INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E BIOMECÂNICA DO ÂMNIO CONSERVADO EM
GLICEROL ESTERILIZADO COM DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO
IONIZANTE**

FERNANDO AUGUSTO NEVES SOARES

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Aplicações

Orientadora: Dra. Monica Beatriz Mathor

São Paulo
2013

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E BIOMECÂNICA DO ÂMNIO CONSERVADO EM
GLICEROL ESTERILIZADO COM DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO
IONIZANTE**

FERNANDO AUGUSTO NEVES SOARES

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Aplicações

Orientadora: Dra. Monica Beatriz Mathor

São Paulo
2013

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Lino Gilberto Soares e Regina de Fátima Neves Soares, meu irmão Fillipe Henrique Neves Soares e minha esposa Carla Cristina Tiltscher Soares por serem minhas fontes de estímulo e inspiração em todos os momentos importantes de minha vida.

AGRADECIMENTOS

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

À Dra. Monica Beatriz Mathor, pela orientação, confiança, compreensão e amizade depositadas em mim durante todo desenvolvimento do trabalho.

À Pós Graduação do IPEN, pela confiança e pela oportunidade.

Ao Dr. Anderson Zanardi de Freitas, pela ajuda, pelo conhecimento e pela amizade a mim conferidos.

À Dra. Luci Diva Brocardo Machado, pelo apoio, compreensão e amizade desenvolvida nesse período.

Ao Dr. André Oliveira Paggiaro pelo fornecimento dos Âmnios par estudo e pela abertura da linha de pesquisa com membranas amnióticas.

À Dra. Diva Moreno e Magna Soares do Instituto Butantan pela grande amizade adquirida na conclusão do estudo com a confecção das lâminas de histologia.

À Dra. Yasko Kodama, pela amizade, confiança e parceria nos estudos e nas corridas.

Aos meus colegas de pesquisa Stefany Santin, Antonio Carlos Martinho Junior, Bianca Sufi, Daniele Yoshito, Natália Mencacci, Rodrigo Crespo Mosca, Fabiana Bringel, pela confiança e amizade.

Aos amigos Marcelo, Patrícia, Marcos, Mara pela amizade e nos auxílios prestados durante a pesquisa.

À Dra. Duclerc Parra, pela concessão das pinças para o ensaio de tração, pois sem elas o estudo não seria concluído.

À Dra. Susy Sabato, pela amizade e pela concessão de uso do texturômetro para análise biomecânica.

À Dra. Sônia Baldochi, por permitir a utilização do microscópio de luz polarizada para conclusão das análises.

Ao Mestre Hélio Hissei Nagatomi, por ser amigo e fonte de inspiração na área científica, desde o início da pesquisa acadêmica na graduação.

Ao Mestre Hiroshi, pelos ensinamentos na área de análise de infravermelho e pela amizade.

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia, pelo empenho e dedicação na irradiação das membranas amnióticas, essencial para desenvolvimento deste estudo.

Ao enfermeiro Eugênio Polo, pela amizade e auxílio na captação e processamento das membranas amnióticas para esse trabalho.

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

A minha cunhada, Anny Meire Tiltscher pela revisão textual do trabalho e pelo apoio na etapa conclusiva do mesmo.

Ao meu irmão, mestre Fillipe Soares, principalmente, por me inspirar e incentivar em todos os momentos.

À minha mãe, Regina Soares, por ser a precursora da família na área de pesquisa científica e por fornecer toda educação durante minha vida.

Ao meu pai, Lino Soares, por me amar em todos os momentos e me sustentar nas mais diversas situações.

À minha esposa, Carla Tiltscher Soares, por acreditar, apoiar e compreender a importância de minha dedicação ao trabalho.

Análise morfológica e biomecânica do âmnio conservado em glicerol esterilizado com diferentes doses de radiação ionizante

Fernando Augusto Neves Soares

RESUMO

A membrana amniótica é a camada interna das membranas fetais (placenta), amplamente utilizada em transplantes por ser um tecido que combina propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifibróticas, além da limitada capacidade de provocar reações imunológicas. O uso da membrana fresca tem algumas limitações, como a necessidade de rápida utilização e a impossibilidade de obter total segurança diante de certas infecções. Qualquer tecido biológico utilizado para transplante deve ser estéril. A radioesterilização é uma alternativa para garantir a qualidade e segurança dos tecidos usados em transplantes e outras aplicações clínicas, a fim de minimizar os riscos de contaminação do receptor do tecido, porém a mesma pode causar alterações indesejáveis no tecido. No presente trabalho, foram testadas doses de 10, 15, 25 e 35 kGy, utilizando duas fontes de radiação ionizante: raios gama proveniente de fonte de Cobalto-60 e feixe de elétrons. Na análise qualitativa visual e tátil foi observado que, nas doses mais elevadas (a partir de 25 kGy) para ambas as fontes de radiação, as membranas irradiadas sofreram maior alteração de cor, tornando-se mais amareladas e com diminuição da elasticidade, deixando-as mais rígidas. A colorimetria sólida possibilitou minimizar a subjetividade da análise visual e a microscopia óptica foi essencial para avaliar as alterações histológicas comprovando, respectivamente, que a alteração de cor da membrana e o grau de degradação das camadas subjacentes do tecido tem relação direta com a dose de radiação empregada. Desse modo, as doses de 10-35 kGy podem ser aplicadas nas membranas amnióticas para sua utilização como bandagem biológica, porém, para as doses a partir de 25 kGy deve-se levar em consideração a alteração de coloração e condensação das camadas da membrana se estas forem destinadas para o uso oftálmico ou como substrato transportador para transplante de tecido cultivado *in vitro*. Com as técnicas de OCT, TG e ensaio de tração não foi possível avaliar as alterações biomecânicas encontradas na análise qualitativa, nas condições experimentais realizadas devido aos desvios-padrão obtidos para as cinco membranas testadas.

Morphological and biomechanical analysis of amnion stored in glycerol sterilized with different doses of ionizing radiation

Fernando Augusto Neves Soares

ABSTRACT

The amniotic membrane is the inner layer of the fetal membranes (placenta), widely used in transplantation as it is a tissue that combines properties anti-inflammatory and antifibrotic antimicrobial, and limited ability to induce immune reactions. The use of fresh membrane has some limitations such as the need for rapid deployment and not being completely safe against of certain infections. Any biological tissue used for transplantation should be sterile. The radiosterilization is an alternative to ensure the quality and safety of tissues used in transplants, and other clinical applications to minimize the risk of contamination of the tissue's receptor, but it can cause undesirable changes in the tissue. In this study, we tested doses of 10, 15, 25 and 35 kGy, using two sources of ionizing radiation: gamma rays from cobalt-60 source and electron beam. In qualitative, visual and tactile analysis it has been observed that higher doses (25 kGy and up, to both sources of radiation) irradiated membranes had a greater color change, becoming yellowed and decreased elasticity, becoming more rigid. The solid colorimetry minimized the subjectivity of visual analysis and optical microscopy was essential to evaluate the histological changes showing, respectively, the color change of the membrane and the degree of degradation of the underlying layers of tissue is directly related to the dose of radiation employed. Thus, doses of 10-35 kGy can be applied in the amniotic membranes for application as a biological bandage, however doses from 25 kGy and up should take into account the changes in color and condensation of the layers of the membrane for ophthalmic use or as a carrier substrate for transplantation of cultured tissue in vitro. With the techniques of OCT, TG and tensile testing was not possible to evaluate the biomechanical findings in the qualitative analysis, the experimental conditions due to the standard-deviations obtained for the five membranes tested.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivos gerais.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
3.1	Características da membrana amniótica.....	15
3.2	Colágenos	16
3.2.1	Colágenos que formam fibrilas longas	17
3.2.2	Colágeno que forma rede.....	18
3.2.3	Colágeno de ancoragem	18
3.3	Aplicações clínicas da membrana amniótica	18
3.4	Obtenção da membrana amniótica.....	20
3.5	Métodos de armazenamento	21
3.6	Esterilização de tecidos biológicos	23
3.7	Radioesterilização do âmnio.....	24
3.8	Técnicas experimentais	26
3.8.1	Análise Colorimétrica	26
3.8.1.1	Anatomia ocular e percepção da cor	26
3.8.1.1.1	Retina.....	27
3.8.1.2	Percepção da cor	28
3.8.2	Colorimetria sólida	30

3.9	Tomografia por Coerência Óptica (<i>Optical Coherence Tomography-OCT</i>)	31
3.10	Capacidade de reidratação por termogravimetria (TG).....	33
3.11	Propriedades biomecânicas	34
3.12	Histologia	36
3.12.1	Preservação e fixação do material	36
3.12.2	Inclusão	36
3.12.3	Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)	36
3.12.4	Coloração de Picrossirius	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Captação	38
4.2	Processamento e fracionamento dos âmnios	38
4.2.1	Processamento	38
4.2.2	Fracionamento	39
4.3	Irradiação das amostras em fonte de Cobalto-60 e em acelerador de elétrons .	41
4.4	Análise qualitativa	42
4.5	Colorimetria sólida.....	42
4.6	Tomografia por Coerência Óptica (OCT)	43
4.7	Capacidade de reidratação por termogravimetria (TGA)	45
4.8	Ensaio de tração	45
4.9	Histologia	47
4.9.1	Processamento e cortes.....	47
4.9.2	Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE)	48

4.9.3	Coloração por Picrossirus Red.....	48
4.9.4	Desepitelização do âmnio	48
4.10	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Irradiação do âmnio.....	50
5.2	Análise qualitativa	50
5.3	Colorimetria	54
5.4	Análise por OCT	62
5.5	Coeficiente de atenuação óptica total	66
5.6	Capacidade de Reidratação por termogravimetria (TG)	68
5.7	Ensaio de tração	71
5.8	Histologia	72
5.8.1	Coloração de Hematoxilina-eosina.....	72
5.8.2	Coloração de Picrossirus.....	76
5.8.3	Desepitelização da membrana amniótica	78
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSÕES	94
8	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO A	101

1. INTRODUÇÃO

A busca por fatores de estimulação da regeneração teciduais propicia o surgimento de alternativas terapêuticas com o objetivo de substituir os transplantes convencionais e suas complicações em órgãos e tecidos, por mecanismos mais simples e seguros para restauração de áreas lesadas do corpo (TODA, 2007; PAGGIARO, 2011).

A membrana amniótica é a camada interna das membranas fetais, amplamente utilizada em transplantes por ser um tecido que combina propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antifibróticas, além da limitada capacidade de provocar reações imunológicas, levando à rejeição do tecido transplantado (VERSEN-HÖEYNCK et al., 2004; RIAU et al., 2010; GLYN, 2001; HOPKINSON et al., 2008; LIM et al., 2009; ISHINO et al., 2004; JOHN, 2003; ALBERTS et al., 2004). Segundo Dua & Azuara-Blanco (1999), este tecido serve como uma bandagem biológica para tratamento de queimaduras e feridas de pele, úlceras crônicas e reconstruções de diversas áreas do corpo, inclusive reparações oftálmicas.

Nas últimas décadas, a membrana amniótica (MA) vem sendo utilizada, de forma ampla, também como um substrato transportador na transferência de tecidos cultivados *in vitro*, devido a membrana basal facilitar a migração das células epiteliais, promover a diferenciação e reforçar a adesão celular. A continuidade da membrana basal é essencial para o cultivo celular, desse modo uma etapa crítica no processamento é a remoção das células epiteliais do âmnio mantendo a integridade da camada basal (HOPKINSON, 2008; VERSEN-HÖEYNCK et al., 2004).

Tratando-se de um tecido biológico, o doador da membrana deve ser submetido a uma cuidadosa avaliação clínica e triagem sorológica, reconfirmada após seis meses com novos testes (janela sorológica). O processamento da MA deve ser em bancos de tecidos credenciados para essa função e esta pode ser armazenada nas seguintes condições: a fresco, congelada, criopreservada, liofilizada, seca ao ar (*air dried*) ou em altas concentrações de glicerol. O uso da membrana fresca tem algumas limitações, como a necessidade de rápida utilização

e a impossibilidade de obter total segurança diante de certas infecções. Os outros tipos de preservação demandam processamento da mesma, possibilitando inclusive a esterilização complementar, proporcionando maior segurança ao tecido (PENA *et al.*, 2007; RIAU *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ-ARES *et al.*, 2009; LIBERA *et al.*, 2008; AB HAMID *et al.*, 2012).

A radioesterilização é uma alternativa para garantir a qualidade dos tecidos usados em transplantes e outras aplicações clínicas, a fim de minimizar os riscos de contaminação do receptor (do tecido), sendo utilizadas doses de radiação ionizante suficientes para atingir o nível de segurança de esterilidade ou *Sterility Assurance Level* (SAL) desejado. Os produtos que estão em contato com sangue, soluções parenterais, assim como enxertos de tecidos requerem SAL de 10^{-6} , o que significa probabilidade de 1 em milhão de permanecer microrganismo viável em uma unidade de produto (GLYN, 2001; LEY-CHÁVEZ *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2006; HILMY *et al.*, 2000; DANTAS, 2009).

A radiação ionizante produz ionização e excitação nas moléculas de DNA e/ou RNA dos microrganismos contaminantes, o que resulta na ruptura das ligações e desequilíbrio das cadeias, acarretando a morte dos mesmos, sendo este o mecanismo de esterilização. Além da inativação de microrganismos, esta radiação promove a morte celular e possíveis mudanças químicas e físicas no tecido, dependendo das condições de irradiação do mesmo, tais como: tipo de preservação, temperatura, tipo de fonte, dose e taxa de dose de irradiação.

A dose de radiação para esterilização depende do número de microrganismos contaminantes (*bioburden*), da radiorresistência do microrganismo (D_{10}) e do nível de segurança (SAL) que se deseja atingir. Nos bancos de tecidos, a seleção da dose de irradiação para esterilização permanece como um tema controverso. São selecionadas doses de radiação ionizante de 15 a 50 kGy para esterilização da membrana amniótica. A dose de 15 kGy pode ser utilizada como esterilizante com nível de segurança de 10^{-6} desde que a carga microbiana inicial seja zero, sem indícios de contaminação viral. Segundo a literatura, a dose mais utilizada no Reino Unido, EUA e muitos outros países é de 25 kGy e, em países escandinavos, recomenda-se entre 35 kGy e 45 kGy (DZIEDZIC-GOLLAWSKA *et*

al., 2005; GLYN, 2001; HILMY *et al.*, 2000; PAGGIARO, 2011; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2006)

Doses altas (50 kGy) podem ser necessárias para a esterilização de tecidos que apresentam um nível de carga viral, porém essas podem provocar várias mudanças físicas e químicas nos tecido (GLYN, 2001). De acordo com Paggiaro (2011), doses de 25 kGy alteraram a membrana basal da MA preservada em glicerol, comprometendo o crescimento de novas células autólogas sobre este tecido, sendo mais evidente esta alteração quando o tecido é irradiado em Acelerador de elétrons comparada à irradiação em fonte de Cobalto-60.

Dessa forma, podemos observar a dificuldade de se determinar as condições ideais de radioesterilização da MA. Com intuito de determinar as melhores condições de esterilização da membrana amniótica conservada em glicerol foram utilizados dois tipos de fontes de radiação ionizante, com diferentes taxas de dose (irradiador de cobalto-60 e o Acelerador de Elétrons), variando as doses de 10 a 35 kGy, mantendo-se a temperatura entre 2 a 8 °C.

Havendo necessidade de uma melhor avaliação deste tecido e levando em consideração às características específicas de cada aplicação, foram realizadas análises por colorimetria sólida, microscopia óptica, teste de desepitelização, tomografia por coerência óptica (OCT) e termogravimetria (TG) a fim de observar alterações morfológicas e físico-químicas, além de testes mecânicos de tração, nas amostras de MA irradiadas, comparando os resultados com aqueles obtidos nas amostras não irradiadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O estudo teve como objetivo observar e analisar as alterações morfológicas e biomecânicas do âmnio conservado em glicerol, esterilizado por radiação ionizante com doses de 10, 15, 25 e 35 kGy, em relação ao tecido não irradiado, fornecendo subsídios aos bancos de tecidos na escolha da dose, de acordo com a aplicação clínica desejada.

2.2 Objetivos específicos

- Irradiar as amostras de âmnio no irradiador Gammacell (raios gama por fonte de Cobalto-60) e Acelerador de Elétrons, avaliando as prováveis alterações causadas pelas diferentes doses, taxas de doses, com os diferentes tipos de radiação ionizante utilizados;
- Avaliar se as técnicas de Análise qualitativa; Colorimetria sólida; Tomografia por Coerência Óptica (OCT); Termogravimetria (TG); Ensaio mecânicos de tração; Microscopia óptica; Teste de desepitelização, podem ser utilizadas para analisar possíveis alterações físicas, químicas, morfológicas e biomecânicas, provocadas pelos diferentes tipos e doses de radiação.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Características da membrana amniótica

Âmnio ou membrana amniótica são termos intercambiáveis usados na literatura, sendo a parte interna das membranas fetais, não vascularizada e de tecido multicelular (Fig.1).

Figura 1– Âmnio (adaptado) KEITH *et al.*, 2002; Disponível em: <http://doulasparto-ongap.wikispaces.com/03.+Anatomia+e+fisiologia+do+parto> (adaptado), acessado 09/06/2013.

O âmnio possui normalmente de 0,02 a 0,5 mm de espessura, sendo constituído por cinco camadas subsequentes: o epitélio, membrana basal, camada compacta, camada de fibroblastos e camada esponjosa (FIG. 2). A membrana amniótica é constituída por tecido conjuntivo contendo principalmente colágenos tipos I, III, IV, V e VII além de fibronectina e laminina, presentes na membrana basal (MB). As células estão ligadas a MB por hemidesmossomos e umas às outras por desmossomos (VERSEN-HÖEYNCK *et al.*, 2004, 2008; RIAU *et al.*, 2010; JOHN, 2003; ALBERTS *et al.*, 2004; GLYN, 2001).

A camada epitelial do âmnio é composta por uma camada simples de célula cuboides com núcleo bem definido, com abundantes vacúolos no citoplasma. A membrana basal é constituída de uma rede de fibras reticulares de vários tamanhos. A camada compacta acelular, sendo a camada mais forte, está intimamente ligada à membrana basal. A camada de fibroblastos é a camada mais

espessa do âmnio e consiste em uma rede frouxa com células de Hofbauer (macrófagos). A camada esponjosa, mais externa, conecta o âmnio ao córion e é rica em mucina (VERSEN-HÖEYNCK *et al.*, 2004).

Figura 2- Camadas do âmnio (adaptado) John, 2003.

Estudos da MA revelam que estão presentes vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de transformação (TGF α , β_1 , β_2 e β_3), fator de crescimento de keratinócitos (KGF), receptor de KGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), receptor de HGF, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento de derivado de plaquetas (PDGF).

3.2 Colágenos

O colágeno é constituído por uma família de proteínas selecionadas durante a evolução para exercer diferentes funções (principalmente estruturais). São encontrados na pele, osso, cartilagem, músculo liso e lâmina basal.

A síntese de colágeno foi inicialmente associada a um grupo restrito de células do conjuntivo como os fibroblastos, osteoblastos e condroblastos. Atualmente, entretanto, existem suficientes evidências que mostram que vários outros tipos de células produzem esta proteína. Os principais aminoácidos que constituem o colágeno são a glicina (33,5%), a prolina (12%) e a hidroxiprolina (10%). Alguns aminoácidos, como a hidroxiprolina e a hidroxilisina, são característicos do colágeno (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O colágeno é o tipo mais abundante de proteína do organismo, representando 30% do seu peso seco. Atualmente, a família dos colágenos é

composta por mais de 26 tipos geneticamente diferentes. Na figura a seguir (FIG.3) pode-se observar o esquema de formação de fibrilas e fibras de colágeno (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Figura 3- Representação das estruturas de formação de fibrilas (1 a 3) e fibras (4 e 5) de colágeno (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os colágenos podem ser classificados de acordo com sua estrutura e função, os tipos de colágenos presentes no âmnio são:

3.2.1 Colágenos que formam fibrilas longas

O colágeno do tipo I é o mais abundante, sendo amplamente distribuído no organismo. Ele é formado por estruturas classicamente denominadas fibrilas de colágenos e que formam ossos, dentina, tendões, cápsulas de órgãos, derme etc.

Nos colágenos tipo I e III as moléculas de tropocolágeno (FIG. 3 item 1) se agregam em subunidades (microfibrilas) que se juntam para formar fibrilas, além pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas que são importantes para união destas moléculas e estas fibrilas se associam para formar fibras.

As fibrilas longas de colágeno são formadas pelas moléculas de colágeno do tipo I, III e V, que se agregam para formar fibrilas (FIG. 3 item 3) claramente visíveis ao microscópio eletrônico.

3.2.2 Colágeno que forma rede

O colágeno cujas moléculas se associam para formar uma rede é o colágeno do tipo IV, um dos principais componentes estruturais das lâminas basais, onde tem o papel de aderência e de filtração. O colágeno do tipo IV não forma fibrilas nem fibras. Neste tipo de colágeno as moléculas de tropocolágeno se associam de um modo peculiar, formando uma trama complexa que lembra a estrutura de uma “tela de galinheiro”.

3.2.3 Colágeno de ancoragem

O colágeno de ancoragem é do tipo VII e está presente nas fibrilas que ancoram as fibras de colágeno à lâmina basal.

Quanto ao tecido conjuntivo do âmnio, a rede consiste de feixes amplos de colágeno tipo I e III os quais são conectados, uns aos outros, à membrana basal pelas fibras colágenas tipo V e VII. Tanto os colágenos tipo IV, quanto o tipo VII são característicos da membrana basal do âmnio e sua estrutura íntegra e sem alteração é fundamental para o desenvolvimento de células cultivadas sobre essa camada como será tratado a seguir.

3.3 Aplicações clínicas da membrana amniótica

As propriedades mecânicas e biológicas da membrana amniótica humana, juntamente a sua translucência, tornam-a um biomaterial atrativo para curar uma série de condições clínicas. O âmnio possui muitas características para ser um substituto ideal de pele, pois é capaz de manter um microambiente fisiológico úmido que auxilia na cicatrização, além de atuar como uma barreira efetiva com boa aderência em feridas sem provocar rejeição do material pelo organismo receptor (HOPKINSON, 2008; DUA *et al.*, 2004).

Outra vantagem da utilização da membrana amniótica é a presença dos fatores de crescimento facilitando a re-epitelização. A presença e/ou inibição desses fatores de crescimento provavelmente está relacionada com efeitos benéficos desta membrana (PENA *et al.*, 2007; RIAU *et al.*, 2010).

Uma de suas principais utilizações é como bandagem biológica de cobertura de áreas queimadas do corpo, feridas na pele e úlceras crônicas nas pernas (FIG. 4) e, também, como tecido adjuvante na reconstrução de vaginas artificiais e no tratamento reparatório de onfaloceles¹ (Dua & Azuara-blanco, 1999).

Figura 4 – Enxertia do âmnio sobre superfície da pele (MOHAMMADI, 2011).

A força mecânica proveniente da estrutura da membrana assim como a elasticidade são fatores atraentes para a utilização do âmnio como enxerto cirúrgico. Níveis mais altos de rigidez podem melhorar a resistência e força do enxerto, necessária para resistir ao estresse induzido durante o crescimento do novo tecido formado. A membrana amniótica é amplamente utilizada como bandagem biológica na cobertura de feridas ou queimaduras, diminuindo a desidratação e permitindo uma regeneração destas áreas (RAVISHANKER *et al.*, 2003; RIAU *et al.*, 2010; NAKAMURA *et al.*, 2004). Assim como Dua & Azuara-Blanco (1999) relatam o uso da MA nas reconstruções oftálmicas, atuando como um “curativo de lente de contato”, permitindo o crescimento de células epiteliais abaixo de sua cobertura.

O âmnio vem sendo amplamente utilizado como enxerto cirúrgico oftálmico, bem como substrato transportador de células tronco de tecido equivalente, para reconstrução da superfície ocular. A MA reduz a formação de cicatrizes e inflamação na superfície ocular, reforça a epitelização, além de apresentar limitada reação imunológica e algumas propriedades antimicrobianas (RIAU *et al.*, 2010;

¹Defeito na parede abdominal, na inserção do cordão umbilical, com herniação de órgãos abdominais.

GLYN, 2001; VERSEN-HÖEYNCK *et al.*, 2004; KOIZUMI *et al.*, 2000; PENA *et al.*, 2007; CARVALHO-RÊGO *et al.*, 2008).

Dentre os usos da MA, como substrato em procedimentos oftálmicos, destacam-se o tratamento de defeitos persistentes ou recorrentes da córnea, perfurações corneanas, reconstruções conjuntivas, enxerto após remoção cirúrgica de pterígio e tumores, simbléfaros severos, síndrome de Stevens-Johnson, tratamento de bolhas filtrantes com vazamentos e nas reconstruções palpebrais (FIG. 5). Apesar do crescente interesse no uso da MA em oftalmologia, os diferentes mecanismos de ação que foram atribuídos para explicar seus efeitos benéficos não estão completamente esclarecidos (PENA *et al.*, 2007; JOHN, 2003; HOPKINSON *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Figura 5- Enxertia ocular de membrana amniótica, (JOHN, T., adaptado, 2003).

3.4 Obtenção da membrana amniótica

A membrana amniótica é obtida na cesárea eletiva e, na sequência, em condições estéreis, o âmnio é seccionado e separado do córion após lavagem da placenta, livre de sangue e coágulos (FIG.6). Os teste sorológicos são feitos no momento da coleta do tecido, com a retirada do sangue do cordão umbilical e seis meses após o parto, para confirmação dos resultados. Estes testes devem ser negativos para: HIV-1 e HIV-2 (anticorpos), antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg), anticorpo do núcleo da Hepatite B (HBcAb), anticorpo da Hepatite C (HCV), Vírus Linfonotrófico T Humano (HTLV) anticorpos 1 e 2, Citomegalovírus, Sífilis e Toxoplasmose (JOHN, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Figura 6- Fotografia da sequencia de processamento para obtenção da membrana amniótica. (A) ilustra a membrana assim que é retirada no parto; (B) primeira da separação do âmnio do córion e (C) membrana amniótica isolada, livre de sangue e coágulos (PAGGIARO, 2011; RENNIE *et al.*, 2012).

3.5 Métodos de armazenamento

Existem diferentes métodos para armazenamento da MA nos bancos de tecidos como: a fresco, congelamento, criopreservação, liofilização, secagem ao ar e altas concentrações de glicerol. O uso da membrana fresca tem algumas limitações devido à necessidade de rápida utilização e o elevado risco de contaminação. O congelamento pode promover a formação de gelo danificando a estrutura celular, o que difere da criopreservação, feita em temperatura de até -80°C , porém depende de criopreservantes como glicerol ou dimetilsulfóxido (DMSO) que possibilitam a utilização do tecido a longo prazo com pouca perda de viabilidade celular. As MAs processadas com a técnica de liofilização tem como principal vantagem a possibilidade do seu armazenamento ser feito em temperatura ambiente, além disso, segundo Nakamura *et al.* (2004) estas permanecem com suas membranas basais intactas, porém essa técnica exige um equipamento de custo e manutenção elevados. A secagem ao ar é realizada em cabine de fluxo laminar onde são dispostos com a superfície epitelial para baixo e assim permanecem durante a noite, porém este tipo de secagem deixa o âmnio com aspecto mais fino, além da dificuldade de reprodutibilidade do processo (VERSEN-HÖEYNCK, 2008; SINGH & CHACHARKAR, 2011). O glicerol possui propriedade antiviral e antibacteriana que são dependentes da concentração, tempo e temperatura. Também foi demonstrado que o armazenamento de pele de um cadáver infectado com HIV-1 em glicerol 85% a 4°C resultou em completa inativação do vírus após 5 dias (CARVALHO-RÊGO *et al.*, 2008; GLYN, 2001; HOPKINSON *et al.*, 2006; PENA *et al.*, 2007).

A confirmação da morte celular pela exposição ao glicerol proporciona um benefício aos transplantes de tecidos, inclusive o âmnio usado como biomaterial. Por esse fato, torna-se propício para a aplicação desejada, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas (PAGGIARO, 2011).

A impregnação de altas concentrações de glicerol foi introduzida na Holanda, em 1984. Apesar de o glicerol ter um efeito antiviral conhecido, não é reconhecido como um agente esterilizante. Mesmo depois da preservação por vários meses, bactérias e os vírus ainda podem se recuperar (VERSEN-HÖEYNCK, 2008), sendo considerado um agente descontaminante.

No entanto, os aloenxertos de tecido humano requerem proteção do paciente contra infecções transmissíveis. Por esta razão, os procedimentos de produção devem ser aplicados de acordo com padrões internacionais garantindo segurança (FIG. 7), a fim de manter a alta qualidade dos transplantes (VERSEN-HÖEYNCK *et al.*, 2008).

Figura 7– Demonstração de armazenamento de tecidos nos Bancos de tecidos para segurança e qualidade dos enxertos nele processados e armazenados.
Disponível em: <https://www.ipen.br/sitio/index.php?idc=4674>, acessado 09/06/2013.

3.6 Esterilização de tecidos biológicos

Esterilização tem sido definida como o processo ou ato de inativar ou matar todas as formas de vida, em especial os microrganismos. A cinética de inativação microbiana é de natureza exponencial, o que significa que sempre existe a probabilidade de sobrevivência de alguns microrganismos, independentemente da magnitude do tratamento empregado (RUSSEL, 1991; RUTALA & WEBER, 2004).

Os métodos de esterilização mais empregados são: calor, filtração, óxido de etileno, vapor de formaldeído, plasma de peróxido de hidrogênio, radiação ultravioleta e radiação ionizante, os quais têm suas vantagens e desvantagens resumidas na tabela a seguir (TAB. 1):

Tabela 1 Vantagens e desvantagens dos métodos de esterilização (Martinho Junior, 2008)

Tipo	Vantagens	Desvantagens
Calor	Rápido, eficaz e barato.	As altas temperaturas alteram as propriedades dos materiais.
Filtração	Retém fungos, bactérias e leveduras.	Não elimina vírus e é utilizada somente para gases e líquidos.
Óxido de Etileno	Alto poder de penetração e emprego a baixas temperaturas.	É tóxico, cancerígeno e há necessidade 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 bactérias e cistos.	Baixa penetrabilidade.
Raios Gama e Raios X	Alta penetração na matéria, não altera a temperatura e a pressão do material, alta eficiência em inativar microrganismos e possibilidade de esterilização final.	Necessidade de equipamentos especiais e pessoal técnico qualificado. Necessidade de altas doses de radiação para inativação viral.

Um dos desafios após o processamento de tecidos biológicos é garantir a esterilidade dos mesmos. Desde a coleta, processamento ou armazenamento do enxerto, microrganismos, exceto os príons, podem infectar o tecido e, mesmo em situações em que estes procedimentos sejam executados sob condições assépticas, 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. A radiação é o método mais adequado para esterilização de aloenxertos, pois é efetiva na inativação de microrganismos como vírus, bactérias e fungos (Dziedzic-Goclawska, 2001; AB HAMID *et al.*, 2012), como pode ser observado na Tabela 1.

Existem duas formas da radiação se propagar: corpuscular e eletromagnética.

- Radiação corpuscular é constituída de um feixe de partículas elementares, ou núcleos atômicos, tais como elétrons, prótons, nêutrons, partículas α (alfa) e β (beta), sendo estas obtidas pela desintegração radioativa de isótopos ou por equipamentos específicos no caso de partículas β ou pósitrons (OKUNO, 1998).
- Radiação eletromagnética é constituída de campos elétricos e magnéticos oscilantes que se propagam no vácuo com a velocidade da luz. São exemplos de ondas eletromagnéticas os raios γ (gama), obtidos de radioisótopos, e raios X, gerados por maquinários (OKUNO, 1998).

A radiação ionizante é definida como uma forma de radiação que tem energia suficiente para arrancar elétrons de átomos neutros, ou moléculas, de forma a convertê-los em íons e, assim, modificando-lhes o comportamento químico (DAHLAN, 2001; COLLI & MESQUITA, 2002; CNEN, 2010; YOSHITO, 2011).

3.7 Radioesterilização do âmnio

O uso da radiação ionizante com propósitos de esterilização tem sido apoiado pela Agência Internacional de Energia Atômica (*International Atomic Energy Agency* - IAEA). A eficácia da esterilização por radiação deve-se à grande capacidade de penetrar na matéria (raios gama) e sua alta efetividade para inativar

microrganismos, promovendo moderada elevação de temperatura. A radioesterilização pode ser realizada em materiais embalados, previamente fechados, prevenindo uma possível recontaminação. A soma destes fatores torna este método o mais adequado para esterilização de tecidos humanos (GLYN, 2001; SINGH *et al.*, 2007).

A dose de radiação para esterilização é estabelecida pela relação entre a carga microbiológica, valor de D_{10} e o SAL (*Sterility Assurance Level*) desejado. O valor de D_{10} , que usualmente se expressa em kGy, é a dose de irradiação necessária para reduzir uma população microbiana inicial em um logaritmo ($1 \log_{10}$), ou seja, 90% da carga inicial. O valor pode ser calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Valor D} = \frac{\text{dose de radiação}}{\log N_0 - \log N} \quad [1]$$

Onde N_0 e N representam a diferença dos logaritmos da população inicial e final de microrganismos. O Valor D difere amplamente entre os diferentes tipos de microrganismos.

O conceito de nível de segurança de esterilidade (SAL) deriva de estudos cinéticos de inativação microbiana e expressa a probabilidade de se encontrar microrganismos viáveis em uma unidade de produto, após a aplicação de um método de esterilização. Como exemplo: um SAL de 10^{-6} significa probabilidade de um em milhão de permanecer microrganismo viável em uma unidade de produto (GLYN, 2001).

As doses para esterilização recomendadas pela norma ISO 11137:2006 são de 25 kGy, dose aceitável para esterilização de aloenxertos, levando em consideração a contaminação inicial e a resistência à radiação dos microrganismos que foram encontrados nesses tecidos, ou de 15 kGy como dose mínima para esterilização de tecidos biológicos, no caso de uma carga microbiana inicial zero. Em 2013 a IAEA publicou uma atualização do “Código de práticas para esterilização por irradiação de tecidos humanos para uso clínico”, levando em consideração estes novos parâmetros (IAEA, 2013).

Na Polônia, o Banco de Tecidos Central da Universidade de Medicina de Varsóvia estabeleceu uma dose de 35 kGy para irradiação de enxertos de tecido conjuntivo como ossos, pele e âmnio, por fonte de irradiação Cobalto-60 e/ou Acelerador de Elétrons. Segundo este banco de tecidos, aplicar uma dose de 35 kGy, certamente, fornece uma garantia mais adequada de esterilização, para carga viral, dos enxertos de tecido em relação à dose usada de 25 kGy (DZIEDZIC-GOLLAWSKA *et al.*, 2005).

Segundo DZIEDZIC-GOLLAWSKA (2005), nos enxertos de tecido conjuntivo como ossos, pele e âmnio, quando irradiados com dose de 35 kGy em fonte Cobalto-60 ou acelerador de elétrons, não foi encontrada nenhuma transmissão de doença infecciosa ou reação adversa reportada nos transplantes realizados com tecidos irradiados dessa forma.

No entanto, o uso da radiação ionizante, em doses menores que 25 kGy para esterilização, tornou-se uma nova abordagem nos bancos de tecidos com o intuito de minimizar os efeitos da radiação nas propriedades físicas dos tecidos (AB HAMID *et al.*, 2012; IAEA, 2013).

A MA deve ser estéril para evitar a transmissão de qualquer doença. Apesar da esterilização por radiação ser um procedimento efetivo, ela pode interferir na estrutura da membrana amniótica, promovendo degeneração das células epiteliais e destruição da camada compacta e de fibroblastos (GLYN, 2001; VERSEN-HÖEYNCK *et al.*, 2008; PAGGIARO, 2011).

3.8 Técnicas experimentais

3.8.1 Análise Colorimétrica

3.8.1.1 Anatomia ocular e percepção da cor

Os olhos são órgãos fotossensíveis complexos que atingiram alto grau de evolução, permitindo uma análise minuciosa quanto à forma dos objetos, sua cor e intensidade de luz refletida. Cada olho fica alojado em uma caixa óssea protetora, a órbita, e apresenta basicamente uma câmara escura, uma camada de células receptoras sensoriais, um sistema de lentes para focalizar a imagem e um sistema

de células para iniciar o processamento dos estímulos e enviá-los ao córtex cerebral (NASSAU, 2001).

O olho é constituído por três túnicas dispostas concetricamente: a camada externa, formada pela esclera e pela córnea, a camada média ou túnica vascular, constituída pela coróide, pelo corpo ciliar e pela íris; e a camada interna ou retina, comunica-se com o cérebro pelo nervo óptico (KIERSZENBAUM & TRES, 2012)

3.8.1.1.1 Retina

A retina origina-se de uma invaginação do diencefalo que, à medida que evolui, aprofunda-se no centro, formando uma estrutura de paredes duplas, o cálice óptico. Os fotorreceptores e todo o restante da retina têm origem na parede interna do cálice óptico. A camada pigmentar da retina adere fortemente à coróide, mas prende-se fracamente à camada fotossensível (interna).

A parte da retina situada na região posterior do globo ocular apresenta, de fora para dentro, as seguintes camadas: a camada das células fotossensíveis, os cones e os bastonetes; a camada dos neurônios bipolares, que unem funcionalmente as células dos cones e dos bastonetes às células ganglionares; e a camada das células ganglionares, que estabelece contato na sua extremidade externa com os neurônios bipolares e continua na porção interna com as fibras nervosas que convergem, formando o nervo óptico (NASSAU, 2001).

Entre a camada das células dos cones e bastonetes e a dos neurônios bipolares observa-se uma região onde ocorrem as sinapses entre esses dois tipos celulares, a qual recebeu o nome de camada sináptica externa ou plexiforme externa. Admite-se que uma retina humana tenha aproximadamente 120 milhões de bastonetes. Os bastonetes são extremamente sensíveis à luz e são os principais receptores para baixos níveis de luz, porém só possibilitam uma visão difusa. Os cones são também células alongadas que possuem segmentos interno e externo, corpo basal com cílio e acúmulo de mitocôndrias. Existem aproximadamente 6 milhões de cones em uma retina humana. São elementos de percepção da luz em intensidade normal e possibilitam grande acuidade visual (NASSAU, 2001; KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

Embora uma retina contenha cerca de 126 milhões de receptores, o nervo óptico não tem mais do que um milhão de fibras. A informação recebida pelos receptores é selecionada e agrupada, durante o seu trajeto, pelas células da própria retina. Essas células codificam e integram a informação fornecida pelos fotorreceptores, enviando-as ao córtex cerebral. A retina é, portanto, uma estrutura receptora-integradora (FIG. 8).

Figura 8 – Esquema representativo do olho humano e suas estruturas complexas (adaptado de KUMAR *et al.*, 2005).

3.8.1.2 Percepção da cor

A cor é percebida pela retina do olho por três feixes de cones, designado S, M e L, indicando a sensibilidade máxima em comprimentos de onda curtos, médios e longos, respectivamente. Os picos de sensibilidade ocorrem perto de 440 (azul), 540 (verde) e 580 nm (vermelho) em humanos com visão de cor normal. Os sinais desses três receptores são processados no olho que os envia como três sinais opostos, dois cromáticos e um acromático, para posterior processamento do cérebro e interpretação (NASSAU, 2001).

Após atravessar várias camadas da retina, os raios luminosos atingem os cones e bastonetes, iniciando o processo visual. Este processo é extraordinariamente sensível, porque um fóton é suficiente para desencadear a produção de potenciais elétricos num bastonete. Admite-se que a luz aja promovendo a descoloração dos pigmentos visuais. Esse processo fotoquímico

causa potenciais de membrana que são transmitidos pelo nervo óptico até o cérebro, onde tem lugar a percepção visual (FIG.9). O pigmento visual inicialmente descorado é restaurado, e o processo pode iniciar-se novamente. Os pigmentos visuais se localizam nas vesículas achatadas dos cones e bastonetes e são constituídos pelo retineno, um aldeído da vitamina A.

Figura 9- A figura representa o caminho percorrido pela luz (itens de 10 a 3), até atingir as células fotorreceptoras, os cones e bastonetes (itens 2 e 1) (adaptado de KIERSENBAUM & TRES, 2012).

Como resultado da complexidade do sistema desconhecido da ligação entre o olho e o cérebro, há um número de efeitos que podem interferir com a percepção precisa da cor. Os cones são inativos em baixos níveis de luz, e os bastonetes da retina são ativados e a percepção da cor é então perdida nesta visão noturna (escotópica). A visão do dia (fotópica) é obtida através de três conjuntos de cones, conforme a intensidade da luz aumenta, após o início da percepção da cor, torna-se mais intensa, parecendo mudar de cor, este é o efeito Bezold-Brucke, por

exemplo: as cores azuis são inicialmente muito pouco percebida. Com a adaptação cromática ou sucessivo contraste de brilho há um efeito de fadiga dos receptores de cor azul, e depois, quando se olha para um objeto vermelho, uma imagem verde é vista sobre uma superfície branca. Esse fenômeno é dado pela Teoria das Cores de Hering ou Teoria das cores oponentes (NASSAU, 2001).

3.8.2 Colorimetria sólida

A cor é um fenômeno psicobiofísico sendo uma propriedade de percepção visual, correspondendo nos humanos às categorias vermelho, azul, amarelo, verde, etc. A partir da descoberta de que o olho humano é capaz de perceber todas as cores através das composições das três cores básicas (vermelho, verde e azul), cuja detecção é efetuada pelos cones, na retina, a Colorimetria foi fundamentada no princípio de que todas as cores podem ser representadas a partir da composição destas três cores básicas (Souza *et al.*, 2008).

As características da cor são definidas por três atributos: o atributo da luminosidade e dois atributos da cromaticidade. As siglas que os representam são respectivamente: L^* , a^* e b^* , obtidos da escala CIELAB ou CIE $L^*a^*b^*$ da *Commission Internationale de l'éclairage* (1976). A luminosidade (L^*) tem como limites o zero sendo nessa escala o valor para a cor preta e 100 valor referente a cor branca. A cromaticidade é representada pela raiz quadrada da soma dos valores de a^* e b^* ao quadrado. Quanto mais positivo for o valor de a^* , mais intensa será a coloração vermelha; quanto mais negativo, maior será a coloração verde. Da mesma forma o parâmetro b^* representa a relação entre a cor amarela ($+b^*$) e azul ($-b^*$), conforme esquema da figura 10 (Souza *et al.*, 2008).

Figura 10 - Parâmetros colorimétricos. A figura A representa um esquema tridimensional da disposição dos parâmetros colorimétricos de análise. A figura B representa a variação de coloração dos parâmetros colorimétricos a^* , b^* e L^* . Disponível em: <https://www.byk.com/en/instruments/products/color-measurement/portable-spectrophotometers.html>, acessado, 09/06/2013.

3.9 Tomografia por Coerência Óptica (*Optical Coherence Tomography-OCT*)

A Tomografia por Coerência Óptica é uma tecnologia diagnóstica de análise não-invasiva para obtenção de imagens em escalas microscópicas. Essa técnica é capaz de gerar imagens de secções transversais de sistemas biológicos sem a necessidade de qualquer preparação prévia das estruturas a serem estudadas (FREITAS, 2007).

A capacidade da técnica OCT é de uma resolução espacial de 10 μm ou menos, o que representa uma resolução cerca de 10 vezes maior do que o ultrassom convencional. Além disso, diferentemente do ultrassom convencional, esta técnica não requer contato direto com o tecido a ser estudado. Porém, 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; FREITAS, 2007).

O sistema OCT (FIG. 11) utiliza fibras ópticas e uma fonte compacta de luz. A luz proveniente da fonte é dividida por uma via óptica divisora (FIG. 11 item 1), a qual atua como um interferômetro. Uma das fibras dirige a luz para o tecido (FIG.11 Item 2) a ser estudado e a outra dirige a luz para um espelho-referência em movimento (FIG.11 Item 3), 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. Isto permite uma precisa determinação tanto da distância dentro do tecido que a luz foi refletida quanto sua magnitude. A resolução axial das imagens geradas pelo 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 superluminescente compacta, a resolução axial é de 10 a 20 μm . Se fontes alternativas, como pulsos ultracurtos de *laser*, são utilizadas, a resolução axial pode chegar até 2 a 4 μm (CLIVAZ *et al.*, 1994; FUJIMOTO *et al.*, 1995).

Figura 11 - Fluxo de análise por OCT. O item 01 representa a via óptica divisora (interferômetro), o item 02 indica o caminho percorrido pela luz até a amostra a ser analisada e o item 03 é o caminho percorrido pela luz até o espelho-referência em movimento, para processamento posterior no microcomputador (Adaptado de RAELE, 2009).

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 (FIG. 11). Esta representação pode então ser mostrada em uma escala da cor cinza ou, ainda, por cores falsas (padrão RGB), cujas diferentes cores indicam o grau de espalhamento dos fótons da seguinte maneira: 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*), onde o vermelho representa maior sinal, seguido pelas cores laranja, amarelo, azul, verde e violeta (FUJIMOTO *et al.*, 1995).

3.10 Capacidade de reidratação por termogravimetria (TG)

A termogravimetria é a análise que permite o registro contínuo da variação de massa em função da temperatura e/ou do tempo numa atmosfera controlada. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias (perda ou ganho), assim estabelecendo uma faixa de temperatura em que elas adquirem composição química fixa (massa definida e constante), a temperatura em que começam a decompor e verificar o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre outras. Três modos de termogravimetria são comumente usados: termogravimetria isotérmica, termogravimetria quasi-isotérmica e termogravimetria dinâmica ou convencional (CANEVAROLO, 2003).

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

A utilização da técnica de termogravimetria se torna relevante para se compreender a influência do processo de esterilização por radiação ionizante no método de preservação dos tecidos. A preservação em glicerol provoca o trânsito de moléculas entre a rede de colágeno do tecido e, assim, as modificações provocadas pela radiação ionizante poderiam alterar o fluxo destas, tornando-se necessário saber como as possíveis modificações estruturais afetam o processo de difusão de água no tecido. Neste caso, pela técnica inversa, ou seja, verificando a velocidade de liberação de água medida por TG pela perda do percentual de

massa, pode-se inferir se houve alteração na estrutura terciária do colágeno, liberando a água intrínseca com maior facilidade (MARTINHO, 2012; PAGGIARO, 2011).

3.11 Propriedades biomecânicas

Um dos ensaios mecânicos de tensão de deformação mais comum é conduzido sob tração, podendo ser usado para averiguar diversas propriedades mecânicas de diferentes materiais. Neste tipo de ensaio, uma amostra é deformada por uma carga de tração que é aumentada gradativamente e que é aplicada uniaxialmente ao longo do eixo maior de um corpo-de-prova. As máquinas de ensaios de tração são projetadas para alongar o corpo-de-prova a uma taxa constante, medindo contínua e simultaneamente a carga instantânea que está sendo aplicada (com células de carga) e os alongamentos resultantes (usando um extensômetro). Tipicamente, um ensaio tensão-deformação leva vários minutos para ser realizado e é destrutivo, ou seja, a amostra testada é deformada permanentemente e, frequentemente, fraturada (CALLISTER, 2008).

O resultado de um ensaio de tração desse tipo é registrado na forma da carga, ou força em função, do alongamento. A tensão σ é definida pela relação:

$$\sigma = F/A_0 \quad [2]$$

Onde “F” é a carga instantânea aplicada em uma direção perpendicular à seção transversal do corpo-de-prova, em unidades de Newton (N) ou libras-força (lbf), e “A₀” é a área original da seção transversal antes da aplicação de qualquer carga (em m² ou in²). A unidade para a tensão é megapascal, MPa (CALLISTER, 2008).

A deformação ϵ é definida de acordo com a expressão:

$$\epsilon = l_i - l_0 / l_0 = \Delta l / l_0 \quad [3]$$

Onde “l₀” é o comprimento original antes de qualquer carga ser aplicada e “l_i” é o comprimento instantâneo. Algumas vezes, a grandeza l_i-l₀ é simbolizada por Δl , e representa o alongamento de deformação ou a variação no comprimento em um dado instante, em referência ao comprimento original. A deformação é adimensional, porém são usadas com frequência as unidades metros por metro ou

polegadas por polegadas; o valor da deformação é independente do sistema de unidades (CALLISTER, 2008).

Os materiais, em geral, podem ser classificados de acordo com o grau de deformação. Materiais elásticos recuperam sua dimensão ou forma inicial após uma deformação sem nenhum gasto energético, já os materiais puramente plásticos cedem, continuamente, sob a ação de uma força e não retornam ao estado original espontaneamente após a retirada desta última, requerendo uma força adicional para retornar a seu estado inicial. A combinação destas duas propriedades é denominada viscoelasticidade, que tem como característica, após uma deformação, retornar ao estado original pelo componente elástico; entretanto, esta recuperação segue uma curva diferente, menos linear, devido ao consumo de parte da energia aplicada (SILVER *et al.*, 2001).

O grau até onde uma estrutura se deforma ou se escoa está relacionado com a magnitude de uma tensão imposta. A tensão e a deformação são proporcionais entre si pela seguinte correlação:

$$\sigma = E \epsilon \quad [4]$$

Esta é conhecida como a *lei de Hooke* e a constante de proporcionalidade E (MPa) é o módulo de elasticidade ou *módulo de Young* (CALLISTER, 2008). O módulo de elasticidade (E) é a relação entre a tensão e o alongamento do tecido. Assim, quanto mais resistente o tecido ao alongamento, maior o valor do módulo de elasticidade, sendo calculado da seguinte maneira:

$$E = \Delta\sigma/\Delta\epsilon \text{ ou } E = \sigma_2 - \sigma_1 / \epsilon_2 - \epsilon_1 \quad [5]$$

3.12 Histologia

3.12.1 Preservação e fixação do material

O tecido e seus componentes devem ser preservados e tornados estáveis em termos estruturais em uma condição o mais semelhante possível da condição em vida, para que se evitem a decomposição e a putrefação.

Entretanto, entre outras coisas, devido à alta quantidade de água na matéria viva, isso é possível apenas dentro de certos limites, de modo que não existe um meio de preservação química ideal.

A fixação deve promover o endurecimento do material e, com isso, proporcionar uma textura adequada para que o mesmo possa ser mais facilmente cortado (clivagem do material). A fixação geralmente realizada com solução neutra de formol 10% provavelmente elimina as bactérias e outros microrganismos patogênicos presentes no material (SOBBOTA, 2007).

3.12.2 Inclusão

Os fragmentos de tecidos, já fixados, vão sendo gradativamente colocados em solventes (meios intermediários), até que finalmente sejam “incluídos” em materiais que se solidifiquem para que possam ser cortados. Como solventes, utiliza-se uma série de alcoóis (ou acetonas) em concentração crescente, que não somente leve a uma completa, mas também cuidadosa retirada do conteúdo de água do material e, conseqüentemente, ao seu endurecimento e, ao mesmo tempo, dissolve todas as gorduras e os lipídeos presentes nas células dos tecidos. Por fim, o material desidratado e diafanizado com xilol são incluídos em parafina a fim de propiciar os cortes adequadamente finos, de 5-8 μm , feitos para microscopia óptica (SOBBOTA, 2007).

3.12.3 Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

Dentre todos os corantes, a combinação de hematoxilina e eosina (HE) é a mais comumente utilizada, sendo que a hematoxilina cora em azul ou violeta o

núcleo das células e outras estruturas ácidas e a eosina, por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa. A coloração dos cortes fixados em lâminas é feita após reidratação (Junqueira & Carneiro, 2004; Gartner & Hiatt, 2007). Desta maneira, os cortes histológicos estão prontos para a sua visualização no microscópio.

3.12.4 Coloração de Picrossirius

A coloração de Picrossirius Red sob luz polarizada é o método histoquímico específico para a detecção do colágeno que apresenta, através da birrefringência do tecido, diferentes intensidades de cores, sendo útil para o estudo da distribuição estrutural e diferenciação dos tipos de colágenos. Por esse método, o colágeno tipo I mostra-se fortemente birrefringente, como fibras colágenas grossas, corando-se do amarelo-alaranjado ao vermelho, e o colágeno tipo III (reticulina) se apresenta formado por fibras finas, pouco compactas, corando-se do amarelo-esverdeado ao verde. Sua utilização é de suma importância na investigação de alterações nas fibras colágenas dos tecidos e confirmações de diagnósticos (SOBBOTA, 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Captação

A captação das membranas amnióticas vem sendo realizada, após anamnese e triagem sorológica das doadoras, pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo (ICHC-SP). Os âmnios provenientes de cesariana eletiva, que não puderam ser utilizados para transplante, foram fornecidos pelo Banco de Tecidos do ICHC-SP, depois de realizado pedido formal por meio do “Termo de Doação Livre e Esclarecido” e após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-FSP/USP, sob o nº 2167 (Anexo A). As amostras foram processadas e conservadas em glicerol à concentração maior que 85%, por no mínimo 30 dias, no Banco de Tecidos. Após este período, foram fracionadas e embaladas no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP). Foram utilizadas MA's de cinco doadoras.

4.2 Processamento e fracionamento dos âmnios

4.2.1 Processamento

As amostras, após triagem do doador, foram lavadas com solução fisiológica a 0,9% separando o âmnio do córion e retirando restos de sangue do doador. Depois de limpas, as membranas foram acondicionadas em frasco plástico rígido estéril e imersas em solução salina com antibióticos (penicilina cristalina - 1.000.000 U/L e sulfato de estreptomicina - 1g/L) entre 6 a 12 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram expostas a uma solução de Glicerol com concentração >85% sob agitação de 90 rpm a 37°C durante três horas. Transcorrido este intervalo de tempo, as membranas foram colocadas em solução fresca de Glicerol >85%, conforme exemplificado na figura 12. Essas etapas foram realizadas pelo Banco de Tecidos do ICHC-SP.

Figura 12 – Representação da etapa de limpeza do âmnio

4.2.2 Fracionamento

Cada uma das cinco membranas amnióticas preservadas em glicerol, com concentração superior a 85%, foram seccionadas em 9 tiras (4 para irradiação com fonte de cobalto-60; 4 para irradiação com acelerador de elétrons e 1 para os controles) de 52,5 cm² (FIG. 13), estendidas sobre papel de filtro estéril, com a parte epitelial voltada para cima (superfície lisa e mais brilhante), em condições assépticas, na cabine de fluxo laminar horizontal. Depois de estendidas no suporte de papel de filtro, as faixas foram acondicionadas em embalagens estéreis transparentes, seladas e armazenadas em geladeira na temperatura de 2 a 8 °C até o momento da irradiação. Cada membrana amniótica de um doador foi identificada conforme a ordem de recebimento da amostra.

Figura 13 – Representação do fracionamento para as diferentes análises do âmnio. (A) Uma tira contendo a triplicata. (B) Porção unitária para análise. (C) Cada cor identifica o fragmento destinado para cada tipo de teste.

Cada membrana amniótica tem aproximadamente 900 cm² de área total, da qual pode-se fracionar 9 tiras (FIG.13 A) totalizando uma área de 472,5 cm². Após o fracionamento, a área total utilizada para as análises foi de 405 cm².

As membranas, após seccionadas em tiras, foram embaladas individualmente, com a parte epitelial voltada para cima, em dois sacos estéreis (embalagem primária e secundária) e identificadas com a dose de radiação pertinente e o tipo de irradiador (FIG. 14 A e B). A etiqueta que identifica se o material foi ou não irradiado foi colada junto à embalagem primária. Após a irradiação do tecido, as embalagens foram abertas em fluxo laminar e cada tira foi fracionada, conforme visto anteriormente (FIG. 13), para cada análise prevista no estudo (FIG 14 C). Depois de fracionadas, as secções destinadas aos respectivos experimentos foram reembaladas e identificadas (FIG. 14 D).

Figura 14 - Processamento da membrana amniótica. As imagens A e B se referem ao fracionamento primário no qual o âmnio recebido foi dividido em faixas apoiadas em papel de filtro, embaladas em sacos duplos estéreis. As imagens C e D são referentes à segunda etapa de fracionamento na qual o âmnio foi dividido para todos os testes a serem realizados.

4.3 Irradiação das amostras em fonte de Cobalto-60 e em acelerador de elétrons .

As amostras foram divididas entre amostras não irradiadas (controle), irradiadas por fonte de Cobalto-60 (raios gama) e por acelerador de elétrons (feixe de elétrons.), com doses de 10, 15, 25 e 35 kGy. Para evitar variações de temperatura das amostras, devido ao tempo de irradiação, foram colocadas bolsas térmicas para manter a temperatura entre 2 a 8 °C. As irradiações foram feitas entre fevereiro de 2011 e novembro de 2012. As taxas de dose pertinentes a cada período de irradiação das amostras foram as seguintes (TAB.2):

Tabela 2 – Taxa de dose em relação às fontes /período

Período	Gammacell (kGy/h)	Acelerador de Elétrons (kGy/s)
Fevereiro/2011	1,73	3,91
Março/2012	1,50	3,91
Julho/2012	1,43	3,91
Novembro/2012	1,41	3,91

Abaixo pode-se observar as duas fontes de radiação ionizante utilizadas na irradiação dos âmnios (FIG.15).

Figura 15 - A imagem A refere-se ao irradiador Gammacell Nordion Inc., Quebec, Canadá. A imagem B é referente ao acelerador de elétrons com sistema de esteiras deslizantes.

4.4 Análise qualitativa

A análise qualitativa manual e visual das amostras de dimensão 2 x 2 cm (triplicata) foi realizada, observando-se as características morfológicas e visuais do tecido após o tratamento com radiação ionizante e relacionando possíveis alterações com o tecido não irradiado. Os resultados obtidos foram analisados por meio de documentação fotográfica e de um quadro comparativo entre as amostras irradiadas nas duas fontes de radiação e o controle, de acordo com os quadros abaixo (Quadros 1 e 2). Sendo um teste não destrutivo, as amostras também foram utilizadas no teste de colorimetria sólida e OCT.

Quadro 1 – Modelo de avaliação da análise qualitativa para cor

0	Sem alteração significativa comparada ao controle não irradiado
1	Pouca mudança de cor amarelada
2	Moderada mudança de cor amarelada
3	Elevada alteração de cor amarelada

Quadro 2- Modelo de avaliação da análise qualitativa para Elasticidade→Viscoelasticidade

0	Sem alteração significativa comparada ao controle não irradiado
1	Pouca perda de elasticidade
2	Moderada perda de elasticidade, aumento de viscoelasticidade
3	Elevada perda de elasticidade, aumento de viscoelasticidade

4.5 Colorimetria sólida

Na colorimetria, foram analisadas as características da cor definidas por 3 atributos: o atributo da luminosidade e dois atributos da cromaticidade (L^* , a^* e b^*). As alterações de cor da membrana amniótica glicerolada foram analisadas com a utilização do Colorímetro Gardner Spectro-guide sphere gloss, Byk. As amostras foram dispostas sobre um disco de membrana branca e lisa, GS Millipore de éster de celulose com 47 mm de diâmetro e de porosidade 0,22 μm , apoiado em uma superfície de Silistone® branco absoluto revestido por plástico de PVC (filme). Este sistema possuía características ideais para utilização como padrão devido à variação mínima dos parâmetros colorimétricos e fácil sanitização (FIG.16).

Figura 16 - Esquema representativo da sequência de análise com colorímetro em 90° (A), 180° (B) e 360° (C). A figura D é a representação da amostra de âmnio hidratada para análise posterior.

A análise colorimétrica também foi realizada com as amostras reidratadas a fim de avaliar e comparar as alterações de coloração desde o armazenamento nos bancos de tecidos (membrana em glicerol) até a aplicação clínica após a hidratação das mesmas.

4.6 Tomografia por Coerência Óptica (OCT)

A mesma amostra de proporção 2 x 2 cm do teste de colorimetria sólida foi utilizada para a realização da leitura por OCT.

O âmnio analisado, retirado da superfície do papel de filtro, foi estendido sobre uma lâmina de vidro com um suporte vazado de aço inox, possibilitando uma interface ar/ar para que a membrana não ficasse aderida à lâmina de vidro. Foram realizados três tipos de imagem com diferentes escalas (cinza, cores padrão RGB e cinza invertida) selecionando a melhor visualização para análise dos dados, conforme as ilustrações a seguir (FIG. 17):

Figura 17 - Imagens do âmnio em glicerol geradas por OCT sendo “A” a escala de cinza, “B” a escala de cores “falsas” (padrão RGB) que indicam o espalhamento de fótons e “C” a escala invertida de cinza.

Após a visualização das imagens geradas foi possível escolher a imagem “A”, figura 17 A, como padrão na análise por OCT.

As espessuras da membrana amniótica visualizadas nas imagens geradas pela técnica de OCT puderam ser mensuradas por meio da utilização do software Image J®. Foram realizadas vinte medições de cada imagem em triplicata para cada dose de irradiação nas duas fontes de radiação ionizante.

O cálculo do coeficiente de atenuação óptica total foi realizado por meio de software (FIG.18) o qual permitia a medição de diversas áreas da imagem, gerando o valor do coeficiente em dobro devido a imagem ter sido gerada com a ida do raio luminoso e seu retorno no momento de registro da imagem.

Figura 18- Representação da visualização dos resultados gerados pelo programa computacional de análise da imagem gerada por OCT para cálculo do coeficiente de atenuação óptica total

4.7 Capacidade de reidratação por termogravimetria (TGA)

Nesta etapa, foi utilizado o analisador térmico simultâneo TG/DTA, modelo Q600, marca TA Instruments (FIG.19). O analisador Q600 permite obter simultaneamente dados de termogravimetria (TG) e de análise térmica diferencial ou calorimétrica exploratória diferencial (DTA/DSC), comparando-se o comportamento térmico da amostra contra um padrão de referência termicamente inerte na faixa de temperatura estudada. Alternativamente, o equipamento pode medir a variação de massa de duas amostras simultaneamente, em detrimento dos dados de DTA/DSC, comportando-se como duas termobalanças. Assim, as amostras de 1 x 1 cm previamente hidratadas conforme protocolo estabelecido (PAGGIARO, 2011), foram dispostas nas balanças do equipamento para avaliação simultânea da variação de massa. As amostras (duas a duas) foram submetidas ao aquecimento linear a uma razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até uma temperatura de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de um estágio isotérmico de 10 minutos. Foram avaliadas: a quantidade e a taxa de saída de água das membranas irradiadas e não irradiadas, por meio da regressão linear da curva gerada no software TA Universal Analysis, com os valores da relação percentual de massa x tempo.

Figura 19 - A figura A é o analisador térmico simultâneo TG/DTA SDT-Q600, e a figura B mostra seu sistema de pratos para colocação das amostras.

4.8 Ensaio de tração

Cada fragmento da amostra ($3,5 \times 1\text{ cm}$), cortado no formato de halteres com extensômetro de $0,5\text{ cm}$ de largura e 1 cm de comprimento (FIG. 20), foi fixado nos suportes e submetido a tração com a utilização do Texturômetro (Texture Analyzer modelo TAXT.plus, marca Stable Micro Systems), com

velocidade de afastamento de 10 mm/minuto até a ruptura do material, conforme exemplificado na figura 21 . (CHUA & OYEN, 2009; Nakamura, 2004; BOURROUL, 2004).

Figura 20 - Esquema do corte da MA para o teste de tração.

Figura 21 - Posicionamento da membrana na realização do teste.

Após a confecção dos corpos de prova anteriormente citados (FIG. 22 A), esses foram hidratados em solução salina por 30 minutos (FIG. 22 B) e estendidos nas pinças do equipamento (Texturômetro) para a realização das análises biomecânicas das membranas amnióticas (FIG. 22 C e D).

Figura 22 - Esquema de análise dos corpos de prova feitos em forma de halteres para análise no texturômetro. A imagem A mostra a disposição dos corpos de prova em forma de halteres sobre papel de filtro. A imagem B mostra a etapa de reidratação dos cortes sem o papel de filtro. As imagens C e D mostram a fixação dos corpos de prova no texturômetro para análise biomecânica.

Este teste foi realizado em triplicata, para cada dose de radiação empregada, e efetuado o cálculo dos respectivos módulos de elasticidade (E) segundo equação descrita nas considerações gerais (item 3.11), com os valores de tensão (stress) em MPa e deformação (*strain* ou distância percorrida) em mm, a partir do gráfico (FIG. 23), gerado pelo programa Advantage v 5.4.0.

Figura 23 - Gráfico do ensaio de tração gerado pelo programa computacional, mostrando a relação tensão em MPa (Stress), deformação (Distance) dada pela distância em milímetros.

4.9 Histologia

4.9.1 Processamento e cortes

Os cortes da membrana amniótica de dimensão de 1 X 1 cm foram reidratados, por no mínimo, 30 minutos e acondicionados em recipiente de fundo chato com solução de formalina tamponada 10% por 24 horas, e posteriormente em solução de álcool 70%. Emblocadas em parafina histológica, as membranas foram cortadas em micrótomo com cortes transversais de 5 µm de espessura.

4.9.2 Coloração por Hematoxilina-Eosina (HE)

A coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) foi feita nos cortes de 5 µm, acondicionados em lâminas de vidro, após serem desparafinizados com xylol, passando por álcool absoluto para hidratação até a diluição de álcool 70%, e depois lavados em água corrente. As lâminas foram mergulhadas em Hematoxilina (20 segundos) e novamente lavadas em água corrente. Estas lâminas, em seguida, foram banhadas em álcool-ácido 1,0% e uma nova lavagem em água por 5 minutos. Os cortes foram corados com Eosina, por 20 segundos, e submetidos a uma solução de álcool 90% até o álcool absoluto, em seguida as lâminas foram mergulhadas em xylol por 5 minutos.

4.9.3 Coloração por Picrossirus Red

A coloração de Picrossirus, realizada com corante Sirius Red (F3BA), feita nos cortes de 5 µm, acondicionados em lâminas de vidro, desparafinizados com xylol, hidratados com água, e corados por 1 hora em solução 0,1% de Sirius Red dissolvido em solução saturada de ácido pícrico. As secções foram rapidamente lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina por 5 minutos, lavadas novamente em água corrente e posteriormente lavadas em água destilada (MONTES, 1996). Após a coloração, a análise foi realizada no microscópio de luz com dois filtros polarizadores (Leica, modelo DMLP, com câmera Canon Power Shot S40) para estudar a birrefringência da coloração do colágeno e para visualizar possíveis alterações após o tratamento com radiação ionizante, e as imagens foram registradas fotograficamente.

4.9.4 Desepitelização do âmnio

As amostras irradiadas de dimensão 2 x 2 cm, em triplicata, foram desepitelizadas pela técnica de Tripsina/EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético). A remoção do epitélio é fundamental para o cultivo de células sobre a membrana basal do âmnio. As porções irradiadas foram fracionadas em alíquotas de 1 x 1 cm, reidratadas por 30 minutos e incubadas em solução de Tripsina a 0,05% /EDTA a 0,02% a 37 °C, por 20 minutos (FIG.20), conforme procedimentos estabelecidos (PAGGIARO, 2011). Após este procedimento, as amostras foram conservadas em formalina tamponada 10% por 24 horas e acondicionadas

posteriormente em solução de álcool 70%. Emblocadas em parafina histológica, as membranas foram cortadas em micrótomo com cortes transversais de 5 μ m de espessura. A eficiência de desepitelização foi avaliada por coloração histológica com Hematoxilina-Eosina e Picrossirius, conforme descrito anteriormente.

Figura 20 - Esquema de desepitelização das amostras para análise microscópica. A figura A representa a etapa de reidratação das amostras antes da aplicação de Tripsina a 0,05% /EDTA a 0,02%. As figuras B e C mostram o acondicionamento em Tripsina/EDTA e incubação das amostras a 37 °C, respectivamente. A figura D mostra a etapa de acondicionamento das amostras em formalina 10% para confecção dos blocos histológicos e análise posterior.

4.10 Análise estatística

Os resultados das análises dos respectivos testes foram expressos em média e desvio padrão, sendo comparados estatisticamente, em relação ao grupo controle pela análise de variância *One-way* ANOVA utilizando o programa computacional Excel®, onde valores de “p” menores que 0,05 foram considerados como significativamente diferentes.

5 RESULTADOS

5.1 Irradiação do âmnio

As doses nas membranas irradiadas por Cobalto-60 (Gammacell) foram de 10; 15; 25 e 35 kGy e as doses aplicadas com o A.E. foram de 10,5; 15,75; 24,5 e 35 kGy. Essa variação em acelerador foi devida ao sistema de esteiras do equipamento, para o qual é necessário calcular a dose mais próxima da desejada em função do número de voltas do material nesse circuito. Dessa forma, para melhor compreensão do trabalho, foram adotadas as mesmas doses aplicadas em acelerador de elétrons e Gammacell.

Os tempos necessários para atingir a dose requerida foram diferentes para as duas fontes de radiação devido à diferença das taxas de dose (item 4.3, TAB. 2) entre as mesmas.

5.2 Análise qualitativa

A avaliação qualitativa das alterações físicas que a radiação ionizante pode provocar nos tecidos glicerolados é fundamental para determinar a capacidade de manuseio do material (PAGGIARO, 2011).

A análise qualitativa foi realizada em triplicata para cada dose de radiação para ambas as fontes (Gammacell e A.E.), nas membranas conservadas em glicerol e posteriormente reidratadas. Os testes foram realizados simultaneamente com o teste de colorimetria sólida, onde era necessário um manuseio das amostras para análise colorimétrica. O grau de variação dos parâmetros de coloração e elasticidade foi avaliado conforme a escala de grau de alteração citados anteriormente (item 4.4, Quadros 1 e 2). Foi possível verificar que as membranas conservadas em glicerol e irradiadas em Gammacell, assim como no A.E., com dose de 35 kGy mostraram notória modificação de suas características originais (controle) nos parâmetros de coloração (aspecto amarelado), elasticidade (menos elástica, tornando-se mais viscoelástica), estas alterações foram gradativas a partir de 10 kGy para o parâmetro coloração e de 15 kGy para o parâmetro elasticidade, conforme a tabela 3:

Tabela 3- Análise qualitativa das membranas amnióticas gliceroladas

Dose	Tipo de irradiação	Coloração amarelada	Elasticidade→Viscoelasticidade
Controle (0 kGy)	-----	0	0
10 kGy	GAMA	1	0
	A.E.	2	1
15 kGy	GAMA	2	1
	A.E.	2	2
25 kGy	GAMA	2	2
	A.E.	3	2
35 kGy	GAMA	3	2
	A.E.	3	2

Tabela 4- Análise qualitativa das membranas amnióticas reidratadas

Dose	Tipo de irradiação	Coloração amarelada	Elasticidade→Viscoelasticidade
Controle (0 kGy)	-----	0	0
10 kGy	GAMA	1	0
	A.E.	1	0
15 kGy	GAMA	1	1
	A.E.	1	0
25 kGy	GAMA	2	0
	A.E.	2	1
35 kGy	GAMA	2	3
	A.E.	3	3

Após a reidratação das membranas, estas foram analisadas (TAB. 4) utilizando os mesmos parâmetros da avaliação das membranas conservadas em glicerol. Estas membranas, quando irradiadas com doses até 15 kGy, por ambas as fontes de irradiação (Fonte de cobalto-60 e feixe de elétrons), tiveram de pouca à moderada (valores de 1 a 2) alteração de cor; já com doses mais elevadas, a partir de 25 kGy, as cinco membranas analisadas tiveram de moderada à elevada (valores de 2 a 3) alteração de coloração, deixando-as com aspecto mais amarelado, assim como os resultados obtidos na análise do âmnio gliceroldado.

Quanto ao parâmetro de viscoelasticidade, as membranas tiveram pouca alteração (valor 1) a partir de 15 kGy em A.E e elevada alteração com 35 Kgy (valor 3) para as amostras irradiadas em Gammacell e A.E..

Dessa forma, a representação gráfica das alterações encontradas nas membranas conservadas em glicerol foi realizada para melhor visualização das diferenças individuais observadas nas membranas em relação à dose de radiação, sendo que quando as mesmas são irradiadas com doses de 35 kGy por ambas as fontes, as alterações de coloração têm o mesmo resultado qualitativo (FIG.24).

Figura 24 - Comparação entre as alterações de coloração do âmnio encontradas nas membranas gliceroladas irradiadas em Gammacell (A) e A.E. (B).

A alteração de coloração foi observada em todas as amostras, variando sua intensidade conforme o aumento da dose. Fotograficamente (FIG.25 e 26) foi difícil avaliar as variações de coloração da membrana após a irradiação, vistas a olho nu, tanto nas membranas conservadas em glicerol quanto nas membranas reidratadas. A avaliação dessa alteração visualmente perceptível não é evidente quando fotografada.

As alterações vistas nas cinco membranas analisadas, conservadas em glicerol, foram às mesmas encontradas após a reidratação, por esse motivo não foi realizada a representação gráfica desses resultados.

Após a avaliação qualitativa, com a atribuição de valores de grau de alteração, conforme mostrado nas tabelas anteriores, o registro fotográfico foi realizado, para melhor compreensão de quanto são perceptíveis as mudanças ocorridas nos âmnios após a irradiação dos mesmos (FIG.25).

Figura 25 - Comparação fotográfica das alterações de coloração nas amostras de membrana amniótica em glicerol não irradiada (A), amostras irradiadas com cobalto-60 (B1-B4) e amostras irradiadas em A.E. (C1- C4).

Na figura 26, as membranas amnióticas não irradiadas (controle), quando reidratadas, parecem estar mais opacas, comparadas às membranas quando estão conservadas em glicerol (FIG. 25, A), porém suas alterações de coloração, visualmente percebidas, mantiveram as mesmas variações vistas nas membranas conservadas em glicerol.

Figura 26 - Comparação fotográfica das alterações de coloração nas amostras de membrana amniótica reidratadas, não irradiada (A), amostras irradiadas raios gama emitidos por cobalto-60 (B1-B4) e amostras irradiadas em A.E. (C1-C4).

Ao contrário do parâmetro de coloração, as alterações vistas nas cinco membranas, conservadas em glicerol, analisadas quanto à elasticidade foram homogêneas entre si até a dose de 15 kGy (FIG.27). Sendo que os mesmos resultados foram obtidos após a reidratação, não foi realizada a representação gráfica dos mesmos.

Figura 27- Comparação entre as alterações de elasticidade do âmnio encontradas nas 5 diferentes membranas gliceroladas e irradiadas em Gammacell (A) e A.E.(B).

5.3 Colorimetria

Foram realizadas três leituras em triplicata para cada dose de irradiação para cada âmnio, a fim de observar as variações de cor e luminosidade, tanto em sua forma de armazenamento (glicerol) quanto em sua fase de aplicação clínica com a membrana reidratada.

As medições foram realizadas primeiramente com as membranas não irradiadas (controle) armazenadas em glicerol e posteriormente, após reidratação das mesmas. Na figura 28, observando os parâmetros colorimétricos citados anteriormente (item 3.8.2), onde para “b*” o deslocamento foi positivo (em direção ao amarelo), variando de 2,0 a 6,0 na escala de cromaticidade, nas medições realizadas nas cinco membranas estudadas, tanto para as membranas gliceroladas, quanto para as reidratadas. Quanto ao parâmetro “a*”, observa-se uma variação negativa (em direção ao verde) de -0,2 a -0,5 para o controle em glicerol e, -0,2 a -0,8; para os controles reidratados. Nessa análise, tanto nas membranas em glicerol quanto nas membranas reidratadas, foi observado alteração no parâmetro de luminosidade, variando de -0,8 a -3,5 nos controles conservados em glicerol e -0,8 a -4,5 nos mesmos após reidratação.

Figura 28 – Gráfico dos resultados individuais correlacionando os parâmetros a^* (eixo X), b^* (eixo Y) e L^* na sua lateral (representando o eixo Z no plano bidimensional): (A) 5 membranas gliceroladas não irradiadas, em triplicata e (B) 5 membranas reidratadas não irradiadas, em triplicata.

Na etapa seguinte foram analisadas as membranas irradiadas nos irradiadores Gammacell e A.E., a partir dos resultados apresentados nas figuras 29 e 30, respectivamente, onde estão representados os resultados médios (das triplicatas) de variação de coloração e luminosidade, de todas as amostras, inclusive o controle não irradiado, a fim de avaliar a tendência de variação da cor em função da dose e fonte de radiação ionizante. Estas membranas foram analisadas da mesma forma que as membranas controle, ou seja, membranas em glicerol e após reidratação.

Figura 29 - Gráfico correlacionando os parâmetros a^* (eixo X), b^* (eixo Y) e L^* (na sua lateral). Em (A) estão os resultados das colorações e luminosidade encontradas nas amostras controle e das amostras irradiadas com 10, 15, 25 e 35 kGy em Gammacell, conservadas em glicerol. Em (B), são as variações ocorridas nas mesmas amostras após a reidratação.

Figura 30 - Gráfico correlacionando os parâmetros a^* (eixo X), b^* (eixo Y) e L^* (na sua lateral). Em (A) estão os resultados das colorações e luminosidade encontradas nas amostras controle e das amostras irradiadas com 10, 15, 25 e 35 kGy em Acelerador de Elétrons, conservadas em glicerol. Em (B), são as variações ocorridas nas mesmas amostras após a reidratação.

Nas membranas irradiadas por raios gama de cobalto-60 (Gammacell), foi observado que as alterações de cor estavam relacionadas ao deslocamento dos valores de cromaticidade no eixo $+b^*$ e no eixo $-a^*$, em relação à dose, assim como, o grau de alteração da cor (MA amarelada) tem um comportamento linear em relação à dose. Esse evento foi observado nas membranas conservadas em glicerol que tiveram variação no eixo $"b^*"$ de 2,0 a 8,3; no eixo $"a^*"$ -0,1 a -0,9 (FIG 29 A). Após a reidratação, os resultados no eixo $"b^*"$ foram de 2,0 a 9,8 e no eixo $"a^*"$ de -0,1 a -1,2 (FIG.29 B).

Nas análises das membranas irradiadas por feixe de elétrons, foi possível verificar que houve uma maior variação no eixo $+b^*$, de 2,0 a 9,0; e no eixo a^* -0,2 a -1,2, em relação ao controle e diretamente proporcional ao aumento de dose (FIG 30 A). Esse evento foi observado nas membranas que após a reidratação tiveram resultados no eixo b^* de 2,0 a 12,0 e no eixo a^* de -0,2 a -1,45 (FIG 30 B).

As variações de luminosidade entre as amostras irradiadas por ambas as fontes, conservadas em glicerol e reidratadas, foram comparáveis entre si.

Com as medições das membranas feitas pelo colorímetro, (5 membranas, em triplicata), foram obtidos os 45 resultados para cada dose de radiação gama e feixe de elétrons aplicadas, além dos controles não irradiados. As médias dos resultados foram representados na figura 31, e mesmo foi feito com os resultados após reidratação (FIG.31 B).

Figura 31 – Em (A) estão os resultados da análise das médias dos âmnios conservados em glicerol (controle, irradiado Gammacell e A.E.), com suas respectivas doses. Em (B) estão os resultados das médias dos âmnios após reidratação (controle, irradiado Gammacell e A.E.), com suas respectivas doses.

Os valores das médias obtidas entre os controles e as amostras irradiadas pelas respectivas fontes mostram a mesma tendência de variação de coloração em relação às doses. Partindo do controle não irradiado até a dose de 15 kGy (Gammacell e A.E.) a média dos valores apresenta variações no eixo “b*” de 2,5 a 4,0; e no eixo “a*” de -0,45 a -0,52. A partir de 25 kGy (Gammacell e A.E.) a variação no eixo “b*” de 5,0 a 6,0; e no eixo “a*” de -0,75 a -0,9 (FIG.31 A). Após reidratação, foi observado o mesmo comportamento entre as médias dos valores, variando em “b*” de 2,5 a 5,0; e em “a*” de -0,5 a -0,75, até 15 kGy e, a partir de 25 kGy, de 6,2 a 8,0 (+b*) e -0,8 a -1,1 (-a*) (FIG.31 B).

Após análise estatística dos valores de variação colorimétrica (dE*), foram construídos os gráficos (FIG. 32), os quais permitiram observar que a variação de coloração das membranas amnióticas conservadas em glicerol tiveram resultados estatisticamente significativos a partir de 25 kGy (FIG. 32 A), enquanto após a reidratação das mesmas, a variação na coloração, comparada ao do controle não irradiado, foi estatisticamente significativa a partir de 10 kGy (FIG. 32 B).

Figura 32- Em (A) estão os resultados da análise estatística da variação de coloração das amostras conservadas em glicerol. Em (B) estão os resultados da análise estatística da variação de coloração das amostras reidratadas. O símbolo “*” representa variação estatisticamente significativa entre o controle ($p < 0,05$).

Os resultados das médias obtidos nas análises dos controles, amostras irradiadas com raios gama e feixes de elétrons foram comparados em relação às suas Curvas Espectrais entre os comprimentos de ondas de 400 nm a 700 nm (FIG. 33). Recordando que, conforme visto anteriormente (item 3.8.1), a percepção do olho humano aos diferentes picos de comprimentos de ondas está compreendida entre 440 nm a 580 nm.

Figura 33- Representação da Curva Espectral da coloração da membrana amniótica, obtida por reflectância. (A) média total das análises do âmnio conservado em glicerol; (B) média total das análises do âmnio após reidratação.

No caso das amostras conservadas em glicerol (FIG.33 A), há uma variação decrescente de reflectância no início dos espectros, partindo do controle, sendo esse mais transparente, possibilitando maior reflexão (cerca de 80% de reflexão em 400 nm e com pico em 500 nm de comprimento de onda), até as amostras irradiadas com 35 kGy. Todas as amostras irradiadas tiveram esse mesmo perfil de espectro em relação aos comprimentos de onda, porém em escala decrescente apresentaram uma relação inversamente proporcional entre a reflexão e a dose de radiação. Dessa forma, observou-se que ambas as amostras, as conservadas em glicerol e posteriormente reidratadas (FIG. 33 B), tinham elevação máxima de suas curvas espectrais a partir de 500 nm, onde se inicia a reflexão da coloração verde-amarela.

5.4 Análise por OCT

A verificação das possíveis alterações causadas pela radiação ionizante no âmnio foi feita também utilizando a técnica de OCT que permite gerar imagens de alta resolução, em tempo real, sendo uma técnica não destrutiva, sem necessidade de preparo prévio das amostras.

As imagens a seguir são das membranas amnióticas em glicerol (TAB.5) ou reidratadas (TAB. 6), irradiadas por duas fontes de radiação, em suas respectivas doses:

Tabela 5- Imagens do OCT do âmnio em glicerol irradiado com raios gama e feixe de elétrons.

Dose	Gammacell	A.E.
10 kGy
15 kGy
25 kGy
35 kGy

Tabela 6- Imagens do OCT do âmnio reidratado irradiado com raios gama e feixe de elétrons.

Dose	Gammacell	A.E.
10 kGy
15 kGy
25 kGy
35 kGy

Apesar de somente pela visualização das imagens produzidas pelo OCT, não ser perceptível nenhuma alteração, tem-se a impressão de um aumento de espessura nas membranas irradiadas, após reidratação. Por meio da análise das imagens pelo programa computacional Image J®, foi possível medir as variações

de espessura verificadas nas amostras-controle, irradiadas no irradiador Gammacell e no A.E.. A FIG. 34 mostra a variação da espessura em função da dose encontrada na análise da membrana glicerolada AM2 irradiada por ambas as fontes.

Figura 34 - Espessura média da AM 2 em glicerol irradiada por Gammacell (Azul) e A.E. (vermelho)

A mesma comparação feita com membrana conservada em glicerol (AM2) irradiada por ambas as fontes, também foi realizada após a reidratação (FIG.35).

Figura 35 - Espessura média da membranas AM2 reidratadas, irradiadas por Gammacell (Azul) versus A.E. (vermelho).

Foram comparadas as variações encontradas na análise da AM2, as irradiadas por Gammacell conservadas em glicerol e posteriormente reidratadas (FIG.36 A), assim como as amostras de AM2 irradiadas em A.E. conservadas em glicerol e reidratadas (FIG. 36 B), seguindo os métodos descritos anteriormente.

Figura 36 - Gráfico Espessura média AM2 Gammacell em glicerol X AM2 Gammacell reidratado (A) e AM2 A.E. glicerol X AM2 A.E. reidratado; (B). Em A as amostras irradiadas por Gammacell em glicerol (azul) foram comparadas às mesmas membranas depois de reidratadas (verde). Em B, as amostras irradiadas por A.E. (vermelho) foram comparadas às mesmas amostras irradiadas por A.E. após reidratação.

Contudo, analisando a espessura média das cinco membranas amnióticas, foi verificado o comportamento das membranas, tanto as conservadas no glicerol quanto nas reidratadas, onde a tendência gráfica demonstra uma redução da espessura em relação do controle não irradiado com as doses de 10 e 15 kGy para as duas fontes de irradiação. Nas doses de 25 a 35 kGy, foi observado um aumento na espessura das membranas, obtendo um valor próximo do material não irradiado (FIG.37).

Figura 37 – Comparação da espessura média dos âmnios em glicerol irradiados por GammaCell (Azul) e A.E. (vermelho): (A) conservadas em glicerol e (B) após reidratação.

As medições revelaram que as amostras conservadas em glicerol, irradiadas com radiação gama ou feixe de elétrons, por esta técnica, não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.5 Coeficiente de atenuação óptica total

Para análise com maior precisão dos resultados de OCT do âmnio, foi utilizado o programa computacional para análise do Coeficiente de atenuação óptica total, desenvolvido e atualizado pelo Dr. Anderson Zanardi Freitas (2013).

O Cálculo do Coeficiente de atenuação óptica total do 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. As médias dos valores obtidos encontram-se na tabela.7.

Tabela 7–Coeficiente de atenuação óptica total das amostras em glicerol e posteriormente hidratadas

Amostras em glicerol		Amostras reidratadas	
	Média Desvio padrão (μm^{-1})		Média Desvio padrão (μm^{-1})
Controle	0,22 $\pm$ 0,11	Controle	0,29 $\pm$ 0,16
Gamma 10 kGy	0,26 $\pm$ 0,12	Gamma 10 kGy	0,24 $\pm$ 0,11
Gamma15 kGy	0,24 $\pm$ 0,11	Gamma15 kGy	0,20 $\pm$ 0,09
Gamma 25 kGy	0,30 $\pm$ 0,13	Gamma 25 kGy	0,29 $\pm$ 0,15
Gamma 35 kGy	0,28 $\pm$ 0,11	Gamma 35 kGy	0,26 $\pm$ 0,08
AE 10 kGy	0,19 $\pm$ 0,04	AE 10 kGy	0,22 $\pm$ 0,11
AE 15 kGy	0,23 $\pm$ 0,08	AE 15 kGy	0,21 $\pm$ 0,08
AE 25 kGy	0,30 $\pm$ 0,09	AE 25 kGy	0,28 $\pm$ 0,11
AE 35 kGy	0,30 $\pm$ 0,11	AE 35 kGy	0,27 $\pm$ 0,08

Por meio dos valores encontrados na tabela 7, foi possível gerar os gráficos (FIG.38) tanto para as membranas irradiadas em Gammacell e A.E., conservadas em glicerol, quanto para as membranas reidratadas, comparadas com seus controles não irradiados nas mesmas condições.

Figura 38 – O gráfico (A) mostra a tendência da variação do coeficiente de atenuação óptica total em função da dose de radiação ionizante (Cobalto-60 e A.E.) das amostras conservadas em glicerol. O gráfico (B) mostra a tendência das variações ocorridas após a reidratação.

Nas membranas gliceroladas pode ser observada uma tendência do aumento do coeficiente de atenuação, diretamente proporcional à dose, diferentemente do que ocorreu após a reidratação das mesmas, onde houve uma diminuição destes valores para as doses de 10 e 15 kGy, em ambas as fontes, e com doses maiores (25 e 35 kGy) esses valores tenderam a se aproximar do controle não irradiado. A análise estatística não mostrou variação significativa nos casos.

5.6 Capacidade de Reidratação por termogravimetria (TG)

Visando a determinar a capacidade de reidratação das membranas armazenadas em glicerol, estas foram avaliadas por termogravimetria e seus resultados foram expressos em gráficos com valores de taxa de perda de água e perda total de água da amostra, representados pela velocidade de saída de água da membrana e pelo percentual de água retido na membrana, respectivamente. O comportamento da membrana amniótica reidratada e não irradiada, controle (FIG. 39), apresentou uma taxa de perda de água de -16,13 %massa/min e a perda de água total de 94,41 %massa.

Figura 39 – Curva termogravimétrica da AM 1 não irradiada (controle). Onde a taxa de perda é determinada pela regressão linear da curva e a de perda total de água é dada pela diferença porcentagem entre o valor máximo e o mínimo de perda.

Nas amostras irradiadas por A.E., como exemplo, na FIG. 40 foram representadas as curvas referentes a membrana analisada AM1, em que não foi

verificada grande variação nos valores de taxa de perda de água, assim como na perda de água total como mostram os gráficos abaixo. Na figura 40 A, a taxa de perda de água da amostra irradiada com 10 kGy foi de -16,19 %massa/min e sua perda total foi de 92,00 %massa, na figura 40 B, a taxa de perda de água da amostra irradiada com 35 kGy foi de -15,93 %massa/min e sua perda total de 91,98 %massa. Gráfico obtido originalmente do programa TA Universal Analysis acoplado ao equipamento TGA.

Figura 40 - Curva termogravimétrica AM1 A.E. 10 kGy (A) e Curva termogravimétrica AM1 A.E. 35 kGy (B).

As amostras irradiadas por Gammacell tiveram um resultado mais expressivo em relação a seus valores de taxa de perda e perda total de água. Entre as doses de 10 kGy e 35 kGy irradiadas por fonte de cobalto-60 é possível observar essa diferença no comportamento da membrana após reidratação sendo que a taxa de perda de água foi de -16,63 %massa/min e sua perda total foi de 96,52 %massa para a amostra irradiada com 10 kGy e, a taxa de perda de água foi de -18,69 %massa/min e sua perda total de 95,17 %massa, para a amostra irradiada com 35 kGy (FIG.41).

Figura 41 - Curva termogravimétrica AM1 Gammacell. 10 kGy (A) e Curva termogravimétrica

AM1Gammacell. 35 kGy (B).

Após a determinação das curvas termogravimétricas, foram calculadas as médias referentes às análises das cinco membranas (TAB. 8) relativas à taxa de desidratação e desidratação total.

Tabela 8 – Taxa de desidratação e umidade total das membranas analisadas

	Taxa de desidratação		Umidade total	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
	(%massa/min)		(%massa)	
Controle	12,6 ± 2,43		93,8 ± 1,72	
Gamma 10 kGy	14,5 ± 1,93		93,2 ± 1,61	
Gamma 15 kGy	14,1 ± 3,2		94,8 ± 1,16	
Gamma 25 kGy	15,2 ± 1,70		93,6 ± 2,67	
Gamma 35 kGy	16,2 ± 1,39		94,5 ± 1,16	
AE 10 kGy	15,5 ± 1,62		93,2 ± 1,68	
AE 15 kGy	14,2 ± 2,57		94,2 ± 1,35	
AE 25 kGy	16,3 ± 0,96		94,3 ± 1,29	
AE 35 kGy	14,6 ± 1,46		93,7 ± 0,93	

Feitos os cálculos das médias das regressões lineares, foi possível construir o gráfico das alterações na taxa de desidratação (FIG. 42) em relação à dose de radiação ionizante empregada nas duas fontes de radiação. O mesmo foi realizado com os valores das médias de desidratação total das membranas analisadas (FIG. 43), representando a variação da umidade total das membranas em função da dose de radiação em Gammacell e A.E., comparadas ao controle não irradiado.

Figura 42 –Gráfico da variação da taxa de desidratação em função da dose de radiação ionizante.

Figura 43- Gráfico de umidade total em função da dose de radiação ionizante das duas fonte de radiação (Gammacell e A.E.).

Foi observada que tanto a taxa de desidratação (FIG.42) e desidratação total (FIG.43) das membranas, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), dependendo da dose de radiação aplicada.

5.7 Ensaio de tração

A realização do ensaio de tração possibilitou medir a variação biomecânica em função da dose de radiação ionizante em Gammacell e A.E.. Foi realizado o cálculo médio dos módulos de elasticidade por meio da divisão da tensão pela deformação do tecido (TAB.9).

Tabela 9 –Módulo de elasticidade das membranas irradiadas em Gammacell e A.E.

Radiação/Dose	Média Desvio padrão (MPa)		Média Desvio padrão (MPa)
Controle	17,8 ± 11,29		
Gama 10 kGy	28,3 ± 19,98	A.E. 10 kGy	16,3 ± 11,28
Gama 15 kGy	11,4 ± 6,94	A.E. 15 kGy	12,9 ± 5,94
Gama 25 kGy	18,0 ± 8,29	A.E. 25 kGy	22,6 ± 12,68
Gama 35 kGy	14,1 ± 9,18	A.E. 35 kGy	19,0 ± 7,52

Figura 44 - Relação entre a tensão média de ruptura e a dose de radiação ionizante para as amostras de âmnio irradiadas em Gammacell e A.E..

Utilizando os dados da tabela 9, foi construído o gráfico do módulo de elasticidade em função da dose de radiação das fontes de Cobalto-60 e A.E (FIG.44). Não foi possível detectar variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nessas condições de ensaio.

5.8 Histologia

5.8.1 Coloração de Hematoxilina-eosina

As lâminas coradas com Hematoxilina-eosina (HE) foram analisadas com um aumento de 400x, onde foi possível observar as diferentes camadas (vide item 3.1) da membrana amniótica em corte transversal (FIG 45).

Figura 45 -Fotomicrografia da AM1 não irradiada (A); irradiada em Gammacell (B1 a B4) e com A.E (C1 a C4), com aumento de 400x. (↘) indica posicionamento da camada epitelial.

Na figura 45 A (controle não irradiado), foi possível observar a camada epitelial com células bem definidas, representada pela seta em preto, assim, como suas camadas subjacentes. As amostras irradiadas com 10 kGy em Gammacell e A.E., figuras 45 B1 e C1, respectivamente, aparentam estar com pouca perda de células em sua camada epitelial e preservação de suas camadas subjacentes, assim como visto nas amostras irradiadas com 15kGy, figuras 45 B2 e C2. As amostras irradiadas a partir de 25 kGy aparentam estar mais espessas, figuras 45 B3 e C3, assim como visto quando irradiadas com 35 kGy, figuras 45 B4 e C4.

A fim de observar alterações na superfície da membrana, foi realizada a coloração de HE na membrana estendida sobre a lâmina, irradiada em fonte de Cobalto-60 (Gammacell). Devido à sua relativa transparência, foi empregada a coloração histológica semelhante à utilizada em análises de mesentério (superfície da membrana) (FIG. 46). Nesse caso, foi visto que a rede formada na membrana não irradiada estava bem coesa com presença de vários núcleos celulares (FIG. 46 A), conforme foram aplicadas doses crescentes de radiação, foi observada uma tendência de diminuição desses núcleos celulares assim como o distanciamento entre eles (FIG. 46 B a D). Na dose de 35 kGy (FIG. 46 E), ficou evidente a formação de vacúolos na superfície da membrana, indicado pela seta em preto.

Figura 46 - Fotomicrografias da superfície da membrana irradiada em Gammacell corada com HE em aumentos de 100x e 400x. (↘) indica formação de vacúolo.

5.8.2 Coloração de Picrossirius

A análise das lâminas coradas com Picrossirius foi realizada com a utilização de microscópio equipado com luz polarizada a fim de observar alterações nas fibras colágenas da membrana. A análise de microscopia óptica das membranas com epitélio foi necessária para visualizar as estruturas das camadas das membranas (controle e irradiadas) antes de sofrerem o processo de desepitelização (FIG.47). A coloração verde indica presença de colágeno dos tipos IV e VII, enquanto a coloração vermelha indica presença de colágeno dos tipos I e III. Algumas fotomicrografias correspondem a mesma membrana apresentada diversas vezes, devido ao seu enovelamento durante o preparo histológico.

A figura 47 A (controle não irradiado) apresenta coloração esverdeada na área próxima ao epitélio da membrana amniótica, indicado pela seta em branco. O mesmo fato é visto nas membranas irradiadas, em ambas as fontes, com dose de 10 kGy (FIG. 47 B1 e C1). Nas MA's irradiadas a partir de 15 kGy (FIG. 47 B2 e C2), percebeu-se que essas apresentavam coloração predominantemente avermelhada com pouca coloração verde, comparado ao controle. Fato semelhante foi visto nas membranas irradiadas em Gammacell e A.E., quando irradiadas com o dose de 25 kGy (FIG. 47 B3 e C3), já na dose de 35 kGy (FIG. 47 B4 e C4) a coloração é de um vermelho intenso, com ausência da coloração esverdeada inicialmente vista.

Figura 47 - Fotomicrografia da AM1 picrossirius com aumento de 400x, controle, amostras irradiadas por Gammacell (B1 a B4) e A.E. (C1 a C4) com epitélio. (seta branca e]) indicam uma membrana individualizada.

5.8.3 Desepitelização da membrana amniótica

Em virtude da necessidade de cultivo dos queratinócitos sobre as membranas desepitelizadas, testou-se a possibilidade da retirada do epitélio das mesmas após o processo de irradiação, por ambas as fontes de radiação ionizante. Após a desepitelização, descrita no item 4.9.3, as amostras foram analisadas por microscopia óptica, primeiramente com a coloração de HE, com aumento de 400x para avaliar as alterações sofridas pela membrana com a saída do epitélio, após irradiação nos diferentes tipos e doses empregadas (FIG.48).

Na figura 48 A (controle), a membrana apresenta retirada total do epitélio com relativa delaminação das camadas adjacentes. As amostras irradiadas com 10 e 15 kGy (FIG. 48 B1, B2, C1 e C2), em Gammacell e A.E., apresentam células epiteliais escassas porém sem delaminação das camadas adjacentes. Nas amostras irradiadas em ambas as fontes de radiação com 25 kGy (FIG. 48 B3 e C3), foi possível observar a presença de células epiteliais e maior proximidade entre as demais camadas da membrana e, com dose de 35 kGy, houve maior proximidade dessas, resultando no aparecimento dos fibroblastos (células em azul alongadas), que antes formavam uma camada independente (vide item 3.1), agora localizados entre as camadas anteriormente citadas (FIG. 48 B4 e C4, setas em preto).

Figura 48 – Fotomicrografia das membranas desepitelizadas, coradas com HE, aumento de 400x das amostras controle (A), irradiadas em Gammacell (B1 a B4) e A.E (C1 a C4) nas doses de 10 a 35 kGy, (↘) indicam fibroblastos no interior da membrana.

As membranas desepitelizadas coradas com picrossirius também foram analisadas em microscópio de luz polarizada a fim de observar suas estruturas, principalmente em nível da camada basal essencial para o cultivo celular sobre o âmnio (FIG. 49).

Figura 49 - Fotomicrografia das membranas desepitelizadas, coradas com Picrossirius, aumento de 400x: controle (A), irradiadas por Gammacell (B1 a B4) e A.E. (C1 a C4), (seta branca e]) indicam uma membrana individualizada.

Na figura 49 A (controle), foi visualizada coloração predominantemente verde após a retirada do epitélio da membrana, nas figuras 49 B1 e C1, das amostras irradiadas com 10 kGy ainda se observa bem concentrada a coloração verde, já com 15 kGy essa coloração tem menor concentração e houve um início de predominância da cor vermelha mais pronunciada nessa dose empregada em acelerador de elétrons. Nas figuras 49 B3 e C3, observou-se que na dose de 25 kGy aplicada por Gammacell a coloração verde ainda era visualizada na amostra, porém com a mesma dose aplicada em A.E., praticamente não se percebia a coloração verde e a coloração vermelha era mais evidente. Com a dose de 35 kGy o predomínio da coloração vermelha foi nitidamente perceptível em ambas as fontes de radiação.

6 DISCUSSÃO

Na utilização da membrana amniótica, tanto como bandagem biológica, quanto como substrato para cultivo celular cutâneo ou ocular, é de suma importância a avaliação prévia por parte do médico transplantador. Esta primeira análise é efetuada de forma qualitativa, por meio de manipulação do material, dando uma ideia se o mesmo encontra-se em condições de uso.

As membranas amnióticas, armazenadas em Bancos de Tecidos, devem manter sua esterilidade com um nível de segurança de 10^{-6} (ISO 11137:2006), para não comprometer a eficácia do transplante. A melhor maneira de esterilizar este tipo de material é utilizar a radiação ionizante, porém esta deve ser aplicada de maneira controlada, mantendo as condições de armazenagem e minimizando modificações estruturais no tecido (TAB. 1, item 3.6).

Os principais parâmetros que devem ser levados em consideração na esterilização por radiação ionizante são as taxas de doses e as doses propriamente ditas. Neste estudo procurou-se avaliar o efeito das duas fontes distintas de radiação (Cobalto-60 e Acelerador de Elétrons), com taxas de doses de diferentes magnitudes, na ordem de 1,5 kGy/hora e 3,9 kGy/s (TAB. 2, item 4.3), respectivamente. Foram também avaliadas diferentes doses entre 10 e 35 kGy, para verificar a relação dose dependência nas prováveis alterações.

Para tanto, foi realizada a análise qualitativa com a manipulação das amostras, a fim de perceber as alterações nas membranas amnióticas, conservadas em glicerol e irradiadas, assim como após reidratação (TAB. 3 e 4), onde foi possível verificar algumas variações, visíveis a olho nu. Estas alterações puderam ser classificadas, pois entre as cinco membranas analisadas para cada condição (n=5) estas diferenças foram pouco perceptíveis, já que todas as amostras conservadas em glicerol tinham aspectos bem homogêneos devido ao próprio meio de conservação.

Nakamura (2004), em seu estudo com membranas liofilizadas, notou que, após o processo de armazenagem e esterilização, as membranas mostram-se muito leves, finas, de fácil manuseio e suturáveis, transmitindo suave flexibilidade após reidratação, similar à membrana criopreservada. No presente estudo, foi

possível observar que as membranas, quando irradiadas com doses até 15 kGy em ambas as fontes de irradiação (Gammacell e A.E.), tiveram de pouca à moderada alteração de cor; já com doses mais elevadas, a partir de 25 kGy, as cinco membranas analisadas para cada grupo tiveram de moderada à elevada alteração de coloração, apresentando aspecto mais amarelado (FIG. 24).

Alteração na coloração foi observada em todas as amostras, variando sua intensidade conforme o aumento da dose. Fotograficamente (FIG. 25 e 26) foi difícil avaliar as variações de coloração da membrana após a irradiação, vistas a olho nu, tanto nas membranas conservadas em glicerol quanto nas membranas reidratadas. A avaliação dessa alteração visualmente perceptível não é evidente quando fotografada.

Ainda na análise qualitativa do parâmetro de elasticidade (TAB. 3 e 4) e com o intuito de avaliar alterações macroscópicas quanto à aplicação clínica da membrana amniótica, assim como na análise qualitativa de coloração, foram observadas variações táteis entre os grupos analisados. Assim, com doses a partir de 15 kGy, variações de pouca à moderada são perceptíveis, tanto nas amostras irradiadas por Gammacell como por A.E., não havendo variações entre as membranas do mesmo grupo. Nas doses de 25 e 35 kGy, há pequenas variações entre as membranas, mas em todas foi verificada alteração de elasticidade com caráter de homogeneização do resultado com dose de 35 kGy nas amostras irradiadas por ambas fontes (FIG. 27).

Sendo estes parâmetros subjetivos, procuramos analisar o grau das alterações observadas, utilizando as seguintes técnicas analíticas: colorimetria sólida para a análise de alteração de cor; OCT, TG e biomecânica, para a avaliação do parâmetro de elasticidade e consequências das alterações; e a histologia para confirmação morfológica das alterações estruturais.

Dessa forma, utilizamos a colorimetria sólida, possibilitou analisar com precisão as alterações de cor sofridas pelo material de acordo com a dose aplicada. Nas análises dos controles (FIG.28), foi possível observar que houve uma variação de 2,0 pontos (+b*) na escala de cromaticidade, com variação no tom

amarelo. Esse evento foi observado tanto nas membranas conservadas em glicerol quanto nas membranas reidratadas. No parâmetro de luminosidade (L^*), houve variação de 1,0 ponto entre as amostras em glicerol e reidratadas. Nas membranas irradiadas por raios gama emitidos por cobalto-60 (Gammacell), foi observado que as alterações de cor, em relação à dose, também estavam relacionadas ao grau de alteração da cor $+b^*$ (amarelamento da MA), tendo um comportamento linear em relação à dose dessa fonte de radiação ionizante. Esse evento foi observado nas membranas conservadas em glicerol e depois de reidratadas (FIG 29 A e B).

Nas análises das membranas irradiadas por A.E., foi possível verificar que houve maior variação no eixo $+b^*$ em relação ao controle, além do fato de haver uma maior variação no eixo de cromaticidade verde-vermelho ($-a^*$) no qual houve a predominância da coloração verde. Esse evento foi observado tanto nas membranas irradiadas por A.E., conservadas em glicerol, quanto nas mesmas após a reidratação (FIG 30 A e B).

Os valores até o momento apresentados foram referentes à análise individual das amostras, cada uma repetida por três vezes ($n=45$). O resultado da média das amostras em glicerol, nas doses de 10 e 15 kGy, por ambas as fontes de irradiação, foi o mesmo tanto na variação em escala de azul-amarelo ($+b^*$) quanto na escala de verde-vermelho ($-a^*$) e semelhante ao valor obtido na média dos controles (amostras não irradiadas). O resultado da análise das amostras em glicerol irradiadas com 25 kGy e 35 kGy foi de maior variação em ambas as escalas ($+b^*$ e $-a^*$), quando comparados ao resultado colorimétrico das médias dos controles não irradiados (FIG.31 A).

Na avaliação da média das membranas quando reidratadas e irradiadas com 10 e 15 kGy, o comportamento das variações de coloração foram semelhantes ao das variações médias das amostras conservadas em glicerol irradiadas com as mesmas doses, tanto por fonte raios gama emitidos por cobalto-60 quanto em acelerador de elétrons. Já com doses de 25 e 35 kGy, a variação de coloração das amostras reidratadas foi superior às variações médias das amostras em glicerol, com valores mais elevados da escala azul-amarelo, com maior deslocamento dos resultados no eixo $-a^*$ para cor verde, o que resulta em uma coloração predominantemente amarelo-esverdeada (FIG. 31 B).

Quanto ao parâmetro luminosidade, houve um pequeno deslocamento, dose dependente, na escala branco-preto ($-L^*$), observando-se um maior deslocamento apenas nas amostras reidratadas e irradiadas em A.E., com doses mais altas (35 kGy). Nos outros grupos, a variação de luminosidade entre as amostras irradiadas conservadas em glicerol e as reidratadas manteve-se praticamente a mesma (FIG. 31 A e B).

Realizando os cálculos estatísticos para os valores médios de variação de coloração (dE^*) comparados ao controle não irradiado (FIG.32), observou-se que a variação de coloração das amostras conservadas em glicerol tiveram resultado estatisticamente significativo ($p<0,05$) na dose a partir de 25 kGy (FIG.32A), porém após a reidratação das mesmas, verificou-se que a variação foi estatisticamente significativa ($p<0,05$) na dose a partir 10 kGy (FIG.32B), ou seja, mesmo a menor dose de radiação empregada por ambas as fontes (raios gama e feixe de elétrons) provocaram alteração na coloração da membrana.

Pode-se observar na curva espectral (FIG. 33) a variação do espectro de cor quando comparados a outros comprimentos de onda em relação à reflexão das amostras. No caso das amostras conservadas em glicerol (FIG.33 A), há uma variação decrescente partindo do controle, sendo mais transparente, possibilitando maior reflexão, com cerca de 80% de reflexão em 400 nm e com pico em 500 nm de comprimento de onda. Todas as amostras irradiadas tiveram esse mesmo perfil em relação aos comprimentos de onda, porém em escala decrescente de reflexão em relação à dose de radiação, tendo uma relação inversamente proporcional. No caso das amostras reidratadas (FIG. 33 B), o controle apresentou maior reflexão, pouco menor se comparada ao tecido preservado em glicerol, possivelmente pela opacidade adquirida quando tratadas com solução fisiológica.

O decréscimo na reflexão foi mantido nas amostras irradiadas por ambas as fontes, analisadas nos mesmos intervalos de comprimento de onda. Dessa forma, observou-se que ambas as amostras conservadas em glicerol como as posteriormente reidratadas tinham elevação de suas curvas espectrais a partir de 500 nm, onde se inicia a reflexão da cor amarela, portanto a variação de cor amarela se dá pelo fato da menor reflexão da coloração azul e, também, como a percepção da cor pelo olho humano fica compreendida entre os picos de

comprimentos de onda de 440, 540 e 580 nm (item 3.8.1.2), essa variação é pouco suscetível nas membranas irradiadas com doses mais baixas (10 e 15 kGy), comparadas às variações mais evidentes nas membranas irradiadas com doses mais altas (25 e 35 kGy).

A análise dos resultados da colorimetria sólida permitiu confirmar que a coloração percebida nas condições de armazenagem da membrana amniótica será a mesma após sua reidratação, com variação apenas na opacidade. Desse modo, a visualização colorimetria possibilitará ao transplantador, quando receber o âmnio processado e armazenado em glicerol, avaliar se a coloração do mesmo é condizente com a aplicação desejada, seja como bandagem biológica ou substrato carreador para cultivo celular dermo-epidérmico/oftálmico.

De maneira a elucidar os resultados obtidos na análise qualitativa no parâmetro de elasticidade da membrana amniótica, foram aplicadas as técnicas de OCT, TG e avaliação biomecânica (ensaio de tração) em texturômetro.

Por meio da análise das imagens geradas no OCT, técnica esta que possibilitou grande avanço em estudos de ultraestrutura de osso e cartilagem (MARTINHO, 2012), não foi possível distinguir as diferentes camadas na estrutura do âmnio conservado em glicerol, porém pode-se visualizar sua espessura total (TAB 5). Também foram realizadas imagens das mesmas membranas após hidratação (TAB. 6), em solução fisiológica 0,9% por 30 minutos, porém, da mesma forma, não foi possível detectar visualmente as variações de espessura da membrana, provocadas pelas diferentes doses de irradiação.

Inicialmente, as análises foram feitas somente com o uso das imagens geradas pelo OCT e analisadas no programa computacional Image J® que permitiu medir as diferentes espessuras do âmnio de acordo com a dose de radiação empregada. Como exemplo, a membrana (AM2), irradiada em Gammacell e A.E conservada em glicerol (FIG. 34), teve uma variação pouco significativa de espessura em relação à dose de radiação empregada. O mesmo é observado quando analisadas as amostras de AM2, irradiadas em ambos equipamentos e posteriormente reidratadas (FIG. 35). Após a reidratação, as amostras de AM2 não

demonstraram variação significativa de espessura, comparadas às amostras irradiadas por Gammacell e A.E, quando analisadas separadamente (FIG.36 A e B).

O mesmo tipo de avaliação também foi feita com a média das espessuras de todas as membranas, em relação à dose de radiação e o tipo de fonte, e da mesma forma foi observado que as variações de espessura das amostras, tanto em glicerol como reidratadas, não foram estatisticamente significativas (FIG. 37 A e B).

Posteriormente, as imagens geradas pelo OCT (TAB. 5 e 6) foram analisadas por meio do cálculo do coeficiente de atenuação total (TAB.7) porém, apesar dos resultados apresentarem uma tendência de variação com o aumento da dose de radiação (Gama e A.E.), esta alteração não foi estatisticamente significativa (FIG. 38 A e B). Isso provavelmente se deve ao fato de que as membranas apresentam uma pequena espessura, próxima ao limite mínimo de detecção do equipamento (FUJIMOTO, 1995).

Desse modo, o teste de termogravimetria foi realizado para avaliar essa tendência, encontrada nas análises de OCT em relação à variação da capacidade de reidratação das membranas após a irradiação. Como exemplo, a membrana não irradiada (controle) apresentou valores de taxa de desidratação de -16,13 %massa/min e desidratação total de 94,41%massa (FIG.39). Quando esta membrana irradiada em A.E., nas doses de 10 e de 35 kGy, foi avaliada, as alterações comparadas ao controle também não foram estatisticamente significativas (FIG.40 A e B). Nas amostras irradiadas em Gammacell, para ambas as doses, foi verificada maior variação dos valores quando comparados aos resultados encontrados nos controles (FIG. 41 A e B), porém ainda não estatisticamente significativa.

Utilizando a média dos valores da taxa de desidratação e perda total de voláteis (água) (TAB.8) foram elaborados gráficos com as variações de doses e tipos de fontes (FIG.42 e 43). Da mesma forma que os dados de OCT, os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à dose ou fonte aplicada. Esse fato é explicado no estudo de MARTINHO (2012), onde foi verificado que o meio de preservação em glicerol anula as diferenças

causadas pelas doses de radiação ionizante para curvas termogravimétricas pois, ao desidratar o tecido, as características do mesmo são homogeneizadas.

Na busca de identificar a razão das alterações percebidas na análise qualitativa preliminar (TAB. 3 e 4), deu-se início a análise biomecânica (ensaio de tração), onde foram realizados os testes (item 4.8) simulando uma situação de aplicação clínica de enxerto de âmnio, em que esse seria estendido para cobrir a superfície de uma ferida.

Após reidratação da membrana, por meio da análise no texturômetro (item 4.8) obtivemos os valores de tensão e deformação necessários para o cálculo do módulo de elasticidade (item 3.11). Com os valores obtidos (TAB.9), foi possível construir o gráfico (FIG.44) do módulo de elasticidade versus variação de dose, para comparação dos resultados das amostras irradiadas em Gammacell e A.E. em relação ao controle não irradiado. Porém, da mesma forma que a análise por OCT e TGA, mesmo analisando as 5 membranas, para cada dose, em triplicada ($n=15$), não foi possível detectar variações estatisticamente significativas nessas condições de ensaio.

No estudo de Nakamura (2004), foi realizado o ensaio biomecânico de duas formas diferentes: uma testando tração e a segunda forma por rasgabilidade no ponto de sutura. No entanto, com um número de seis amostras ($n=6$), os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos entre as amostras irradiadas com raios gama com 25 kGy e a não irradiada.

Chua & Oyen (2009), relatam serem pouco conclusivos os dados sobre as propriedades elásticas da membrana em relação ao módulo de elasticidade. Em tecidos moles, dependendo do nível de tensão e da taxa de deformação, em geral, são necessários mais dados ($n>15$) para construir um gráfico não-linear e obter resultados mais precisos e detalhados da natureza viscoelástica das membranas. Corroborando com as observações de Chua & Oyen (2009), no presente estudo, mesmo utilizando um $n=15$ (triplicata de amostras das cinco membranas), a análise de tração não apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre as

amostras testada, somente sendo possível verificar este comportamento viscoelástico nas membranas amnióticas irradiadas, na avaliação qualitativa.

VERSEN-HÖEYNCK (2004) cita que apesar da irradiação esterilizante (raios gama), introduzida em 1955, ser conhecida por ser eficaz em doses adequadas, verifica-se a interferência na estrutura do tecido e nas propriedades biofísicas. Dessa forma, buscou-se a histologia para elucidar morfologicamente as alterações verificadas na análise qualitativa, no parâmetro de elasticidade por meio da coloração de hematoxilina-eosina (HE) (Paggiaro, 2011). Na análise dos cortes transversais do controle não irradiado e das amostras irradiadas (FIG. 45), observaram-se as estruturas da membrana amniótica descritas na literatura (item 3.1).

Na porção superior da membrana, nota-se a presença do epitélio formado por células bem unidas umas às outras, a lâmina basal separando-o das demais camadas de tecido conjuntivo (colágeno), sendo esta bem íntegra e contínua; a densidade das camadas compacta e de fibroblastos podem ser distinguidas pela intensidade de coloração de HE e pela presença dos fibroblastos, respectivamente; a camada esponjosa é pouco evidente devido aos processos de limpeza ocorridos na manipulação das membranas (FIG. 45 A). Nas doses de 10 kGy em Gammacell (FIG. 45 B1), os cortes histológicos mostram um início de fragmentação do epitélio e preservação das camadas subjacentes, aparentemente sem modificações. Esse fato foi mais evidente para as amostras irradiadas em A.E. com mesma dose.

As amostras irradiadas em Gammacell com dose de 15 kGy (FIG.45 B2) apresentam fragmentação da camada epitelial similar a da dose de 10 kGy com a mesma fonte, com preservação aparente das demais camadas do âmnio. Porém as amostras irradiadas em A.E. (FIG.45 C2), com dose de 15 kGy, além de apresentarem fragmentação do epitélio, tornam perceptível uma condensação das demais camadas do âmnio.

Nas amostras submetidas à dose de 25 kGy em Gammacell (FIG. 45 B3) as células epiteliais são escassas, e as demais camadas apresentam-se fundidas entre si. Nas amostras irradiadas com 25 kGy em A.E. (FIG.45 C3), observa-se que

a camada epitelial está presente com número relativo de células, porém um pouco disformes, e aparente condensação das demais camadas. Neste último caso, provavelmente a condensação de todas as camadas impediu a fragmentação da camada epitelial.

Na amostra irradiada até a dose de 35 kGy Gammacell (FIG.45 B4), foi observada a condensação das camadas, inclusive com presença de epitélio. O mesmo se aplica às amostras irradiadas em A.E. (FIG. 45 C4), nas quais ficam mais evidentes as alterações citadas anteriormente.

A espessura da membrana irradiada por Gammacell com dose de 35 kGy sofreu alteração, conforme visto anteriormente nas imagens de OCT (TAB. 6). Além disso, foi possível visualizar o surgimento de “vacúolos” (FIG.46 E) na superfície da membrana. Esta alteração evidente com 35 kGy teve início gradativo com doses a partir de 15 kGy em Gammacell (FIG.46 C), com um reagrupamento da rede de colágeno, o qual desencadeou rupturas e ligações entre as redes. Com dose de 25 kGy (FIG. 46 D) já ocorre outro fenômeno, no qual pode-se observar a trama da rede das camadas mais internas, provavelmente pela fragmentação da camada epitelial, diferentemente da imagem vista com dose de 35 kGy (FIG.46 E), a qual apresenta uma trama da rede das camadas internas, densamente arranjadas, restando a camada epitelial, porém com formação de vacúolos.

Com base nos eventos apresentados, fica evidente que, em função da dose, quanto maior esta seja, a dose maior o grau de condensação entre as camadas do âmnio (35 kGy). A laminina e o colágeno tipo IV se fundem, tornando-se indistinguível a camada basal. VERSEN-HÖEYNCK (2004) retrata a alteração do epitélio amniótico, após tratamento com radiação esterilizante, sendo o mais impressionante, o surgimento de amplos espaços intracelulares e degeneração das células epiteliais amnióticas. Esse fato também é relatado por AB HAMID (2012), nas doses de 35 kGy das amostras conservadas em glicerol, já nas amostras preservadas com a técnica de *air dried*, essas alterações são percebidas com dose de 25 kGy.

Nakamura (2004) cita que a organização das macromoléculas da matriz extracelular tem um papel importante nas propriedades físicas e biológicas da MA. Com base nas análises físicas, análise microscópica e imunoistoquímica, acredita-

se que os processos de secagem e irradiação não afetam as propriedades físicas e biológicas da membrana, porém seu estudo foi realizado com membranas irradiadas com 25 kGy em fonte de Cobalto-60. VERSEN-HÖEYNCK (2004) constatou que embora a membrana basal permaneça intacta após o processo de irradiação esterilizante, especialmente o epitélio da membrana amniótica, foi parcialmente destruído. No presente estudo, observou-se que nestas mesmas condições houve condensação entre as camadas do âmnio, deixando evidente suas alterações estruturais.

A coloração específica de colágenos (Picrossirius) permitiu avaliar o nível de alteração das membranas irradiadas, onde a lâmina basal foi visualizada e comparada ao controle não irradiado. Da mesma forma que a análise em HE, as amostras foram avaliadas primeiramente com epitélio, e o controle mostrou a camada basal íntegra bem evidente com coloração amarelo-esverdeada (FIG.47 A).

Na análise das lâminas de dose de 10 kGy (FIG. 47 B1 e C1) ainda observa-se a presença íntegra da membrana basal sem aparente alteração. A partir de 15 kGy, em ambas as fontes (FIG. 47 B2 e C2), observou-se a degradação parcial da membrana basal evidenciada pela pouca intensidade da coloração característica desta camada (amarelo-esverdeada). Com doses de 25 kGy, o nível de condensação das camadas do âmnio foi maior, para ambas as fontes (FIG. 47 B3 e C3), no qual verifica-se ainda a presença de áreas com lâmina basal. Na dose de 35 kGy, o nível de condensação entre as camadas da membrana amniótica foi elevado a tal ponto que não é possível distinguir a estrutura basal da membrana (FIG. 47 B4 e C4).

De acordo com AB HAMID (2012), a preservação em glicerol é um método recomendado para o armazenamento do âmnio pois mantém sua estrutura morfológica semelhante à membrana a fresco, porém neste mesmo estudo é relatado que nas membranas preservadas em glicerol, ou secas por *air dried*, e irradiadas com dose de 15 kGy, a superfície não é afetada, o que difere dos resultados obtidos neste trabalho, pois a partir de 15 kGy já são observados fenômenos os quais foram anteriormente citados, mesmo que em baixa intensidade.

Essa análise histológica, com as estruturas íntegras da membrana amniótica, foi também utilizada para avaliar a efetividade da desepitelização do âmnio após a irradiação por diferentes tipos de dose e fontes.

A desepitelização do âmnio é a etapa fundamental para possibilitar o cultivo celular sobre a membrana, servindo esta como arcabouço para a proliferação, diferenciação e prevenção de apoptose. Desse modo o passo crítico é a remoção das células epiteliais do âmnio, de maneira a preservar a camada basal íntegra e contínua, possibilitando um bom cultivo celular (HOPKINSON et al., 2008). Além disso, segundo VERSEN-HÖEYNCK (2004), como a membrana basal facilita a migração das células epiteliais e reforça adesão celular, a continuidade desta é essencial para outras aplicações em feridas.

Após a análise das membranas íntegras tanto em corte histológico transversal como na análise superficial, a desepitelização, utilizando Tripsina 0,05% /EDTA 0,02%, foi realizada nas amostras controle e irradiadas, em ambas as fontes, para cada uma das cinco membranas utilizadas no estudo.

Na análise histológica em HE, o controle (FIG.48 A) representa o evidente sucesso na desepitelização da membrana, com pouca delaminação das camadas adjacentes, assim como no estudo proposto por Paggiaro (2011), que padronizou a técnica de desepitelização nas condições anteriormente relatadas. Nas doses de 10 kGy, o epitélio está presente, com remoção parcial do mesmo nas membranas irradiadas por ambas as fontes (FIG.48 B1 e C1). Em doses de 15 kGy (FIG.48 B2 e C2) há maior fragmentação da camada epitelial, com células que ainda presentes. Nas doses de 25 e 35 kGy (FIG.48 B3, B4, C3 e C4), as alterações das camadas foram semelhantes às encontradas nas membranas que não haviam sofrido o processo de desepitelização (FIG.45 B3, B4, C3 e C4), onde o alto nível de compactação das camadas internas, levando à maior retenção da camada epitelial, poderia explicar a presença de fragmentos desta camada.

As lâminas das amostras desepitelizadas, coradas com picrossirius, foram analisadas, sendo que o controle (FIG. 49 A) mostra a camada basal íntegra após remoção do epitélio (coloração esverdeada). Nas lâminas das amostras irradiadas com 10 kGy por ambas as fontes, a presença de fragmentos de epitélio é anteriormente vista com a coloração com HE (FIG. 48 B1 e C1), provavelmente foi

devido à presença da membrana basal evidentemente íntegra, mesmo após o processo de desepitelização (FIG. 49 B1 e C1).

Nas doses de 15 kGy (FIG. 49 B2 e C2), em ambas as fontes, verificou-se menor quantidade de camada basal, sendo condizente com a análise prévia em HE, onde havia pequena quantidade de células epiteliais. Nas doses de 25 kGy (FIG. 48 B3), observou-se maior fragilização da camada basal nas amostras irradiadas em Gammacell. Já na mesma dose aplicada por A.E. (FIG. 49 C3), verifica-se a total ausência da camada basal. Com dose 35 kGy (FIG. 49 B4 e C4), foi observado maior compactação das camadas da membrana e baixa distinção da camada basal o que justifica a dificuldade de retirada de epitélio nestas condições de tripsina/EDTA. De maneira geral, nas amostras irradiadas com A.E. foram intensificadas as alterações causados pela ação da radiação no tecido, comparado ao efeito da radiação gama, pois promoveu maior compactação das camadas do âmnio nas altas doses, transformando-a em uma só membrana.

A completa desepitelização das membranas foi obtida por Nakamura et al. (2004), utilizando 0,02% EDTA a 37°C por 2 horas antes de irradiá-las, procedimento diferente do empregado neste estudo, pois a desepitelização ocorreu após a irradiação do tecido, simulando a rotina que ocorre em banco de tecidos no qual a membrana está íntegra e pode ser destinada para qualquer uso. Segundo Paggiaro (2011), esse seria o método mais adequado para retirar o epitélio, mas ao mesmo tempo que com este tipo de técnica as células são retiradas, pode existir um dano nas demais camadas do tecido, ocasionando uma delaminação. O uso de Tripsina 0,05% /EDTA 0,02%, por 20 minutos, acarreta a retirada completa do epitélio com menor delaminação das demais camadas nas membranas não irradiadas. Dessa forma, o método foi considerado padrão para seu estudo, levando em consideração a menor delaminação das camadas do âmnio e a preservação da estrutura da membrana basal. Como as membranas irradiadas com doses a partir de 25 kGy apresentam maior grau de condensação das camadas internas, poderia-se propor uma nova padronização de desepitelização das membranas irradiadas, com menor nível de delaminação das camadas internas.

7 CONCLUSÕES

- Na análise qualitativa, foi observado que, nas doses mais elevadas (a partir de 25 kGy) para ambas as fontes de radiação, as membranas irradiadas sofreram maior alteração de cor, tornando-se mais amareladas e com diminuição da elasticidade, deixando-as mais rígidas. Estas alterações geralmente foram intensificadas nas doses aplicadas com feixe de elétrons.
- Na colorimetria sólida, foi observado que a alteração de cor da membrana tem relação direta com a dose de radiação, podendo ser esse um teste a ser empregado na análise de rotina dos Bancos de Tecidos, para uma avaliação técnica do nível de alteração tecidual nas membranas irradiadas, minimizando a subjetividade da análise visual.
- Com as técnicas de OCT, TG e ensaio de tração, não foi possível avaliar as alterações biomecânicas encontradas na análise qualitativa, nas condições experimentais empregadas, devido aos desvios-padrão obtidos para as cinco membranas testadas.
- Foram observadas na microscopia óptica que as alterações histológicas do âmnio relacionadas com a dose de radiação empregada devem-se ao grau de degradação das camadas subjacentes do tecido. Este fato, provavelmente deve-se a mudanças estruturais do colágeno, agrupando as camadas com tendência de fusão entre as mesmas, nas doses a partir de 25 kGy.

Desse modo, a membrana amniótica irradiada com doses de 10-35 kGy podem ser destinadas para aplicação como bandagem biológica, nas doses a partir de 25 kGy deve-se levar em consideração a alteração de coloração e condensação das camadas da membrana, para uso oftálmico ou como substrato transportador para transplante de tecido cultivado *in vitro*, respectivamente.

8 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia molecular da célula*, Porto Alegre, **Artmed**, 4 ed., 2004, p.1096, 1097, 1103-1016.
- AB HAMID, S. S., NOR, K. Z.I, NORIMAH Y., ASNAH, H.. Scanning electron microscopic assessment on surface morphology of preserved human amniotic membrane after gamma sterilisation. **Cell and Tissue Banking**, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23187886>. Acesso em: 09 mar.2013.
- BOURROUL, S. C., Caracterização dos efeitos da radiação ionizante em pele humana para aloenxerto, 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- CALLISTER , W. D. Jr, *Ciência e engenharia de materiais uma introdução*, São Paulo, **LTC**, 7 ed., 2008. p. 100-101.
- CANEVAROLO Jr, S. V. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*, **Ed. Artliber**, 2003, p. 209-228.
- CARVALHO-RÊGO, P.R; GOMES , J.A.P.; BALLALAI, P.L.; CUNHA, M. C.; SOUZA, L. B.; ERWENNE, C.M. Membrana amniótica na reconstrução da superfície ocular após exérese de carcinoma de células escamosas da conjuntiva. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.71, n.1, p. 22-27, 2008.
- CHUA, W. K.; OYEN, M. L. Do you know the strenght of the chorioamnion? A critical review and analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.144S, p. 128-133, 2009.
- CLIVAZ, X.; MARQUIS-WEIBLE, F.; SALATH, R.P. in European Biomedical Optics Conference, **SPIE Proceedings**, p. 2083-2092, 1994.
- CNEN - Comissão nacional de Energia nuclear. Radiotividade. Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf> Acesso em: 20 nov. 2010.
- COLLI, C.; MESQUITA, C.H. Biossegurança no uso de radioisótopos. In: HIRATA, M.H.; MANCINI FILHO, J. *Manual de Biossegurança*. São Paulo, Manole, 2002. p. 201-246.
- DANTAS, V. Infraestrutura, O caminho para a retomada do crescimento. **Brasil Nuclear**, Rio de Janeiro, ano 15, n. 35, set. 2009. p.32 – 35.
- DAHLAN, K.Z.M. Radiation Sciences. In: PHILIPS, G.O.; NATHER, A. *Advances in tissue banking, The Scientific basis if Tissues Transplantation World Scientific*, v. 5, 2001.
- DZIEDZIC-GOLLAWSKA, A.; KAMINSKI, A.; VHRYNOWSKA-TYSZKIEWICZ, I.; STACHDWICZ, W. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. **Cell and Tissue Banking**, v. 6, p. 201-219, 2005.
- DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Amniotic membrane transplantation. **British Journal of Ophthalmology**, v. 83, p. 748-752, 1999.

DUA, H. S., GOMES, J. A. P., KING, A. J., MAHARAJAN, V.S., The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology**, v. 49, n.1, p.51–77, 2004.

FREITAS, A. Z., Caracterização de tecidos biológicos através da tomografia de coerência óptica, 2007. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

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.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de Histologia em cores. 3.ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2007. p. 253-266.

GLYN, P. O. Radiacion y operacion de banco de tejidos, Peru, **Peru Printing Service**, 2001, p.57-70,73-88.

HILMY, N.; FEBRIDA, A.; BASRIL, A. Validation of radiation sterilization dose for lyophilized amnion and bone grafts. **Cell and Tissue Banking**, v.1, p. 143-148, 2000.

HOPKINSON, A.; MCINTOSH, R. S.; TIGHE, P. J., JAMES, D. K.; DUA, H. S. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF- β content. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.47, n.10, p. 4316-4322, oct., 2006.

HOPKINSON, A.; SHANMUGANATHAN, V. A.; GRAY, T.; YEUNG, A.M.; LOWE, J.; JAMES, D. K.; DUA, H. S. Optimization of Amniotic Membrane (AM) denuding for tissue engineering. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 4, p. 371-381, 2008. Part. C.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Radiation sterilization of tissue allografts: Requeriments for validation and routine control. Viena, 2007. Disponível em: http://www.pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1307_web.pdf. Acesso em: 06 abr. 2010.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, projeto RLA/6/062, Código de práticas para esterilização por irradiação de tecidos humanos para uso clínico: requisitos para validação e controle de rotina atualização, 1ª ed, Costa Rica, **Editorial Tecnológica de Costa Rica**, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO 11137-1:2006, Sterilization of health care products -- Radiation-- Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices, 2006.

ISHINO, Y.; SANO, Y.; NAKAMURA, T., CONNOR, C. J.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N.J.; KINOSHITA, S. Amniotic membrane as a Carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 03, p. 800-806, mar. 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, Sterilization of health care products- Requirements for validation and routine control-Radiation sterilization, 2006 (ISO11137).

JOHN, T. Human amniotic membrane transplantation: Past, present, and future. **Ophthalmology Clinics of North America**, v.16, p. 43-65, 2003.

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

KEITH, L. M.; PERSAUD, T. V. N.; SHIOTA, K. Atlas colorida de embriologia clínica. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2. ed., 2002. p.71, 86 – 87.

KIERSZENBAUM, A. L., TRES L. L., Histologia e Biologia celular- Uma introdução à Patologia, **Elsevier**, 3 ed., 2012. p.11,19, 268-273.

KOIZUMI, N.; FULLWOOD, N. J.; BAIRAKTARIS, G.; TSUTOMU, I.; KINOSHITA, S.; QUANTOCK, A. J. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.41, n.9, 2506-2513, aug. 2000.

LEY-CHÁVEZ, E.; MATÍNEZ-PARDO, M. E.; ROMAN, R.; OLIVEROS-LOZNO, F. de J.; CANCHOLA-MARTÍNEZ, E. Application of biological dressings from radiosterilized amnios with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients. **Annals of Transplantation**, v. 8, n. 4, p.46-49, 2003.

LIBERA, R. D., MELO, G. B. de; LIMA, A. S.; HAAPALAINEN, E. F.; CRISTOVAM, P.; GOMES, J. A. P. Assessment os use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (AM) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 71, n. 5, p. 669-673, 2008.

LIM, L. S.; RIAU, A.; POH, R.; TAN, D. T.; BEUERMAN, R. W.; MEHTA, J. S. Effect of disperse denudation on amniotic membrane. **Molecular Vision**, v. 15, p. 1962-1970, 2009.

LIU, T., ZHAI, H., XU, Y., DONG, Y., SUN, Y., ZANG, X., & ZHAO, J., Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2137–46, May 2012.

KUMAR, V. *et al. Robbins & Cotran Bases patológicas das doenças*, 7. ed., Rio de Janeiro: **Editora Elsevier**, 2005. p. 1243-1248, 1488, 1496-1498, 1510.

MADHIRA, S. L.; VEMUGANTI, G.; BHADURI, A.; GADDIPATI, S.; SANGWAN, V. S.; GHANEKAR Y. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. **Molecular Vision**, v. 14, p. 189-196, 2008.

MALAK, T. M., OCKLEFORD, C. D., BELL S.C., DALGLEISH, R., BRIGHT, N., MACVICAR, J. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, II, III, IV, V e VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. **Placenta**, v. 14, p. 385-406, 1993.

MARTINHO JUNIOR, A. C., Estudo dos efeitos da radiação ionizante em cartilagem costal humana por meio de termogravimetria e tomografia por coerência

óptica, 2012 Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

MOHAMMADI, A. et al, how does human amniotic membrane help major burn patients who need skin grafting: new experiences, Skin Grafts – Indications, Applications and Current Research , **InTech**, p. 18 , 2011.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15-27, 1996.

NAKAMURA, T.; YOSHITANI, M.; RIGBY, H.; FULLWOOD, N. J.; ITO, W.; INATOMI, T.; SOTOZONO, NAKAMURA, T.; SHIMIZU, Y; KINOSHITA, S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 1, p. 93-99, jan. 2004.

NAKAMURA, T., INATOMI, T., SEKIYAMA, E., ANG, L. P. K., NORIHIKO, Y., KINOSHITA, S. Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 84, p. 401-405, 2006.

NASSAU, K.-The Physics and Chemistry of Color, The fifteen causes of color. **Ed. John Wiley & Sons Inc.**, 2ª ed., 2001.

OLIVEIRA, E. C.; RAMOS, G. Z.; AFONSO, V.C.; SOUZA, L B. Retrospective study of amniotic membrane transplantation in a tertiary ophthalmic health care service. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 67, n. 4, p. 165-171, 2008.

OKUNO, EMIKO. Radiação: efeitos, riscos e benefícios. São Paulo: **Harbra**, 1998.

PAGGIARO, A. O., Efeitos da radiação ionizante em membranas amnióticas gliceroladas empregadas como substrato ao cultivo de epitélio humano, 2011. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

PENA, J.D.; MELO, G. B.; GOMES, J. A. P.; HAAPALAINEN, E. F.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N. C.; FILHO, A. A. L.; RIZZO, L.V. Análise estrutural e de fatores de crescimento de diferentes métodos de preservação da membrana amniótica utilizada em cirurgia ocular, **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 70, n. 5, p.756-762, 2007.

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 glycerolation for the use as an epidermal substitute: light and electron microscopic studies. **Cell and Tissue Banking** ,v. 2, n. 2, p.95-102, 2001.

RENNIE, K., GRUSLIN, A., HENGSTSCHLÄGER, M., PEI, D., CAI, J., NIKAIDO, T., & BANI-YAGHOUB, M.. Applications of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. **Stem cells international**, 2012 Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3474290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em 09 mar.2013.

RIAU, A.K.; BEUERMAN, R. W.; LIM, L. S.; MEHTA, J.S. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, p.216-225, 2010.

RAVISHANKER, R.; BATH, A. S., ROY, R. "Amnion Bank"- the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. **Burns**, v. 29, p. 369-374, 2003.

RODRÍGUEZ-ARES, M. T.; LOPÉS-VALLADARES, M. J.; TOURIÑO, R.; BEGOÑA, V.; GUDE, F.; SILVA, M. T.; COUCEIRO, J. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. **Acta Ophthalmologica**, v. 87, p. 396-403, 2009.

RUSSEL, A.D. Principles of antimicrobial activity. In: BLOCK, S.S. Desinfection, sterilization and preservation. 4. ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, Philadelphia, Londres, 1991.

RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Desinfection and sterilization in health care facilities: what clinicians need to know. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 702-709, 2004.

SOUZA, J. de, FILHO, J., BARROS, M., & LIRA, B.. Análise colorimétrica de rochas ornamentais. **Estudos Geológicos**, v.18,n. 1, p. 55-64, 2008. Disponível em <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Análise+colorimétrica+de+rochas+ornamentais#0>. Acesso em 17 jun.2010.

SINGH, R.; PUROHIT, S.; CHACHARKAR, M. P.; BHANDARI, P. S., BATH, A. S. Microbiological safety clinical efficacy of radiation sterilized amniotic membranes for treatment of second-degree burns. **BURNS**, v. 33, p. 505-510, 2007.

SINGH, R.; PUROHIT, S.; CHACHARKAR, Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. **Journal of tissue viability**, v.20, n.2, p.49-54, 2011.

SILVER, F.H.; FREEMAN, J.W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin Research and Technology**, v. 1, n. 7, p. 18-23, 2001.

TODA, A., OKABE, M. YOSHIDA, T., NIKAIDO, T., The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.105, p.215-228, 2007.

TURRER, C.L.; FERREIRA, F.P.M.- Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v 23 n 3, p 234-239, 2008.

VASHI, A. V, WERKMEISTER, J. A, VUOCOLO, T., ELVIN, C. M., & RAMSHAW, J. A M.,Stabilization of collagen tissues by photocrosslinking. **Journal of Biomedical materials Research. Part A**, 100(9), 2239–43. doi:10.1002/jbm.a.34164, 2012.

VERSEN-HÖEYNCK, F. von; SYRING, C.; BACHMANN, S.; MÖLLER, D. E. The influence of different preservation and sterilization steps on the histological

properties of amnion allografts- light and scanning electron microscopic studies. **Cell Tissue Banking**, v.5, p.45-56, 2004.

VERSEN-HÖEYNCK, F. von; STEINFELD, A. P.; BECKER, J.; HERMEL, M.; RATH, W.; HESSELBARTH, U. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. **Biologicals**, v.36, p. 248-255, 2008.

YOSHITO, D., Cultivo e irradiação de fibroblastos humanos em meio enriquecido com lisado de plaquetas para obtenção de camada de sustentação em cultura de células de epiderme., 2011.

ANEXO A

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/427/10

7 de dezembro de 2010.

Prezado pesquisador e orientadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP **analisou**, em sua **10ª/10 Sessão Ordinária**, realizada em **03/12/2010**, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - CNS e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º **2167**, intitulado "**ANÁLISE MORFOLÓGICA E BIOMECÂNICA DO ÂMNIO ESTERELIZADO COM DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO IONIZANTE**", área temática **GRUPO I**, sob responsabilidade do pesquisador **Fernando Augusto Neves Soares** e orientação da Doutora **Monica Beatriz Mathor**, considerando-o **APROVADO**, devendo ser encaminhada cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado pelo Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP aos sujeitos doadores dos tecidos.

Cabe lembrar que, conforme a Resolução CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a): 1. Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste 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 COEP, no caso eventual auditoria; 3. Comunicar formalmente a este Comitê quando houver o encerramento da pesquisa; 4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; 5. Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Claudio Leone
Professor Titular

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª

Dr.ª Monica Beatriz Mathor

Centro de Tecnologia das Radiações - CTR

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP