	4,73	0,99	6,93	0,99	6,94	0,99	7,24	0,99
2	5,78	0,98	6,25	0,99	6,39	0,99	6,67	0,98
3	6,19	0,99	7,38	0,99	8,47	0,99	8,96	0,99
4	7,24	0,99	6,69	0,98	7,51	0,99	8,30	0,99
5	4,97	0,99	5,61	0,99	8,45	0,99	8,43	0,99
6	7,73	0,99	5,85	0,99	5,69	0,99	5,37	0,98
7	10,11	0,99	7,91	0,99	7,31	0,99	7,04	0,98
8	8,93	0,99	9,49	0,99	7,6	0,99	8,3	0,99
9	7,24	0,99	5,72	0,99	6,36	0,99	7,31	0,99
10	8,00	0,99	4,48	0,99	7,08	0,99	6,93	0,97
11	8,07	0,99	6,11	0,99	6,17	0,99	6,67	0,99
12	8,67	0,99	4,81	0,98	6,89	0,99	5,43	0,99
13	7,23	0,99	7,42	0,99	9	0,99	7,31	0,99
14	8,12	0,99	5,55	0,99	5,73	0,99	8,19	0,99
15	8,96	0,99	5,79	0,99	5,29	0,99	7,22	0,99
$\bar{x} \pm E$	7,43±0,39	0,99±0	6,39±0,33	0,99±0	6,99±0,28	0,99±0	7,29±0,26	0,99±0

|m| = módulo do coeficiente angular, equivalente à taxa de desidratação (%m/min).

R² = correlação entre as variáveis.

Tabela 5.3.1.1.2 – Resultado da regressão linear das curvas termogravimétricas da região superficial das cartilagens preservadas em glicerol

Amostra	Controle		15 kGy		25 kGy		50 kGy	
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²
1	8,56	0,99	7,46	0,99	8,48	0,99	9,52	0,99
2	5,27	0,98	7,29	0,99	6,03	0,99	8,27	0,98
3	10,15	0,99	8,42	0,99	8,97	0,99	7,72	0,99
4	10,11	0,99	9,03	0,98	5,95	0,99	7,50	0,99
5	10,23	0,99	6,59	0,99	9,03	0,99	4,56	0,99
6	7,06	0,99	8,18	0,99	7,96	0,99	5,36	0,98
7	6,76	0,99	9,15	0,99	8,84	0,99	8,85	0,98
8	7,41	0,99	9,36	0,99	7,63	0,99	10,15	0,99
9	5,82	0,99	9,23	0,99	7,79	0,99	10,69	0,99
10	4,46	0,99	7,77	0,99	7,22	0,99	9,12	0,99
11	5,63	0,99	7,77	0,99	6,97	0,99	7,38	0,99
12	9,32	0,99	7,62	0,98	5,75	0,99	7,40	0,99
13	3,01	0,99	8,89	0,99	5,58	0,99	7,52	0,99
14	3,81	0,99	8,22	0,99	7,11	0,99	5,73	0,99
15	8,73	0,99	7,52	0,99	6,67	0,99	8,18	0,99
$\bar{x} \pm S$	7,09 ± 0,62	0,99 ± 0	8,17 ± 0,21	0,99 ± 0	7,33 ± 0,30	0,99 ± 0	7,86 ± 0,44	0,99 ± 0

|m| = módulo do coeficiente angular, equivalente à taxa de desidratação (%m/min).

R² = correlação entre as variáveis.

Na FIG. 5.3.1.1.1 podemos notar a variação da taxa de desidratação das cartilagens congeladas a -70 °C e na FIG. 5.3.1.1.2 podemos ver a variação da taxa de desidratação das cartilagens preservadas em glicerol e reidratada.

Ao se comparar os grupos controles de ambas formas de preservação encontramos um $p=0,61$, denotando não haver diferença estatisticamente significativa entre as formas de preservação da cartilagem.

Figura 5.3.1.1.1 – Variação da taxa de desidratação da região superficial das cartilagens congeladas a -70 °C de acordo com a dose de radiação ionizante. O símbolo * foi utilizado para representar grupos que apresentam média estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Figura 5.3.1.1.2 - Variação da taxa de desidratação da região superficial das cartilagens preservadas em glicerol de acordo com a dose de radiação ionizante.

5.3.1.2 Umidade total

A quantidade média de água presente na região superficial das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e nas cartilagens preservadas em glicerol podem ser observadas nas TAB. 5.3.1.2.1 e TAB. 5.3.1.2.2. Para melhor visualizar a influência das formas de preservação, os mesmo valores são plotados no gráfico da FIG. 5.3.1.2.1. Note que a quantidade de água nas amostras preservadas em glicerol e reidratadas são superiores às aquelas congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, independente da dose de irradiação.

Tabela 5.3.1.2.1 – Quantidade média de água na região superficial das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Controle	15 kGy	25 kGy	50 kGy
$\bar{x} \pm E$	$47,16 \pm 2,03\%$	$51,02 \pm 1,21\%$	$55,08 \pm 1,58\%$	$53,01 \pm 1,46\%$

Tabela 5.3.1.2.2 – Quantidade média de água na região superficial das cartilagens preservadas em glicerol

	Controle	15 kGy	25 kGy	50 kGy
$\bar{x} \pm E$	$61,71 \pm 2,08\%$	$63,77 \pm 1,08\%$	$63,89 \pm 0,95\%$	$67,62 \pm 1,26\%$

Figura 5.3.1.2.1 – Umidade total das amostras congeladas a -70 °C e das amostras preservadas em altas concentração de glicerol. O símbolo * foi utilizado para evidenciar os grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o grupo controle congelado a -70 °C e o símbolo ** para o grupo controle preservado em glicerol. O símbolo *** foi utilizado para destacar a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as formas de preservação.

5.3.1.3 Curvas termogravimétricas médias

Nas FIG. 5.3.1.3.1 e FIG. 5.3.1.3.2 podemos ver as curvas termogravimétricas médias das cartilagens congeladas a -70 °C e preservadas em glicerol, respectivamente. Note a pequena diferença entre as curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol (FIG. 5.3.1.3.2) quando comparadas às congeladas a -70 °C (FIG. 5.3.1.3.1).

Figura 5.3.1.3.1 – Curvas termogravimétricas média da região superficial das cartilagens congeladas a -70 °C não irradiadas e irradiadas com doses de 15, 25 e 50 kGy.

Tabela 5.3.1.3.1 – Equações de reta obtidas por regressão linear das curvas TG médias da região interna das cartilagens congeladas a -70 °C. O valor de x é dado em minutos e y em % de massa

Dose (kGy)	Equação de reta	R ²
0	$y = -0,10x + 114,42$	0,99
15	$y = -0,10x + 114,68$	0,99
25	$y = -0,12x + 126,49$	0,99
50	$y = -0,13x + 118,12$	0,99

Figura 5.3.1.3.2 – Curvas termogravimétricas média da região superficial das cartilagens preservadas em glicerol não irradiadas e irradiadas com doses de 15, 25 e 50 kGy.

Tabela 5.3.1.3.2 – Equações de reta obtidas por regressão linear das curvas TG médias da região interna das cartilagens preservadas em glicerol. O valor de x é dado em minutos e y em % de massa

Dose (kGy)	Equação de reta	R ²
0	$y = -0,14x + 125,41$	0,99
15	$y = -0,13x + 126,05$	0,99
25	$y = -0,13x + 126,19$	0,99
50	$y = -0,14x + 123,01$	0,99

5.3.2 Região interna da cartilagem

5.3.2.1 Taxa de desidratação

Na TAB. 5.3.2.1.1 podemos identificar os valores obtidos pela regressão linear de três pontos colineares da curva termogravimétrica (região supostamente constante) das amostras congeladas a -70 °C e na TAB 5.3.2.1.2 podemos identificar os mesmos resultados das amostras preservadas em glicerol.

Tabela 5.3.2.1.1 – Resultado da regressão linear das curvas termogravimétricas da região interna das cartilagens congeladas a -70 °C

Amostra	Controle		15 kGy		25 kGy		50 kGy	
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²
1	6,13	0,99	6,01	0,99	4,64	0,99	6,19	0,99
2	5,59	0,98	4,78	0,99	6,43	0,99	5,15	0,98
3	8,82	0,99	5,26	0,99	5,71	0,99	5,76	0,99
4	9,13	0,99	5,81	0,98	8,10	0,99	7,22	0,99
5	7,37	0,99	6,47	0,99	5,34	0,99	6,07	0,99
6	6,09	0,99	3,63	0,99	4,85	0,99	5,81	0,98
7	7,58	0,99	6,22	0,99	6,08	0,99	5,19	0,98
8	9,08	0,99	6,46	0,99	6,99	0,99	7,50	0,99
9	8,79	0,99	7,80	0,99	7,79	0,99	6,51	0,99
10	5,59	0,99	5,13	0,99	7,75	0,99	5,12	0,99
11	6,16	0,99	6,95	0,99	6,81	0,99	7,21	0,99
12	5,49	0,99	5,66	0,98	6,97	0,99	4,49	0,99
13	6,28	0,99	6,75	0,99	7,06	0,99	6,43	0,99
14	6,88	0,99	7,20	0,99	4,73	0,99	6,19	0,99
15	5,72	0,99	6,35	0,99	4,47	0,99	4,91	0,99
$\bar{X} \pm E$	6,98 ± 0,36	0,99±0	6,03 ± 0,27	0,99±0	6,25 ± 0,32	0,99±0	5,98 ± 0,23	0,99±0

|m| = módulo do coeficiente angular, equivalente à taxa de desidratação (%m/min).

R² = correlação entre as variáveis.

Tabela 5.3.2.1.2 – Resultado da regressão linear das curvas termogravimétricas da região interna das cartilagens preservadas em glicerol e reidratadas

Amostra	Controle		15 kGy		25 kGy		50 kGy	
	m	R ²	m	R ²	m	R ²	m	R ²
1	8,22	0,99	8,57	0,99	7,17	0,98	8,77	0,99
2	7,83	0,99	7,37	0,99	7,21	0,99	6,31	0,99
3	7,34	0,99	8,07	0,99	7,17	0,99	7,64	0,99
4	7,13	0,99	7,46	0,99	8,61	0,99	7,04	0,99
5	7,64	0,99	5,86	0,99	6,42	0,99	7,08	0,99
6	9,23	0,99	6,30	0,99	5,89	0,99	7,11	0,99
7	6,37	0,99	7,18	0,99	9,11	0,99	6,64	0,99
8	8,45	0,99	7,79	0,99	6,41	0,99	8,91	0,99
9	7,02	0,99	8,22	0,99	8,26	0,99	8,43	0,99
10	7,51	0,98	9,36	0,99	7,95	0,99	8,26	0,99
11	7,36	0,99	5,48	0,99	8,62	0,99	8,94	0,99
12	7,10	0,99	8,49	0,99	8,23	0,99	7,05	0,99
13	7,35	0,99	8,81	0,98	8,48	0,99	7,71	0,99
14	6,77	0,99	6,93	0,99	3,50	0,99	5,41	0,99
15	6,10	0,99	7,95	0,99	8,97	0,99	7,07	0,99
$\bar{x} \pm E$	7,42 ±0,20	0,99±0	7,58 ±0,28	0,99±0	7,46 ±0,38	0,99±0	7,49 ±0,26	0,99±0

|m| = módulo do coeficiente angular, equivalente à taxa de desidratação (%m/min).

R² = correlação entre as variáveis.

Na FIG. 5.3.2.1.1 podemos notar a variação da taxa de desidratação das cartilagens congeladas a -70 °C e na FIG. 5.3.2.1.2 podemos ver a variação da taxa de desidratação das cartilagens preservadas em glicerol e reidratadas. Como podemos notar nas figuras, cartilagens irradiadas com 15, 25 e 50 kGy apresentam uma taxa de desidratação média inferior ao controle, embora as cartilagens irradiadas com 25 kGy não apresentem uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 5.3.2.1.1 – Variação da taxa de desidratação da região interna das cartilagens congeladas a -70 °C de acordo com a dose de radiação ionizante. O símbolo * foi utilizado para representar grupos que apresentam média estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo controle.

Na figura 5.3.2.1.2 podemos notar que a taxa de desidratação nas cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com doses de 15, 25 e 50 kGy não são estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Figura 5.3.2.1.2 - Variação da taxa de desidratação da região interna das cartilagens preservadas em glicerol de acordo com a dose de radiação ionizante.

Ao se comparar os grupos controles de ambas formas de preservação encontramos um $p=0,28$, denotando não haver diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre as formas de preservação da cartilagem.

5.3.2.2 Umidade total

A quantidade média de água presente na região interna das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e nas cartilagens preservadas em glicerol podem ser observadas nas TAB. 5.3.2.2.1 e TAB. 5.3.2.2.2. Para melhor visualizar a influência das formas de preservação, os mesmo valores são plotados no gráfico da FIG. 5.3.2.2.1. Note que a quantidade de água nas amostras preservadas em glicerol são superiores às aquelas congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, independente da dose de irradiação.

Tabela 5.3.2.2.1 – Quantidade média de água na região interna das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Controle	15 kGy	25 kGy	50 kGy
$\bar{x} \pm S$	$50,93 \pm 1,83\%$	$45,78 \pm 1,37\%$	$47,06 \pm 1,33\%$	$45,63 \pm 1,00\%$

Tabela 5.3.2.2.2 – Quantidade média de água na região interna das cartilagens preservadas em glicerol e reidratadas

	Controle	15 kGy	25 kGy	50 kGy
$\bar{x} \pm S$	$59,07 \pm 1,03\%$	$58,47 \pm 0,92\%$	$58,09 \pm 1,77\%$	$60,62 \pm 1,0\%$

Figura 5.3.2.2.1 – Umidade total das amostras congeladas a -70 °C e das amostras preservadas em altas concentração de glicerol. O símbolo * foi utilizado para evidenciar os grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o grupo controle congelado a -70 °C e o símbolo *** foi utilizado para destacar a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as formas de preservação. Note que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras preservadas em glicerol.

5.3.2.3 Curvas termogravimétricas médias

Nas FIG. 5.3.2.3.1 e FIG. 5.3.2.3.2 podemos ver as curvas termogravimétricas médias das cartilagens congeladas a -70 °C e preservadas em glicerol, respectivamente. Note a pequena diferença entre as curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol (FIG. 5.3.2.3.2) quando comparadas às congeladas a -70 °C (FIG. 5.3.2.3.1). Nas TAB. 5.3.2.3.1 e TAB. 5.3.2.3.2 podemos verificar os valores das equações de reta que descrevem o comportamento térmico da região interna das cartilagens congeladas a -70 °C e das cartilagens preservadas em glicerol e reidratadas.

Figura 5.3.2.3.1 – Curvas termogravimétricas média da região interna das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ não irradiadas e irradiadas com doses de 15, 25 e 50 kGy.

Tabela 5.3.2.3.1 – Equações de reta obtidas por regressão linear das curvas TG médias da região interna das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. O valor de x é dado em segundos

Dose (kGy)	Equação de reta	R^2
0	$y = -0,11x + 109,29$	0,99
15	$y = -0,07x + 99,17$	0,98
25	$y = -0,08x + 105,53$	0,99
50	$y = -0,07x + 101,31$	0,99

Figura 5.3.2.3.2 – Curvas termogravimétricas média da região interna das cartilagens preservadas em glicerol não irradiadas e irradiadas com doses de 15, 25 e 50 kGy.

Tabela 5.3.2.3.2 – Equações de reta obtidas por regressão linear das curvas TG médias da região interna das cartilagens preservadas em glicerol. O valor de x é dado em segundos

Dose (kGy)	Equação de reta	R ²
0	$y = -0,12x + 121,90$	0,99
15	$y = -0,13x + 120,80$	0,99
25	$y = -0,09x + 109,07$	0,94
50	$y = -0,13x + 120,48$	0,99

5.4 Análise estrutural por OCT

5.4.1 Imagens das cartilagens congeladas a -70 °C

Todas as imagens das cartilagens congeladas a -70 °C obtidas por OCT utilizadas para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica total podem ser encontradas nos apêndices B, C, D, E, F e G (controle, 15, 25, 50, 75 e 100 kGy, respectivamente), constando de 5 imagens obtidas de cada amostra para 15 doadores. De forma ilustrativa, nas FIG. 5.4.1.1, 5.4.1.2, 5.4.1.3, 5.4.1.4, 5.4.1.5 e 5.4.1.6 podemos observar exemplos representativos da atenuação óptica no tecido de amostras do grupo controle e irradiadas com doses de 15, 25, 50, 75 e 100 kGy, respectivamente.

Figura 5.4.1.1 – OCT de cartilagem costal humana congelada e não irradiada.

Figura 5.4.1.2 – OCT de cartilagem costal humana congelada e irradiada com dose de 15 kGy.

Figura 5.4.1.3 – OCT de cartilagem costal humana congelada e irradiada com dose de 25 kGy.

Figura 5.4.1.4 – OCT de cartilagem costal humana congelada e irradiada com dose de 50 kGy.

Figura 5.4.1.5 – OCT de cartilagem costal humana congelada e irradiada com dose de 75 kGy.

Figura 5.4.1.6 – OCT de cartilagem costal humana congelada e irradiada com dose de 100 kGy.

5.4.2 Imagens das cartilagens preservadas em glicerol

Da mesma maneira como apresentado para as cartilagens congeladas, as imagens das cartilagens preservadas em glicerol obtidas por OCT utilizadas para o cálculo do coeficiente de atenuação óptica total podem ser encontradas nos apêndices H, I, J, K, L e M (controle, 15, 25, 50, 75 e 100 kGy, respectivamente). De forma ilustrativa, nas FIG. 5.4.2.1, 5.4.2.2, 5.4.2.3, 5.4.2.4, 5.4.2.5 e 5.4.2.6 podemos observar exemplos representativos da atenuação óptica no tecido de amostras do grupo controle e irradiadas com doses de 15, 25, 50, 75 e 100 kGy, respectivamente.

Figura 5.4.2.1 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e não irradiada.

Figura 5.4.2.2 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com dose de 15 kGy.

Figura 5.4.2.3 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com dose de 25 kGy.

Figura 5.4.2.4 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com dose de 50 kGy.

Figura 5.4.2.5 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com dose de 75 kGy.

Figura 5.4.2.6 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com dose de 100 kGy.

5.4.3 Cálculo do coeficiente de atenuação óptico total

Na TAB 5.4.3.1 podemos identificar os resultados do cálculo do coeficiente de atenuação óptico total das cartilagens congeladas a -70°C e na TAB. 5.4.3.2 podemos visualizar os mesmos resultados para as cartilagens preservadas em glicerol.

Tabela 5.4.3.1 – Valores médios dos coeficientes de atenuação óptico total (cm^{-1}) das cartilagens congeladas a -70°C e seus respectivos desvios padrões

Dose	0 kGy	15 kGy	25 kGy	50 kGy	75 kGy	100 kGy
	$17,4 \pm 1,57$	$23,8 \pm 2,53$	$18,5 \pm 1,21$	$15,2 \pm 1,42$	$14,2 \pm 1,42$	$12,6 \pm 2,50$

Tabela 5.4.3.2 – Valores médios dos coeficientes de atenuação óptico total (cm^{-1}) das cartilagens preservadas em glicerol e seus respectivos desvios padrões

Dose	0 kGy	15 kGy	25 kGy	50 kGy	75 kGy	100 kGy
	$18,7 \pm 2,66$	$22,9 \pm 2,42$	$19,1 \pm 2,07$	$17,5 \pm 2,12$	$16,3 \pm 1,98$	$15,6 \pm 2,09$

Ao se comparar os valores dos coeficientes de atenuação óptica total entre os grupos controles, encontramos $p=0,35$, denotando não haver diferença estatisticamente significativa entre as formas de preservação.

Na FIG. 5.4.3.1 podemos visualizar o valor médio da variação do coeficiente de atenuação óptica total para as diferentes doses de radiação das cartilagens congeladas a -70°C e na FIG 5.4.3.2 das amostras preservadas em glicerol.

Figura 5.4.3.1 – Coeficiente de atenuação óptica total das amostras congeladas a -70 °C. O símbolo * foi utilizado para representar grupos que apresentam média estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao o grupo controle.

Figura 5.4.3.2 – Coeficiente de atenuação óptica total das amostras preservadas em glicerol. O símbolo * foi utilizado para representar grupos que apresentam média estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao o grupo controle.

5.4.4 Comparação entre os valores médios do coeficiente de atenuação óptica total e os valores médios da tensão de ruptura.

De forma a comparar os resultados do coeficiente de atenuação óptica total com os valores da tensão de ruptura obtidos anteriormente (Martinho Junior, 2008), foram plotados os gráficos da FIG. 5.4.4.1 para amostras congeladas a -70°C e da FIG. 5.4.4.2 para amostras preservadas em glicerol. Note que existe uma estreita relação entre o comportamento mecânico das cartilagens com o coeficiente de atenuação óptica total, visto que ocorre uma elevação para ambas as propriedades medidas quando as cartilagens são irradiadas com 15 kGy. Além

disso, podemos verificar uma diminuição de ambas propriedades quando as cartilagens são irradiadas com doses de 25 e 50 kGy.

Figura 5.4.4.1 – Comparação entre a tensão média de ruptura com o coeficiente de atenuação óptica total das cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com diferentes doses. O símbolo ** foi utilizado para destacar os valores que apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$) em relação ao coeficiente de atenuação óptica total.

Figura 5.4.4.2 - Comparação entre a tensão média de ruptura com o coeficiente de atenuação óptica total das cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com diferentes doses. O símbolo * foi utilizado para destacar os valores que apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$) em relação a tensão de ruptura e o símbolo ** em relação ao coeficiente de atenuação óptica total.

5.4.5 Comparação entre os valores médios do coeficiente de atenuação óptica total e os valores médios da taxa de desidratação.

De forma a comparar a taxa de desidratação com o coeficiente de atenuação óptica total das cartilagens foram plotados os gráficos da FIG. 5.4.5.1 para as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e da FIG. 5.4.5.2 para as amostras preservadas em glicerol. Note a relação inversamente proporcional para as amostras irradiadas com dose de 15 kGy.

Figura 5.4.5.1 - Comparação entre a taxa de desidratação com o coeficiente de atenuação óptica total das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com diferentes doses. O símbolo * foi utilizado para destacar os valores que apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$) em relação a taxa de desidratação e o símbolo ** em relação ao coeficiente de atenuação óptica total.

Figura 5.4.5.2 - Comparação entre a taxa de desidratação com o coeficiente de atenuação óptica total das cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com diferentes doses. O símbolo ** foi utilizado para destacar os valores que apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$) em relação ao coeficiente de atenuação óptica total.

5.5 Análise da orientação das fibras colágenas por meio de Tomografia por Coerência Óptica sensível à Polarização (PS-OCT)

Como demonstrado matematicamente no item 3.7.3.2.4, a birrefringência das fibras colágenas é capaz de ser verificada por meio da técnica de PS-OCT. Utilizando o padrão de cores de referência, podemos observar que a formação das imagens se dá com a variação do ângulo de incidência do feixe de luz, como podemos verificar na FIG. 5.5.1 para cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e na FIG. 5.5.2 para as cartilagens preservadas em glicerol. Note o surgimento de “franjas” quando o ângulo de incidência da luz se aproxima de 45° .

Figura 5.5.1 – Verificação da birrefringência das fibras colágenas na cartilagem hialina congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ de acordo com o ângulo de incidência da luz. As cores apresentadas nas figuras estão relacionadas com o ângulo de rotação do vetor resultante do campo eletromagnético e segue o padrão representado como referência, variando de 0 a π .

Figura 5.5.2 – Verificação da birrefringência das fibras colágenas na cartilagem hialina congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ de acordo com o ângulo de incidência da luz. As cores apresentadas nas figuras estão relacionadas com o ângulo de rotação do vetor resultante do campo eletromagnético e segue o padrão representado como referência, variando de 0 a π .

Nas FIG. 5.5.3 a FIG. 5.5.8 podemos observar a birrefringência das cartilagens congeladas a -70°C não irradiadas e irradiadas com doses de 15, 25, 50, 75 e 100 kGy, respectivamente.

Figura 5.5.3 – Birrefringência observada nas cartilagens congeladas a -70°C não irradiadas.

Note nas imagens acima a formação de “frangas” que representam o retardo de fase causado pela birrefringência das moléculas de colágeno.

Figura 5.5.4 – Birrefringência observada nas cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ irradiadas com 15 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 15 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persistem após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.5 – Birrefringência observada nas cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ irradiadas com 25 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 25 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persistem após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.6 – Birrefringência observada nas cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ irradiadas com 50 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 50 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persistem após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.7 – Birrefringência observada nas cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ irradiadas com 75 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 75 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persistem após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.8 – Birrefringência observada nas cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ irradiadas com 100 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 100 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persistem após a irradiação das mesmas.

Nas FIG. 5.5.9 a FIG. 5.5.14 podemos observar a birrefringência das cartilagens preservadas em glicerol não irradiadas e irradiadas com doses de 15, 25, 50, 75 e 100 kGy, respectivamente.

Figura 5.5.9 – Birrefringência observada nas cartilagens preservadas em glicerol não irradiadas.

Note nas imagens acima a formação de “franjas” que representam o retardo de fase causado pela birrefringência das moléculas de colágeno.

Figura 5.5.10 – Birrefringência observada nas cartilagens preservadas em glicerol irradiadas com 15 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 15 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persiste após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.11 – Birrefringência observada nas cartilagens preservadas em glicerol irradiadas com 25 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 25 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persiste após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.12 – Birrefringência observada nas cartilagens preservadas em glicerol irradiadas com 50 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 50 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persiste após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.13 – Birrefringência observada nas cartilagens preservadas em glicerol irradiadas com 75 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 75 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persiste após a irradiação das mesmas.

Figura 5.5.14 – Birrefringência observada nas cartilagens preservadas em glicerol irradiadas com 100 kGy.

Note nas imagens acima o retardo de fase apresentado pelas amostras irradiadas com 100 kGy, denotando que a orientação das fibras de colágeno persiste após a irradiação das mesmas.

De forma a facilitar a comparação entre as imagens de PS-OCT das cartilagens preservadas de diferentes formas e irradiadas com diferentes doses, selecionamos algumas das imagens acima e as inserimos lado a lado (FIG. 5.5.15). Note que em ambas as formas de preservação e para todas as doses de radiação pode-se verificar o retardo de fase que evidencia a presença de uma estrutura birrefringente, nesse caso, o colágeno.

Figura 5.5.15 – Comparação entre as imagens de PS-OCT de cartilagens preservadas de diferentes formas e irradiadas com diferentes doses.

5.6 Análise morfológica por microscopia óptica

Da mesma forma como as imagens de OCT e PS-OCT foram comparadas anteriormente, na FIG 5.6.1 fazemos a comparação entre as amostras coradas por HE, na FIG. 5.6.2 entre as amostras coradas por Tricrômio de Masson e na FIG. 5.6.3 entre as amostras coradas por Picro Sírius.

Note que nas imagens obtidas por microscopia óptica e coradas por Tricrômio de Masson podemos identificar o colágeno (azul) e as proteoglicanas (vermelho) para ambas as formas de preservação e para todas as doses de radiação ionizante. Já para amostras coradas por Picro Sírius, note que coloração mais escura identifica a presença específica de colágeno.

Figura 5.6.1 – Comparação entre imagens de microscopia óptica de cartilagens coradas por HE e preservadas de diferentes formas e irradiadas com diferentes doses.

Note nas imagens acima a evidenciação dos condrócitos (seta azul), grupos isogênicos (seta preta) e lacunas deixadas pelos condrócitos devido ao processo de preparação das amostras, os quais são possíveis de serem identificados em todas as amostras. Ainda, podemos identificar um vaso sanguíneo que atravessa o tecido cartilaginoso (seta vermelha) no qual podemos visualizar a sua luz (L).

Figura 5.6.2 – Comparação entre imagens de microscopia óptica de cartilagens coradas por Tricrômio de Masson e preservadas de diferentes formas e irradiadas com diferentes doses.

Nas imagens acima podemos visualizar a distribuição da rede de colágeno (azul) predominantemente na região superficial da cartilagem. Corado em vermelho podemos identificar as proteoglicanas. Ainda, podemos visualizar um vaso sanguíneo (seta vermelha) e sua luz (L). Células e grupos isogênicos também podem ser visualizados nas imagens (não indicados).

Figura 5.6.3 – Comparação entre imagens de microscopia óptica de cartilagens coradas por Picro Sirius e preservadas de diferentes formas e irradiadas com diferentes doses.

Nas imagens acima podemos identificar a presença de colágeno (região escura) bem como células e grupos isogênicos (não indicados). O mesmo vaso sanguíneo apresentado nas imagens anteriores também pode ser identificado (seta vermelha) com sua luz.

5.7 Comparação entre imagens de OCT, PS-OCT e técnicas convencionais de Microscopia óptica.

De forma a comparar as imagens obtidas por OCT e PS-OCT com as técnicas convencionais de visualização de tecidos biológicos, podemos ver na FIG. 5.7.1 os resultados obtidos a partir de uma secção transversal de cartilagem costal humana congelada a -70 °C e não irradiada, por meio de OCT, PS-OCT e microscopia óptica com diferentes colorações.

Figura 5.7.1 – OCT de cartilagem costal humana congelada a -70°C e não irradiada. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

Na FIG. 5.7.2 podemos observar os mesmos resultados mostrados anteriormente para cartilagens congeladas a -70°C e irradiadas com 15 kGy.

Figura 5.7.2 – OCT de cartilagem costal humana congelada a -70°C e irradiada com 15 kGy. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

Na FIG. 5.7.3 podemos observar os mesmos resultados mostrados anteriormente para cartilagens congeladas a -70°C e irradiadas com 25 kGy.

Figura 5.7.3 – OCT de cartilagem costal humana congelada a -70°C e irradiada com 25 kGy. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

Na FIG. 5.7.4 podemos observar os mesmos resultados mostrados anteriormente para cartilagens congeladas a -70°C e irradiadas com 50 kGy.

Figura 5.7.4 – OCT de cartilagem costal humana congelada a -70°C e irradiada com 50 kGy. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

Nas FIG. 5.7.5 podemos ver os resultados obtidos a partir de uma secção transversal de cartilagem costal humana preservada em glicerol e não irradiada, por meio de OCT e PS-OCT, microscopia óptica com diferentes colorações.

Figura 5.7.5 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e não irradiada. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

Na FIG.5.7.6 podemos observar os mesmos resultados mostrados anteriormente para cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 15 kGy.

Figura 5.7.6 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com 15 kGy. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

Nas FIG.5.7.7 podemos observar os mesmos resultados mostrados anteriormente para cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 25 kGy.

Figura 5.7.7 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com 25 kGy. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

Nas FIG.5.7.8 podemos observar os mesmos resultados mostrados anteriormente para cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 50 kGy.

Figura 5.7.8 – OCT de cartilagem costal humana preservada em glicerol e irradiada com 50 kGy. A – Hematoxilina e Eosina; B – Tricrômio de Masson; C – Picro Sírius; D – imagem de OCT; E – imagem de PS-OCT.

6. DISCUSSÃO

Em estudos preliminares sobre termogravimetria do tecido cartilaginoso humano preservado em glicerol e reidratados, em que a quantidade total de água foi maior quando comparadas às cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Martinho Junior, 2008; Santin et al. 2009), foi levantada a hipótese de que esse tecido, antes do processo de preservação, não se encontraria completamente hidratado, sendo essa uma possível razão para explicar as diferenças encontradas nesses estudos. Dessa forma, para elucidar a possível origem dessas diferenças, realizamos, inicialmente, um teste de intumescência de cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, com um tempo de reidratação em soro fisiológico igual a 10 minutos. Como podemos verificar na TAB. 5.1.1 e FIG. 5.1.1, as cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ainda são capazes de absorver água do meio, elevando em $8,67 \pm 0,71\%$ a sua massa inicial. Essa quantidade de água é suficiente para explicar as diferenças encontradas nos trabalhos anteriores, bem como ao longo do presente trabalho. Assim, de fato, as cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, bem como a cartilagem fresca (Santin et al., 2009), não apresentam sua máxima hidratação, o que irá diferir das cartilagens preservadas em glicerol, as quais passam por um processo de reidratação em soro fisiológico, o que possibilita uma maior incorporação de água antes de serem utilizadas nos experimentos, bem como nos pacientes que receberão aloenxertos preservados dessa maneira.

Quando as cartilagens congeladas são hidratadas por 6 horas, mesmo período de tempo que Sóhar et al. (2007) e Tóth et al. (2010) utilizaram em seus trabalhos, verificou-se um acréscimo de massa de $12,16 \pm 0,68\%$ (TAB. 5.1.2) e (FIG. 5.1.2). Por meio da análise estatística podemos verificar que os grupos

testados (10 minutos vs 6 horas) apresentam diferenças significantes ($p\text{-value} = 0,008$), indicando que o tempo de hidratação influencia a quantidade final de água da cartilagem.

Ainda, outra dúvida originada nos mesmos estudos preliminares, era se o processo de reidratação removeria por completo o glicerol presente nas cartilagens preservadas por esse método, uma vez que Ross & Kearney (2004) propuseram que o glicerol não age desidratando os materiais, mas sim sequestrando a água livre presente neles (item 3.2.2). Caso isso seja verdadeiro, como o ponto de ebulição do glicerol é igual a $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou seja, acima de nossa temperatura de teste ($105\text{ }^{\circ}\text{C}$), parte da água poderia permanecer sequestrada pelo glicerol.

Em nossos resultados de infravermelho, podemos verificar os picos de absorção da cartilagem congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FIG. 5.2.1.1), e da cartilagem preservada em glicerol e reidratada (FIG. 5.2.2.1). Na FIG. 5.2.1.2 podemos observar que é possível visualizar os picos dos comprimentos de onda característicos do glicerol em comparação aos da cartilagem congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ao compararmos o espectro de absorção das cartilagens preservadas em glicerol e posteriormente reidratadas com o espectro de absorção do glicerol (FIG. 5.2.2.2), podemos verificar (setas vermelhas) que mesmo após a reidratação do tecido ainda restam vestígios de glicerol em sua composição. Contudo, como veremos adiante (item 5.3.1.1), mesmo restando vestígios de glicerol em sua composição, o mesmo não causa diferenças na taxa de desidratação que sejam significantes do ponto de vista termogravimétrico. Na FIG. 5.2.3.1 podemos comparar o espectro de absorção de infravermelho em cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e preservadas em glicerol e reidratadas.

Em relação à termogravimetria, apesar de ser uma técnica consolidada há décadas para diversos tipos de materiais, pouquíssimo se conhece a respeito do comportamento termogravimétrico da cartilagem humana. Os poucos artigos publicados (Mankin & Brandt, 1992; Sohár et al., 2007, Tóth et al., 2010) têm como objetivo analisar a quantidade de água no tecido cartilaginoso afetado por osteoartrite, mas nenhum deles faz um estudo mais detalhado a respeito da dinâmica do fluxo de água nas diversas regiões da cartilagem, o que nos fornece uma medida indireta de como se apresentam as estruturas internas desse tecido e que são responsáveis pela sua manutenção. Assim, como a água é o principal elemento responsável pelas características mecânicas desse tecido em conjunto com as fibras colágenas, e sendo que ambos não se encontram distribuídos uniformemente pelo tecido, um dos objetivos do presente trabalho foi diferenciar duas regiões da cartilagem. Dessa maneira, pode-se verificar não só as modificações causadas pela ação dos métodos de preservação desse tecido e da radiação ionizante sobre o mesmo, mas também suas propriedades termogravimétricas básicas.

No trabalho publicado por Soár et al. (2007) sobre termogravimetria da cartilagem foi determinado um novo protocolo também utilizado pelo mesmo grupo em trabalhos posteriores (Tóth et al., 2010). Apesar desse protocolo utilizar uma razão de aquecimento de 5 °C/min até atingir 150 °C, em nossos experimentos realizamos alterações nesses parâmetros para determinar se tanto uma razão de aquecimento mais elevada como uma nova configuração da rampa de aquecimento seriam capazes de identificar as mudanças sensíveis induzidas pela radiação ionizante e pelos métodos de preservação.

Nessas condições, na região superficial da cartilagem, as amostras

congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ não irradiadas apresentaram uma taxa de desidratação média igual a $7,43 \pm 0,39\%/ \text{min}$. Amostras irradiadas com 15, 25 e 50 kGy apresentaram taxas de desidratação média iguais a $6,39 \pm 0,33\%/ \text{min}$, $6,99 \pm 0,28\%/ \text{min}$ e $7,29 \pm 0,26\%/ \text{min}$, respectivamente (TAB. 5.3.1.1.1). Por meio de ANOVA, foi possível verificar que as cartilagens irradiadas com 15 e 50 kGy apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (FIG. 5.3.1.1.1).

Ainda para região superficial da cartilagem, quando as amostras foram preservadas em glicerol, o grupo controle apresentou uma taxa de desidratação média igual a $7,09 \pm 0,62\%/ \text{min}$. Já as amostras irradiadas com doses de 15, 25 e 50 kGy apresentaram taxas de desidratação médias iguais a $8,17 \pm 0,21\%/ \text{min}$, $7,33 \pm 0,30\%/ \text{min}$ e $7,86 \pm 0,44\%/ \text{min}$, respectivamente (TAB. 5.3.1.1.2). A análise estatística não encontrou nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos irradiados e o grupo controle. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle das amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e preservadas em glicerol e reidratadas ($p = 0,61$).

Importante verificar que os resultados obtidos da taxa de desidratação são pertencentes à região linear da curva, o que fica evidenciado pelo valor do R^2 (TAB. 5.3.1.1.1 e TAB 5.3.1.1.2) que, quanto mais próximo de 1, maior é o ajuste dos pontos à reta.

Em relação à quantidade de água, ou umidade total (FIG. 5.3.1.2.1), podemos verificar que as amostras preservadas em glicerol (TAB. 5.3.1.2.2) apresentaram um valor mais elevado, para todas as doses de radiação, do que as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TAB. 5.3.1.2.1), o que era esperado a partir dos ensaios de intumescência já discutidos anteriormente. Ainda, a diferença na

quantidade de água nos tecidos, para cada grupo testado, enquadra-se dentro do calculado no ensaio de intumescência (aumento de $8,67 \pm 0,71\%$). Estatisticamente, em relação às cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, os grupos experimentais irradiados com doses de 25 e 50 kGy diferiram do grupo controle ($p<0,05$). Quando se utiliza glicerol como método de preservação, podemos verificar que somente o grupo irradiados com dose de 50 kGy diferiu estatisticamente do grupo controle ($p<0,05$). Ainda, podemos verificar que existe uma diferença estatisticamente significativa para as formas de preservação do tecido ($p<0,001$) no que tange a quantidade final de água presente nos mesmo.

As curvas termogravimétricas médias das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ são apresentadas na FIG. 5.3.1.3.1 e as das cartilagens preservadas em glicerol são apresentadas na FIG. 5.3.1.3.2. Nelas podemos observar diretamente o efeito do uso de glicerol como meio de preservação, uma vez que esse meio praticamente anula as diferenças causadas pelas doses de radiação ionizante para as curvas termogravimétricas. Nas curvas termogravimétricas médias das cartilagens congeladas a -70°C podemos verificar a influência da radiação ionizante sobre o tecido por meio da diferença das curvas. Na TAB. 5.3.1.3.1 e TAB. 5.3.1.3.2 estão indicadas as equações de reta para as cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e preservadas em glicerol, respectivamente, que podem ser utilizadas para determinar a porcentagem de água de uma amostra ao longo do tempo, a uma razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Para a região interna, em cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TAB. 5.3.2.1.1) observamos uma redução significativa ($p<0,05$) na taxa de desidratação para amostras irradiadas com 15 kGy e 50 kGy, sendo que não foi encontrada nenhuma diferença estatística para amostras irradiadas com 25 kGy (FIG.

5.3.2.1.1). As amostras do grupo controle apresentaram uma taxa de desidratação média de $6,98 \pm 0,36\%/min$, ao passo que as cartilagens irradiadas com 15, 25 e 50 kGy apresentaram uma taxa de desidratação média $6,03 \pm 0,27\%/min$, $6,25 \pm 0,32\%/min$ e $5,98 \pm 0,23\%/min$ (TAB. 5.3.2.1.1), respectivamente.

Para cartilagens preservadas em glicerol (TAB. 5.3.2.1.2), não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para nenhum grupo experimental quando comparado ao grupo controle (FIG. 5.3.2.1.2). As amostras do grupo controle apresentaram uma taxa de desidratação média de $7,42 \pm 0,20\%/min$, ao passo que as cartilagens irradiadas com 15, 25 e 50 kGy apresentaram, respectivamente, $7,58 \pm 0,28\%/min$, $7,46 \pm 0,38\%/min$ e $7,49 \pm 0,26\%/min$ (TAB. 5.3.2.1.2). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle das amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e preservadas em glicerol ($p = 0,28$).

Em relação à quantidade de água, ou umidade total, (FIG. 5.3.2.2.1), podemos verificar que as amostras preservadas em glicerol (TAB. 5.3.2.2.2) apresentaram um valor mais elevado, para todas as doses de radiação, do que as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TAB. 5.3.2.2.1). Ainda, a diferença na quantidade de água no tecidos, para cada grupo testado, enquadra-se dentro do calculado no ensaio de intumescência, assim como ocorrido para a região superficial da cartilagem. Por meio da análise estatística desses resultados, verificamos que cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ irradiadas com doses de 15 e 50 kGy diferem do grupo controle ($p < 0,05$). Contudo, nenhum grupo preservado em glicerol diferiu estatisticamente do seu grupo controle. Ainda, assim como verificado para a região superficial da cartilagem, os grupos controles apresentam diferença

estatisticamente significantes ($p < 0,001$), que, junto ao resultado obtido para a região superficial, corrobora nossa hipótese de que a cartilagem preservada em glicerol apresenta um conteúdo de água maior do que as congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ devido ao fato de que o tecido cartilaginoso não se encontra completamente hidratado *in vivo*.

Em seus estudos, Tóth et al. (2010) utilizaram uma taxa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e encontraram uma taxa de desidratação para cartilagens sadias igual a $1,33\%/^{\circ}\text{C}$. Ao se considerar a taxa de desidratação em função do tempo, para essa respectiva razão de aquecimento, a taxa de desidratação passa a ser igual a $6,65\%/ \text{min}$, o que está de acordo com nossos resultados para cartilagens não irradiadas, tanto da região superficial quanto da região interna, preservadas de ambas as formas. Contudo, a perda de massa relatada em seus estudos apresentam-se diferentes de nossos resultados, uma vez que seus experimentos apontaram uma perda de $79,21 \pm 9,07\%$.

Da mesma forma, Sohár et al. (2007), ao determinarem um novo protocolo para avaliação termogravimétrica de cartilagens, encontraram uma perda de massa de $80,79 \pm 7,09\%$. Contudo, ambos os trabalhos foram conduzidos estocando as amostras em 20 mL de solução salina por um tempo médio de 6 horas. Como demonstrado por nossos resultados e já discutido anteriormente, a manutenção das amostras em solução salina aumenta significativamente o conteúdo de água das cartilagens, o que compromete os resultados obtidos por ambos os autores.

Quando usamos os valores de intumescência ($15 \pm 6,03\%$) para corrigir os valores dos autores acima mencionados, chegamos bem próximo aos nossos valores, uma vez que os resultados desses trabalhos se aproximariam de 65%, o

que está de acordo com nossos resultados para cartilagens preservadas em glicerol, mas ainda com uma quantidade de água maior do que as cartilagens congeladas a -70°C . Contudo, essa última diferença pode ser compreendida pelo fato de que os autores utilizaram cartilagens hialinas provenientes do côndilo femoral, as quais devem ser capazes de responder à compressão mecânica e, portando, devem apresentar uma quantidade de água maior do que as cartilagens costais utilizadas no presente trabalho, uma vez que essas últimas não sofrem compressão *in situ*.

De forma geral, assim como ocorre na região superficial da cartilagem, podemos observar as variações, nas curvas termogravimétricas médias das cartilagens congeladas a -70°C pertencentes à região interna da cartilagem (FIG. 5.3.2.3.1), tanto na taxa de desidratação quanto na quantidade final de água no tecido. Já para as cartilagens preservadas em altas concentrações de glicerol (FIG. 5.3.2.3.2), verifica-se a sobreposição das curvas médias, o que demonstra as semelhanças em seus valores de taxa de desidratação e quantidade final de água discutidas acima. Na TAB. 5.3.2.3.1 e TAB. 5.3.2.3.2 podemos encontrar as equações de reta da região linear de desidratação das cartilagens congeladas a -70°C e preservadas em glicerol, respectivamente.

Como podemos observar, as cartilagens preservadas em glicerol apresentaram uma taxa de desidratação maior do que as congeladas a -70°C . Isso se deve ao fato de que, como demonstrado anteriormente, cartilagens preservadas em glicerol apresentam um conteúdo maior de água em sua estrutura.

Ainda, como verificado no trabalho de Bourroul (2004), doses de 15 kGy promovem uma torção na estrutura terciária das fibras colágenas. Em se tratando

de colágeno tipo II, o qual não forma fibras, mas apenas fibrilas, tal torção parece dificultar a liberação de água pelo tecido, visto que 30% de seu conteúdo encontra-se ligado à essa estrutura. De fato, podemos observar uma diminuição na taxa de desidratação das cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com doses de 15 kGy, tanto para a região superficial (FIG. 5.3.1.1.1) quanto para a região interna (FIG. 5.3.2.1.1) da cartilagem. Quando observamos as cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 15 kGy, notamos que o efeito global da reidratação suprime tal diferença (FIG 5.3.1.1.2 e FIG 5.3.2.1.2).

De forma geral, para o comportamento termogravimétrico das cartilagens, a forma de preservação possui maiores consequências do que o uso da radiação ionizante, visto que todas as amostras preservadas em glicerol (FIG. 5.3.1.1.2 e FIG. 5.3.2.1.2) e irradiadas com doses de 15, 25 e 50 kGy não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle. Assim, como a preservação dos tecidos é obrigatória para os bancos de tecidos, é importante para os mesmos saber que a forma de preservação a ser escolhida para o tecido em questão é mais importante do que as modificações estruturais que serão causadas nos mesmos, decorrentes do uso de radiação ionizante para esterilizá-los.

De acordo com nossos resultados, a quantidade de água na cartilagem varia de acordo com as zonas em questão, diminuindo da região superficial em relação à região calcificada. Hasler et al. (1999) propuseram que a quantidade de água na região superficial seria de aproximadamente 85%, reduzindo-se a cerca de 60% na região radial. Apesar de estar em concordância com os resultados de Hasler et al. (1999) no que tange a redução do conteúdo de água entre as diferentes regiões da cartilagem, ainda que os valores sejam muito próximos entre

as diferentes regiões, os valores absolutos obtidos no presente trabalho discordam dos apresentados pelo autores, os quais em seu trabalho parecem estar superestimados, uma vez que nossos resultados apresentaram uma quantidade de água na região superficial da cartilagem de aproximadamente 50% quando congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 65% quando preservadas em glicerol, sabendo-se que, nessa última, o conteúdo de água tende a ser maior devido à hiperhidratação das mesmas. Já para a região interna (radial), cartilagens que foram congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram um conteúdo de água de aproximadamente 45% e as preservadas em glicerol 60%. Entretanto, os resultados de Hasler et al. (1999) são válidos de forma genérica para todas as cartilagens hialinas, sendo que os resultados apresentados nesse trabalho são válidos apenas para cartilagem costal, não se considerando, ainda, indivíduos menores de 18 anos de idade, o que tenderia a aumentar a quantidade de água no tecido (Alberts et al, 1997).

A evolução das técnicas de OCT possibilitou um grande avanço na compreensão da ultraestrutura da cartilagem. O cálculo do coeficiente de atenuação óptica total no tecido é de grande valia para quantificar as diferenças, tanto para o efeito da radiação ionizante em tecidos, como para os efeitos das diferentes formas de preservação utilizadas.

Por se tratar de um método de cálculo nunca antes utilizado para cartilagens irradiadas, além das doses convencionais de 15, 25 e 50 kGy utilizamos amostras irradiadas com doses de 75 e 100 kGy, para compreender melhor o efeito de doses elevadas de radiação ionizante que possam vir a ser utilizadas pelos bancos de tecidos.

As imagens de OCT são mostradas nas FIG. 5.4.1.1 a FIG. 5.4.1.6 para cartilagens congeladas a -70°C e irradiadas com diferentes doses. Da mesma forma, nas FIG. 5.4.2.1 a FIG 5.4.2.6 são mostradas imagens de OCT das cartilagens preservadas em glicerol.

Somente por meio da análise visual das imagens de OCT não é possível identificar as possíveis modificações estruturais decorrentes dos métodos de preservação e/ou ação da radiação ionizante no tecido. Contudo, uma vez que as imagens geradas por OCT são construídas por meio de valores do coeficiente de atenuação dos fótons no tecido, podemos calcular a atenuação óptica total e, dessa forma, realizar uma comparação quantitativa entre os diferentes grupos.

Para o cálculo do coeficiente de atenuação óptico total foi utilizado um software desenvolvido pelo Dr. Anderson Zanardi de Freitas. Os resultados obtidos (FIG. 5.4.3.1) para as amostras congeladas a -70°C e irradiadas com 15 kGy apresentaram um valor médio para o coeficiente de atenuação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao valor médio encontrado para o grupo controle, sendo o mesmo fato observado para cartilagens irradiadas com doses de 50, 75 e 100 kGy. Contudo, amostras irradiadas com doses de 25 kGy não apresentaram diferenças estatísticas para o grupo controle. Como podemos ver na TAB. 5.4.3.1, o grupo controle apresentou um coeficiente médio de atenuação óptica total igual a $17,4 \pm 0,61 \text{ cm}^{-1}$. Já as cartilagens irradiadas com doses de 15, 25, 50, 75 e 100 kGy apresentaram, respectivamente, valores iguais a $23,8 \pm 0,98 \text{ cm}^{-1}$, $18,5 \pm 0,47 \text{ cm}^{-1}$, $15,2 \pm 0,55 \text{ cm}^{-1}$, $14,2 \pm 0,55 \text{ cm}^{-1}$ e $12,6 \pm 0,97 \text{ cm}^{-1}$.

Para amostras preservadas em glicerol somente existe diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos

irradiados com 15 e 100 kGy (FIG. 5.4.3.2). O grupo controle apresentou um coeficiente médio de atenuação óptica total igual a $18,7 \pm 1,03 \text{ cm}^{-1}$. Os grupos irradiados com 15, 25, 50 75 e 100 kGy apresentaram um coeficiente médio de atenuação óptica total, respectivamente, iguais a $22,9 \pm 0,94 \text{ cm}^{-1}$, $19,1 \pm 0,80 \text{ cm}^{-1}$, $17,5 \pm 0,82 \text{ cm}^{-1}$, $16,3 \pm 0,77 \text{ cm}^{-1}$ e $15,6 \pm 0,81 \text{ cm}^{-1}$ (TAB. 5.4.3.2). Além disso, por meio desta técnica, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controles congelados a $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e preservados em glicerol ($p=0,35$).

Ao se considerar a forma de preservação do tecido, podemos verificar que quando preservamos os tecidos com altas concentrações de glicerol, estes tendem a se apresentar mais homogêneos, visto que somente ocorrem diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) para doses de 15 e 100 kGy, sendo que esta última não é utilizada para esterilizar tecidos, como descrito no item 4.2.

Ao se comparar os valores dos coeficientes médios de atenuação óptica total com os valores da tensão de ruptura das cartilagens anteriormente obtidas (Martinho Junior et al., 2012), podemos verificar que tais valores são proporcionais, uma vez que em ambos os testes ocorre uma elevação dos valores para doses irradiadas com 15 kGy, independentemente do tipo de preservação utilizada e uma redução de seus valores para doses de 25 e 50 kGy (FIG. 5.4.4.1 e FIG. 5.4.4.2). Por outro lado, ao se comparar os valores médios do coeficiente de atenuação de fótons com a taxa de desidratação das cartilagens, podemos verificar que tratam-se de eventos inversamente proporcionais para doses de 15 kGy (FIG. 5.4.5.1 e FIG 5.4.5.2). Como a redução da taxa de desidratação para cartilagens congeladas a $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com dose de 15 kGy se dá pela criação de ligações cruzadas de fibrilas colágenas que retém a água em seu

interior, as mesmas ligações cruzadas, ao se considerar o tecido como um todo, irão resultar em uma maior atenuação dos fótons. O mesmo não é observado para cartilagens preservadas em glicerol, visto que, embora a técnica de OCT tenha revelado que a estrutura interna das amostras apresente uma maior atenuação dos fótons, assim como apresentado nas cartilagens congeladas a -70°C , no momento da irradiação não havia água no interior do tecido e, assim, não ocorreria uma maior retenção de água na rede de colágeno causado pelas ligações cruzadas. Uma vez que o conteúdo de água oriundo do processo de reidratação das amostras não está preso na rede de colágeno, e estas já se encontram com ligações cruzadas pela ação da radiação ionizante, a água oriunda do processo de reidratação das amostras encontra-se livre e, assim, apresenta uma taxa de desidratação mais elevada do que a observada no grupo controle.

A proporcionalidade apresentada entre os valores médios do coeficiente de atenuação óptica total e da tensão de ruptura das cartilagens, somada à proporcionalidade inversa entre os valores médios do coeficiente de atenuação óptica total e da taxa de desidratação – para amostras irradiadas com dose de 15 kGy - sugerem que o coeficiente de atenuação óptica total está diretamente ligado à estrutura tridimensional da rede de colágeno da cartilagem, visto que, como exposto acima, doses de 15 kGy tendem a criar ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno, dificultando a difusão da água para o meio externo e, com isso, provocando uma redução na taxa de desidratação, mas que, por outro lado, aumenta a resistência a tensão da mesma.

As imagens de OCT permitem um tipo de visualização do tecido muito mais confiável do que a microscopia, a qual, até o momento, é o padrão ouro para esse

tipo de estudo. Essa confiabilidade se deve ao fato de não ser necessária uma preparação prévia da amostra, como ocorre na microscopia, a qual provoca a desidratação dos tecidos, promovendo alterações na sua estrutura (Kemp et al., 2006). Contudo, vale lembrar que as imagens geradas por OCT não podem ser comparadas com as imagens obtidas por microscopia óptica, visto a natureza de cada uma delas (Kemp et al., 2006).

Uma vez que existe uma relação direta entre o coeficiente de atenuação óptica total e a tensão média de ruptura das cartilagens, será possível utilizando somente a técnica de OCT, prever a qualidade mecânica do tecido a ser utilizado como enxerto. Outra vantagem dessa técnica é o fato de não ocorrer contato entre o equipamento e o tecido, evitando assim o risco de contaminação, bem como, por ser um teste destrutivo, esta técnica pode ser aplicada para avaliar o próprio tecido a ser utilizado para transplante.

No que tange ao uso de PS-OCT para avaliar a estrutura do tecido cartilaginoso, podemos verificar que os conceitos teóricos da variação do ângulo de incidência da luz para formação das imagens, tratados com detalhes no item 3.7.3.2.4, são rapidamente identificados pelos resultados mostrados nas FIG. 5.5.1 e FIG. 5.5.2. As imagens, quando analisadas de cima para baixo, percebemos que a luz, antes de incidir sobre o tecido, é apresentada como uma região de cor preta na imagem e, ao penetrar no tecido, passa a ter o vetor resultante do campo eletromagnético alterado devido a organização das fibras colágenas, que possibilitam que a luz viaje com diferentes velocidades, o que resulta na variação do seu ângulo, representado por diferentes cores exibidas nas imagens de acordo com o padrão de referência. O vetor resultante, ao sofrer uma inversão de fase completa (2π), passa a ser apresentado novamente pela cor

preta, formando as regiões de “franjas” apresentadas nas imagens (FIG. 5.5.3 a FIG. 5.5.14).

De acordo com nossos resultados, podemos verificar que a birrefringência da cartilagem é preservada em ambas as formas de preservação bem como em todas as doses de radiação ionizante utilizadas para esterilizar os tecidos (FIG. 5.5.3 a FIG. 5.5.14). Esse fato demonstra que as formas de preservação utilizadas no presente estudo, bem como as doses de radiação ionizante, não alteram a estrutura de colágeno de forma significativa para que ocorra uma desorientação generalizada do arcabouço estrutural que mantém a cartilagem, como é observado em doenças degenerativas como a osteoartrite (Xingde et al., 2006) (FIG. 3.7.3.6.2), na qual podemos notar a desorganização da rede de colágeno nas regiões afetadas do tecido. Contudo, como demonstrado por Youn et al. (2005), pequenas alterações ocorrem na estrutura da cartilagem mas não podem ser notadas visualmente por meio apenas das imagens. Quando analisadas matematicamente, podemos verificar que as alterações provocadas pela ação da radiação podem ser identificadas e quantificadas. Assim, nossos resultados apenas sugerem que a ação das formas de preservação de tecido, bem como a ação da radiação ionizante (FIG. 5.5.15), não são suficientes para que haja perda total da organização das fibrilas de colágeno tipo II no arcabouço estrutural da cartilagem costal humana. Esse fato é especialmente importante para as cartilagens que foram preservadas em glicerol, visto que o processo de desidratação das mesmas, e sua posterior reidratação para uso em pacientes poderia modificar tal estrutura de forma a desorientar a rede de colágeno.

Estudos recentes demonstraram que as medidas do retardo de fase da técnica de PS-OCT não são simétricas nem centradas em seu valor verdadeiro.

Recentemente, Duan et al. (2011) desenvolveram um novo método baseado em simulações de Monte-Carlo para corrigir a distribuição dos ruídos que acompanham o sinal de PS-OCT. Assim, estudos futuros devem levar em consideração não somente a existência desse ruído no sinal de PS-OCT como também devem considerar formas de eliminá-los, propiciando resultados com valores reais. Ainda, Ugryumova et al. (2009) demonstraram que a disposição das fibras colágenas visualizada pela técnica de PS-OCT é compatível com os dados obtidos por microscopia polarizada, a qual, no caso de fibras e fibrilas de colágeno, também não necessita de preparação prévia das amostras, ou seja, não altera a estrutura inicial do tecido.

No que tange à microscopia óptica, ao analisarmos as imagens da FIG. 5.6.1, podemos verificar que não é possível identificar nenhuma diferença histológica, tanto para a forma de preservação quanto para a dose de irradiação do tecido, por meio da coloração por HE. Contudo, colorações específicas para colágeno são mais indicadas para a identificação dessas possíveis modificações, como pode ser visto nas imagens das FIG. 5.6.2. (Tricrômio de Masson) e FIG. 5.6.3 (Picro Sirius).

Nas imagens da FIG. 5.6.2 podemos verificar uma maior quantidade de colágeno na região superficial da cartilagem, bem como ao redor das lacunas dos condrócitos, o que é evidenciado pela coloração azulada indicativa de colágeno. Por outro lado, a coloração avermelhada indica a presença de proteoglicanas, a qual encontra-se predominantemente na região interna do tecido.

O mesmo ocorre quando analisamos as cartilagens coradas com Picro Sirius (FIG. 5.6.3), nas quais podemos verificar que ocorre uma maior coloração na região superficial do tecido e ao redor das lacunas dos condrócitos.

Embora colorações específicas para colágeno sejam as mais indicadas para a análise do tecido cartilaginoso, em nossos resultados não identificamos, por meio dessa técnica, modificações promovidas tanto pelas formas de preservação do tecido como pelas doses de irradiação utilizadas.

Como podemos notar, as imagens de OCT e PS-OCT não podem ser comparadas com imagens obtidas por microscopia óptica (FIG. 5.6.1 a FIG. 5.6.8), por fornecerem informações diferentes sobre a estrutura dos tecidos. Além de fornecerem informações diferentes, as técnicas de OCT e PS-OCT preservam as dimensões *in situ* reais, uma vez que não requerem desidratação dos tecidos a serem observados. Como observado por Kemp et al. (2006) de forma veemente, é fútil tentar validar quantitativamente as dimensões estruturais obtidas por OCT por meio de comparações com histologia convencional.

7. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que as técnicas de TGA, OCT e PS-OCT são sensíveis o suficiente para detectar pequenas modificações estruturais na cartilagem costal humana causadas tanto pela ação dos métodos de preservação do tecido como pela utilização de radiação ionizante como método de esterilização dos mesmos. A utilização de tais técnicas fornecem novas perspectivas aos bancos de tecidos no que tange ao conhecimento prévio da qualidade do enxerto que será distribuído aos hospitais, uma vez que se torna possível avaliar os tecidos antes de sua liberação sem que se perca sua esterilidade, como no caso do uso das técnicas de OCT e PS-OCT, ou com a perda de uma pequena quantidade de material – da ordem de miligramas de tecido – como no caso do TGA. Embora a técnica de PS-OCT nos permita concluir que a rede de colágeno mantém sua birrefringência até doses de 100 kGy, métodos para quantificar pequenas alterações nessa rede ainda precisam ser aprimorados, sendo este um dos focos de futuros estudos.

Em relação ao protocolo aceito mundialmente para análise térmica da cartilagem, por termogravimetria, sugerimos que o mesmo seja reavaliado de forma a rever a manutenção das amostras de cartilagem em solução salina quando o seu objetivo seja determinar o conteúdo total de água no tecido, uma vez que tal manutenção, mesmo que por curtos períodos, promove um aumento significativo do conteúdo de água no tecido, mascarando o seu real valor. Para isso, sugerimos que as amostras sejam tão logo analisadas ou que se estabeleça um coeficiente de correção para os valores obtidos por meio do atual protocolo.

Ainda, o presente trabalho permite as seguintes conclusões:

- A cartilagem costal humana não se encontra completamente hidratada em condições fisiológicas normais, e aumenta sua massa caso mantida em solução salina. Por sua vez, cartilagens preservadas em glicerol, quando reidratadas, aumentam sua massa até sua capacidade máxima;
- Doses de radiação de 15 kGy, quando aplicadas em cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, promovem ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno tipo II que resultam em uma redução significativa na taxa de desidratação. Contudo, quando as cartilagens são preservadas em glicerol, doses de 15, 25 e 50 kGy não promovem alterações na taxa de desidratação do tecido;
- A quantidade de água na cartilagem varia de acordo com sua região, como proposto em outros estudos, mas apresenta uma quantidade de água menor, visto serem provenientes de diferentes fontes.
- O coeficiente de atenuação óptico total é diretamente proporcional à tensão de ruptura das cartilagens, tanto quando congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ como quando preservadas em glicerol. Esse resultado abre uma nova janela para as aplicações da técnica de OCT, podendo prever a qualidade mecânica dos enxertos a serem utilizados pela populações em geral;
- Para cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bem como para preservadas em glicerol, doses de 15 kGy promovem um aumento significativo no coeficiente de atenuação óptica total;
- O coeficiente de atenuação óptica total poderá ser utilizado para quantificar o “estado” generalizado da matriz extracelular da cartilagem, estimando assim suas propriedades mecânicas;
- Para permitir a quantificação das possíveis alterações estruturais

promovidas pela preservação e/ou radioesterilização, as imagens obtidas por PS-OCT devem ser analisadas matematicamente;

- De forma geral, cartilagens preservadas em glicerol respondem melhor à radioesterilização, uma vez que seus resultados quase não diferiram dos resultados do grupo controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3ª ed., Porto Alegre, Artmed, 1997.

ANDERSON, W.B.; HUCK, P.M.; DIXON, D.G.; MAYFIELD, C.I. Endotoxin Inactivation in Water by Using Medium-Pressure UV Lamps. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, nº5, p. 3002–3004, 2003.

AKAL, M & KARA, M. The use of a homologous preserved costal cartilage in an infant with Poland's syndrome. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**. v.21, p. 146-148, 2002.

ALVAREZ, J., HORTON, J., SOHN, P., SERRA, R. The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation. **Developmental Dynamics**, v. 221, p. 311-321, 2001.

ALVAREZ, J., SOHN, P., ZENG, X., DOETSCHMAN, T., ROBBIN, D.J., SERRA, R. TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. **Development**, v.129, p.1913-1924, 2002.

AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPAEDIC SURGEONS ADVISORY STATEMENT # 1011: Use of Musculoskeletal Tissue Allografts. ROSEMONT, I.L., American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2001. Disponível em <<http://www.aaos.org/about/papers/advistmt/1011.asp>>. Acesso em 12 de janeiro de 2008.

ARAÚJO, M. M., MARIN-HUACHACA, N. S., MANCINI-FILHO, J., DELINCEE, H., VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Identification of irradiated refrigerated pork with DNA comet assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 183-185, 2004.

ARAÚJO, M. M., THOMAZ, F. S., FANARO, G. B., DUARTE, R. C., AQUINO, S., CORREA, B., VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Irradiation as a Decontamination Processing for Rice Paper Sheet. In: **International Nuclear Atlantic Conference**, Santos, 2007.

ARNOCZKY, S. P., Di CARLO, E. F., O' BRIEN, S. J., WARREN, R. F. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal autografts: an experimental study in the dog. **Arthroscopy**, v. 8, p. 428-436, 1992.

AYAD, S., BOOT-HANDFORD, R., HUMPHRIES, M.J., KADLER, K.E. and SHUTTLEWORTH, A. **The Extracellular Matrix. Facts Book**. 2º ed., Academic Press, London, 1996.

BASILE, A. R. D. A comparative study of glicerized and lyophilized porcine skin dressing for third degree burns. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 69, p. 969-972, 1982.

BETHESDA, M.D. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. **Journal of the American Medical Association**, v.260(17), p. 2487, 1988.

BLOCK, S.S. **Disinfection, Sterilization, and Preservation**. Lea & Febiger, Filadélfia, Londres, 4ed, 1991.

BORK, P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. **FEBS Letters**, v.327, p.125-130, 1993.

BORN, M. e WOLF, E. **Principles of Optics**, Cambridge University Press, 7ª edição (expandida), Londres, 1999.

BOURROUL, S.A. **Caracterização dos efeitos da radiação ionizante em pele humana para aloenxertos**. 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

BRASIL, Lei nº 9434, de 04 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de fevereiro de 1997. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=3932&word=>>. Acesso em: 28/08/2006.

BRASIL, Decreto nº 2268, de 30 de junho de 1997. Regulamenta a Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997, que dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento, e dá outras providências. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de julho de 1997. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=666&word=>>. Acesso em: 28/08/2006.

BRASIL, Portaria nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema nacional de transplantes. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html>

BRASIL, Portaria nº 3407, de 05 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre as atividades de transplantes e dispõe sobre a Coordenação Nacional de Transplantes. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 06 de agosto de 1998. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=14502&word=>>. Acesso em: 28/05/2006.

BRASIL, Portaria nº 263, de 31 de março de 1999. A utilização de tecidos, órgãos

ou partes do corpo humano para fins científicos somente será permitida depois de esgotadas as possibilidades de sua utilização em transplantes. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de abril de 1999. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1019&word=>>. Acesso em: 28/08/2006.

BRASIL, Lei nº 10211, de 23 de março de 2001. Altera dispositivos da Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997, que "dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento". D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de março de 2001. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=471&word=>>. Acesso em: 28/08/2006.

BRASIL, Portaria nº 1686, de 20 de setembro de 2002. Aprova, na forma do Anexo I desta Portaria, as Normas para Autorização de Funcionamento e Cadastramento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos pelo Sistema Único de Saúde. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de setembro de 2002. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=14815&word=>>. Acesso em: 28/08/2006.

BRASIL, Resolução RDC 220 de 29 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. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 29 de dezembro de 2006. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25456&word=>>>. Acesso em: 05/01/08.

BRAZ, A. K. S., KYOTOKU, B. B. C., BRAZ, R., GOMES, A. S. L. Evaluation of crack propagation in dental composites by optical coherence tomography. **Dental Materials**, v. 25, p. 74-79, 2009.

BREZINSKI, M. E. Optical Coherence Tomography: Principles and Applications. Academic Press, Burlington, 2006.

BUCKWALTER, J.A. & MANKIN, H.J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **Instrumental Course Lecture**. v.47, p.477-486, 1998.

BUMANN, A., EICKBOHM, J. E., KOPP, S., WANGERIN, K. Effects of different sterilizing techniques on osseous regeneration of grafted lyophilized cartilage. **Zeitschrift für Stomatologie** v. 86(5), p 249-257, 1989.

BURMAN, S., TEJWANI, S., VEMUGANTI, G. K., GOPINATHAN, U., SANGWAN, V. S. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: A review of current indications. **Cell and Tissue Bank**, v. 5, p. 161-175, 2004.

CABRAL, W.A., MAKAREEVA, E., COLIGE, A., LETOCHA, A.D., TY, J.M.,

YEOWELL, H.N., PALS, G., LEIKIN, S., MARINI, J.C. Mutations near amino end of alpha 1(I) collagen cause combined OI/EDS by interference with N-propeptide processing. **Journal of Biological Chemistry** v.22, p.19259-19269, 2005.

CAMARGO, G. O fogo dos deuses: uma história da energia nuclear: Pandora 600 a.C. - 1970. **Editora Contraponto**, Rio de Janeiro, 344 p., 2006.

CENSE, B., CHEN, T., PARK, B., PIERCE, M., DE BOER, J. Thickness and birefringence of healthy retinal nerve fiber layer tissue measured with polarization-sensitive optical coherence tomography. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 45, p. 2606–2612, 2004.

CENTER OF DISEASE CONTROL: Transmission of HIV through bone transplantation. Case report and public health recommendations. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 37:39, 1988.

CHRISTENSEN, E. A., KRISTENSEN, H., MILLER, A. Radiation sterilization. In: RUSSEL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J. **Practice of Desinfection, Preservation and Sterilization**, 2^a ed, Oxford, Blackwell Science, 1992.

CIENFUEGOS, F. & VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. p. 523-532.

CLIVAZ, X., MARQUIS-WEIBLE, F., SALATH, R. P. in European Biomedical Optics Conference, **SPIE Proceedings**, p. 2083-2092, 1994.

COLNOT, C. Cellular and mollecular interactions regulating skeletogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 95, p. 688-697, 2005.

COLOCHO, G. GRAHAM, W. P., GREENE, A. E., MATHESON, D. W., LYNCH, D. Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. **Arch Surg**, v. 109, p. 370-373, 1974.

CONWAY, B. e TOMFORD, W. Radiosensitivity of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clinical Infectious Diseases**., v.14, p.978-979, 1992.

CONWAY, B., TOMFORD, W., MANKIN, H., HIRSCH, M.S. SHOOLEY, R.T. Radiosensitivity of HIV-1. Potencial application to sterilization of bone allografts. **AIDS**, v.5, p.608-609, 1991.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**. 2^a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

CORNELISSEN, M., THIERENS, H. & RIDDER, L. DE. Effects of ionizing radiation on cartilage: Emphasis on effects on the extracellular matrix. **Scanning**

Microscopy, v.10, n. 3, p.883-840, 1996.

CUNHA, A. S., LEMOS, S. P. S., SILVA, C. F., BARROS FILHO, T. E. P., COSTA, M. P., FERREIRA, M. C. Utilização da veia glicerolada na regeneração neural: estudo experimental em ratos. **Acta Ortop Bras**, v. 15, p. 210-213, 2007.

DAHLAN, K. Z. H. M. Radiation Sciences. In: PHILLIPS, G. O. , NATHER, A. **Advances in tissue banking v. 5 – The Scientific Basis of Tissue Transplantation**, World Scientific, 2001.

De COSTER, P.J., MARTENS, L.C., De PAEPE, A. Oral health in prevalent types of Ehlers-Danlos syndromes. **Journal of Oral Pathology Medicine**. v.34(5), p.298-307, 2005.

Di FIORE, J. H. **Histologia**. 1ª. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

DION, N. & SIM, F. H. The use of Allografts in Musculoskeletal Oncology. In: BEATY, J. H. **Instructional Courses Lectures**, v. 51, capítulo 53, 2002.

DOEGE, K.J., SASAKI, M., KIMURA, T., YAMADA, Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266(20), p.894-902, 1991.

DUAN, L., MAKITA, S., YAMANARI, M., LIM, Y., YASUNO, Y. Monte-Carlos-based phase retardation estimator for polarization sensitive optical coherence tomography. **Optics Express**, v. 19 (17), p. 16330-16345, 2011.

DZIEDZIC-GOCLAUSKA, A. The application of ionising radiation to sterilise connective tissue allografts. In: PHILLIPS, G. O. **Radiation and Tissue Banking**, World Scientific, 2000.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A., KAMINSKI, A., UHRYNOWSKA-TYSZKIEWICZ, I., STACHOWICZ, W. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. **Cell and Tissue Banking**, v. 6, p.201-219, 2005.

EISBERG, R., RESNICK, R. **Física Quântica**. 4ª. ed. Editora campus, Rio de Janeiro, 1986.

FABRICINIANI, C., LUCANIA, L., PANNI, A. S., EVANGELIST, M. Meniscal allografts: cryopreservation vs deep-frozen technique. An experimental study in goats. **Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA**, v.5, p. 124-134, 1997.

FANARO, G. B., ARAÚJO, M. M., THOMAZ, F. S., DUARTE, R. C.,

VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Comparison of Treatment in Soybean Grains between ^{60}Co and E-beams Applications. In: **International Nuclear Atlantic Conference**, Santos, 2007.

FARACH-CARSON, M.C., HECHT, J.T., CARSON, D.D. Heparan sulfate proteoglycans: key players in cartilage biology. **Critical Reviews in Eukaryotes Gene Expression**. v. 15(1), p.29-48, 2005.

FENG, J., HU, T., LIU, W., ZHANG, S., TANG, Y., CHEN, R., JIANG, X., WEI, F. The biomechanical, morphologic, and histochemical properties of the costal cartilages in children with Pectus Excavatum. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 36, n. 12, p. 1770-1776, 2001.

FIDELER, B.M., VANGNESS, C.T., MOORE, T., LI, Z., RASHEED, S. Effects of gamma irradiation on the human immunodeficiency virus. **Journal of Bone and Joint Surgery**. Supl. 76-A, p. 1032-1035, 1994.

FONTANA, A. J. Dew-point method for the determination of water activity. In: Wrolstad, R. E. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, **John Wiley and Sons Inc.**, New York, 2001.

FRATZL, P. Cellulose and collagen: from fibers to tissues. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. v.8, p.32-39, 2003.

FREITAS, A. Z., ZECELL, D. M., MAYER, M. P. A., RIBEIRO, A. C., GOMES, A. S. L., VIEIRA JR, N. D. Determination of dental decay rates with optical coherence tomography, **Laser Physics Letters**, v. 6(12), p. 896-900, 2009.

FREITAS, A. Z., AMARAL, M. M., RAELE, M. P. Optical Coherence Tomography: Development and Applications. In: Duarte, F. J. **Laser Pulse Phenomena and Applications**, inTech, Croacia, 474 p., 2010.

FUJIMOTO, J. G., BREZINSKI, M. E., TEARNEY, G. J., BOPPART, S., A., BOUMA, B., HEE, M. R., SOUTHERN J. F., SWANSON, E. A. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nature Medicine*, v.1, p.970-972, 1995.

FUKUNAGA, T., YAMASHIRO, T., OYA, S., TAKESHITA, N., TAKIGAWA, M., TAKANO-YAMAMOTO, T. Connective tissue growth factor mRNA expression pattern in cartilages is associated with their type I collagen expression. **Bone**, v.33, p.911-918, 2003.

GAJIWALA, K. & LOBO GAJIWALA, A. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, p. 73-80, 2004.

GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. **Tratado de Histologia**. 2^a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.

GELSE, K., PÖSCHL, E., AIGNE, T. Collagens – structure, function, and biosynthesis. **Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1531-1546, 2003.

GLORIEUX, F.H. Caffey disease: an unlikely collagenopathy. **Journal of Clinical Investigation**. v.115(5), p.1142-1144, 2005.

GOLDRING, M. B., BIRKHEAD, J., SANDELL, L. J., KIMURA, T., KRANE, S. M. Interleukin 1 supresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III colagens in human chondrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82(6), p. 2026-2037, 1988.

GRECA, C.P.S. **Estudo citoquímico ultra-estrutural associado a tratamento enzimático da matriz extracelular fundamental do endotélio de camundongas**. 1996. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

HAAS, S. A study of the viability of bone after removal from the body. **Archives of Surgery**. v.7, p.213-226, 1923.

HALL, B.K. (editor): Cartilage, Vol I: *Strucutre, Function, and biochemistry*, **Academic Press**, 1983.

HASCALL, V.C., KIMURA, J.H. Proteoglycans: isolation and characterization. **Methods in Enzymology**. v.82, p.769-800,1982.

HASLER, E. M., HERZOG, W., WU, J. Z., MÜLLER, W. and WYSS, U. Articular cartilage Biomechanics: Theoretical models, material properties, and biosynthetic response. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 27 (6), p. 415-488, 1999.

HASCALL, V.C., HEINERGARD, D.K., WIGHT, T.N. Proteoglycans: Metabolism and Pathology. In: RAY, E.H. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, New York, Plenum Press, 1991.

HARNER, C.D., OLSON, E., IRRGANG, J.J., SILVERSTEIN, S., FU, F.H., SILBEY, M, Allograft versus autograft anterior cruciate ligament reconstruction: 3- to 5-year outcome. **Clinical Orthopaedics**, v.324, p. 134-144, 1996.

HARWOOD, L. M. e MOODY, C. J. Experimental organic chemistry: Principles and Practice (Illustrated ed.). Wiley-Blackwell. p. 292, 1989.

HAVIKO, T. & LAASIK, P. 40 years of tissue banking in Estonia. **Cell and Tissue**

Banking, v. 2, p.173-177, 2001.

HAY, E. D. **Cell Biology of the Extracellular Matrix**. Plenum Press, New York, 1993.

HAY, E. D. Biogenesis and organisation of extracellular matrix. **FASEB Journal**. v. 13(suppl 2), p. S281-283, 1999.

HAY, J. **The Biomechanics of Sports Techniques**. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, N.J., 1978.

HERSON, M.R. & MATHOR, M.B. Bancos de Tecidos In: GARCIA, V.D.; ABUD, M.; NEUMANN, J.; PESTANA, J.O.M. **Transplantes de Órgãos e Tecidos**, 2ª Ed., São Paulo: Segmento Farma Editores Ltda. 2006, Cap. 16, p.174-185.

HERSON, M.R., MATHOR, M.B., FERREIRA, M.C. Bancos de pele II. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v.2(2), p.15-21, 2002.

HERSON, M.R., MATHOR, M.B., PEDRAZA, J.M. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) programme on radiation and tissue banking in Brazil. **Cell and Tissue Banking**, v. 10(2), 143-147, 2009.

HILMY, N. & LINA, M. Effect of ionising radiation on viruses, proteins and prions. In: PHILLIPS, G. O. , NATHER, A. **Advances in tissue banking v. 5 – The Scientific Basis of Tissue Transplantation**, World Scientific, 2001.

HOEKSTRA, M. J., KREIS, R. W., DU PONT, J. S. History of the euro skin bank: the innovation of preservation techniques. **Burns**. Suppl. 1, p. 543-547, 1994.

HUNZIKER, E. B., MICHEL, M. and STUDER, D. Ultrastructure of adult human articular cartilage matrix after cryotechnical processing. **Microscopy Research and Technique**, v. 37, p. 271-284, 1997.

IAEA. Thematic Plan for Radiation Sterilization in Tissue Banking. Viena, Austria. 1998. Disponível em: <www.iaea.org>. Acesso em 31 de julho de 2007.

INCLAN, A. The use of preserved bone grafts in orthopedic surgery. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.24, p.81-96, 1942.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Code of practice tissue allograft- Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for validation and routine control, 2004. Disponível em: <<http://www.int-tissuebank.com>>. Acesso em 05 de janeiro de 2008.

IONASHIRO, M. GIOLITO, I. Nomenclatura, padrões e apresentação dos resultados em análise térmica. **Cerâmica**, v. 26 (121), p. 17-24, 1980.

IOZZO, R.V. Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia. **Laboratory Investigation**. v.53(4), p.3733-96, 1985.

ISO 11.137-2:2006. Sterilization of health care products – Radiation – Part 2: Establishing the sterilization dose. Disponível em: <<http://www.iso.org>>. Acesso em 09 de janeiro de 2008.

JACKSON, R.L., BUSCH, S.J. and CARDIN, A.D. Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interaction, and role in physiological processes. **Physiology Reviews**. v.71, p.481-539, 1991.

JENKINS, R.N., OSBORNE-LAWRENCE, S.L., SINCLAIR, A.K., EDDY, R.L., BYERS, M.G., SHOWS, T.B., DUBY, A.D. Structure and Chromosomal Location of the Human Gene Encoding Cartilage Matrix Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265(32), p.19624-19631, 1990.

JOHNSON, R. J., KETTLEKAMP, D. B., CLARK, W. LEAVERTON, P. Factors affecting late results after meniscectomy. **American Journal of Sports**, v. 55, p. 719-729, 1974.

JOSLYN, L.J. Sterilization by heat. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, 1991, p. 495-526.

JUNQUEIRA, L. C. V. & CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

KAINER, M.A., LINDEN, J.V., WHALEY, D.N., HOLMES, H.T., JARVIS, W.R., JERNIGAN, D.B., ARCHIBALD, L.K. Clostridium infections associated with musculoskeletal-tissue allografts. **New England Journal of Medicine**, v.350(25), p.2564-2571, 2004.

KAPLAN, I. **Física Nuclear**, 2^o ed, Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1983.

KARAM JUNIOR, D. **Estudo de aplicação da tecnologia “fieldbus” nos sistemas de controle de segurança de uma planta de radioesterilização**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

KAUR, C. Histology of cartilage. In: PHILLIPS, G. O. **Radiation and Tissue**

Banking, v. 05. World Scientific, 2001.

KEMP, N. J., PARK, J., ZAATARI, H. N., RYLANDER III, H. G., MILNER, T. E. Fibre orientation contrast for depth-resolved identification of structural interfaces in birefringent tissue . **Physics in Medicine and Biology**, v. 51, p. 3759-3767, 2006.

KLEIN, H.G. Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, p. 224–237. 2005.

KOBAYASHI, T., LYONS, K. M., MCMAHON, A. P. AND KRONENBERG, H. M. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. **PNAS**, v. 102 (50), p. 18023-18027, 2005.

KOMENDER, J., MALCZEWSKA, H., SLADOWKI, D., KOMENDER, A. Allogenic preserved costal cartilage in reconstructive surgery. **Annals of transplantation**, v. 2(1), p. 49-51, 1997.

KOSMISKAS, L. O. C. **Análise mecânica de réguas ósseas esterilizadas por radiação gama para uso em Banco de Tecidos**. 2007. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – USP, São Paulo.

KUEHNERT, M.J., CLARK, E., LOCKHART, S.R., SOLL, D.R., CHIA, J., JARVIS, W.R. Candida albicans endocarditis associated with a contaminated aortic valve allograft: implications for regulation of allograft processing. **Clinical Infectious Diseases**. v. 27 (4), p.688-691, 1998.

KUMARASINGHE, G. Transmissible diseases of particular importance in the immunocompromised and transplant recipients. In: PHILLIPS, G. O. **Radiation and Tissue Banking**, v. 05. World Scientific, 2001.

LEMOS, S. P. S., CUNHA, A. S., SILVA, C. F., BARROS FILHO, T. E. P., COSTA, M. P., FERREIRA, M. C. Nervo alógeno conservado em glicerol: estudo experimental em ratos. **Acta Ortop Bras.**, v. 16, p. 133-137, 2008.

LEPHART, S.M., KOCHER, M.S., HARNER, C.D., FU, F.H. Quadriceps strength and functional capacity after anterior cruciate ligament reconstruction. Patellar tendon autograft versus allograft. **American Journal of Sports Medicine**, v. 21, p. 738-743, 1993.

LEVY, R.V. & LEAHY, T.J. Sterilization Filtration. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, 1991, p. 527-579.

LI, C.M., HO, Y.R., LIU, Y.C. Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report. **Journal of the Formosan Medical**

Association, v.100(5), p.350-351, 2001.

LI, X., MARTIN, S., PITRIS, C., GHANTA, R., STAMPER, D., HARMAN, M., FUJIMOTO, J. G. E BREZINSKI, M. High-resolution optical coherence tomographic imaging of osteoarthritic cartilage during open knee surgery, **Arthritis Research & Therapy**, v. 7(2), p. 318-323, 2005.

LINBERG, J.V., ANDERSON, R.L., EDWARDS, J.J., PANJE, W.R., BARDACH, J. Preserved irradiated homologous cartilage for orbital reconstruction. **Ophthalmic Surgery**. v. 11(7), p. 457-462, 1980.

LITTLE, C.B., MEEKER, C.T., HEMBRY, R.M., SIMS, N.A., LAWOR, K.E., GOLUB, S.B., LAST, K., FOSANG, A.J. Matrix metalloproteinases are not essential for aggrecan turnover during normal skeletal growth and development. **Molecular Cell Biology**, v.25(8), p.3388-3399, 2005.

MANKIN, H. J. & BRANDT, K. D. Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical management, WB Saunders, Philadelphia, p. 109, 1992.

MANKIN, H. J. & THRASHER, A. Z. Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. **Journal of Bone and Joint Surgery [American]**, v. 57, p. 76-80, 1975.

MARAL, T., BORMANA, H., ARSLAND, H., DEMIRHANC, B., AKINBINGOLA, G., HABERALD, M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. **Burns**, v. 25, p. 625-635, 1999.

MARTINHO JUNIOR, A. C. Estudo dos efeitos físicos, químicos e estruturais ocasionados pela radiação ionizante e preservação em cartilagem costal humana. Dissertação de mestrado. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2008.

MARTINHO JUNIOR, A. C., ROSIFINI, A. P. A. C., PINO, E. S., MACHADO, L. D. B., HERSON, M. R., MATHOR, M. B. Effects of ionizing radiation and preservation on biomechanical properties of human costal cartilage. Cell and Tissue Banking, Disponível em <<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s10561-012-9306-4>> Acesso em 04 de abril de 2012.

E. S. Pino¹, L. B. D. Machado¹, M. R. Herson³, S. P. Santin¹, M. B. Mathor¹

MASON, C., MARKUSEN, J. F., TOWN, M. A., DUNNIL, P., WANG, R. The potencial of optical coherence tomography in the engineering of living tissue. **Physics in Medicine and Biology**, v. 49(7), p.1097-1115, 2004.

MATCHER, S. J. Practical aspects of OCT imaging in tissue engineering.

Methods Mol. Biol., v. 695, p. 261-280, 2011.

MATOS, J. R. & MACHADO, L. D. B. Análise Térmica – Termogravimetria. In: CANEVAROLO Jr, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**, Ed. Artliber, 2003, p. 209 a 228.

McDONALD, J.A. & CAMENISCH, T.D. Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide. **Glycoconjugates Journal**, v.19(4-5), p.331-339, 2002.

MECHAM, R. P. & HEUSER, J. E. The elastic fiber. In: HAY, E.H. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, New York, Plenum Press, 1991.

MIURA, M., YAMANARI, M., IWASAKI, T., ELSNER, A. E., MAKITA, S., YATAGAI, T., YASUNO, Y. Imaging polarimetry in age-related macular degeneration. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 49, p. 2661–2667, 2008.

MORDIFFI, S. Z., NATHER, A. Principles of sterile technique. In: PHILLIPS, G. O., NATHER, A. **Advances in tissue banking v. 5 – The Scientific Basis of Tissue Transplantation**, World Scientific, 2001.

MUIR, H., BULLOUGH, P. and MAROUDAS, A. The distribution of collagen in articular cartilage with some of its physiological implications. **Journal of Bone and Joint Surgery [Br]**, v. 52, p. 554-563, 1970.

MUIR, H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. **Biochemical Society Transactions**, v. 11, p. 613-622, 1983.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger Principles of biochemistry**. 3^a ed. Worth Publishers, New York, 2000.

NÖTZLI, H. & CLARK, J. Deformation of loaded articular cartilage prepared for scanning electron microscopy with rapid freezing and freezing-substitution fixation. **Journal of Orthopaedic research**, v. 15, p. 76-86, 1997.

OGUZKAYA, F. & AKÇALI, Y. Multiple pellets expectoration: bronchial repair by using a costal cartilage graft. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**. v.2, p. 268-269, 2003.

PACIFICI, M., SHIMO, T., GENTILI, T., KIRSCH, T., FREEMAN, T.A., ENOMOTO-IWAMOTO, M., IWAMOTO, M., KOYAMA, E. Syndecan-3: a cell-surface heparan sulfate proteoglycan important for chondrocyte proliferation and function during limb skeletogenesis. **Journal of Bone Mineral Metabolism**, v.23, p.191-199, 2005.

PAGGIARO, A. O. **Efeitos da radiação ionizante em membranas amnióticas gliceroladas empregadas como substrato ao cultivo de epitélio humano.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

PEDRAZA, J.M. The International Atomic Energy Agency (IAEA) Programme in Radiation and Tissue Banking: Past, Present and Future. 2003. Disponível em <<http://www.int-tissuebank.com>>. Acesso em 03 de junho de 2005.

PHILLIPS, G.O. Module 5: Processing. In: **Multimedia distance learning package on tissue banking**, 1st Ed., Singapura: IAEA, 1997.

PIGOSSI, N., RAIA, A., LEX, A., HABR GAMA, A., SIMONSEN, O., HADDAD, J., STOLF, N. A. G., ZERBINI, E. J., MINITI, A., TENUTO, R. Estudo experimental e clínico do emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Rev Assoc Med Bras**, v. 17, p. 263-278, 1971.

PIRCHER, M., GOETZINGER, E., FINDL, O., MICHELS, S., GEITZENAUER, W., LEYDOLT, C., SCHMIDT-ERFURTH, U., HITZENBERGER, C. K. Human macula investigated in vivo with polarization-sensitive optical coherence tomography. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** v. 47, p. 5487–5494, 2006.

POOLE, A.R., WEBBER, C., PIDOUX, I., CHOI, H., ROSENBERG, L.C. Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues. **Journal of Histochemical and Cytochemical**, v.34(5), p.619-625, 1986.

POSSARI, J.F. **Esterilização por óxido de etileno.** 1^a Ed. São Paulo, SP.: Iátria, 2003i.

POSSARI, J.F. **Esterilização por vapor de baixa temperatura e formaldeído.** 1^a Ed. São Paulo, SP.: Iátria, 2003ii.

POSSARI, J.F. **Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio.** 1^a Ed. São Paulo, SP.: Iátria, 2005.

PRASAD, P. N. **Introduction to biophonics.** John Wiley Professio, 1^a ed., 624 p., 2003.

PROSKURIN, S.G., SOKOLOVA, I.A., WANG, R.K. Imaging of non-parabolic velocity profiles in converging flow with optical coherence tomography. **Physics in Medicine and Biology**, v. 48(7), p. 2907-2918, 2003.

PRUSS, A., KAO, M., GOHS, U., KOSCIELNY, J., VERSEN, R. Von, PAULI, G. Effects of Gamma radiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-contaminated viruses. **Biologicals**, v. 30, p. 125-133, 2002.

RAELE, M. P. Desenvolvimento de um Sistema de Tomografia por Coerência Óptica no Domínio de Fourier Sensível à Polarização e sua Utilização na Determinação das Matrizes de Mueller. Dissertação de Mestrado. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

REJZEK, A., WEYER, F., EICHBERGER, R., GEBHART, W. Physical changes of amniotic membranes through glycerololation for use as an epidermal substitute: light and electron microscopic studies. **Cell and Tissue Banking**, v. 2(2), p. 95-102, 2001.

RICHTERS, C. D., HOEKSTRA, M. J., VAN BAARE, J. DU PONT, J. S., KAMPERDIJK, E. W. Immunogenicity of glycerol-preserved human cadaver skin *in vitro*. **Burn Care Rehabil**, v. 18, p. 228-233, 1997.

ROBERTS, M. J., ADAMS, S.B., PATEL, N.A., STAMPLER, D.L., WESTMORE, M.S., MARTIN, S.D. A new approach for assessing early osteoarthritis in the rat. **Anal Bioanal. Chem.** v.377, p. 1003-1006, 2003.

ROSENBERG, L.C., CHOI, H.U., POOLE, A.R., LEWANDOWSKA, K. CULP, L.A. Biological roles of dermatan sulphate proteoglycans. **Ciba Foundation Symposium**, v.124, p.47-68, 1986.

ROSS, A. & KEARNEY, J. N. The measurement of water activity in allogenic skin grafts preserved using high concentration glycerol or propylene glycol. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, p. 37-44, 2004.

RUSSEL, A.D. Principles of antimicrobial activity. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, 1991, p. 29-58.

RUTALA, W.A. & WEBER, D.J. Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: What Clinicians Need to Know. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 702-709, 2004.

SADDEMI, S.R., FROGAMENI, A.D., FENTON, P.J., HARTMAN, J. HARTMAN W. Comparison of perioperative morbidity of anterior cruciate ligament autograft versus allografts. **Arthroscopy**, v.9, p. 519-524, 1993.

SAGE, H. The evolution of elastin: Correlation of functional properties with protein structure and phylogenetic distribution. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.74B, p. 373-380, 1983.

SAGE, H. & GRAY, W.R. Studies on the evolution of elastin. I. Phylogenetic distribution. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 64B, p. 313-327, 1979.

SANTIN, S. P., MARTINHO JUNIOR, A. C., MATHOR, M. B. **Estudo do comportamento termogravimétrico da cartilagem costal humana a fresco ou preservada em glicerol em alta concentração**. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, São Paulo, 2009.

SCHMID, A., SCHMID, F., TILING, T. Electron microscopical studies on human meniscal tissue preserved for transplantation. In: MULLER, W., HACKENBRUCH, H. (eds). **Surgery and Arthroscopy of the knee**. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 703-707, 1988.

SHECHMEISTER, I.L. Sterilization by ultraviolet irradiation. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, 1991, p. 553-565.

SHELTON, W.R., TREACY, S.H., DUKES, A.D., use of allografts in knee reconstruction: I. Basic science aspects and current status. **Journal of American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v.6, p. 165-168, 1998.

SILVERMAN, G.J. Sterilization and preservation by ionizing irradiation. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, p. 566-579, 1991.

SIMONDS, R.J., HOLMBERG, S. D., HURWITZ, R.L., COLEMAN, T.R., BOTTENFIELD, S., CONLEY, L.J., KOHLENBERG, S.H., CASTRO, K.G., DAHAN, B.A., SCHABLE, C.A. et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. **New England Journal of Medicine**, v.326(11), p.726-732, 1992.

SOHÁR, G., PALLAGI, E., SZABÓ-RÉVÉSZ, P., TÓTH, K. New thermogravimetric protocol for the investigation of normal and damaged human hyaline cartilage. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89(3), p. 85-856, 2007.

SOBOL, E. N., MILNER, T. E., SHEKHTER, A. B., BAUM, O. I., GULLER, A. E., IGNATIEVA, N. Y., OMELCHENKO, A. I., ZAKHARKINA, O.L. Laser reshaping and regeneration of cartilage, **Laser Physics Letters**, v. 4(7), p. 488-502, 2007.

STRAUCH, B. & WALLACH, G. Reconstruction with irradiated homograft costal cartilage. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v.111 (7), p.2405-2411, 2003.

TAO, R.C., KELLEY, R. E., YOSHIMURA, N. N., BENJAMIN, F. Glycerol: its metabolism and use as an intravenous energy source. **J Parent Emt Nut**, v. 7, p. 479-488, 1983.

TAPPER, E. M. HOOVER, N. W. Late results after meniscectomy. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 51, p. 517-526, 1969.

TIMPL, R. Macromolecular organization of basement membranes. **Current Opinion in Cell Biology** v. 8, p. 618-624, 1996.

THAN, P., VERMES, Cs., SCHÄFFER, B., ÓRINCZY, D. L. Differential scanning calorimetric examination of the human hyaline cartilage: A preliminary study. **Thermochimica Acta**, v. 346, p. 147-151, 2000.

The IAEA Radiation and Tissue Banking Program i: General Information about the IAEA Program. Disponível em <http://www.int-tissuebank.com/> . Acesso em 05 de janeiro de 2008.

The IAEA Radiation and Tissue Banking Program ii: IAEA Training Programme in Radiation and Tissue Banking. Distance Learning: The IAEA/NUS Curriculum. Disponível em <<http://www.int-tissuebank.com>>. Acesso em 05 de janeiro de 2008.

THOMAS, G. J. & DAVIES, M. The organisation of the extracellular matrix. In: PHILLIPS, G. O. **Radiation and Tissue Banking**, vol. 05. World Scientific, 2001.

TOOLE, B. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: HAY, E.D. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, 2^a. ed., New York, Plenum Press, 1991.

TÓTH, K., AIGNER, Z., WELLINGER, K., SZABÓ-RÉVÉSZ, P., SOHÁR, G. Thermoanalytical investigation of different hip joint arthropathies. **Thermochimica Acta**, v. 506, p. 94-97, 2010.

UGRYUMOVA, N., GANGNUS, S.V., MATCHER, S.J. Three-dimensional optic axis determination using variable-incidence-angle polarization-optical coherence tomography. **Optical Letters**, v. 31(15). p. 2305-2307, 2006.

Ugryumova, N., Jacobs, J., Bonesi, M., Matcher, S. J. Novel optical imaging technique to determine the 3-D orientation of collagen fibers in cartilage: variable-incidence angle polarization-sensitive optical coherence tomography . **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, p. 33-42, 2009.

VAJARADUL, Y. Bangkok biomaterial center: 15 years experience in tissue banking. **Cell and Tissue banking**. v. 1, p. 229-239, 2000.

VAN BAARE, J. BUITENWERF, J., HOESHTRA, M. J., DU PONT, J. S. Virucidal effect of glycerol-preserved cadaver skin. **Burns**, v. 20(Suppl 1), p. 77-80, 1994.

VAN BAARE, J. CAMERON, P. U. VARDAXIS, N. PAGNON, J., REECE, J., MIDDEKOOP, E., CROWE, S. M. The 1998 Lindberg Award Comparison of glycerol preservation with cryopreservation methods on HIV-1 inactivation. **Journal of Burn Care Rehabilitation**, v. 19(6), p. 494-500, 1998.

VANGSNESS JR, C.T, TRIFFON, M.J., . Soft tissue for allograft reconstruction of the human knee: A survey of the American Association of Tissue Banks. **The American Journal of Sports Medicine**, v.24, p. 230-234, 1996.

VANGSNESS JR, C.T., GARCIA, I.A., MILLS, C.R., KAINER, M.A., ROBERTS, M.R. And MOORE, T.M. Allograft Transplantation in the Knee: Tissue Regulation, Procurement, Processing, and Sterilization. **The American Journal of Sports Medicine**, v.31(3), p. 474-481, 2003.

VEKSLER, B., KOBZEV, E., BONESI, M., MEGLINSKI, I. Application of optical coherence tomography for imaging of scaffold structure and micro-flows characterization, **Laser Physics Letters**, v. 5(3), p. 236-239, 2008.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H. **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de ^{60}Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata***. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 1998.

WATANABE, H. Cartilage proteoglycan aggregate: structure and function. **Clinical Calcium**, v. 14(7), p.9-14, 2004.

WENST, J. R., ULICH, T., RAO, P. N. Long term survival of human skin allografts in patients with immunosupresion. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 113, p. 1347-1354, 2001.

WIESAUER, K., PIRCHER, M., GÖTZINGER, E., HITZENBERGER, C. K., ENGELKE, R., AHRENS, G., GRÜTZNER, G., STIFTER, D. Transversal ultrahigh-resolution polarizationsensitive optical coherence tomography for strain mapping in materials. **Optics Express**, v. 14(13), p. 5945-5953, 2006.

WIGHT, T.N., HEINERGARD, D. AND HASCALL, V.C. Proteoglycans: Structure and function. In: HAY, E.H. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, New York, Plenum Press, 1991.

WONG, M., WUETHRICH, P., BUSCHMANN, M. D., EGGLI, P. and HUNZIKER, E.B. Chondrocyte biosynthesis correlates with local tissue strain in statically compressed adult articular cartilage. **Journal of Orthopaedic research**, v. 15, p. 189-196, 1997.

XIE, T., GUO, S., ZHANG, J., CHEN, Z., PEAVY, G.M i. Use of polarization-sensitive optical coherence tomography to determine the directional polarization sensitivity of articular cartilage and meniscus. **Journal of Biomedical Optics**, v. 11(6), p. 64001 , 2006.

XIE, T., GUO, S., ZHANG, J., CHEN, Z., PEAVY, G.M ii. Determination of

characteristics of degenerative joint disease using optical coherence tomography and polarization sensitive optical coherence tomography. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 38(9), P. 852-865, 2006.

XINGDE, L., MARTIN, S., PITRIS, C., GHANTA, R., STAMPER, D. L., HARMAN, M., FUJIMOTO, J. G., BREZINSKI, M. High-resolution optical coherence tomography imaging of osteoarthritic cartilage during open knee surgery. **Arthritis Research and Therapy**, v. 7(2), p. 381-323, 2005.

YAHIA L.H, DROUIN G, ZUKOR D. The irradiation effect on the initial mechanical properties of meniscal grafts. **Biomedical Materials and Engineering**. v.3(4), p. 211-21, 1993.

YAMADA, K. M. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: HAY, E.H. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, New York, Plenum Press, 1991.

YESSIAN, M.R. Oversight of Tissue Banking Office of general the general department of health and human services, 2001. Disponível em <<http://www.oig.hhs.gov/>>. Acesso em 12 de janeiro de 2008.

YIM, C. J. & CARLSON, E. R. Mandibular reconstruction using bone allografts In: PHILLIPS, G. O., VERSEN, R. Von, STONG, D. M., NATHER, A. **Advances in tissue Banking** v. 4, World Scientific, 2000, p.15-148.

YOUN, J., VARGAS, G., WONG, B. J. F., MILNER, T. E. Depth-resolved phase retardation measurements for laser-assisted non-ablative cartilage reshaping. **Phys. Med. Biol.**, v.50, p. 1937-1950, 2005.

YUSOF, N. Effect of radiation on microorganisms – Mechanism of radiation sterilization. In: **Advances in tissue Banking**. v. 4, World Scientific, 2001, p.342-357.

APÊNDICE

Apêndice A

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Of.COEP/ 202 / 08

Protocolo	1820
Projeto de Pesquisa	ESTUDO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZADA EM CARTILAGEM COSTAL HUMANA POR TERMOGRAVIMETRIA E TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA
Pesquisador(a)	Antonio Carlos Martinho Junior

21 de AGOSTO de 2008.

Prezado(a) Orientador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP analisou, em sua 7.ª/08 Sessão ORDINÁRIA, realizada em 15/08/08, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96 e suas complementares, o protocolo de pesquisa acima intitulado e o considerou **APROVADO**.

Cabe lembrar que conforme Resolução CNS/196/96 são deveres do (a) pesquisador (a):

1. Comunicar, de imediato, qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa;
2. Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP, no caso eventual auditoria;
3. Comunicar, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto;
4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
5. Justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP

Ilm.ª Sr.ª
Prof.ª Dr.ª MONICA BEATRIZ MATHOR
INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS - IPEN

Apêndice B – Imagens de OCT das cartilagens congeladas a -70 °C não irradiadas

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice C – Imagens de OCT das cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com 15 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice D – Imagens de OCT das cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com 25 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice E – Imagens de OCT das cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com 50 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice F – Imagens de OCT das cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com 75 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice G – Imagens de OCT das cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com 100 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice H – Imagens de OCT das cartilagens preservadas em glicerol não irradiadas

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice I – Imagens de OCT das cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 15 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice J – Imagens de OCT das cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 25 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice K – Imagens de OCT das cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 50 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice L – Imagens de OCT das cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 75 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15

Apêndice M – Imagens de OCT das cartilagens preservadas em glicerol e irradiadas com 100 kGy

	A	B	C	D	E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
11
12
13
14
15