

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICA E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Estudo dos efeitos físicos, químicos e estruturais ocasionados
pela radiação ionizante e preservação em cartilagem costal
humana**

ANTONIO CARLOS MARTINHO JUNIOR

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

Orientadora:
Dra. Mônica Beatriz Mathor

SÃO PAULO
2008

À minha mãe, pessoa sem a qual eu não seria nada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à natureza, pela sua beleza e complexidade, o que torna o seu estudo a arte mais bela dentre todas as artes.

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

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

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

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

À Dra. Marisa Roma Herson, pela oportunidade de trabalharmos em conjunto na esperança de desenvolver a ciência e a saúde no Brasil.

À minha mãe, pessoa que sempre me motivou aos estudos e sem a qual nada disso seria possível.

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

À minha tia Elza, pelo acolhimento e preocupação nos momentos em que estive em seu lar.

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

À Dra. Ana Paula Alves Rosiffini, pelo carinho e atenção com as avaliações biomecânicas e por toda sua dedicação à realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Biologia do Endométrio do Instituto de Ciências Biomédicas, sob a ilustre figura do Prof. Dr. Sérgio Ferreira Oliveira, pelo carinho e sinceridade nas horas mais necessárias e pelos ensinamentos sobre histologia.

Ao Dr. Alex Kors, pelos ensinamentos dedicados sobre os procedimentos

histológicos e pelas conversas sobre física moderna que nos distraíam por alguns momentos.

Ao Gaspar, por toda sua presteza e dedicação ao seu trabalho e pelo real professor que foi durante os meses de trabalho em seu laboratório.

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

Ao Dr. Dácio Roberto Matheus da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo, pela dedicação na análise estatística dos resultados.

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

Aos amigos do Ipen Tiago Luis, Luis Otávio, Cynara Viterbo, Selma Bourroul e Maria Fátima Klingbell pela ajuda e troca de conhecimentos.

A todos os meus alunos, pessoas pelas quais valem todos os esforços, em especial a Luiz Fernando Sabanay, Isadora Sabanay, Guilherme Alencar Coca, Osíris Veríssimo, Cecília Bruno, André Borgheri, Vinícius Ramos, Pedro Castro, Rodrigo Seixas, Vinícius Seixas, Julius Bartholomäeus, Henrique Boturão, Rafael Moraes, Paulo Fontana, Lucas Walmor, Mariana Loreto, Gabriela Esteves, Raquel Lichtner, Bárbara Prado, Ricardo Rodaski, Matheus Silvestrim e Fábio Coffani.

A todos meus amigos de trabalho, em especial a Sílvia Matheus, Fabrício Cruz, Thiago dos Santos, Fernando Martins Alonso, Ulysses Diegues, Mirella Lucchessi, Patrícia Jordão Lucchessi e Cecília Câmara, os quais sempre estiveram dispostos a me ajudar nas horas necessárias e a rir nas horas fundamentais.

À Ângela Claro Perez Miguel, Andrés Perez Miguel e toda família pela amizade e companheirismo durante todos esses anos de estudo.

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

Ao técnico Prado e toda sua equipe, pela coleta do material e especial atenção em seu armazenamento.

Ao Dr. Eddy Segura Pino, por toda sua contribuição nesse trabalho e pelas horas de risadas dadas juntas.

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

Ao Eng. José Jorge Ambiel pelo projeto do suporte que foi utilizado na máquina Isomet para o corte das amostras, os quais foram realizados com exatidão.

A todo pessoal da mecânica do Ipen, em especial ao mecânico José Carlos Sabino, pela confecção do suporte para Isomet.

A todo pessoal da Universidade de Taubaté, em especial a José Arauto Ribeiro e ao Luiz Flávio Martins Pereira, pela dedicação e carinho durante as infindáveis horas de caça as amostras .

Ao Manoel Francisco dos Santos Filho, pelo corte de dezenas de amostras e pela sua dedicação ao trabalho mesmo durante os finais de semana.

À todos os meus amigos que cresceram comigo e fazem parte da minha vida, em especial a Jairo Campos, Ricardo Nowak, Thiago Licastro, Tiago Gomes, Victor Licastro e Marco Gandra.

À Débora Quaresma de Freitas, João Carlos Dias de Freitas, Luciana Quaresma de Freitas e, em especial, à Tereza Cristina Quaresma de Freitas, que sempre esteve ao meu lado me encorajando.

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

À minha sobrinha Bella-Nicole, que não tem nem idéia do que se trata por ser muito nova e não entender nada de português.

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

*"[The Universe] is written in the language of mathematics,
and its characters are triangles, circles, and other geometrical figures,
without which it is humanly impossible to understand a single word of it..."*

*"O Universo é escrito em linguagem matemática,
e seus caracteres são triângulos, círculos e outras figuras geométricas,
sem as quais é humanamente impossível compreender uma única palavra."*

Galileu Galilei, the controversy on the Comets of 1618

ESTUDO DOS EFEITOS FÍSICOS, QUÍMICOS E ESTRUTURAIS OCAIONADOS PELA RADIAÇÃO IONIZANTE E PRESERVAÇÃO EM CARTILAGEM COSTAL HUMANA

Antonio Carlos Martinho Junior

RESUMO

Bancos de Tecidos de diversas regiões do mundo têm estocado cartilagens humanas obtidas de doadores cadavéricos recentes para uso em diversos tipos de cirurgias reconstrutivas. Para garantir que tais tecidos não estejam contaminados, estes têm sido esterilizados com radiação ionizante. Entretanto, altas doses de radiação gama podem causar efeitos indesejáveis nos tecidos, diminuindo suas propriedades mecânicas. No presente trabalho, avaliamos as alterações físico/químicas e estruturais em cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, bem como em cartilagens preservadas em altas concentrações de glicerol ($>98\%$), antes e depois da esterilização por radiação gama em três diferentes doses (15, 25 e 50 kGy), usando um irradiador com fonte de ^{60}Co . Amostras de cartilagem costal humana foram obtidas de 20 doadores cadavéricos, com idade variando entre 18 e 55 anos. Para verificar as alterações ocorridas na cartilagem foram realizados testes de Termogravimetria (TG), Tomografia por Coerência Óptica (OCT) e testes mecânicos (tração e compressão). Nos resultados de termogravimetria podemos verificar que as curvas de saída de água têm o mesmo padrão, independente da amostra. Por outro lado, as amostras não irradiadas apresentaram grande variabilidade de curvas termogravimétricas entre diferentes doadores e entre o mesmo doador. Em relação aos testes mecânicos, quando cartilagens são irradiadas com 15 kGy, sua resistência à tração aumenta cerca de 24%. As amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando irradiadas com 25 e 50 kGy, tiveram uma diminuição das propriedades mecânicas menos significativas do que as amostras preservadas em altas concentrações de glicerol e irradiadas com as mesmas doses. Portanto, cartilagens congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ podem ser esterilizadas com doses de até 50 kGy, ao passo que cartilagens preservadas em altas concentrações de glicerol podem ser esterilizadas com doses de até 25 kGy.

STUDY OF PHYSICAL, CHEMICAL AND STRUCTURAL EFFECTS CAUSED BY IONIZING RADIATION AND PRESERVATION ON HUMAN COSTAL CARTILAGE

Antonio Carlos Martinho Junior

ABSTRACT

Tissue Banks around the world have stored human cartilages obtained from cadaveric donors for use in several kinds of reconstructive surgeries. To ensure that such tissues are not contaminated, they have been sterilized with ionizing radiation. However, high doses of gamma radiation may cause undesirable changes in the tissues, decreasing the mechanical properties of the grafts. In this work, we evaluate physical/chemical and structural changes in deep-frozen (-70 °C) or high concentration of glycerol (> 98%) preserved costal cartilage, before and after sterilization by ionizing radiation at 3 different doses (15, 25 and 50 kGy). Samples of human costal cartilage were obtained from 20 cadaveric donors ranging between 18 and 55 years old. A ⁶⁰Co irradiator was used as irradiation source. Thermogravimetry (TG), Optical Coherence Tomography (OCT) and mechanical tension and compression tests were carried out to evaluate the changes in the cartilage. Regarding the thermogravimetric results, the obtained data has shown that the TG curves have the same pattern independently of the sample irradiated or not. On the other hand, non-irradiated samples showed great variability of thermogravimetric curves among different donors and for the same donor. Concerning the mechanical tests, when cartilages were irradiated with 15 kGy, their mechanical strength to tension was increased about 24%, in both deep-frozen and preserved in glycerol samples. Samples deep-frozen, when irradiated with 25 and 50 kGy, presented a decrease of their mechanical behavior smaller than those preserved in high concentrations of glycerol and irradiated with the same dose. Therefore, deep-frozen cartilages can be sterilized with doses until 50 kGy and cartilages preserved in high concentrations of glycerol can be sterilized with doses until 25 kGy without significant changes in their bio-mechanical properties.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	17
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
3.1 Introdução aos Bancos de Tecidos.....	18
3.2 Física das radiações.....	23
3.2.1 Interação da radiação γ com a matéria.....	26
3.2.1.1 Efeito fotoelétrico.....	27
3.2.1.2 Efeito Compton.....	27
3.2.1.3 Produção de pares.....	27
3.2.2 Raios γ e sua absorção pelos materiais.....	28
3.3 Esterilização.....	30
3.4 Esterilização por radiação ionizante.....	35
3.4.1 Doses apropriadas para esterilização de tecidos biológicos.....	37
3.4.2 Mecanismos envolvidos na inativação de microorganismos por radiação ionizante.....	40
3.4.3 Esterilização da cartilagem por radiação ionizante.....	41
3.5 Características gerais da cartilagem.....	41
3.5.1 Ultraestrutura da cartilagem hialina.....	46
3.5.1.1 Zona superficial.....	48
3.5.1.2 Zona de transição.....	48
3.5.1.3 Zona radial.....	48
3.5.1.4 Zona calcificada.....	49
3.6 Características gerais da matriz extracelular.....	49
3.6.1 Colágeno.....	51
3.6.2 Glicosaminoglicanas.....	57
3.6.2.1 Ácido hialurônico.....	58
3.6.2.2 Condroitin-sulfato.....	59

3.6.2.3	Dermatan-sulfato.....	59
3.6.2.4	Queratan-sulfato.....	60
3.6.2.5	Heparan-sulfato.....	60
3.6.2.6	Heparina.....	61
3.6.3	Proteoglicanas.....	61
3.6.4	Fibras elásticas.....	64
3.6.5	Glicoproteínas estruturais.....	65
3.7	Biomecânica.....	66
3.7.1	Biomecânica da cartilagem.....	68
3.7.1.1	Aspectos da cartilagem sobre compressão.....	72
3.7.1.2	Aspectos da cartilagem sobre tração.....	73
3.7.1.3	Módulo de elasticidade.....	73
3.8	Técnicas experimentais.....	74
3.8.1	Termogravimetria.....	74
3.8.2	Tomografia por Coerência Óptica (Optical Coherence Tomography OCT).....	76
3.8.3	Propriedades mecânicas.....	78
3.8.4	Análise Estatística.....	79
3.8.4.1	Análise de Variância (ANOVA).....	79
3.8.4.2	Método de Tukey.....	80
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
4.1	Obtenção das amostras.....	81
4.1.1	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas.....	83
4.2	Limpeza das amostras.....	83
4.3	Preservação das amostras.....	84
4.4	Irradiação das amostras.....	85
4.5	Termogravimetria.....	85
4.6	OCT (<i>Optical Coherence Tomography</i>).....	86
4.7	Biomecânica.....	87
4.7.1	Ensaio de tração.....	88

4.7.2 Ensaio de Compressão.....	89
4.8 Análise estatística.....	89
5. RESULTADOS.....	91
5.1 Termogravimetria.....	91
5.1.1 Curvas controle.....	91
5.1.2 Comparação entre as amostras irradiadas e as curvas de máximo e mínimo.....	92
5.2 OCT (<i>Optical Coherence Tomography</i>).....	95
5.2.1 Amostras congeladas a -70 °C.....	96
5.2.2 Amostras preservadas em glicerol.....	97
5.3 Ensaio Biomecânicos.....	98
5.3.1 Padrão de curvas obtidas nos ensaios de tração.....	98
5.3.2 Ensaio de tração.....	98
5.3.2.1 Comparação da resistência à tração das amostras entre as doses e os tipos de preservação	99
5.3.2.2 Comparação dos pontos de ruptura médios entre as diferentes doses e formas de preservação	100
5.3.3 Padrão de curvas obtidas nos ensaios de compressão.....	101
5.3.4 Ensaio de compressão.....	101
5.3.4.1 Comparação da carga compressiva das amostras entre as doses e os tipos de preservação	102
5.3.4.2 Comparação das cargas compressivas médias entre as diferentes doses e formas de preservação	103
5.4 Análise Estatística.....	104
5.4.1 Análise comparativa das duas formas de preservação.....	104
5.4.2 Análise comparativa das tensões médias de ruptura nas diferentes doses.....	104
5.4.3 Análise comparativa das cargas médias compressivas nas diferentes doses.....	106
6. DISCUSSÃO.....	108
7. CONCLUSÃO.....	121
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

APÊNDICE.....	142
Apêndice A- quadro detalhado de amostras.....	142
Apêndice B- Valores obtidos nos ensaios de tração.....	144
Apêndice C- Valores obtidos nos ensaios de compressão.....	146
Apêndice D- Análise de variância com Método de Tukey para tração e formas de preservação.....	149
Apêndice E- Análise de variância com Método de Tukey para compressão e formas de preservação.....	152
Apêndice F- Curvas termogravimétricas das amostras congeladas.....	155
Apêndice G- Curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol.....	161
ANEXOS.....	167
ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética do Serviço de Verificação de Óbitos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SVO-FMUSP).....	168
ANEXO B- Aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen).....	170

1. INTRODUÇÃO

As últimas décadas testemunharam um crescimento vertiginoso do conhecimento humano por meio de uma rede evolutiva, onde a ciência básica fornece suporte ao desenvolvimento de novas tecnologias que, cedo ou tarde, acabam por gerar novos mecanismos de auxílio à pesquisa. Nessa rede observa-se com facilidade a interação das mais diferentes áreas do conhecimento humano, denotando uma íntima ligação entre as ciências exatas e biológicas.

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

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

Após a Segunda Guerra Mundial, principalmente durante a Guerra Fria, houve um silencioso e gradual aumento no uso pacífico da energia nuclear, a qual é hoje uma importante ferramenta em diversas áreas, mas que na medicina tem fator preponderante. Dentre as diversas utilizações da energia nuclear na medicina destaca-se a sua alta capacidade de esterilização de materiais utilizados em diversos procedimentos médicos-hospitalares (Silverman, 1991). Além disso, a aplicação da radiação ionizante para esterilização de materiais biológicos tem garantido a segurança no uso como enxertos em diversos países. Cada vez mais os bancos de tecidos vêm utilizando a radiação ionizante como forma eficaz de esterilização final, face às diversas complicações já enfrentadas pela medicina no uso de enxertos contaminados, os quais em algumas situações, culminaram com o óbito de pacientes (Kuehnert et al. 1998; Kainer et al., 2004).

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

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

Diversos trabalhos têm sido realizados buscando-se avaliar os danos causados nos tecidos biológicos esterilizados por radiação ionizante (Bourroul, 2004; Dziedzic-Goclawska et al., 2005, Kosmiskas, 2007). Em particular, o grupo de Irradiação de Tecidos Biológicos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen - CNEN/SP), em conjunto com o Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da

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

Faculdade de Medicina da USP (IHC-FMUSP), vêm desenvolvendo, desde 2000, estudos que visam relacionar os efeitos da radiação ionizante nos tecidos biológicos esterilizados por essa técnica (Bourroul, 2004; Kosmiskas, 2007).

A necessidade de se esterilizar a cartilagem decorre do fato desta não existir com disponibilidade suficiente para se realizar um transplante autólogo², a exemplo do que pode ocorrer com a pele e, assim, a obtenção desse tecido se dá a partir de doadores cadavéricos ou multi-órgãos (Herson & Mathor, 2006).

Desde 1969 já se sabia que, quando se realiza um transplante heterólogo de pele, quase que inevitavelmente essa pele é rejeitada e, para se garantir o sucesso do transplante, torna-se necessário o uso de enxertos autólogos, ou seja, a pele é removida de um local para outro no mesmo paciente. Felizmente isso pode ser feito de maneira tal que o paciente fique com pele na região onde o enxerto foi retirado e também naquela em que foi transplantado. Entretanto, com a cartilagem encontra-se uma situação diferente do que ocorre com a pele, uma vez que um indivíduo não apresenta tanta cartilagem disponível. Assim, quando se quer reconstruir um nariz ou orelha com emprego de cartilagem como tecido de sustentação, não se encontra material disponível para enxertos autólogos. Isso levou às tentativas de empregar cartilagem obtida de cadáveres recentes para enxerto em pessoas que necessitassem de cirurgias reconstrutivas (Ham, 1969).

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

Por outro lado, não se pode aplicar altas doses de radiação sobre os aloenxertos de

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

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

Assim, faz-se necessário estudar as alterações causadas na cartilagem após o procedimento de esterilização por radiação ionizante em diferentes doses, de modo a determinar a dose ótima para esterilização desse tecido, na qual se obtenha segurança na esterilidade e na estrutura material do enxerto a ser transplantado.

2. OBJETIVOS

Avaliar as características físicas, químicas e biomecânicas do tecido cartilaginoso costal, preservados em glicerol ou congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, após o processo de esterilização por radiação ionizante e compará-las aos controles não irradiados.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Introdução aos Bancos de Tecidos

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

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

A radiação ionizante passou a ser utilizada em Bancos de Tecidos em 1983, em um Banco de Tecidos em Mianmar, concomitantemente ao início do Programa de Radiação e Banco de Tecidos da IAEA. Logo em seguida, a IAEA deu suporte ao desenvolvimento de outros 17 Bancos de Tecidos naquela região, onde hoje existem 66 bancos de tecidos associados ao programa. Na América Latina, o primeiro Banco de Tecidos associado ao programa foi desenvolvido em 1993, na Argentina, e hoje existem 37 Bancos de Tecidos em 7 países dessa região que participam do programa (The IAEA Radiation & Tissue Banking Program i), entre eles o Brasil, que em 1998, desenvolveu seu primeiro Banco de Tecidos de referência envolvido no Programa de Radiação e Banco de Tecidos, o qual foi inaugurado em outubro de 2000 e passou a ser tornar totalmente operacional em janeiro de 2001 (Herson et al., 2008). Atualmente, o país conta com 5 novos bancos desenvolvidos a partir deste (The IAEA Radiation e Tissue Banking Program ii).

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

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

No Brasil, a disponibilização de tecidos humanos para transplante passou a ser regulamentada em fevereiro de 1997 pela Lei nº 9.434, que estabelece critérios para a retirada de tecidos de doadores para transplante ou tratamento *in vivo* ou *post mortem*. Essa lei prevê que a retirada de tecidos, órgãos ou partes do corpo humano *post mortem* para transplante ou tratamento deve ser precedida de diagnóstico de morte encefálica, que deve ser realizado por dois médicos não participantes da equipe de remoção e transplante, baseado em critérios clínicos e tecnológicos predefinidos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fiscaliza e controla o funcionamento dos bancos assim como o uso de tecidos em transplantes, como determinado pelas seguintes legislações

(Herson et al, 2002):

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

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

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

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

Portaria nº 1686 de 20 de setembro de 2002, que Aprova, na forma do Anexo I desta Portaria, as Normas para Autorização de Funcionamento e Cadastramento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos pelo Sistema Único de Saúde (Brasil, Portaria nº1686, 2002).

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

Nos últimos anos, várias áreas de aplicação clínica e de cirurgia reconstrutiva têm utilizado enxertos de tecidos alógenos preservados, como cartilagem, ossos, tendões, dura máter, válvulas cardíacas, âmnion e pele (Pruss et al., 2002). Em particular, a cartilagem costal tem sido utilizada para a reconstrução de pênis e nariz (Vajaradul, 2000; Strauch & Wallach, 2003), no reparo dos brônquios (Oguzkaya & Akçali, 2003), em cirurgias

oculares (Haviko & Laasik, 2001; Herson & Mathor, 2006), reconstrução do pavilhão auricular (Herson & Mathor, 2006) e para a reconstrução da parede peitoral em crianças com Síndrome de Poland (Akal & Kara, 2002).

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

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

Segundo Kumarasinghe (2001), apesar da queda a baixos níveis da transmissão de doenças em países desenvolvidos, nos países em desenvolvimento as infecções ainda continuam causando considerável morbidade e mortalidade. Segundo o mesmo autor, os patógenos que causam doenças transmissíveis de particular importância para, não só pacientes imuno-comprometidos, mas também para receptores de transplante, são: Vírus da hepatite, Vírus da família herpes (Vírus Varicela-zoster, Citomegalovírus, Vírus Epstein-

Barr, Vírus da Herpes humana 6, 7 e 8), Micobactérias, agentes causadores de Tuberculose, HIV, Príons (Mal de Creutzfeldt-Jakob) e fungos.

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

Há na literatura científica diversos artigos que relacionam o uso de aloenxertos em transplantes com várias complicações, entre elas septicemia e óbito do paciente que recebeu o enxerto. Kuehnert et al. (1998) descreveram o caso de um paciente que desenvolveu endocardite por *Candida albicans* e fungemia após sofrer uma substituição da válvula aórtica. De acordo com o autor, durante o processamento do tecido foi verificado que o biomaterial estava contaminado por *C. albicans*, mas após o procedimento de desinfecção com solução anti-fúngica e anti-microbiana o enxerto apresentou cultura-negativa para *C. albicans*. Uma comparação entre *C. albicans* isoladas pré-implantação e pós-implantação revelou notável similaridade genética entre elas, entretanto, testes de susceptibilidade antifúngica mostraram que os isolados pós-implantação foram mais resistentes a fluconazol e anfotericina B do que os isolados pré-implantação, sugerindo aparecimento de resistência após a desinfecção. Os autores concluíram que a contaminação de um paciente após receber o implante de uma válvula cardíaca contaminada pode ocorrer mesmo após o processo de desinfecção, o que resultou em endocardite no receptor.

Segundo Kainer et al. (2004), a morte de um homem de 23 anos ocorreu por septicemia causada por *Clostridium sordelli* depois que o mesmo recebeu um enxerto músculo-esquelético. Um estudo realizado no banco de tecidos responsável pela liberação do enxerto mostrou que, provavelmente, alguns dos seus testes anti-microbianos resultaram

em falsos negativos, uma vez que os tecidos eram cultivados somente depois do tratamento com solução anti-fúngica e anti-microbiana. Assim, os tecidos dos doadores implicados com a infecção foram liberados apesar de estarem contaminados, o que provocou infecção em outros pacientes.

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

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

3.2 Física das radiações

De acordo com Kaplan (1983), em 1896 Becquerel descobriu que cristais de sais de urânio emitiam raios que eram semelhantes aos raios X; pelo fato de que eram altamente penetrantes, podiam afetar uma chapa fotográfica e induziam condutividade elétrica em gases. A descoberta de Becquerel foi seguida pela identificação por Pierre e Marie Curie, em 1898, de dois elementos radioativos, o polônio e o rádio. Descobriu-se que a atividade do rádio medida, pela intensidade dos raios emitidos, era mais de um milhão de vezes maior que a do urânio.

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

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

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

O estudo químico detalhado das substâncias radioativas mostrou que cada substância é um elemento, e que sua radioatividade é causada por uma desintegração espontânea dos átomos radioativos em outros átomos (Kaplan, 1983).

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

Existem dois tipos de radiação ionizantes (FIG. 3.2.1):

a) partículas de alta energia, tais como partículas α (alfa) e β (beta), pósitrons e nêutrons, sendo estas obtidas pela desintegração radioativa de isótopos ou, no caso específico de partículas β e pósitrons, gerados por equipamentos específicos. De todas estas, os nêutrons

possuem a capacidade extra de induzir radioatividade (Silverman, 1991).

b) ondas eletromagnéticas com pequeno comprimento de onda e grande energia, como radiação γ (gama), obtida de radioisótopos, e raios X, gerados por maquinário (Dahlan, 2001).

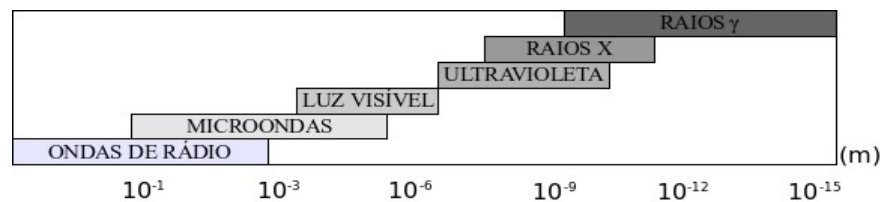


Figura 3.2.1- Série de radiações eletromagnéticas. Observar o comprimento de onda de cada tipo de radiação eletromagnética. Adaptado de Dahlan, 2001.

A radiação ionizante pode ser obtida a partir de duas diferentes fontes: a) radioisótopos e b) máquinas de descargas elétricas. Os mais comuns radioisótopos usados comercialmente são o cobalto-60 (^{60}Co) e o césio-137 (^{137}Cs).

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

O ^{60}Co e o ^{137}Cs são fontes industriais de radiação γ , os quais possuem diferentes meias-vida, como mostrado na TAB. 3.2.1.

O ^{60}Co é a mais popular fonte industrial de radiação γ devido a sua alta energia quando comparada a do ^{137}Cs . É usado para a esterilização de produtos médicos,

fitoterápicos, cosméticos e itens farmacêuticos, descontaminação de esgotos, vulcanização da borracha (Dahlan, 2001), para a irradiação de alimentos (Villavicencio, 1998; Araújo, 2004; Araújo, 2007; Fanaro, 2007).

Tabela 3.2.1 Meia-vida e energia de radiação dos isótopos ^{60}Co e ^{137}Cs .

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

fonte: Dahlan, 2001.

3.2.1 Interação da radiação γ com a matéria

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

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

3.2.1.1 Efeito Fotoelétrico

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

3.2.1.2 Efeito Compton

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

3.2.1.3 Produção de pares

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

3.2.2 Raios γ e sua absorção pelos materiais

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

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

A propriedade básica da absorção de raios γ é o decréscimo exponencial na intensidade da radiação quando um feixe de raios γ homogêneo passa através de uma placa fina de matéria. Quando um feixe de raios γ de intensidade I incide sobre uma placa de espessura Δx , a mudança na intensidade do feixe ao passar através da placa é proporcional à espessura e à intensidade incidente

$$\Delta I = -\mu I \Delta x,$$

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

$$I / I_0 = e^{-\mu x}.$$

A última equação dá a intensidade de radiação I depois que um feixe de intensidade I_0 atravessou uma espessura x de um dado material. A intensidade pode ser escrita como:

$$I = Bh\nu,$$

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

$$B / B_0 = e^{-\mu x}.$$

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

A interação dos raios γ com a matéria é marcadamente diferente daquela para partículas, tais como as partículas α e β . A diferença se torna aparente pelo poder de penetração muito maior dos raios γ nas leis de absorção. Raios γ e raios X mostram a absorção exponencial característica na matéria e não têm alcance definido como se

encontra nas partículas carregadas. Partículas carregadas, especialmente as pesadas, perdem sua energia durante o curso devido a um grande número de colisões com elétrons atômicos. A perda de energia ocorre em inúmeros pequenos degraus e a partícula gradualmente diminui de velocidade até parar e ser absorvida. Entretanto, quando um feixe de fótons de raios γ incide sobre um absorvedor fino, cada fóton que é absorvido do feixe é removido individualmente num único evento. O evento pode ser um processo de absorção real, caso no qual o fóton desaparece, ou em que pode ser espalhado para fora do feixe. A característica um evento único do processo de remoção é responsável pela absorção exponencial. Por isso, o número de fótons que pode ser removido na passagem através de uma espessura Δx do absorvedor é proporcional a Δx e ao número de fótons que alcança Δx ; este tipo de dependência conduz diretamente à lei de absorção exponencial (Kaplan, 1983).

3.3 Esterilização

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

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

Cada método possui características próprias, as quais definem o espectro de ação e

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

Os métodos de esterilização mais utilizados são: calor, filtração, óxido de etileno (ETO), vapor de formaldeído, plasma de peróxido de hidrogênio, radiação ultravioleta e radiação ionizante, os quais têm suas vantagens e desvantagens relacionadas na TAB. 3.3.1 e são resumidos logo a seguir:

Tabela 3.3.1- Vantagens e desvantagens dos principais métodos e esterilização.

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

a) Calor:

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

b) Filtração:

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

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

c) Óxido de Etileno (EtO):

Agente químico descoberto em 1859, muito eficiente na esterilização de produtos, tem sido empregado, na forma de vapor, na área médica devido a seu alto poder de penetração, não ser corrosivo para maioria dos materiais e de ser aplicado a baixas temperaturas. O mecanismo de ação do EtO se dá pela alquilação de compostos no interior dos microorganismos, principalmente a guanina e a adenina presente no DNA. Por esta razão, o EtO é extremamente eficiente na eliminação da maioria dos microorganismos, seja na forma vegetativa ou de esporos. Existem, porém, limitações quanto ao uso do EtO: inicialmente o vapor de EtO é explosivo quanto atinge a concentração de 3% no ar, além disso, o composto é tóxico, potencialmente cancerígeno, teratogênico, mutagênico e neurotóxico. Tendo em vista tais limitações, a utilização de materiais esterilizados por EtO requer uma série de passos de segurança. Já embutida no processo de esterilização, há uma etapa de aeração que visa retirar o vapor e seus possíveis subprodutos presentes no material. Tal etapa pode consistir apenas na circulação de ar estéril ou na combinação de ciclos de vácuo. A duração da aeração pode variar de algumas horas a um dia, dependendo das características dos materiais esterilizados. Além dessa etapa é imprescindível que o vapor já utilizado de EtO seja tratado antes de ser eliminado para o ambiente. O tratamento muitas vezes consiste na reação do vapor com água para formação de etileno glicol. O uso de EPI (Equipamento de Proteção Individual) por todos os envolvidos no processo de esterilização é obrigatório para evitar ao máximo a exposição ao EtO. Durante o processo de esterilização, podem ser formados subprodutos na presença de íons cloro (etileno

cloridrina) ou de água (etileno glicol), tais compostos também são tóxicos e de difícil remoção. Tendo em vista o contato direto que certos produtos médicos e tecidos transplantados têm com a corrente sanguínea e os órgãos dos pacientes, ambos não devem ser esterilizados com EtO, já que os resíduos deixados por tal processo, mesmo com os cuidados para redução e diminuição destes, apresentam riscos ao paciente devido a seus possíveis efeitos tóxicos (Possari, 2003i).

d) Vapor de Formaldeído:

O emprego do vapor de formaldeído surgiu como uma das alternativas ao uso do EtO. A ação deste composto sobre microorganismos é conhecida desde 1888 e os primeiros estudos sobre a eficácia na forma de vapor datam de 1906. Porém apenas em 1966 foi desenvolvida uma técnica que permitisse o uso do vapor de formaldeído em baixas temperaturas. A técnica, conhecida por LTSFS (do inglês *Low Temperature Steam and Formaldehyde Sterilization*) permite o uso do vapor de formaldeído a 2%, na faixa de temperatura de 56-60°C. A atuação sobre microorganismos é semelhante à do EtO, alquilando proteínas e ácidos nucléicos no interior dos microorganismos. De maneira geral, o LTSFS é superior ao EtO, sendo mais econômico, de mais fácil utilização e mais saudável para o meio ambiente e para a equipe que o utiliza. A principal limitação, contudo, se encontra no fato de materiais que absorvam o formaldeído em grandes quantidades não poderem ser esterilizados por esta técnica já que há uma enorme dificuldade em eliminar o produto impregnado (Possari, 2003ii).

e) Plasma de Peróxido de Hidrogênio:

Como descrito pelo próprio nome, esta técnica se baseia na associação de vapor de peróxido de hidrogênio com plasma de baixa temperatura. Tal tecnologia data dos anos 80 tendo sido aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration, USA*³) apenas em 1993. O

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

mecanismo de ação de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio se dá pela formação de radicais livres, os quais reagem inespecificamente com inúmeros compostos celulares e levam a uma inativação eficiente de esporos, bactérias e vírus. Em comparação com o EtO, este método não é tóxico já que os subprodutos principais são água e oxigênio. Porém, há a necessidade de se investir em embalagens especiais para os produtos, sendo que estas não podem conter compostos que absorvam o peróxido, tais como celulose e derivados e a penetração não é ideal (Possari, 2005).

f) Radiação Ultravioleta:

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

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

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

3.4 Esterilização por radiação ionizante

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

A eficácia da utilização da radiação como método de esterilização é decorrente da sua grande capacidade de penetração na matéria e de sua alta eficiência em inativar microorganismos sem a ocorrência de grandes variações da temperatura, nenhuma diferença de pressão ou atrasos por barreiras de difusão, além de permitir a esterilização de materiais que estejam em pacotes previamente fechados, que desta forma previne uma recontaminação posterior. A pequena variação de temperatura permite que materiais biológicos sensíveis sejam esterilizados e é eficiente tanto à temperatura ambiente como em temperaturas abaixo de zero (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

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

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

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

O termo radiação ionizante é usado para todas as radiações com excesso de energia e capazes de produzir cascatas de ionização na matéria. A variação da energia

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

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

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

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

3.4.1 Doses apropriadas para esterilização de tecidos biológicos

De maneira geral, o valor da dose de esterilização depende da carga microbiana

inicial, resistência dos microorganismos ao método de esterilização e do nível de garantia de esterilidade (SAL *Security Assurance Level*) necessário (International Atomic Energy Agency IAEA, 2004). Alguns patógenos, especialmente os príons e os vírus são muito resistentes aos métodos de esterilização mais comuns, incluindo a esterilização por radiação.

O termo D_{10} descreve a quantidade de energia transferida, número de microorganismos contaminantes e sua resistência à radiação ionizante. O valor D_{10} , usualmente expresso em kGy, é a dose de radiação necessária para reduzir a população microbiana inicial de um \log_{10} , ou seja, reduzi-la em 90%.

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

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

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

encontraram que uma dose de 30-40 kGy é necessária para parar a seqüência de amplificação do HIV-1 em enxertos frescos congelados em ligamentos patelares.

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

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

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

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

Pelo fato de os contaminantes poderem variar largamente de um doador para outro, torna-se muito difícil, senão impossível, determinar a resistência e quantidade inicial dos microorganismos no tecido coletado. Quando a resistência e a densidade de microorganismos são desconhecidos e não puderem ser medidos diretamente, recomenda-

se que um alto valor D_{10} para organismos resistentes consistentes com as condições físicas e químicas que sejam usadas para a avaliação.

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

3.4.2 Mecanismos envolvidos na inativação de microorganismos por radiação ionizante

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

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

De acordo com a iso 11.137-2:2006, mesmo um tecido apresentando *bioburdem* igual a zero, exige-se que este venha a ser esterilizado com a dose mínima para garantir a

real esterilidade, a qual é igual a 15 kGy.

3.4.3 Esterilização da cartilagem por radiação ionizante

Sabe-se pouco sobre os efeitos da radiação ionizante sobre a cartilagem. Segundo Cornelissen et al. (1996), a literatura que descreve os efeitos da radiação ionizante sobre a cartilagem é vaga e contraditória, pois frequentemente os experimentos são realizados sob diferentes condições. Yahia et al. (1993) relataram que os efeitos da radiação gama, em relação às doses normalmente utilizadas para a esterilização de enxerto, provocam alterações significativamente adversas sobre a elasticidade e viscosidade destes enxertos, concluindo que a esterilização por radiação ionizante não é um método apropriado para o uso clínico. Bumann et al. (1989) avaliando a estabilidade conformacional dos enxertos de cartilagem costal esterilizados por diferentes métodos, observaram que os enxertos esterilizados por Raios-X e Raios Beta não eram apropriados na reconstrução de defeitos ósseos faciais, uma vez que os enxertos perderam completamente sua configuração após 125 e 230 dias, respectivamente. Já os que foram preservados com óxido de etileno perderam sua configuração somente após 328 dias, concluindo que outros métodos de esterilização de biomateriais devem ser reconsiderados. Em contrapartida, Linberg et al. (1980) utilizando cartilagem costal irradiada em seus estudos de reconstrução orbital e periorbital relatam que este método de esterilização permite a utilização desta cartilagem, uma vez que os transplantes não sofrem reações de rejeição, resistem a infecções e raramente sofrem absorção.

3.5 Características gerais da cartilagem

A cartilagem é uma forma especializada de tecido conjuntivo que suporta fadiga

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

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

Essas células se diferenciam tornando-se condroblastos e, a partir desse momento, começam a secretar matriz em torno de si, o que as afastam uma das outras. Assim, a diferenciação das cartilagens dá-se do centro para a periferia (Junqueira & Carneiro, 2004). Com a continuação desse processo, os condroblastos ficam envolvidos pela matriz secretada por eles e acabam contidos dentro de pequenos compartimentos individuais denominados lacunas. No momento em que os condroblastos ficam envoltos pela matriz eles passam a ser denominados condrócitos. Ainda capazes de divisão celular, os

condrócitos podem formar grupos isogênicos de duas a quatro células dentro de uma mesma lacuna, separadas por um septo de matriz fibrosa (FIG. 3.5.1) (Cormack, 2003; Gartner & Hiatt, 2003).

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

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

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

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

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

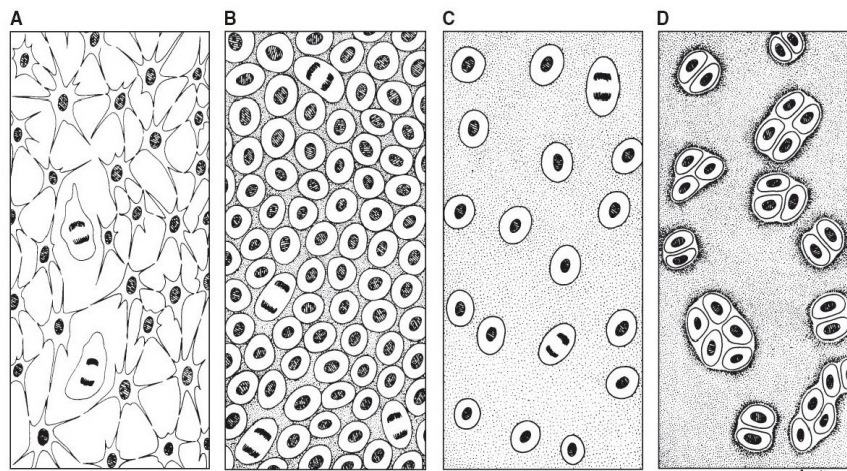


Figura 3.5.1- Esquema representativo do processo de histogênese da cartilagem. a) multiplicação das células mesenquimatosas com seus prolongamentos; b) retração dos prolongamentos das células mesenquimatosas e rápida multiplicação, formando agregados; c) secreção de matriz extracelular com o conseqüente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

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

Em ambos os casos, os condrócitos recém formados logo passam a sintetizar fibrilas de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas, de forma que o crescimento real é

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

Pelo fato de ainda não apresentar quantidade de proteoglicanas como na cartilagem madura, as áreas de crescimento recém-formadas apresentam-se acidófilas. Além disso, com a idade, a cartilagem antiga reduz sua basofilia, tornando-se, em alguns locais, acidófila, uma vez que os condrócitos perdem gradualmente a capacidade de produzir proteoglicanas (Di Fiore, 2003). Com um aumento maior da idade, a cartilagem degenera e se depositam minerais na matriz (Dziedzic-Goclawska, 2000), o que é acompanhado pela diminuição do conteúdo de água, afetando a difusão das substâncias nutritivas pela matriz, fazendo com que os condrócitos passem a consumir suas reservas de lipídeos e de glicogênio, processo esse que logo em seguida conduz os condrócitos à morte (Di Fiore, 2003).

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

Conforme as diversas necessidades funcionais do organismo, as cartilagens se diferenciam em três tipos: a) cartilagem hialina, que é a mais comum e cuja matriz possui delicadas fibrilas constituídas principalmente de colágeno tipo II. A fresco, a cartilagem hialina é branco-azulada, semi-transparente e flexível. É encontrada no nariz, na laringe,

nas extremidades ventrais das costelas, onde se articulam com o esterno, nos anéis da traquéia e dos brônquios e nas superfícies articulares das articulações móveis do corpo. Durante o desenvolvimento embrionário, essa cartilagem forma o molde cartilaginoso de vários ossos e constitui as placas epifisárias dos ossos em desenvolvimento; b) cartilagem elástica, que possui poucas fibrilas de colágeno tipo II e abundantes fibras elásticas. Está presente no pavilhão da orelha, nas tubas auditivas interna e externa, epiglote e laringe (cartilagem cuneiforme). A fresco, a cartilagem elástica é amarelada e mais opaca do que a cartilagem hialina devido a presença de fibras elásticas. De forma geral, a cartilagem elástica é idêntica a cartilagem hialina e, freqüentemente, está associada a esta; e c) cartilagem fibrosa, que apresenta matriz constituída preponderantemente por fibras de colágeno tipo I e se encontra em diversas articulações, em particular nos discos das articulações temporomandibulares, esternocostoclavicular e acromioclavicular, nos discos intervertebrais, na sínfise púbica, no bordo cotilóideo do acetábulo do osso da coxa e nos discos da articulação do joelho, além do que em muitos locais de fixação de tendões às cartilagens. Por ser formada por feixes de fibras colágenas paralelos entre si e muito apertados, entre os quais se encontram grupos ou fileiras de condrócitos imersos em uma matriz extracelular similar a da cartilagem hialina, a cartilagem fibrosa é considerada um tecido de transição entre a cartilagem hialina e o tecido conjuntivo denso regular ou modelado. (Cormack, 2003; Di Fiore, 2003; Gartner & Hiatt, 2003; Junqueira & Carneiro, 2004; Kaur, 2001).

3.5.1 Ultraestrutura da cartilagem hialina

A cartilagem madura apresenta-se como um material anisotrópico (as propriedades físicas variam de acordo com a direção e o sentido considerados) formada por quatro zonas distintas em sua secção vertical (FIG. 3.5.1.1), além de regiões de matriz distintas ao redor

dos condrócitos. A estrutura, composição e as propriedades mecânicas variam dentro dessas quatro diferentes zonas (TAB. 3.5.1.1). Assim, temos uma grande variação de formas, tamanhos e atividades celulares, diâmetro das fibrilas de colágeno, bem como sua orientação, conteúdo de água da matriz e conteúdo de proteoglicanas (Hunziker et al., 1997).

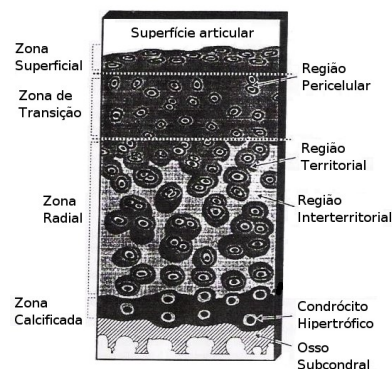


Figura 3.5.1.1- Esquema de corte transversal da cartilagem evidenciando as quatro diferentes zonas. Modificado de Hasler et al. (1999).

Tabela 3.5.1.1- Distribuição dos principais componentes da cartilagem hialina.

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

Fonte Hasler et al. (1999)

3.5.1.1 Zona superficial

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

3.5.1.2 Zona de transição

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

3.5.1.3 Zona radial

Freqüentemente, a zona radial é dividida em zona radial superior e zona radial inferior (Huzinker et al., 1997). Nesta zona as fibrilas de colágeno apresentam seu maior diâmetro e aparecem orientadas de maneira a ficar perpendiculares ao osso subcondral e o seu conteúdo de proteoglicanas é alto (Wong et al., 1997). Estudos de Microscopia Eletrônica demonstraram que as fibrilas de colágeno formam lâminas que se estendem do osso subcondral até a superfície da cartilagem (Nötzli & Clark, 1997).

3.5.1.4 Zona calcificada

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

3.6 Características gerais da matriz extracelular

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

Em células mesenquimatosas, a MEC pode ser dividida em dois tipos: a) matriz pericelular, que está próxima ou adjacente à superfície celular e b) matriz intercelular, a qual está mais distante e circunda a célula. A matriz intercelular pode formar estruturas especializadas, como o tendão, a cartilagem e, com uma deposição secundária de fosfato de cálcio, ossos e dentes (Thomas & Davies, 2001). Segundo Timpl (1996), a matriz na qual estão apoiados todos os endotélios e epitélios possui uma composição química e organização diferente da matriz mesenquimal, sendo referida como membrana basal.

Antes do conhecimento mais profundo da natureza molecular da MEC, esta era considerada como um local inerte de desenvolvimento de células e tecidos. Hoje é reconhecido que a MEC é um pré-requisito para a existência de organismos multicelulares,

pois atua na manutenção da forma dos tecidos e polarização das células, tem um papel central em diferentes processos celulares, os quais incluem a migração celular, diferenciação e cicatrização de ferimentos. Muitos componentes da MEC tem também mostrado atuar como antígenos em certos processos imunopatológicos e, ainda, como componentes anormais em certas condições patológicas (Thomas & Davies, 2001).

A MEC dos tecidos conjuntivos representa um complexo molecular constituído por fibras insolúveis, microfibrilas e uma grande quantidade de proteínas e glicoproteínas solúveis (Hay, 1993). De acordo com Jenkins (1990), a MEC da cartilagem representa 95% do seu peso total. Estudos de biologia molecular e bioquímica têm identificado quatro classes de macromoléculas que formam a MEC, a quais são chamadas de colágenos, proteoglicanas e glicosaminoglicanas, glicoproteínas estruturais e elastina (Ayad et al., 1996). Todos esses componentes estão dissolvidos no fluído extracelular, o qual é formado por água (60 a 85% do peso total) (Mankin & Thrasher, 1975). Os múltiplos componentes da matriz são secretados por células do próprio tecido conjuntivo, nas quais a orientação do seu citoesqueleto influencia o padrão da MEC por elas sintetizadas. Esses múltiplos componentes dividem-se em dois grupos: 1) aqueles constituídos por molécula protéicas alongadas, que se agregam formando estruturas fibrilares ou fibrosas, como o colágeno e a elastina; e 2) os constituintes que se agregam mas não formam fibrilas ou fibras, e que, por sua vez, podem ter dois sub-tipos: a) glicoproteínas alongadas, como a fibronectina e a laminina, cuja função principal é realizar a adesão entre a matriz e as células; e b) glicosaminoglicanas e proteoglicanas, que formam um gel hidratado no qual estão imersos os outros componentes da matriz. O colágeno e a elastina são responsáveis pelo arcabouço estrutural e elástico de vários tecidos. A fibronectina é responsável pela adesão das células não epiteliais à matriz, e a laminina, por sua vez, é responsável pela adesão das células epiteliais à lâmina basal. Já as glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um gel hidrófilo, semi-fluido, que permite a circulação, nos tecidos conjuntivos, de nutrientes, hormônios e outros mensageiros químicos. Nas cartilagens, as moléculas de

glicosaminoglicanas e proteoglicanas formam um complexo de pontes moleculares unindo as fibrilas de colágeno entre si, emprestando a este tecido a sua importante característica de rigidez e discreta compressibilidade (Alberts et al., 1997; Junqueira & Carneiro, 2000).

3.6.1 Colágeno

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas altamente características, encontradas em todos os animais multicelulares (Alberts et al., 1997). Essa família de proteínas foi selecionada durante a evolução para exercer diferentes funções, entre elas, principalmente, estrutural (Junqueira & Carneiro, 2004). Segundo Fratzl (2003), o colágeno é o maior constituinte dos tecidos biológicos. De acordo com Alberts et al. (1997), o colágeno constitui 25% da massa protéica total de um mamífero. Os colágenos podem ser divididos em quatro sub-famílias: a) colágenos formadores de fibras, b) colágenos associados a fibras, c) não fibrilares e d) um grupo de colágenos detectados a partir do cDNA e seqüenciamento genético (Thomas & Davies, 2001). Outros autores classificam os colágenos em: a) colágenos formadores de fibrilas, b) colágenos associados às fibrilas (FACIT, do inglês *fibril-associated colagens*), c) colágenos formadores de redes, d) fibrilas de ancoragem, e) colágenos transmembrana, f) colágenos de membrana basal e g) outros tipos de colágenos com funções únicas (Gelse et al., 2003).

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

A estrutura longa, rígida, de tripla-hélice é a característica principal de uma molécula de colágeno (FIG. 3.6.1.1) (Alberts et al., 1997). Sua tripla-hélice tem um comprimento de aproximadamente 300 nm, o que corresponde a cerca de 1000 aminoácidos, e é formada por duas cadeias chamadas α_1 associadas com uma terceira cadeia, do tipo α_2 , que são similares, mas não são idênticas. Cada uma das três cadeias α forma uma hélice voltada para a esquerda, que segundo Thomas & Davies (2001) é específica para colágeno, não sendo encontrada em nenhuma outra proteína, e cada volta é composta por cerca de 18 aminoácidos (Gelse et al., 2003). As moléculas são reunidas em fibrilas de colágeno, as quais, quando observadas ao microscópio eletrônico, revelam estriações transversais com uma periodicidade de 67 nm, o que reflete uma alternância regular das moléculas de colágeno que compõem essas fibrilas (FIG. 3.6.1.2) (Alberts et al., 1997; Fratzl, 2003).

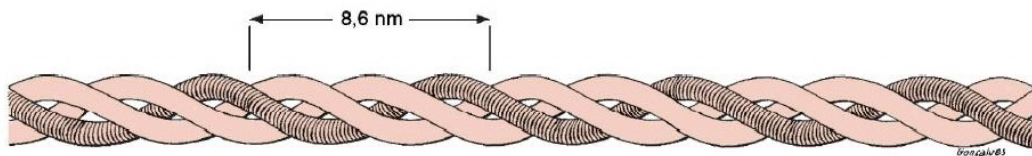


Figura 3.6.1.1- Molécula de colágeno. A imagem evidencia a formação do colágeno por duas cadeias α_1 associadas com uma terceira cadeia, do tipo α_2 . Cada cadeia alfa é enrolada em alfa hélice com passo à direita, sendo mantidas unidas por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Cada volta completa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

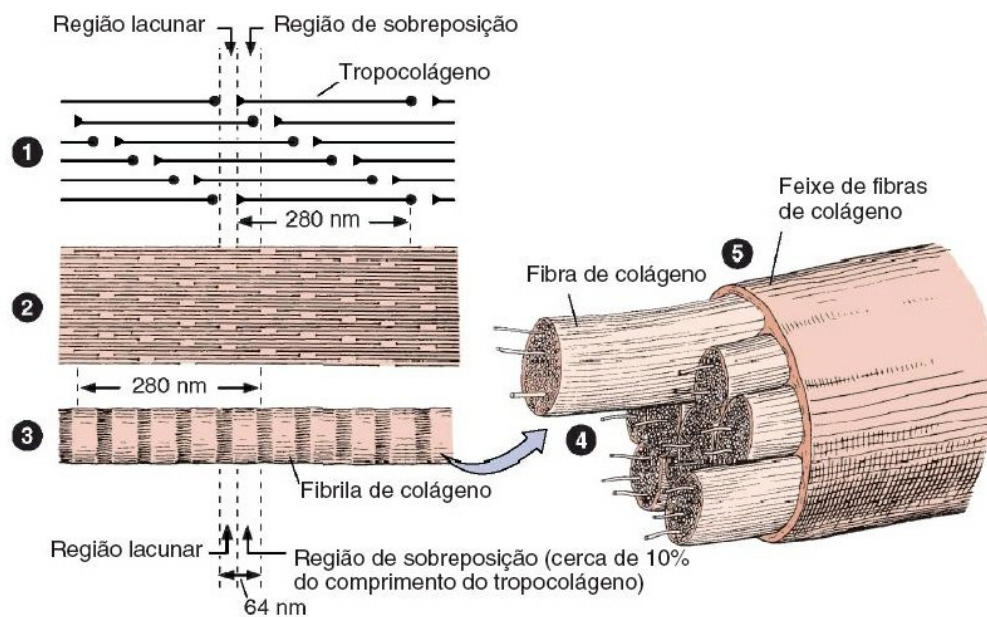


Figura 3.6.1.2- Esquema de reunião de moléculas de colágeno para a formação de fibrilas de colágeno (1 a 3) e fibras de colágeno (4 e 5) (Junqueira & Carneiro, 2004).

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

Um pré-requisito estrutural essencial para a reunião das fibrilas em uma tripla-hélice é um resíduo de glicina em toda terceira posição das cadeias polipeptídicas, resultando na seqüência exposta acima. As cadeia α reúnem-se em torno de um eixo central de forma que todos os resíduos de glicina estejam posicionados na região central da tripla-hélice, enquanto as cadeias laterais dos outros aminoácidos ocupam as regiões mais externas da tripla-hélice (Gelse et al., 2003).

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

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

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

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

meio de vesículas de secreção, processo este dependente dos microtúbulos. Ao atingir a superfície celular, as moléculas de pró-colágeno solúveis são descarregadas no espaço extracelular.

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

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

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

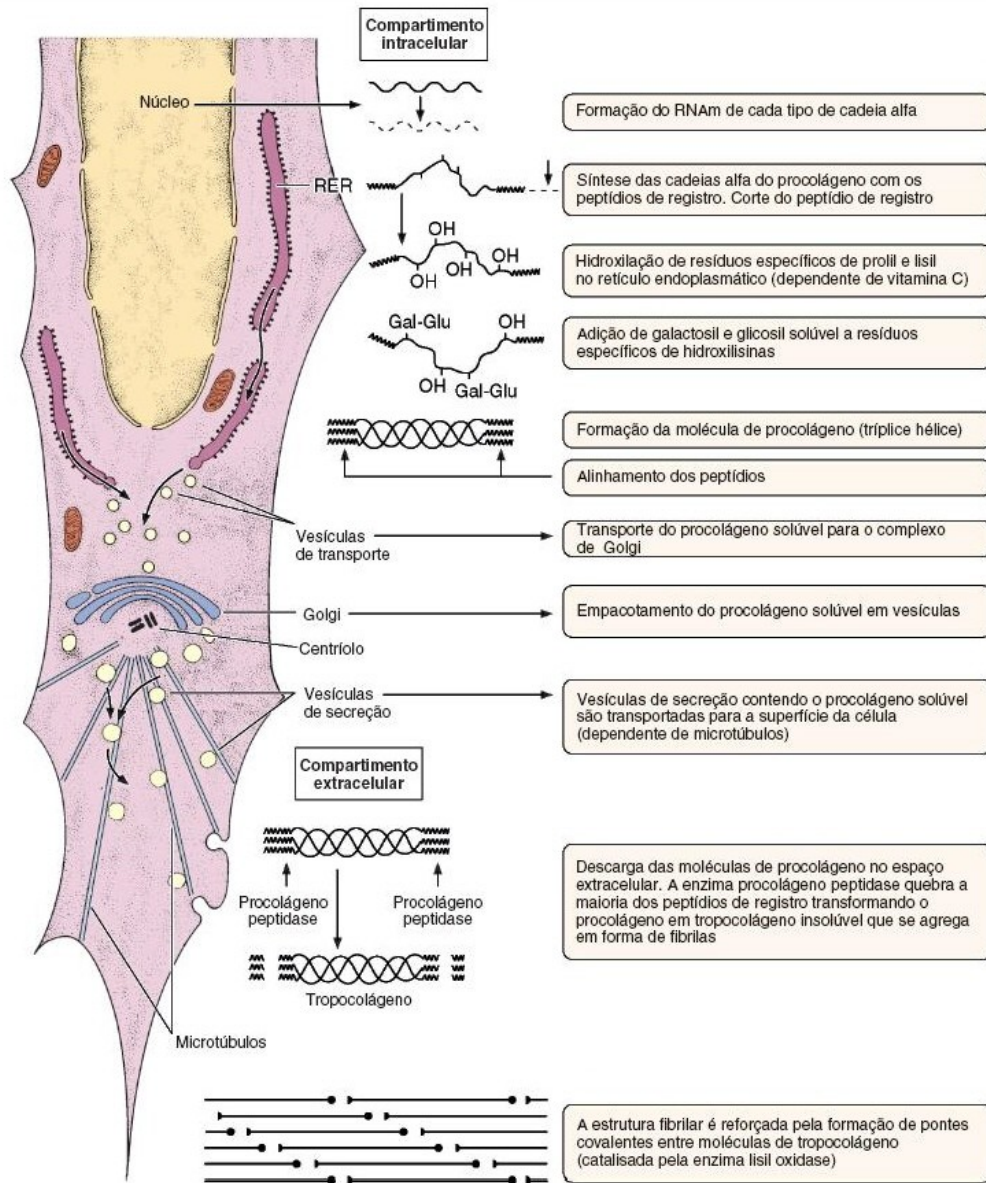


Figura 3.6.1.3- A imagem mostra as principais etapas da biossíntese de colágeno (Junqueira & Carneiro, 2004).

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

al., 2003).

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

3.6.2 Glicosaminoglicanas

As glicosamonoglicanas (GAGs) são cadeias heteropolissacarídicas, lineares, não ramificadas, compostas por unidades dissacarídicas não repetitivas. Um dos dois açúcares do dissacarídeo sempre é um açúcar aminado (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina), normalmente sulfatado. O segundo açúcar normalmente é um ácido urônico (D-glicurônico ou L-idurônico), sendo que a galactose pode substituir o ácido urônico, como no caso da GAG queratan-sulfato.

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

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

- a) ácido hialurônico;
- b) condrotin-sulfato ou dermatan sulfato;
- c) queratan-sulfato;

d) heparan-sulfato e heparina

3.6.2.1 Ácido hialurônico

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

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

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

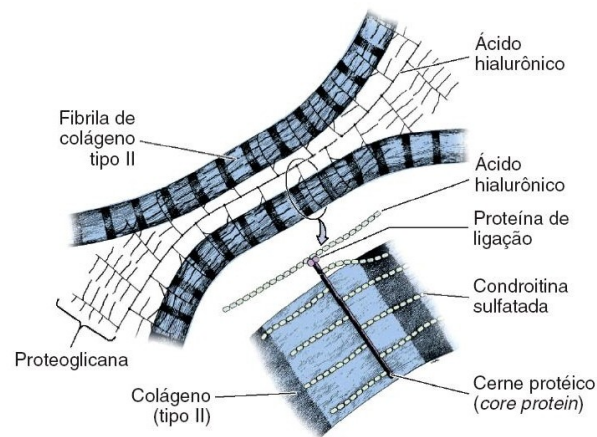


Figura 3.6.2.1.1- Atuação do ácido hialurônico na matriz extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.6.2.2 Condroitin-sulfato

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

3.6.2.3 Dermatan-sulfato

O dermatan-sulfato pode ser considerado um isômero do condrotin-sulfato, no qual uma porção variável de ácido D-glicurônico é convertida, pela ação de uma epimerase, para ácido L-idurônico (Wight et al., 1991). Proteoglicanas que contém dermatan-sulfato em sua estrutura são largamente distribuídas na MEC da pele, tendão, cartilagem entre

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

3.6.2.4 Queratan-sulfato

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

3.6.2.5 Heparan-sulfato

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

3.6.2.6 Heparina

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

3.6.3 Proteoglicanas

O termo proteoglicana (PG) foi originalmente introduzido na década de 60 para definir qualquer molécula constituída por um núcleo ou eixo protéico que interage covalentemente com ao menos uma molécula de GAG (FIG. 3.6.3.1) (Hascall & Kimura, 1982; Muir, 1983). Entretanto, hoje caracteriza-se proteoglicana como uma superfamília de proteínas encontradas na superfície celular, membranas basais e incorporadas à MEC (Alberts et al., 1997; Jackson et al., 1991). Os agregados de proteoglicanas são o maior componente estrutural da MEC da cartilagem. Esses agregados fornecem à cartilagem uma propriedade de gel, dando resistência a deformação pela absorção de água. As PGs estão relacionadas também a outros eventos, como no caso da proteoglicana heparan-sulfato, a qual está envolvida no desenvolvimento da cartilagem, o que inclui regulação da expressão gênica, apresentação de fatores de crescimento, estabelecimento de gradientes morfogênicos e modulação da homeostase sanguínea (Farach-Carson et al., 2005; Watanabe, 2004). Hoje sabe-se também que a PG heparan-sulfato Syndecan-3 atua como co-receptor para fatores de crescimento e citocinas (Pacifci et al., 2005). Duas anomalias genéticas letais, a nanomelia em galináceos e a deficiência de matriz na cartilagem em ratos estão relacionadas a conteúdos inferiores a 5% do seu conteúdo normal de proteoglicanas, embora apresente quantidades normais de colágeno tipo II. Na ausência de proteoglicanas a matriz da cartilagem se reduz grandemente (Hascall et al., 1991).

A principal proteoglicana encontrada nas cartilagens é a agregcana, que dá a este

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

A constituição molecular dos eixos protéicos das PGs no que se refere ao peso molecular, a seqüência de aminoácidos, e o tipo de aminoácidos com os quais as GAGs interagem só foram descobertos recentemente, graças aos avanços das técnicas de biologia molecular, em especial, nos métodos de seqüenciamento de aminoácidos e obtenção de clones de cDNA. Desta forma, os pesquisadores já isolaram e nomearam pelo menos 6 tipos de eixos protéicos (Wight et al., 1991), dentre eles o eixo da agrecana, que consiste de 2316 aminoácidos e tem aproximadamente 220 kDa de peso molecular. A comparação da agrecana humana com a de ratos revelou 75% de similaridade entre elas (Doege et al., 1991).

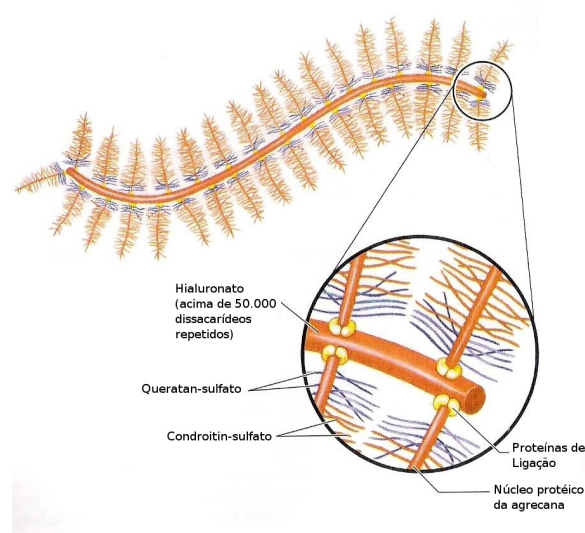


Figura 3.6.3.1- Esquema representativo de uma molécula de proteoglicana. Observar a ligação das glicosaminoglicanas no cerne protéico (Nelson & Cox, 2000).

Os eixos protéicos das PGs são sintetizados nos ribossomos aderidos à membrana do retículo endoplasmático e, em sua luz, são empacotados. As cadeias de polissacarídeos

são montadas principalmente no Complexo de Golgi. Primeiramente, um tetrassacarídeo de ligação interage com o aminoácido serina no núcleo protéico, servindo como um iniciador para o crescimento do polissacarídeo e, subsequentemente, uma molécula de açúcar é adicionada de cada vez, por enzimas glicosil-transferases específicas. Ainda no Complexo de Golgi, uma série de reações seqüenciais e coordenadas de epimerização, que alteram a configuração dos substituintes ao redor dos átomos de carbono na molécula de açúcar e de sulfatação, que aumentam as cargas negativas das PGs, modificam covalentemente as unidades de açúcar. A sua síntese depende de um balanço hormonal adequado. Hormônios como a tiroxina e a testosterona aceleram a sua síntese e os hormônios cortisona, hidrocortisona e estradiol retardam-a (Junqueira & Carneiro, 2004).

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

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

Como já mencionado anteriormente, a agrecana é a principal macromolécula encontrada na cartilagem. É dividida em números de domínios, os quais incluem três

domínios globulares e regiões separadoras, nas quais os oligossacarídeos e cadeias GAG se ligam aos proteoglicanos maduros. Aparentemente, esses quatro núcleos protéicos não estão geneticamente relacionados, embora cada um deles possa ser um membro de sua própria família gênica. A agrecana pertence a família dos proteoglicanos que possuem hialuronato ligado ao seu eixo protéico. Os membros dessa família normalmente possuem cadeias laterais como condroitin ou dermatan-sulfato, mas a agrecana é também frequentemente sintetizada com cadeias laterais de queratan sulfato (Wight et al., 1991).

3.6.4 Fibras elásticas

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

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

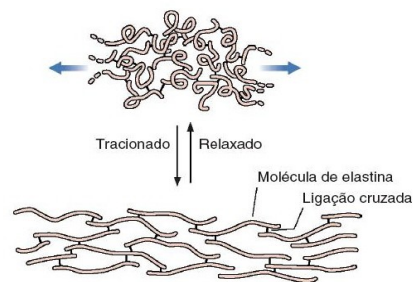


Figura 3.6.4.1- As moléculas de elastina são unidas por pontes covalentes que geram uma rede interconectadas e extensível. Como cada uma das moléculas de elastina contida na rede pode expandir-se em qualquer direção, resulta que a rede inteira pode esticar-se e encolher-se como um fio elástico (Junqueira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

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

3.6.5 Glicoproteínas estruturais

Fibronectina, laminina e outras proteínas extracelulares não colagenosas tem um importante papel em muitas interações da superfície celular. Por exemplo, a fibronectina ajuda a mediar a adesão celular, migração celular durante o desenvolvimento embrionário e cicatrização de feridas, enquanto a laminina pode promover processos tão diversos quanto crescimento axonal, manutenção da polarização, diferenciação fenotípica das células epiteliais sobre a membrana basal e metástase. Cada uma dessas glicoproteínas pode participar de uma variedade de funções pelo uso de diferentes domínios especializados ou reconhecimento de seqüências peptídicas para a ligação de receptores de superfície

específicos, a colágenos, proteoglicanos ou a outras moléculas extracelulares (Yamada, 1991).

3.7 Biomecânica

Hay (1978) descreve a Biomecânica como sendo a ciência que estuda as forças internas e externas que atuam no corpo humano e os efeitos produzidos por essas forças. Assim, observam-se dois campos no estudo da Biomecânica: a) a biomecânica interna, que estuda a determinação das forças internas e as conseqüências resultantes dessas forças e, b) a biomecânica externa, que representa os parâmetros de determinação qualitativa ou quantitativa referentes às mudanças de lugar e de posição do corpo, ou seja, referem-se às características observáveis externamente na estrutura do movimento. McGinnis (1999) refere que os estudos do sistema esquelético, do sistema nervoso e do sistema muscular, assim como o dos biomateriais, estão integrados à biomecânica interna. O mesmo autor integra à biomecânica externa o estudo da cinética linear e angular, da cinemática linear e angular, do equilíbrio e da mecânica dos fluidos. Outra definição de biomecânica caracteriza-a como sendo o estudo da estrutura e da função dos sistemas biológicos, utilizando os métodos da Mecânica Clássica (Adrian & Cooper, 1995 ; Enoka, 1988; Hall, 1991).

A principal diferença quando comparamos qualquer material de engenharia com um tecido biológico é que, ao contrário daquele, este é capaz de se adaptar e responder ao ambiente com potenciais de autoreparo e a habilidade de alterar suas propriedades e arquitetura. Isso faz com que o estudo das propriedades mecânicas dos tecidos biológicos seja dinâmico e mais desafiador.

Para os aloenxertos, várias questões são normalmente levantadas no que diz respeito à suas propriedades mecânicas. As mais importantes estão relacionadas com a

compreensão dos mecanismos de falha e fratura (Pereira, 2001):

- ☐ Quão forte deve ser o aloenxerto a ser utilizado?
- ☐ Como os aloenxertos se comportam em relação a uma carga externa?
- ☐ Pode um aloenxerto suportar as condições de carga quando incorporado ao receptor?
- ☐ Quais são as limitações?
- ☐ Quando ele vai falhar?
- ☐ O evento de falha ou fratura pode ser predito?
- ☐ Pode o risco de falha ser reduzido?

Algumas destas questões podem ser respondidas quando se possui entendimento básico da estrutura mecânica do material ou tecido e se houver a possibilidade de medir seu comportamento mecânico e seus limites quando submetidos à carga.

Quando uma força externa ou momento é aplicado a qualquer tecido, a resposta inicial é resistir à carga aplicada. O tecido começa a se deformar quando a resistência interna é superada pela força aplicada. Exemplos incluem: puxar um ligamento com ele esticando ou pressionar uma cartilagem com esta se comprimindo. A deformação do tecido pode continuar, se a carga aumentar ainda mais. Chegar-se-ia a um ponto no qual o tecido finalmente cederia. Essa falha pode ser um rasgo completo ou uma rachadura sobre o tecido em um instante, ou poderia ser gradual e progressiva (Pereira, 2001).

Em nível microestrutural, as deformações envolvem o deslocamento dos átomos e moléculas constituintes que é resistido pelas ligações interatômicas que mantêm o material coeso. Quanto maior esta força, maior será a resistência e menor será o grau de deformação. Essa resistência pode depender de: (a) quantas ligações existem em um dado tecido (propriedade estrutural) e (b) de que são feitas estas ligações e como elas estão

arranjadas e organizadas em relação à carga externa aplicada (propriedade material). Para cada tecido as propriedades estruturais são essencialmente dependentes do formato e do tamanho, enquanto as propriedades materiais descrevem o comportamento que é dependente da composição e organização de seus constituintes. As propriedades do material são normalmente constantes, independentes da geometria. Para tecidos cartilagosos, alguns outros fatores afetam as propriedades deste material. Esses incluem a razão mineral/colágeno, a orientação da fibra colágena e a percentagem de água (Pereira, 2001). As propriedades de mecânicas do tecido cartilaginoso são determinadas pela composição de sua matriz extracelular e do fluído extracelular (Pearle et al., 2005).

As vantagens em se determinar as propriedades do material são: (a) classificar ou comparar o comportamento de vários materiais de tecidos em relação à carga e (b) prever as limitações e falhas para uma dada carga.

3.7.1 Biomecânica da cartilagem

Não existem artigos sobre as propriedades biomecânicas específicas para a cartilagem costal assim como relatado por Feng et al. (2001) e constatado em levantamentos bibliográficos realizados pelo autor deste estudo. Feng et al. (2001) realizaram seus trabalhos com métodos que são utilizados para examinar as propriedades biomecânicas de cartilagens articulares de outras regiões, pelo fato de ambas serem cartilagens hialinas.

De acordo com estudos de Wu & Herzog (2002), a forma e a concentração volumétrica dos condrócitos em cartilagens articulares produzem diferentes efeitos sobre as propriedades biomecânicas desse tecido, parecendo estar relacionadas à estabilidade mecânica da matriz na qual se encontram. De acordo com seus estudos, a matriz é

mecanicamente estável na zona superficial da cartilagem mesmo quando a concentração volumétrica dos condrócitos alcança 20%. Por outro lado, em regiões mais profundas da cartilagem, a matriz extracelular torna-se instável quando a concentração volumétrica dos condrócitos atinge cerca de 10%, o que sugere que para a matriz extracelular da cartilagem ser estável globalmente, a concentração volumétrica de condrócitos deve diminuir da superfície em direção às regiões mais profundas. Salvatore et al. (2004) verificaram que o módulo de elasticidade dos condrócitos é pelo menos três vezes menor do que o módulo de elasticidade do tecido completo e, portanto, a matriz extracelular da cartilagem deve ser muito rígida para manter a rigidez do tecido de forma similar à rigidez da cartilagem articular cuja concentração celular é baixa.

Em cartilagens articulares, a exemplo da cartilagem costal, os agregados de proteoglicanas interagem com a rede de colágeno. As cargas negativas fixas apresentadas pelos agregados de proteoglicanos (SO_3^- e COO^-) possuem uma distância que varia de 1 a 1,5 nm. Dessa forma, as cartilagens articulares possuem uma alta densidade de cargas negativas fixas (Comper & Laurent, 1978), o que atrai os íons móveis (Na^+ e Ca^{2+}) da solução externa onde se encontra a cartilagem. Esse desbalanço iônico aumenta a pressão interna do tecido tornando-a maior que a pressão da solução externa criando uma pressão osmótica de aproximadamente 0,3 MPa (Grodzinsky, 1983). A pressão de turgência da célula é aproximadamente proporcional à densidade de cargas negativas fixas. Tal pressão de turgência (pressão de inchamento) é decorrente da soma das forças repulsivas causadas pela proximidade das cargas negativas com a pressão osmótica. Para evitar um colapso da cartilagem nessas condições, a turgência dos proteoglicanos é balanceada pela tração da rede de colágeno (Basser et al., 1998).

Na ausência de uma força externa, a rede de colágeno está sujeita a um pré-estresse decorrente da pressão de turgência (Maroudas, 1976), uma vez que os proteoglicanos estão confinados em apenas 20% do seu domínio livre de solução (Muir, 1983). Ao se aplicar

uma carga externa, a cartilagem sofre uma deformação causada, em um primeiro momento, por uma diminuição da solução de domínios de agregados de proteoglicanos, o que conseqüentemente aumenta a densidade de cargas. Esse aumento de densidade de cargas aumenta a pressão osmótica do fluído extracelular dentro dos poros da MEC. Haverá saída de líquido intersticial se a pressão do fluído intersticial for maior do que a pressão osmótica, resultando num aumento de concentração de proteoglicanas dentro da MEC, o que resulta em um aumento das forças repulsivas até o momento em que entrar em equilíbrio com a intensidade da carga aplicada. Dessa forma, as propriedades físico-químicas das proteoglicanas em conjunto com a malha de colágeno promovem a resistência das cartilagens à compressão (Maroudas, 1975).

O fluído extracelular das cartilagens articulares é composto por água, na qual se dissolvem gases, pequenas proteínas e metabólitos. Cerca de 60 a 85% da cartilagem consiste de água, o seu mais abundante componente (Mankin & Thrasher, 1975), sendo que aproximadamente 30% desse conteúdo total de água está presente na forma de água intersticial, localizada no espaço intrafibrilar do colágeno (Katz et al., 1986; Maroudas et al., 1991).

Existem diversos modelos teóricos para cartilagem articular, as quais envolvem desde modelos de fase única até modelos multi-fásicos. Inicialmente, os primeiros modelos teóricos não relacionavam, diretamente, a natureza das cargas elétricas do tecido. Assim, nesses modelos as propriedades e a mecânica das estruturas elementares foram introduzidas por meio de equações utilizando parâmetros obtidos experimentalmente. Entretanto, a partir dos anos 80, novas teorias foram propostas para descrever as propriedades físico-químicas e/ou eletro-químicas do comportamento das cartilagens articulares (Lai et al., 1993), dentre elas a Teoria termoanalógica de turgência (Myers et al., 1984), a Teoria Bicomponente de Lanir (Lanir, 1987), a Teoria Eletro-mecânica de Eisenberg e Grodzinsky (Eisenberg & Grodzinsky, 1987; Lai et al. 1991) e a Teoria

Trifásica de Lai (Lai et al. 1991).

A Teoria Eletro-mecânica combina as leis para a transdução electrocinética linear de meios ionizados com os princípios da Teoria Bifásica linear (Mow et al., 1980). Por outro lado, a Teoria Trifásica de Lai et al. (1991) é uma extração da Teoria Bifásica, incorporando uma fase iônica às fases sólidas e fluídas da Teoria Bifásica.

De acordo com Hasler et al. (1999), as três principais configurações experimentais mais utilizadas nos testes de compressão da cartilagem articular são: a indentação (FIG. 3.7.1.1-a), a compressão confinada (FIG. 3.7.1.1-b) e a compressão não confinada (FIG. 3.7.1.1-c).

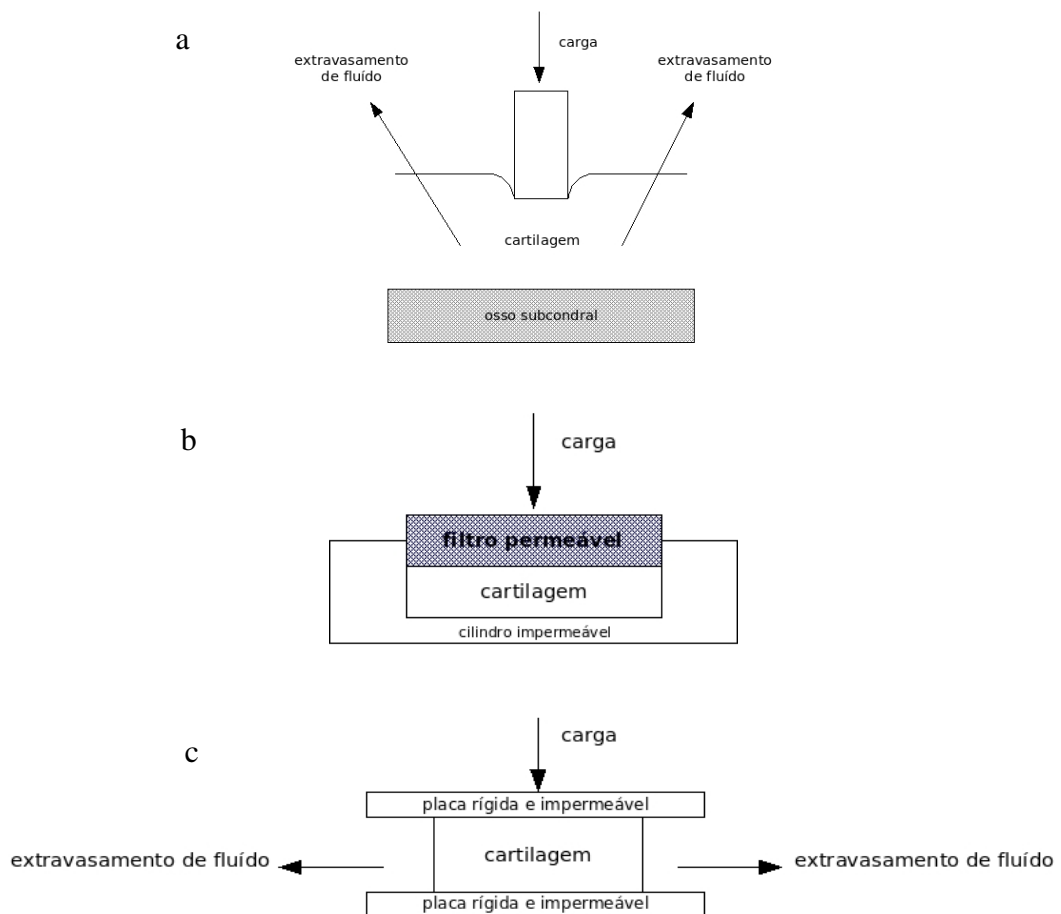


Figura 3.7.1.1- Configurações experimentais de testes de compressão. a- indentação, b- compressão confinada, c- compressão não confinada. Adaptado de Hasler et al. (1999).

Qualquer que seja o método escolhido para derivar as propriedades da cartilagem deve assumir que este tecido é homogêneo e isotrópico (mesmas propriedades físicas, independente da direção e sentido considerados). Por serem extremamente simplificados, ao se assumir tais condições, deve-se tomar um cuidado maior na análise de seus resultados (Hasler et al., 1999).

Vários estudos demonstraram que as cartilagens articulares comportam-se de formas diferentes quando tensionadas e quando comprimidas, demonstrando uma não-linearidade entre tração e compressão (Roth & Mow, 1980; Akizuki et al., 1986).

3.7.1.1 Aspectos da cartilagem sobre compressão

Ao se aplicar uma carga sobre o tecido cartilaginoso de forma a comprimi-lo, alterações volumétricas passam a ocorrer devido ao movimento do fluido dentro do tecido. Esse movimento é determinado pela permeabilidade hidráulica, o qual está diretamente ligado à concentração de proteoglicanas (Maroudas, 1975), o que foi demonstrado por Torzilini et al. (1997), quando as proteoglicanas foram digeridas enzimaticamente, resultando em uma diminuição no módulo de compressão. A diminuição do equilíbrio do módulo de compressão tem sido correlacionada a um aumento do conteúdo de água (Armstrong et al., 1984; Torzilini et al., 1997). Por outro lado, estudos têm sugerido uma analogia entre o módulo de tração e o módulo de compressão da cartilagem. Dessa forma, a resistência à compressão pode depender não somente do conteúdo de proteoglicanas, mas também da integridade da rede de colágeno (Bader et al., 1992).

Existe muita controvérsia acerca da correlação entre a espessura da cartilagem e o módulo de compressão (Hasler et al., 1999). Os resultados obtidos em diversos estudos mostram variações entre a espessura da cartilagem e seu módulo de compressão, indo de grandes variações (Kempson, 1979), passando por variações moderadas (Räsänen &

Messner, 1996) e chegando a apresentar nenhuma variação (Athanasίου et al., 1991).

3.7.1.2 Aspectos da cartilagem sobre tração

De acordo com Akizuki et al. (1986), o módulo de tração da cartilagem é dependente da densidade de fibrilas de colágeno, orientação dessas fibrilas e quantidade de ligações entre as fibrilas. Além disso, em cartilagens articulares humanas adultas saudáveis, o módulo de tração diminui significativamente conforme se distancia da zona superficial. Existe uma forte correlação positiva entre o equilíbrio do módulo de tração e a relação colágeno/proteoglicanas, enfatizando a importância da interação entre as moléculas de colágeno e de proteoglicanas na MEC.

Entretanto, o módulo de tração, em relação às zonas da cartilagem, varia muito. A zona superficial da cartilagem não apresenta correlação entre o módulo de tração e sua composição, o que sugere uma alta organização da estrutura dessa zona, tendo grande importância na determinação do módulo de tração. Por outro lado, a região mediana e a região profunda da cartilagem possuem uma organização da rede de colágeno mais aleatória e, portanto, podem possuir um papel mais importante na determinação do módulo de tração do que o apresentado pela zona superficial (Guilak et al., 1994).

3.7.1.3 Módulo de elasticidade

Entende-se por Módulo de Elasticidade (E) (ou Módulo de Young, em homenagem ao cientista inglês Thomas Young) a relação entre a tração (σ) ou compressão exercida sobre um dado material e sua deformação (ϵ).

$$E = \frac{\text{Tensão}}{\text{Deformação}} = \frac{F / A}{\Delta l / L}$$

onde F é a força aplicada; A é a secção através da qual é exercida a tração, Δl é a deformação e L é o comprimento inicial do material. Um importante parâmetro a ser considerado na determinação do módulo de elasticidade é a velocidade do ensaio (Canto & Pessan, 2003).

3.8 Técnicas experimentais

Neste trabalho, para analisar as propriedades da cartilagem costal preservadas de diferentes formas e após o processo de irradiação das mesmas, foram utilizadas as seguintes técnicas experimentais: a) Termogravimetria; b) Tomografia de coerência óptica (*Optical Coherence Tomography* - OCT) e c) Propriedades mecânicas

3.8.1 Termogravimetria

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

a) uma propriedade física deve ser medida;

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

A Análise Termogravimétrica ou Termogravimetria (TGA do inglês *Termogravimetric Analysis*) é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química, fixa, definida e constante, a temperatura em que começam a decompor, acompanhar o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre outras. Três modos de termogravimetria são comumente usados: a) termogravimetria isotérmica, b) termogravimetria quasi-isotérmica e c) termogravimetria dinâmica ou convencional (Matos & Machado, 2003).

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

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

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

Todos os equipamentos de análise térmica têm características em comum. De maneira geral, o que os diferencia é o tipo de transdutor empregado em sua configuração, o qual tem a função de converter as propriedades físicas avaliadas em sinais elétricos. O instrumental básico de um analisador termogravimétrico consiste de uma balança de

precisão acoplada a um forno que permite programar de diferentes maneiras o seu comportamento térmico. A amostra é colocada numa pequena plataforma acoplada à balança. Os dados da massa da amostra gerados são captados pela saída serial do equipamento, a qual está acoplada a um microcomputador equipado com software específico para análise dos dados. Um forno elétrico envolve a plataforma onde se encontra a amostra de forma que, ao aumentar sua potência, aumenta-se a temperatura do forno (Cienfuegos & Vaitsman, 2000). O transdutor gera um sinal elétrico que é amplificado e transferido para a unidade controladora, mantendo a comunicação permanente com a célula de medida. Esta unidade, além de receber os dados da célula de medidas, transfere as informações necessárias para colocar o equipamento em operação de acordo com os parâmetros (faixa de temperatura, razão de aquecimento, tipo de atmosfera) previamente estabelecidos (Matos & Machado, 2003). Os resultados obtidos são apresentados sob a forma de uma curva termogravimétrica, onde a massa é registrada em função da temperatura e/ou do tempo (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

3.8.2 Tomografia por Coerência Óptica (*Optical Coherence Tomography* OCT)

A Tomografia por Coerência Óptica (do inglês *Optical Coherence Tomography* - OCT) é uma tecnologia de obtenção de imagens em escalas microscópicas. Essa técnica é capaz de gerar imagens de seções transversais de sistemas biológicos sem a necessidade de qualquer preparação prévia das estruturas a serem estudadas (Huang et al., 1991). Essa técnica de obtenção de imagens é análoga ao ultra-som ou ao radar, exceto pelo fato de utilizar luz ao invés de ondas de rádio. Por ser uma técnica óptica, o OCT consegue uma resolução espacial de 10 µm ou menos, o que representa uma resolução cerca de 10 vezes maior do que o ultra-som convencional. Além disso, diferentemente do ultra-som, esta técnica não requer o contato direto com o tecido a ser estudado. Pelo fato da luz sofrer forte espalhamento na maioria dos tecidos, a profundidade de obtenção de imagens é limitada a

poucos milímetros (Fujimoto et al., 1995).

O sistema OCT utiliza fibras ópticas e uma fonte compacta de luz. A luz proveniente da fonte é dividida por uma via óptica divisora, a qual atua como um interferômetro. Uma das fibras dirige a luz para o tecido a ser estudado e a outra dirige a luz para um espelho referência em movimento, onde a posição de referência do espelho é precisamente controlada por um sistema eletrônico e um computador. Tanto a luz refletida pelo tecido quanto a luz refletida pelo espelho são recombinadas e a interferência entre os dois sinais ocorre somente quando os seus comprimentos correspondem ao comprimento de coerência da luz. Isto permite uma precisa determinação tanto da distância dentro do tecido que a luz foi refletida quanto sua magnitude (Fujimoto et al., 1995). A resolução axial das imagens geradas por OCT é determinada pelo comprimento de coerência da luz que foi utilizado na obtenção das imagens. Em um sistema OCT típico, que utiliza uma fonte de luz super-luminescente compacta, a resolução axial é de 10 a 20 μm . Se fontes alternativas, como pulsos ultra-curtos de *laser*, são utilizados, a resolução axial pode chegar até 2 a 4 μm (Clivaz et al., 1994).

A medição realizada com um feixe luminoso incidente em um único ponto do tecido produz uma medida de variação da reflexão óptica ao longo do eixo do feixe. Uma imagem da secção transversal de uma amostra é produzida de maneira similar ao radar: um feixe de luz é lançado no tecido e os perfis de reflexão de diversas posições transversas são gravados no computador. O resultado é uma representação bidimensional da secção transversal do tecido. Esta representação pode então ser mostrada em uma escala da cor cinza ou, ainda, por cores falsas⁴ (padrão RGB), onde as diferentes cores indicam o grau de espalhamento dos fótons onde 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 temos o vermelho como maior sinal, seguido pelas cores laranja, amarelo, azul, verde

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

e violeta (menor sinal). (Fujimoto et al., 1995).

3.8.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos materiais são de grande importância e interesse científico e tecnológico, devido aos requisitos ou exigências que os diversos materiais devem atender na maior parte de suas aplicações (Canto & Pessan, 2003).

Os ensaios de tração, flexão e compressão são executados em um aparelho chamado Máquina Universal de Ensaio . Esta máquina consiste basicamente de um arranjo constituído por duas travessas (uma fixa e outra móvel), uma célula de carga, um mecanismo de direcionamento, acessórios de fixação dos corpos de prova e extensômetros.

Na travessa móvel estão: um mecanismo de direcionamento e uma célula de carga. O mecanismo de direcionamento controla o sentido e a velocidade da travessa móvel, a qual deve ser constante e pré-determinada para o ensaio. A máquina de ensaios deve ter capacidade de manter as velocidades constantes em um intervalo de 1 a 500 mm/s, com tolerância pequena de erros (geralmente menor que 20%). A célula de carga registra a carga (normalmente em Newtons) durante o ensaio. Esta deve ter uma precisão maior que 99% do valor da carga real.

Nos ensaios de tração, são acoplados às travessas fixa e móvel, dispositivos de fixação dos corpos de prova (garras), as quais podem apresentar acionamento manual ou pneumático. Nos ensaios de compressão são utilizadas duas bases, as quais são afixadas na travessa móvel e na fixa (Canto & Pessan, 2003).

Seu funcionamento baseia-se no movimento vertical das garras/prensas, as quais possuem velocidade de afastamento/aproximação, respectivamente, controladas pelo operador. Todo o sistema está conectado a um microcomputador com *software* apropriado para análise dos dados enviados pela máquina, por meio de uma conexão serial. Conforme a amostra é deformada, um gráfico é gerado automaticamente pelo *software*, sendo

geralmente um gráfico de força ou pressão em função da deformação da amostra. Atualmente, o *software* disponível é o Bluehill®, o qual permite a geração de diversos tipos de gráficos, conforme a necessidade do trabalho a ser produzido (Instron do Brasil, 2008).

3.8.4 Análise Estatística

3.8.4.1 Análise de Variância (ANOVA)

A Análise de Variância (ANOVA) permite que vários dados sejam analisados ao mesmo tempo (Hall, 2006; Massad & Silveira, 2003). Essa forma de análise de dados foi desenvolvida pelo geneticista e estatístico Sir Ronald Aylmer Fischer, sendo também conhecida como *Fischer's ANOVA* ou Análise de Variância de Fischer.

Considerando uma variável de interesse com média μ e variância σ^2 , tem-se dois estimadores de σ^2 :

S_B^2 dispersão entre os grupos (onde B significabetween) e;

S_W^2 dispersão dentro dos grupos (onde W significawithin)

A variância das médias amostrais é dada por:

onde k é o número de grupos e $k-1$ é o grau de liberdade.

$$S_{\bar{x}}^2 = \frac{\sum \bar{x}_i^2 - \frac{(\sum \bar{x}_i)^2}{k}}{k-1}$$

Assim, o teste é aplicado para

$$F = \frac{S_B^2}{S_W^2}$$

3.8.4.2 Método de Tukey

O método de Tukey considera todos as possíveis diferenças de médias entre os pares, ao mesmo tempo, aplicando simultaneamente à todos os conjuntos a seguinte comparação:

$$(\mu_i - \mu_j)$$

onde μ_i é o valor com qual se quer comparar e μ_j é o valor a ser comparado.

Tal método utiliza uma variação de distribuição de *Student*, a qual é definida como:

$$q_{r,v} = w/s$$

onde r é o número de observações independentes, w é a variação do conjunto e s^2 é uma estimativa da variância de σ^2 , a qual é baseada em v graus de liberdade (NIST/SEMATECH, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, descrevemos os materiais e os métodos utilizados para detectar a quantidade de água por termogravimetria, a complementação destas medidas por meio de Tomografia por Coerência Óptica (OCT), os ensaios biomecânicos de tração e compressão, além da obtenção, limpeza, preservação e irradiação das amostras.

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade Pró-Análisis e a água de qualidade Milli-Q. Os resíduos de material biológico não patogênicos foram inativados com hipoclorito de sódio, colocados em sacos brancos apropriados e depositados no lixo biológico localizado na parte externa do biotério do Ipen para posterior recolhimento pelo serviço de coleta da prefeitura.

4.1 Obtenção das amostras

Todas as cartilagens costais humanas foram obtidas a partir de uma parceria com o Serviço de Verificação de Óbitos (SVO), da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Para tal obtenção, o projeto deste trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Serviço de Verificação de Óbitos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob responsabilidade do Professor Dr. Carlos Augusto G. Pasqualucci (ANEXO A). Conforme será utilizado pelo Banco de Tecidos, somente doadores com idade variando entre 18 e 55 anos foram considerados aptos.

Foram obtidas 40 amostras de um total de 20 diferentes doadores (55% do sexo masculino e 45% do sexo feminino), como indicado na TAB 4.1.1.

TABELA 4.1.1- Amostras divididas por tipo de preservação e dose de radiação recebida.

Dose	Masculino		Feminino	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Congeladas				
0 kGy	3	60%	2	40%
15 kGy	2	40%	3	60%
25 kGy	3	60%	2	40%
50 kGy	3	60%	2	40%
Glicerol				
0 kGy	3	60%	2	40%
15 kGy	2	40%	3	60%
25 kGy	3	60%	2	40%
50 kGy	3	60%	2	40%
Total	22	55%	18	45%

A idade dos doadores variou entre 20 e 44 anos (média 36,25 anos). No APÊNDICE A observa-se os dados detalhados de cada doador. A identificação das amostras como observado no Apêndice A segue o seguinte padrão: a primeira letra caracteriza a forma de preservação da amostra, utilizado-se a letra C para amostras congeladas a -70 °C e G para amostras preservadas em glicerol; a seguir encontra-se a dose de radiação recebida pela amostras, sendo 0 kGy (controle), 15 kGy, 25 kGy ou 50 kGy; após o hífen encontra-se a numeração da amostra, a qual vai de 01 a 05 ($n=5$). A FIG. 4.1.1 representa a identificação das amostras:

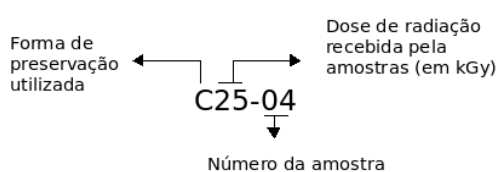


Figura 4.1.1- Logística de identificação das amostras

As cartilagens foram transportadas até o Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen) em caixa térmica contendo elementos refrigerantes.

4.1.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas

Este projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e aprovado sob o protocolo n° 105/CEP-IPEN/SP de 11 de maio de 2005 (ANEXO B).

4.2 Limpeza das amostras

As amostras de cartilagem costal tiveram o seu pericôndrio removido, bem como todo tecido adjacente, por meio de raspagem, com ajuda de um bisturi, tomando-se o cuidado de sempre lavar as amostras em solução fisiológica estéril com antibiótico e antimicótico (Gibco®, catálogo n° 15240-062 Penicilina G sódica 1000 µg/ml, Estreptomicina sulfato 2,5 µg/ml, Anfotericina B 0,085% salina). Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar previamente descontaminado.

Após a limpeza das amostras, as mesmas foram devidamente acondicionadas em embalagens com padrões estabelecidos para Banco de Tecidos. Os plásticos dessas embalagens oferecem uma alta barreira para troca de ar e bactérias, são atóxicos, apirogênicos, resistentes a baixas temperaturas, irradiação e selagem a vácuo. Este procedimento visa simular uma situação mais próxima daquela que será observada rotineiramente.

4.3 Preservação das amostras

Para a preservação das amostras foram utilizadas duas formas distintas: preservação em altas concentrações de glicerol (>98%) e congeladas a -70°C .

Para melhor confiabilidade dos dados, as amostras de cartilagem costal de um mesmo paciente, assim que retiradas, foram preservadas em ambas as formas, sendo a cartilagem costal direita foi preservada em glicerol, mantida em refrigerador a 4°C e a cartilagem costal esquerda congelada a -70°C (FIG. 4.3.1).



Figura 4.3.1- Fluxograma de obtenção e preservação das cartilagens costais humanas.

As amostras que foram preservadas em glicerol, assim que obtidas, foram inicialmente embebidas em glicerol a 50% dentro de tubos de fundo cônico de (50 ml), por duas semanas e mantidas em geladeira a 4°C . Após esse período, as amostras foram preservadas em altas concentrações de glicerol (> 98%) e refrigeradas a 4°C . até o momento dos ensaios. Já as amostras congeladas a -70°C , assim que obtidas dos doadores, foram congeladas a -20°C por duas semanas em tubos de fundo cônico (50 ml) e, após esse período, foram congeladas a -70°C . Esses procedimentos visam simular o processamento das cartilagens em Bancos de Tecidos.

4.4 Irradiação das amostras

O processo de irradiação das amostras foi realizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen - CNEN/SP). As amostras foram irradiadas por fontes de ^{60}Co no Irradiador Multipropósito tipo compacto e receberam doses de 15 kGy, 25 kGy e 50 kGy. Como controle de dose foram utilizados dosímetros poliméricos Red Perspex (5-50 kGy). Como controle negativo, amostras de cartilagem costal foram mantidas nas mesmas condições, porém não foram irradiadas.

Para evitar a variação de temperatura das amostras preservadas em glicerol, a irradiação foi conduzida na presença de elementos refrigerantes e as amostras congeladas a -70°C foram irradiadas em gelo seco (Brasil, RDC n° 220, 2006). A tabela 4.4.1 indica o número de amostras irradiadas em cada dose. Observar que cada doador teve sua amostra irradiada com apenas uma dose. Assim, um conjunto de doadores ($n=5$) serviu como controle negativo, outro conjunto foi irradiado com 15 kGy, outro com 25 kGy e o último com 50 kGy.

Tabela 4.4.1- Quantidade de amostras irradiadas por dose.

Forma de preservação	Doses aplicadas			
	0 kGy	15 kGy	25 kGy	50 kGy
Glicerol	5	5	5	5
Congeladas a -70°C	5	5	5	5

4.5 Termogravimetria

O estudo do comportamento da liberação de água pela cartilagem antes e depois do processo de irradiação foi realizado com o analisador termogravimétrico Shimadzu TGA-50 conectado a um computador, localizado no Centro de Tecnologia das Radiações

do Ipen, sob a supervisão do Dra. Luci D. Brocardo Machado e do MSc. Djalma Baptista Dias. Amostras com massa variando entre 4 a 10 mg foram aquecidas até 300 °C a uma taxa de 10 °C/min sob um fluxo de ar comprimido de 50 ml/min.

Antes de testadas, as amostras preservadas em glicerol foram reidratadas em soro fisiológico (0,9% NaCl). As amostras preservadas a -70°C tiveram o início dos testes ainda congeladas, a fim de evitar perda de água.

As amostras chamadas de controle específico são fragmentos não-irradiados adjacentes aos fragmentos irradiados e tiveram a letra c adicionada a sua nomenclatura para caracterizá-las. Assim, por exemplo, a amostra G25-03, antes de irradiada, teve um fragmento removido que serviu de controle específico para a termogravimetria, sendo este chamado de G25-03-c. Nos resultados, podemos observar que o nome da amostra vem seguido da extração .D00. Essa é a extração do arquivo gerado pelo computador durante a análise e, portanto, não deve ser levada em consideração.

4.6 OCT (*Optical Coherence Tomography*)

As amostras foram analisadas no Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares sob supervisão do Dr. Anderson Z. Freitas no equipamento OCP930SR (Thorlabs). O sistema de OCT utiliza como fonte óptica um led superluminescente (SLD), com largura espectral de 100 ± 5 nm e centrado em 930 nm, com potência de 2 mW na amostra. As imagens com resolução lateral e longitudinal de 6,2 microns são geradas pelo deslocamento do ponto focal na amostra por espelhos acoplados a um galvanômetro. A luz é focalizada na amostra com uma lente de 5 cm de distância focal. Os dados são adquiridos e armazenados num microcomputador para posterior processamento.

Amostras com aproximadamente 4 mm de espessura foram analisadas. As amostras utilizadas foram provenientes dos doadores número 1 (C0-01, C15-01, C25-01, C50-01,

G0-01, G15-01, G25-01 e G50-01). Antes de analisadas, as amostras congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente e as amostras preservadas em glicerol foram reidratadas em soro fisiológico.

4.7 Biomecânica

Os testes biomecânicos envolveram testes de tração e compressão da cartilagem. Ambos os testes foram conduzidos na Máquina de Ensaio Universal Instron Modelo 5567, do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen - CNEN/SP), a qual estava conectada um computador. Os ensaios foram analisados pelo software Bluehill®, produzido pela empresa Instron®. A máquina universal de ensaios mecânicos Instron modelo 5567 possui uma capacidade de carga igual a 30 kN e escala de velocidade que varia de 0,001 a 500 mm/min. Seu sistema de colunas gêmeas proporciona um melhor alinhamento e maior rigidez quando comparada a máquinas de ensaios universais de coluna única. Possui precisão de carga igual a $\pm 0,5\%$ da carga indicada e as garras utilizadas para os ensaios de tração são pneumáticas (Instron do Brasil, 2008).

Antes do início dos ensaios, as amostras congeladas foram previamente descongeladas a temperatura ambiente e as preservadas em glicerol foram reidratadas em soro fisiológico (0,9% NaCl).

Durante os cortes das amostras, tanto das amostras para tração como para compressão, foi possível a obtenção de mais de um corpo de prova por doador. Assim, a identificação de algumas amostras nos ensaios biomecânicos foi seguida de uma letra minúscula, como por exemplo G15-03a, G15-03b, seguindo o mesmo padrão de identificação descrito anteriormente.

4.7.1 Ensaio de tração

Como a região da cartilagem responsável pela resistência à tração (cisalhamento) (TAB. 3.5.1.1) é a zona superficial, as amostras de cartilagem foram cortadas de forma a se obter um corpo de prova dessa zona. Assim, o corte para obtenção de uma amostra de 2 mm de espessura foi realizado em uma máquina para corte com disco diamantado Isomet Buehler, com uso de soro fisiológico como líquido refrigerante. Os cortes foram realizados no Departamento de Materiais e Tecnologia da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, - UNESP, campus de Guaratinguetá, sob supervisão do técnico Manoel Francisco dos Santos Filho. Após o corte, as amostras foram cortadas em formato de alteres com ajuda de uma faca de corte (FIG. 4.7.1.1) desenhada especificamente para esse fim.

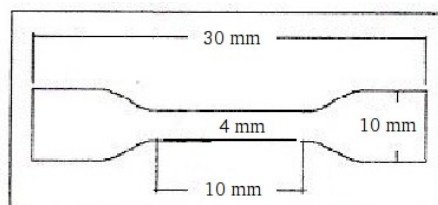


Figura 4.7.1.1- faca de corte utilizada para preparação das amostras para os ensaios de tração.

Note na figura acima que o corpo de prova possui 4 mm de largura e 2 mm de espessura, totalizando 8 mm^2 de área.

O ensaio de tração foi realizado com uma velocidade igual a 5 mm/min. até o seu rompimento total, assim como realizado por Feng. et al. (2001) e com célula de carga igual a 1 kN.

4.7.2 Ensaio de Compressão

As amostras obtidas da região radial da cartilagem (TAB. 3.5.1.1) com secção quadrada de 100 mm^2 (10 x 10 mm) e altura igual a 5 mm com auxílio da máquina Isomet, utilizando-se os mesmos procedimentos que foram utilizados para cortar as amostras para os ensaios de tração.

As amostras foram comprimidas até 50% da sua altura inicial, ou seja, de 5 mm para 2,5 mm, a uma velocidade de aproximação das prensas de 2 mm/min, empregando-se uma célula de carga igual a 1 kN (Dias, 2007).

4.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios biomecânicos foi realizada com o auxílio do *software* Minitab 4.0. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) combinada com o Método de Tukey, onde o valor 0 representa as amostras congeladas a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ e o valor 1 representa as amostras preservadas em glicerol.

Para tal análise, considerou-se que as amostras tiveram um delineamento inteiramente casualizado e as médias obtidas nos ensaios eram iguais entre si, ou seja, a hipótese inicial é que não há diferença entre as doses de radiação e formas de preservação. Assim, temos:

$$H_0 = \bar{X}_1 = \bar{X}_2 = \bar{X}_3 = \bar{X}_{\dots} = \bar{X}_n$$

com $p \geq 0,05$. Para $p < 0,05$, a hipótese H_0 é rejeitada e assume-se a significância do resultado. Assim, se H_0 é rejeitada, temos H_1 , que é a hipótese de que as médias são significativamente diferentes. Dessa forma, temos:

$$H_1 = \bar{X}_1 \neq \bar{X}_2 \neq \bar{X}_3 \neq \bar{X}_{\dots} \neq \bar{X}_n$$

Os gráficos dos ensaios biomecânicos foram plotados com o *software* OpenOffice Planilha 2.2, o qual é um editor de planilhas de código fonte aberto e está disponível gratuitamente na internet (<http://www.openoffice.org>).

5. RESULTADOS

5.1 Termogravimetria

Os resultados obtidos por termogravimetria são mostrados nas FIG. 5.1.1.1 a FIG. 5.1.2.6 e APÊNDICES F e G. Os gráficos representam a variação da massa (em %) em função do aumento da temperatura.

5.1.1 Curvas controle

Nas FIG. 5.1.1.1 e FIG. 5.1.1.2 podemos observar as curvas de máximo e mínimo obtidas dos controles não irradiados, sendo que a FIG. 5.1.1.1 representa as curvas termogravimétricas das amostras congeladas a -70°C e a FIG. 5.1.1.2 representa as curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol. As amostras cujas nomenclatura iniciais são C0 e G0 representam as amostras que serviram como controle negativo das amostras irradiadas e as amostras com a terminação -c são controles específicos das amostras irradiadas, as quais tiveram um fragmento removido antes do processo de irradiação para melhor comparação dos resultados.

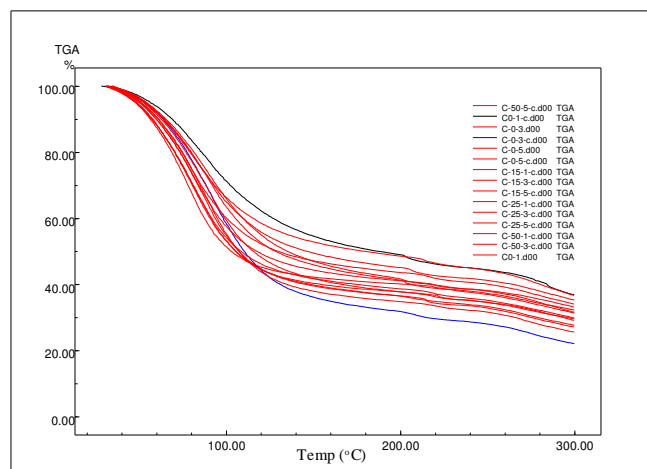


Figura 5.1.1.1- Curvas termogravimétricas das amostras congeladas não irradiadas e os controles específicos das amostras irradiadas. A linha preta refere-se a amostra C0-01-c, e a linha azul refere-se a amostra C0-03-c, determinando as variações máxima e mínima da cartilagem preservada a -70°C .

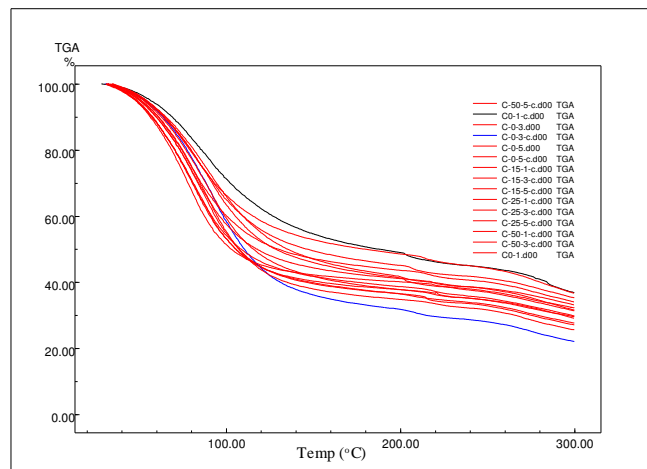


Figura 5.1.1.2- Curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol não irradiadas e os controles específicos das amostras irradiadas. A linha preta refere-se a amostra G25-05-c, e a linha azul refere-se a amostra G15-05-c, determinando as variações máxima e mínima da cartilagem preservada em glicerol.

5.1.2 Comparação entre as amostras irradiadas e as curvas de máximo e mínimo

A seguir, as amostras irradiadas com 15, 25 e 50 kGy congeladas a -70°C (FIG. 5.1.2.1 a FIG. 5.1.2.3) e preservadas em glicerol (FIG. 5.1.2.4 a FIG. 5.1.2.6) são plotadas junto com as curvas de máximo e mínimo obtidas a partir das amostras controle, para cada forma de preservação.

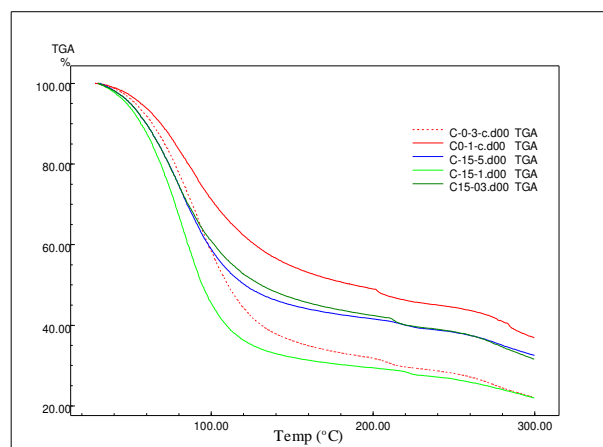


Figura 5.1.2.1- Curvas termogravimétricas das amostras congeladas a -70°C e irradiadas com 15 kGy, comparadas aos seus controles de máximo (linha vermelha cheia) e mínimo (linha vermelha tracejada).

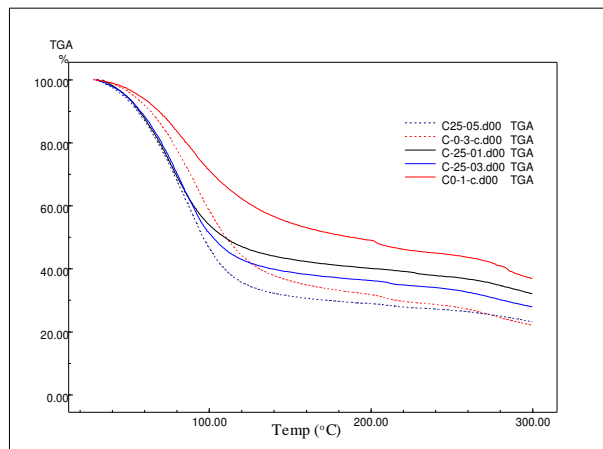


Figura 5.1.2.2- Curvas termogravimétricas das amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com 25 kGy, comparadas aos seus controles de máximo (linha vermelha cheia) e mínimo (linha vermelha tracejada).

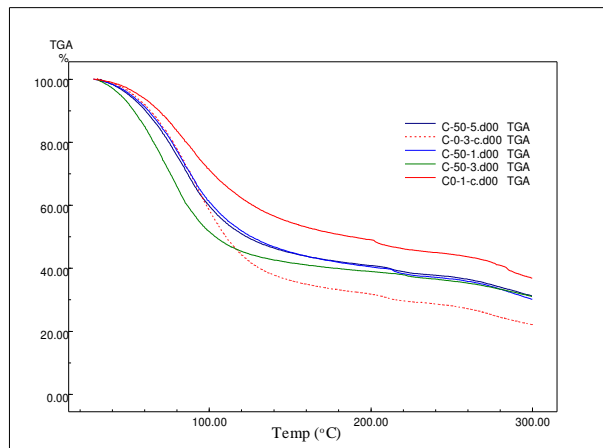


Figura 5.1.2.3- Curvas termogravimétricas das amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com 50 kGy, comparadas aos seus controles de máximo (linha vermelha cheia) e mínimo (linha vermelha tracejada).

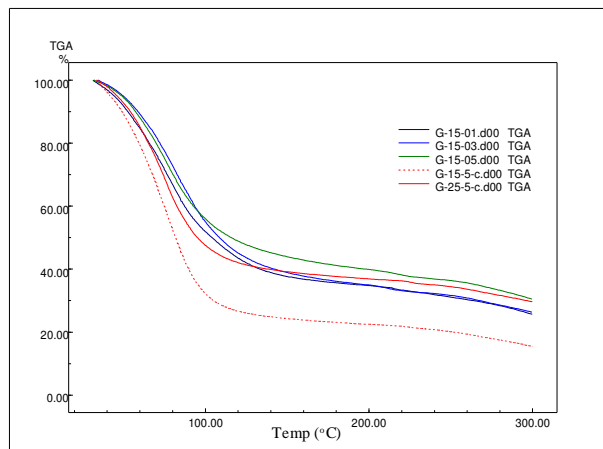


Figura 5.1.2.4- Curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 15 kGy, comparadas aos seus controles de máximo (linha vermelha cheia) e mínimo (linha vermelha tracejada).

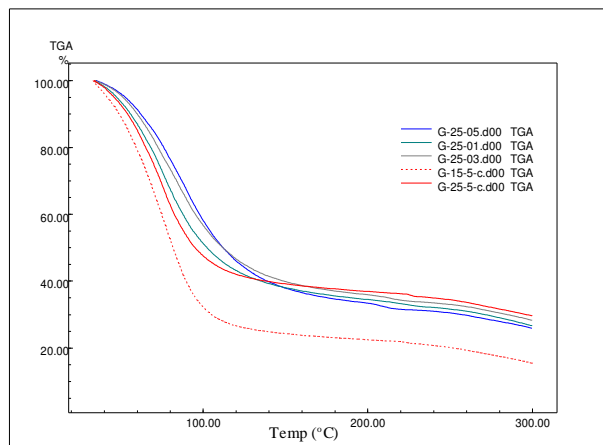


Figura 5.1.2.5- Curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 25 kGy, comparadas aos seus controles de máximo (linha vermelha cheia) e mínimo (linha vermelha tracejada).

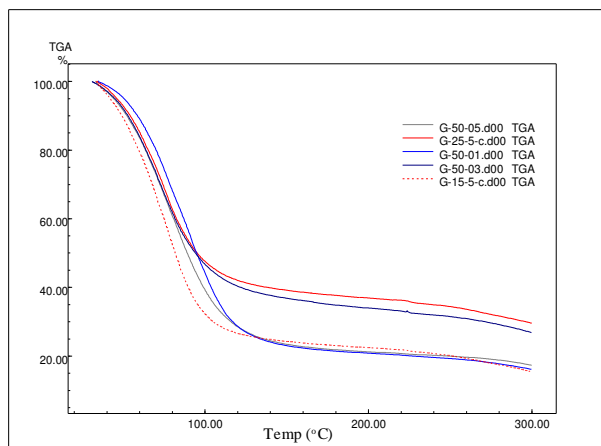
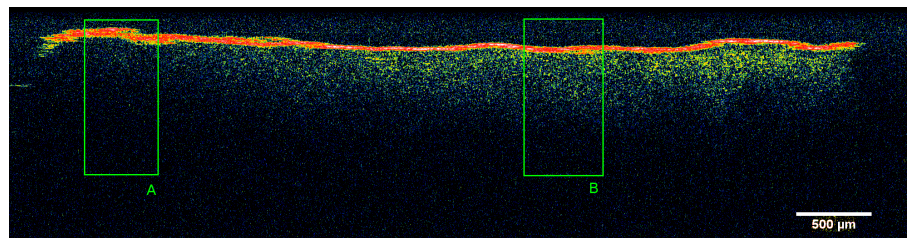


Figura 5.1.2.6- Curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 50 kGy, comparadas aos seus controles de máximo (linha vermelha cheia) e mínimo (linha vermelha tracejada).

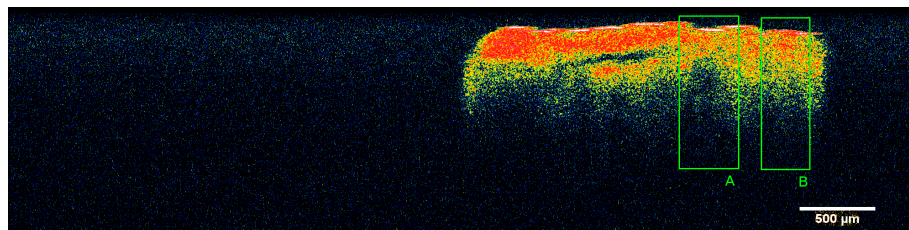
5.2 OCT (*Optical Coherence Tomography*)

De forma a verificar as possíveis causas das variações observadas nas curvas termogravimétricas encontradas nas amostras dos mesmos doadores, as amostras dos doadores identificados com final 01 (C0-01, C15-01, C25-01, C50-01, G0-01, G15-01, G25-01 e G50-01) foram analisadas por meio da técnica de OCT. As FIG. 5.2.1.1 e FIG. 5.2.2.1 mostram as imagens obtidas por meio dessa técnica. A cor branca indica um estouro de escala, ou seja, regiões de alta densidade, a cor preta representa regiões onde não há sinal (menor densidade) e as outras cores seguem o padrão RGB (*Red, Green, Blue*), onde temos o vermelho como maior sinal, seguido pelas cores laranja, amarelo, azul, verde e violeta (menor sinal).

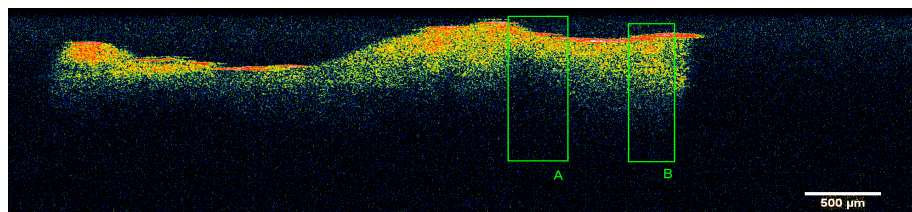
5.2.1 Amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$



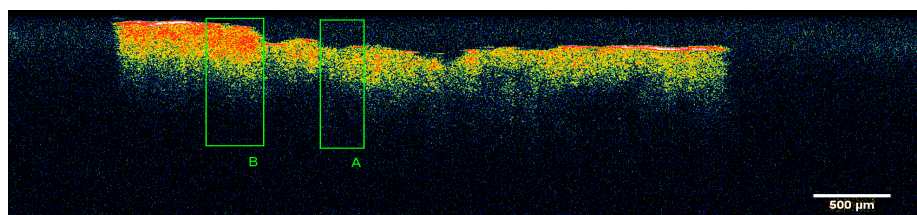
a



b



c



d

Figura 5.2.1.1- Imagens obtidas por OCT das amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Observar a diferença de espalhamento de fótons nas regiões A e B. a- C0-01; b- C15-01; c- C25-01 e d- C50-01.

5.2.2 Amostras preservadas em glicerol

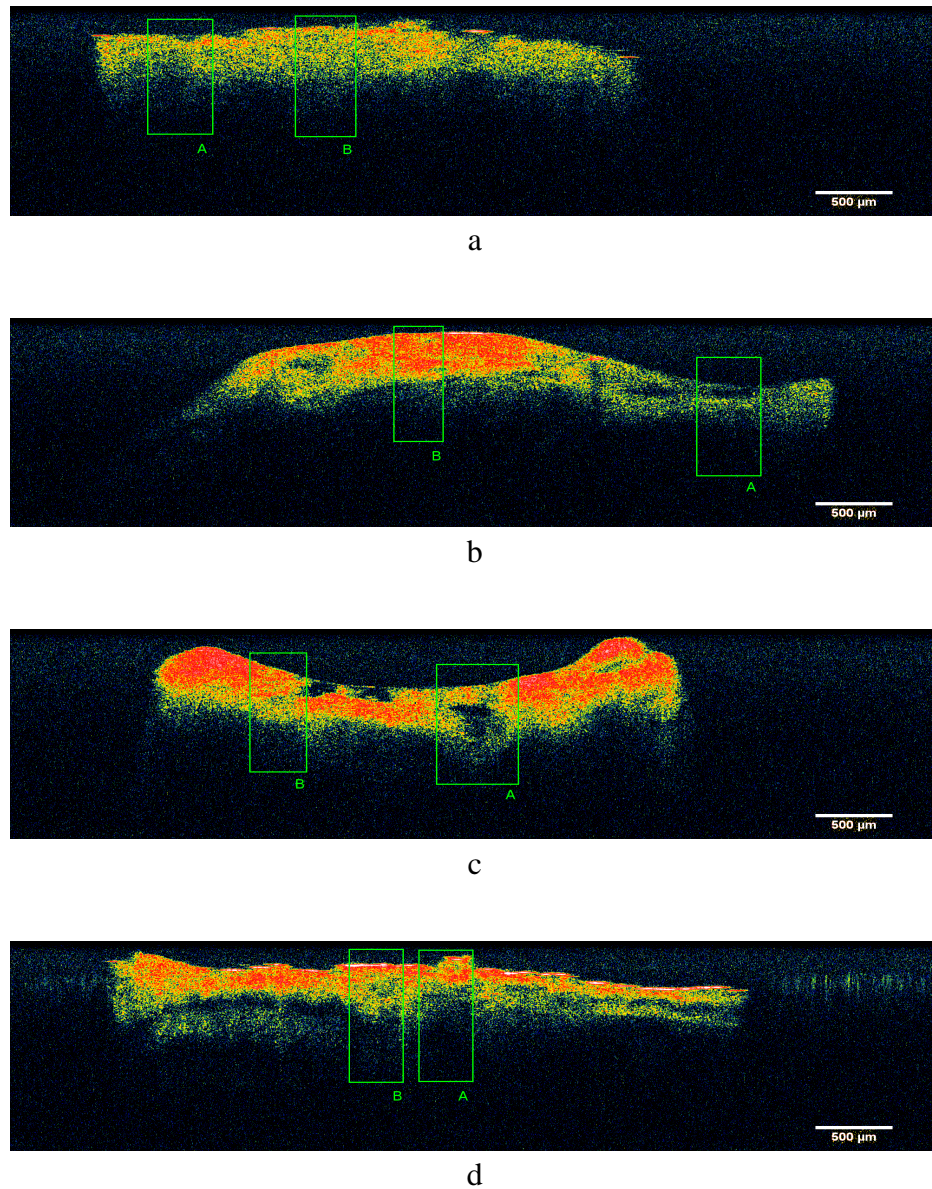


Figura 5.2.2.1- Imagens obtidas por OCT das amostras preservadas em glicerol. Observar a diferença de espalhamento de fótons nas regiões A e B. a- G0-01; b- G15-01; c- G25-01 e d- G50-01.

Podemos notar nas figuras 5.2.1.1 e 5.2.2.1 que existem variações de densidade em diferentes locais da mesma amostra, o que é evidenciado pela regiões assinaladas na figura como A e B, e independem da dose.

5.3 Ensaios Biomecânicos

Os resultados biomecânicos de tração e compressão das amostras congeladas a -70°C e preservadas em glicerol, controle e irradiadas com 15 kGy, 25 kGy e 50 kGy obtidos na Máquina de Ensaios Universais Instron são mostrados abaixo. Note que em algumas amostras foi possível a obtenção de mais de um corpo de prova, o que aumentou o número total de amostras analisadas.

5.3.1. Padrão de curvas obtidas nos ensaios de tração

Na FIG. 5.3.1.1 podemos observar uma curva típica obtida nos ensaios de tração.

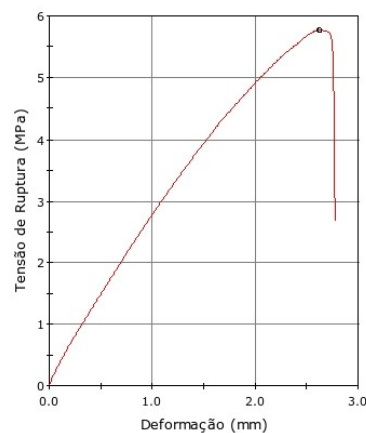


Figura 5.3.1.1- Curva obtida automaticamente pelo *software* Bluehill® nos ensaios de tração.

5.3.2 Ensaios de tração

Os valores da pressão tênsil no ponto de ruptura (MPa) indicam a resistência máxima de tração que a cartilagem pode suportar.

5.3.2.1 Comparação da resistência à tração das amostras entre as doses e os tipos de preservação

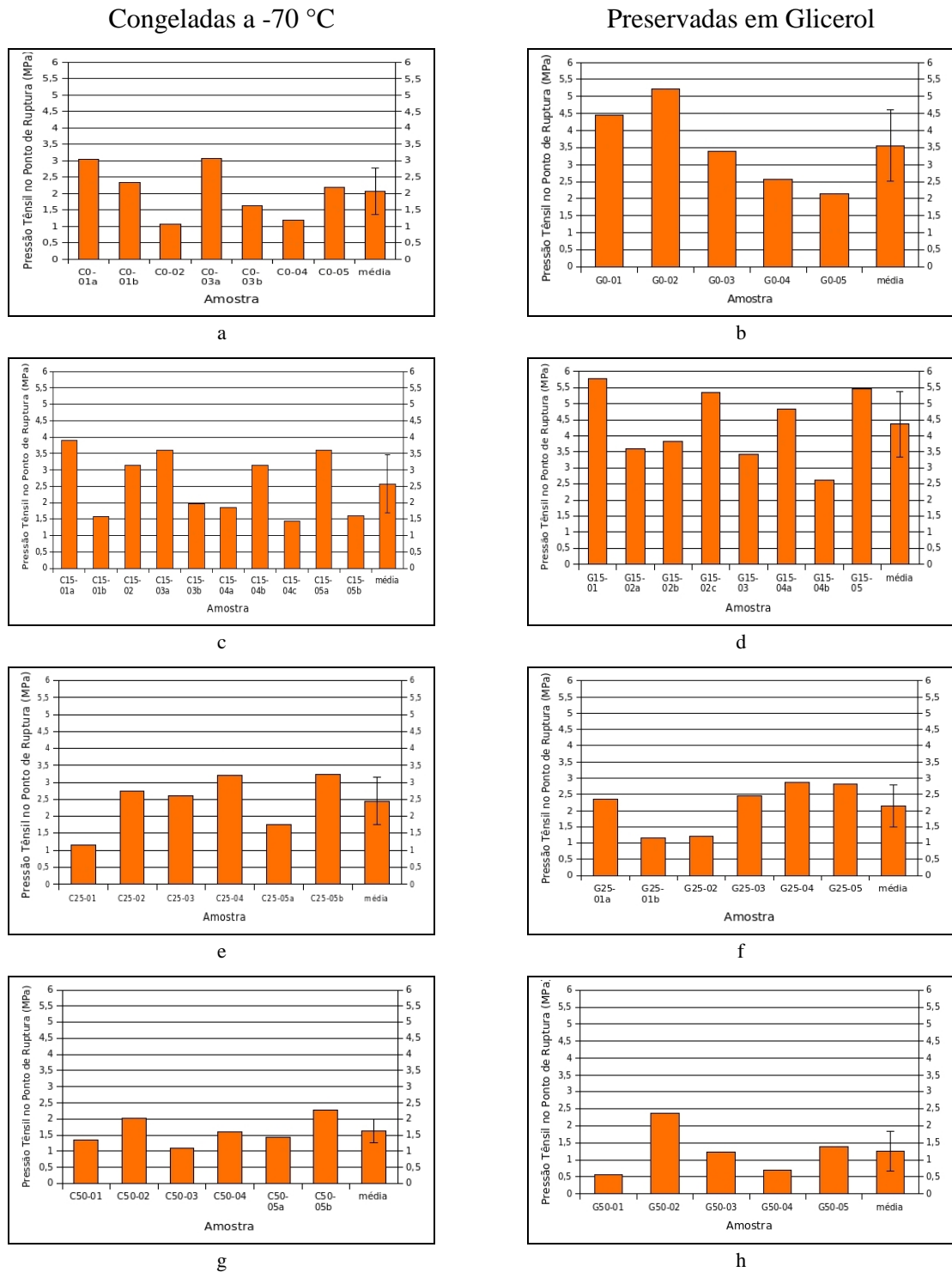


Figura 5.3.2.1.1- Gráficos de tração de ruptura entre as diferentes doses e formas de preservação. a, c, e, g: amostras congeladas não irradiadas, irrad. com 15, 25 e 50 kGy, respectivamente. b, d, f, h: amostras em glicerol não irrad., irrad. com 15, 25 e 50 kGy, respectivamente.

5.3.2.2 Comparação dos pontos de ruptura médios entre as diferentes doses e formas de preservação

A FIG. 5.3.2.2.1 representa a comparação entre as tensões médias de ruptura por dose de irradiação e forma de preservação da cartilagem.

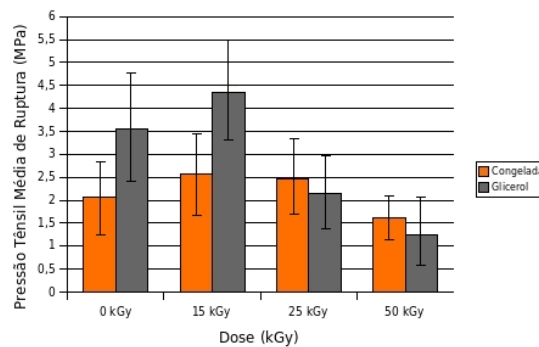


Figura 5.3.2.2.1- Comparação entre as tensões médias de ruptura das amostras irradiadas com diferentes doses e forma de preservação, com barras de desvio padrão de cada grupo.

Para melhor visualização dos dados acima (FIG. 5.3.2.2.1), as amostras controle (0 kGy) foram consideradas como igual a 100% de resistência à tração (FIG. 5.3.2.2.2).

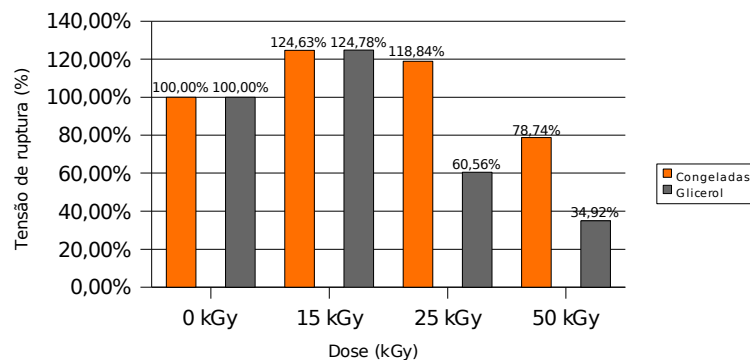


Figura 5.3.2.2.2- Comparação entre as tensões médias de ruptura, em porcentagem, das amostras irradiadas com o controle das amostras congeladas a -70°C e preservadas em glicerol.

Podemos observar que as amostras irradiadas com 15 kGy, congeladas e preservadas em glicerol, bem como as amostras congeladas e irradiadas com 25 kGy tiveram seu ponto de ruptura aumentado, enquanto as amostras preservadas em glicerol e

irradiadas com 25 kGy e as amostras irradiadas com 50 kGy, preservadas de ambas as formas, tiveram seu ponto de ruptura médios diminuídos.

5.3.3 Padrão de curvas obtidas nos ensaios de compressão

Durante os ensaios de compressão algumas amostras romperam-se antes de serem comprimidas em 50%. Para visualizar esses rompimentos, o gráfico da FIG. 5.3.3.1 representa uma amostra que não sofreu rompimento antes da sua compressão em 50% da sua espessura inicial e o gráfico da FIG. 5.3.3.2 representa uma amostra que rompeu-se antes da sua compressão em 50% da sua espessura inicial.

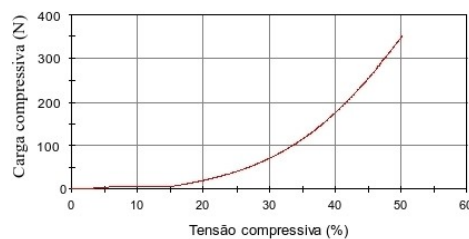


Figura 5.3.3.1- Curva obtida automaticamente pelo *software* Bluehill® na compressão em 50% da espessura.

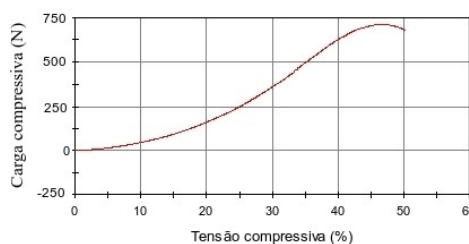


Figura 5.3.3.2- Curva obtida automaticamente pelo *software* Bluehill® na compressão em 50% da espessura, com o rompimento da amostra na compressão de 46,8%.

5.3.4 Ensaios de compressão

Os valores da carga compressiva indicam a carga (N) necessária para comprimir a cartilagem em 50% da sua espessura inicial. Todos os corpos de prova possuíam lados iguais a 10 mm e altura igual a 5 mm.

5.3.4.1 Comparação da carga compressiva das amostras entre as doses e os tipos de preservação

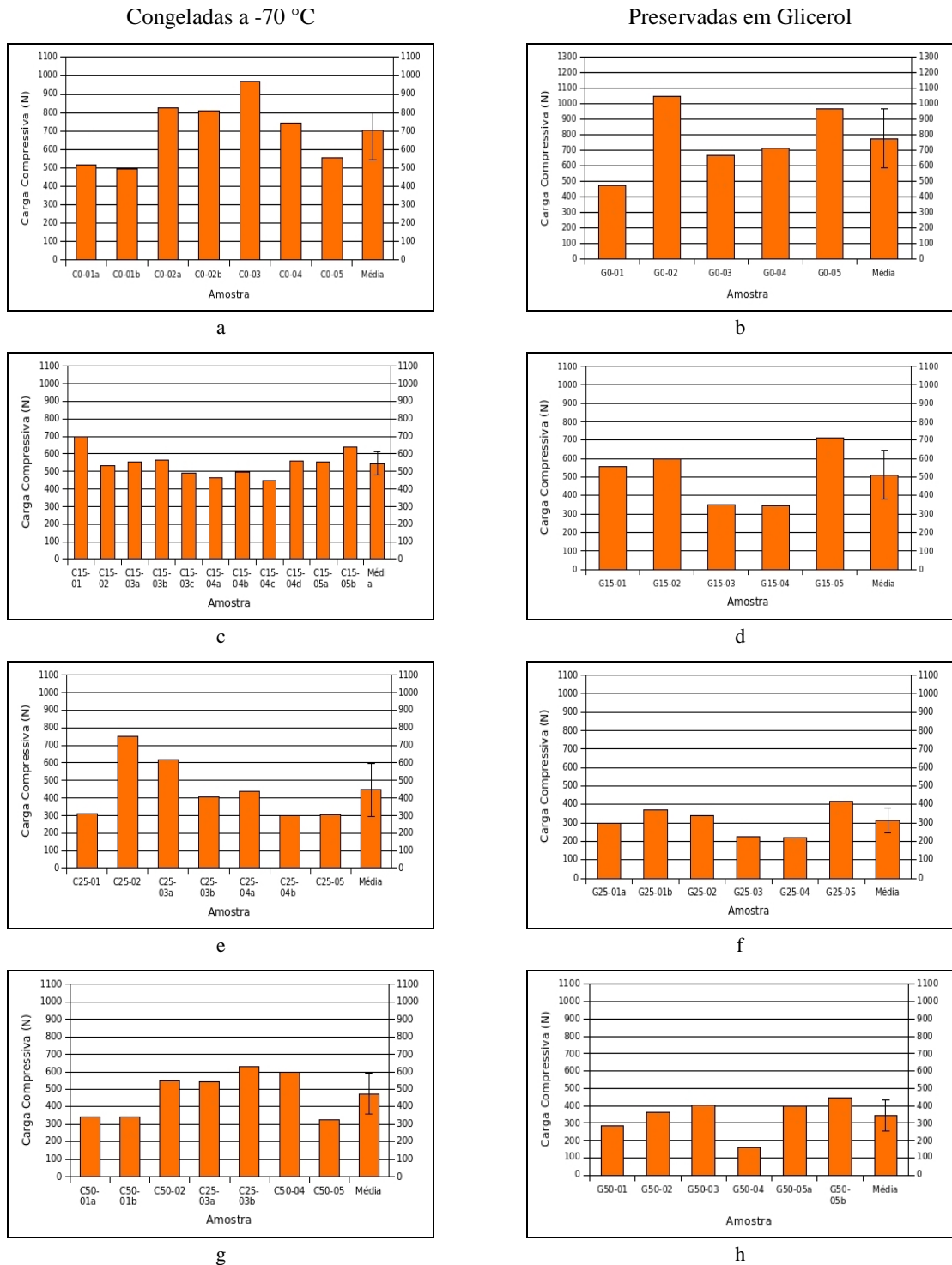


Figura 5.3.4.1.1- Gráficos de carga compressiva entre as diferentes doses e formas de preservação. a, c, e, g: amostras congeladas não irradiadas, irrad. com 15, 25 e 50 kGy, respectivamente. b, d, f, h: amostras em glicerol não irrad., irrad. com 15, 25 e 50 kGy, respectivamente.

5.3.4.2 Comparação das cargas compressivas médias entre as diferentes doses e formas de preservação

A FIG. 5.3.4.2.1 representa a comparação entre as cargas compressivas médias por dose de irradiação e forma de preservação da cartilagem.

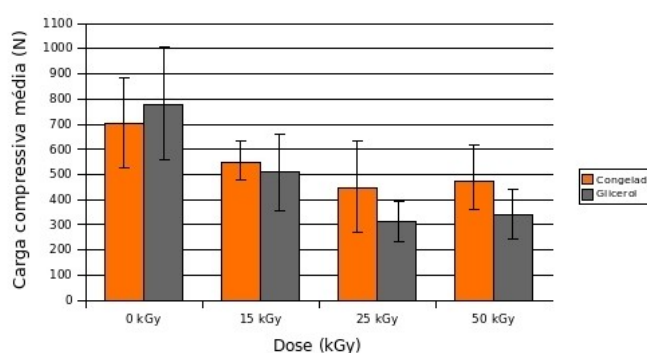


Figura 5.3.4.2.1- Comparação entre as cargas compressivas médias das amostras irradiadas com diferentes doses e formas de preservação, com barras de desvio padrão de cada grupo.

Para melhor visualização dos dados acima (FIG. 5.3.4.2.1), as amostras controle (0 kGy) foram consideradas como igual a 100% de resistência à compressão (FIG. 5.3.4.2.2).

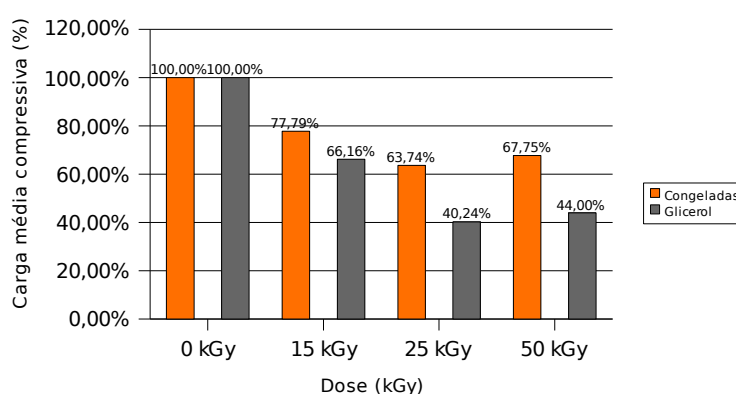


Figura 5.3.4.2.2- Comparação entre as cargas compressivas médias, em porcentagem, das amostras irradiadas com o controle das amostras congeladas a -70°C e preservadas em glicerol.

Podemos observar que as amostras congeladas sofrem menor redução da propriedade compressiva quando comparada com as amostras preservadas em glicerol.

5.4 Análise Estatística

5.4.1 Análise comparativa das duas formas de preservação

Na TAB. 5.4.1.1 podemos verificar os resultados da Análise de Variância das duas formas de preservação combinada com os ensaios de tração e compressão das amostras.

Tabela 5.4.1.1- Análise de Variância da comparação das duas formas de preservação.

Tipo	Valor P
tração	0,017
Compressão	0,164

Podemos observar na tabela acima que em relação à tração, as formas de preservação são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Para análise mais detalhada dos resultados, vide Apêndices D e E.

5.4.2 Análise comparativa das tensões médias de ruptura nas diferentes doses

De acordo com o Apêndice D, temos as seguintes relações de significância entre as médias dos ensaios de tração quando levadas em consideração a dose e congelamento a -70 °C das amostras:

$$\bar{X}_{c,0} = \bar{X}_{c,15}$$

$$\bar{X}_{c,0} = \bar{X}_{c,25}$$

$$\bar{X}_{c,0} = \bar{X}_{c,50}$$

Relacionando as médias pelas igualdades, temos a TAB.5.4.2.1:

Tabela 5.4.2.1- Relação de significância entre as médias de tração das amostras congeladas a -70 °C.

Preservação/Dose	Tukey ($\alpha= 0,05$)
C,0	a
C,15	a
C,25	a
C,50	a

De acordo com a TAB. 5.4.2.1, podemos notar que as médias de tração de ruptura das cartilagens congeladas a -70 °C e irradiadas com diferentes doses não são estatisticamente diferentes das cartilagens não irradiadas.

Em relação às amostras preservadas em glicerol, temos as seguintes relações de significância:

$$\begin{aligned}\bar{X}_{g,0} &= \bar{X}_{g,15} \\ \bar{X}_{g,0} &= \bar{X}_{g,25} \\ \bar{X}_{g,0} &> \bar{X}_{g,50}\end{aligned}$$

Relacionando as médias pelas igualdades, temos a TAB.5.4.2.2:

Tabela 5.4.2.2- Relação de significância entre as médias de tração das amostras preservadas em glicerol.

Preservação/Dose	Tukey ($\alpha= 0,05$)
G,0	a
G,15	a
G,25	a
G,50	b

De acordo com a TAB. 5.4.2.2, podemos notar que as amostras preservadas em

glicerol e irradiadas com 50 kGy possuem médias de tração de ruptura estatisticamente diferente das amostras não irradiadas.

5.4.3 Análise comparativa das cargas médias compressivas nas diferentes doses

De acordo com o Apêndice E, temos as seguintes relações de significância entre as médias dos ensaios de compressão quando levadas em consideração a dose e congelamento a -70 °C das amostras:

$$\begin{aligned}\bar{X}_{c,0} &= \bar{X}_{c,15} \\ \bar{X}_{c,0} &> \bar{X}_{c,25} \\ \bar{X}_{c,0} &= \bar{X}_{c,50}\end{aligned}$$

Relacionando as médias pelas igualdades, temos a TAB. 5.4.3.1:

Tabela 5.4.3.1- Relação de significância entre as médias de carga máxima compressiva das amostras congeladas a -70 °C.

Preservação/Dose	Tukey ($\alpha= 0,05$)
C,0	a
C,15	a
C,25	b
C,50	a

De acordo com a TAB. 5.4.3.1, podemos notar que as cargas médias compressivas das cartilagens congeladas a -70 °C não são significativamente diferentes para as doses de 15 e 50 kGy quando comparadas às amostras não irradiadas.

Em relação às amostras preservadas em glicerol, temos as seguintes relações de

significância:

$$\bar{X}_{g,0} = \bar{X}_{g,15}$$

$$\bar{X}_{g,0} > \bar{X}_{g,25}$$

$$\bar{X}_{g,0} > \bar{X}_{g,50}$$

Relacionando as médias pelas igualdades, temos a TAB. 5.4.3.2:

Tabela 5.4.3.2- Relação de significância entre as cargas compressivas médias das amostras preservadas em glicerol.

Preservação/Dose	Tukey ($\alpha= 0,05$)
G,0	a
G,15	a
G,25	b
G,50	b

De acordo com a TAB. 5.4.3.2, podemos notar que as amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 25 e 50 kGy possuem cargas compressivas médias estatisticamente diferentes das amostras não irradiadas.

6. DISCUSSÃO

Para verificar se o processo de esterilização por radiação ionizante provoca alterações indesejáveis em cartilagens humanas que serão utilizadas por bancos de tecidos, avaliou-se o comportamento biomecânico das mesmas pelo teste de resistência à tração e à compressão. Como a quantidade de água é um fator importante para o comportamento biomecânico da cartilagem, realizaram-se ensaios de termogravimetria, os quais visaram avaliar o comportamento da saída de água, antes e depois do processo de esterilização. De forma complementar, obtivemos imagens por OCT (*Optical Coherence Tomography*), das amostras controle e das amostras irradiadas com diferentes doses.

O estudo dos efeitos da radiação ionizante sobre a cartilagem é de grande interesse para os bancos de tecidos, uma vez que o processo de esterilização por essa técnica pode causar alterações no material quando altas doses são aplicadas. De fato, altas doses de radiação garantiriam a esterilidade viral do enxerto, mas, por outro lado, poderiam causar danos inadmissíveis no mesmo (Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

Durante os testes pré-eliminatórios de termogravimetria, notou-se que havia grande variação de resultados entre as amostras de diferentes doadores, bem como entre amostras de um mesmo doador. Assim, para garantir melhor homogeneidade e reprodutibilidade dos resultados, as amostras de cartilagem costal humanas foram divididas em duas partes, onde uma delas serviu como controle específico (com final -c), não sendo irradiada e a outra foi irradiada com a dose definida.

Os resultados obtidos por termogravimetria nos permitem observar uma considerável variação do conteúdo de água nas amostras não irradiadas, mesmo naquelas pertencente ao mesmo doador, o que pode ser verificado nas FIG. 5.1.1.1 e FIG. 5.1.1.2. Nas amostras congeladas (FIG. 5.1.1.1), a variação máxima do conteúdo de água foi de aproximadamente 12,2% à 300 °C, temperatura na qual todo o conteúdo de água sofreu evaporação. Por outro lado, as amostras preservadas em altas concentrações de glicerol

(FIG. 5.1.1.2) apresentaram uma variação máxima ligeiramente inferior às amostras congeladas, sendo seu valor de aproximadamente 10%. Essas variações podem ser decorrente de vários fatores biológicos, os quais incluem sexo, idade e condições fisiológicas normais do doador.

Analisando-se os gráficos dos APÊNDICE F (*a a l*) e APÊNDICE G (*a a l*), não se pode inferir nenhuma correlação entre as doses de radiação ionizante e o padrão de saída de água das amostras, uma vez que mesmo em altas doses (50 kGy) as curvas são praticamente as mesmas. As pequenas variações encontradas entre as amostras nas doses de 15 kGy e 25 kGy estão situadas dentro da variação encontrada nos controles não-irradiados (FIG. 5.1.2.1, FIG. 5.1.2.2, FIG. 5.1.2.4 e FIG. 5.1.2.5). Entretanto, as amostras irradiadas com 50 kGy (FIG. 5.1.2.3 e FIG. 5.1.2.6) mostram uma menor variação quando comparadas ao controle. Por outro lado, mesmo o gráfico da FIG. 5.1.2.6 mostrando que a amostra G-50-01 possui grande variação em relação as amostras G-50-03 e G-50-05, o gráfico do APÊNDICE G-d mostra que essa é uma característica intrínseca dessa amostra, sendo que sua variação em relação ao seu controle específico é mínima (3,2%).

Assim, os dados obtidos por termogravimetria nos permitem concluir que existe uma tendência à saída de água da cartilagem de forma mais homogênea quando as amostras são irradiadas com altas doses (50 kGy).

A análise das imagens obtidas por OCT revelam grande variação no espalhamento dos fótons dentro de uma mesma amostra, o que pode significar uma variação de densidade da zona superficial em direção ao centro da cartilagem, a qual foi padronizada para os testes termogravimétricos.

Nas FIG. 5.2.1.1 e FIG. 5.2.2.1, as regiões retangulares demarcadas nas imagens representam as regiões de menor espalhamento (A) e de maior espalhamento (B) dos fótons. Dessa forma, a região A da FIG. 5.2.1.1-a, por exemplo, pode, provavelmente, ter uma menor densidade quando comparada à região B da mesma figura. Essa provável variação de densidade pode ser uma explicação para as variações das curvas

termogravimétricas encontradas dentro de uma mesma amostra, como observado nos gráficos do APÊNDICE F-b e APÊNDICE G-j, uma vez que as amostras testadas poderiam ter sido obtidas de regiões que mostram essa variação.

Essa técnica também permite observar bolsões de menor densidade entre duas zonas de maior densidade, como pode ser observado na FIG. 5.2.2.1-d, onde uma região de coloração mais azulada é encontrada a aproximadamente 400 μm do lado esquerdo da região B.

O OCT é uma técnica de obtenção de imagens muito nova (vide Considerações Gerais 3.8.2) quando comparada à outras formas de obtenção de imagem e não existem trabalhos sobre cartilagem disponíveis na literatura, o que impossibilita um maior aprofundamento na discussão dos resultados. Por outro lado, os dados obtidos foram de grande valia no estudo da morfologia interna da cartilagem, o que nos permitiu levantar hipóteses sobre o comportamento desse tecido com maior acurácia.

Os ensaios biomecânicos de tração apresentaram uma grande variação nas tensões de ruptura entre os diferentes doadores e mesmo entre um mesmo doador, uma vez que em algumas amostras foi possível a obtenção de mais de um corpo de prova. O menor valor para o coeficiente de variação foi de 26,40% para as amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 15 kGy (Apêndice B). Por outro lado, as amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 50 kGy apresentaram o maior coeficiente de variação entre todas os conjuntos de amostras, tendo valor igual a 57,68% (Apêndice B).

A escolha da região da cartilagem para a obtenção do corpo de prova foi feita de forma a evitar ao máximo grandes variações. Como relatado por Hunziker et al., 1997 (Considerações Gerais 3.5.1), as propriedades mecânicas da cartilagem variam de acordo com as diferentes zonas, sendo a zona superficial a responsável pelas suas propriedades tênsis, e por este motivo, os corpos de prova foram obtidos desta região da cartilagem. Em nenhum ensaio houve problema com a ruptura do corpo de prova em local indevido

nem problema com escape do mesmo das garras. A FIG. 5.3.1.1 mostra uma curva obtida automaticamente no teste de tração, note que após o ponto de ruptura (assinalado no gráfico) há uma queda brusca na curva, denotando que a amostra não oferece mais resistência à força aplicada, o que indica que a amostra falhou nesse ponto.

No presente trabalho, o módulo de elasticidade das amostras não foi calculado pois como relatado por Salvatore et al. (2004), o módulo de elasticidade do tecido como um todo depende também do módulo de elasticidade dos condrócitos, os quais, após o processo de irradiação, não são mais viáveis e, assim, caso calculado, o módulo de elasticidade não refletiria o seu valor real. Dessa forma, os resultados obtidos refletem apenas a tração de ruptura da matriz extracelular, a qual é responsável por $\frac{2}{3}$ das propriedades biomecânicas deste tecido (Salvatore et al., 2004).

As amostras controle congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram uma tração média de ruptura igual a $2,07 \pm 0,82\text{ MPa}$ (Apêndice B item a), enquanto as amostras controle (0 kGy) preservadas em glicerol apresentaram uma tração média de ruptura igual a $3,55 \pm 1,28\text{ MPa}$ (Apêndice B item b). Plotando-se os resultados apresentados nas tabelas acima citadas obtemos os gráficos da FIG. 5.3.2.1.1-a,b , respectivamente. Feng et al. (2001) encontraram uma tração de ruptura da ordem de $2,27 \pm 0,23\text{ MPa}$ para amostras que foram preservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura a qual, segundo os autores, não afeta as propriedades biomecânicas da cartilagem. Assim, os dados obtidos para amostras preservadas em glicerol apresentam uma tração de ruptura significativamente superior (+56,39%), enquanto as amostras de cartilagem preservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ não apresentam variação significativa, uma vez que o seu desvio padrão fica dentro dos limites encontrados por Feng et al. (2001). Este é um importante dado que deve ser levado em consideração pelos bancos de tecidos no momento da escolha da forma de preservação da cartilagem.

As amostras irradiadas com 15 kGy e congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Apêndice B item c), apresentam uma tração média de ruptura é igual a $2,58 \pm 0,97\text{ MPa}$. O mesmo ocorre com as amostras irradiadas com 15 kGy e preservadas em glicerol, as quais apresentam uma

tração média de ruptura superior às amostras controle preservadas da mesma maneira, sendo seu valor igual a $4,36 \pm 1,15$ MPa (Apêndice B item d). Plotando-se os resultados apresentados na tabela acima citada, obtemos os gráficos da FIG. 5.3.2.1.1-c,d, respectivamente. Dessa forma, ao compararmos as amostras controle com as amostras irradiadas com 15 kGy notamos que as amostras congeladas a -70 °C tiveram um aumento de 24,65% em sua tração média de ruptura, enquanto que as amostras preservadas em glicerol apresentaram um aumento de 24,78% (FIG. 5.3.2.2.2).

As amostras congeladas a -70 °C e irradiadas com 25 kGy apresentaram tração média de ruptura igual a $2,46 \pm 0,83$ MPa e as amostras preservadas em glicerol e irradiadas com a mesma dose apresentaram uma tração média de ruptura de $2,15 \pm 0,77$ MPa (Apêndice B itens e,f, respectivamente). Plotando-se os resultados obtemos os gráficos da FIG. 5.3.2.1.1-e,f, os quais representam os as amostras congeladas e preservadas em glicerol, respectivamente. Comparando as amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 25 kGy com o seu controle, verifica-se que as mesmas apresentaram uma diminuição em sua tração média de ruptura equivalente a 39,44% (FIG. 5.3.2.2.2). Por outro lado, as amostras congeladas a -70 °C apresentaram um aumento igual a 18,84% em sua tração média de ruptura, indicando que a essa dose as amostras congeladas a -70 °C apresentam uma resistência à tração superior às amostras preservadas em glicerol (FIG. 5.3.2.2.2).

Quando se irradia amostras de cartilagem com 50 kGy obtem-se os menores valores para as tensões médias de ruptura. As amostras amostras congeladas apresentaram uma tração média de ruptura igual a $1,63 \pm 0,45$ MPa (Apêndice B item g) e as amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 50 kGy apresentaram uma tração média de ruptura igual a $1,24 \pm 0,72$ MPa (Apêndice B item h). Na FIG. 5.3.2.1.1-g,h podemos os gráficos obtidos pela plotagem dos resultados representados no Apêndice B (itens g e h, respectivamente). Quando comparadas com as amostras controle, verifica-se uma redução de 65,08% para as amostras preservadas em glicerol e de 21,26% para as amostras

congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FIG. 5.3.2.2.2).

Os valores das tensões médias de ruptura, das amostras preservadas em glicerol e congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ quando irradiadas em diferentes doses (15, 25 e 50 kGy), apresentados na FIG. 5.3.2.2.1, nos revelam uma acentuada diminuição da tração média de ruptura das amostras preservadas em glicerol quando irradiadas com doses de 25 e 50 kGy. O mesmo não se observa para as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde os dados são menos variáveis entre todas as doses e as diferenças não são estatisticamente significativas ($p>0,05$) quando comparadas ao grupo controle (0 kGy), como pode se observar na TAB. 5.4.2.1. Entretanto, pela Análise Estatística podemos observar que para ensaios de tração das amostras preservadas em glicerol, as diferenças obtidas para as amostras irradiadas com 25 kGy não são estatisticamente significativas ($p>0,05$) quando comparadas ao grupo controle (0 kGy) (TAB. 5.4.2.2), devido à grande variação de resultados intra-amostras (FIG. 5.3.2.2.1). Já as amostras irradiadas com 50 kGy apresentam uma diferença significativa ($p<0,05$) quando comparadas ao grupo controle (0 kGy).

De forma geral, amostras irradiadas com doses de 15 kGy congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e preservadas em altas concentrações de glicerol, bem como as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com 25 kGy apresentam um comportamento biomecânico de tração que sugere a produção de ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno, uma vez que as fibrilas de colágeno encontram-se densamente empacotadas nessa região e dispostas de forma paralela a superfície da cartilagem (Muir et al., 1970; vide Considerações Gerais item 3.5.1.1). Doses de 50 kGy parecem provocar uma pequena degradação das moléculas de colágeno, a qual é mais significativa quando se preserva a cartilagem em altas concentrações de glicerol. Como a rede de colágeno é responsável por cerca de 30% do conteúdo de água, a qual está ligada intrinsecamente à essa rede (Katz et al., 1986; Maroudas et al., 1991), os resultados termogravimétricos corroboram com os achados biomecânicos, uma vez que altas doses de radiação (50 kGy) provocam uma pequena degradação da rede colágeno, permitindo que a água ligada à ela tenda a sair com maior facilidade, tornando as amostras

mais homogêneas em suas curvas termogravimétricas.

Assim como observado nos ensaios de tração, também pode-se observar nos ensaios de compressão uma grande variação entre as amostras testadas, mesmo em relação a um mesmo doador, uma vez que em diversas situações mais de um corpo de prova pode ser obtido. As amostras controle congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram uma carga compressiva média igual a $701,63 \pm 183,78\text{ N}$ e as amostras controle preservadas em glicerol apresentaram uma carga compressiva média igual a $775,54 \pm 234,31\text{ N}$, para compressão de 50% da espessura inicial das amostras, ou seja, para comprimir as amostras de 5mm à 2,5mm (Apêndice C itens a e b, respectivamente). O menor valor para o coeficiente de variação das amostras é encontrado nas amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com 15 kGy, sendo seu valor igual 13,50% (Apêndice C, item c) e o maior coeficiente de variação é igual a 39%, o qual foi encontrado nas amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com 25 kGy (Apêndice C, item e). A menor variação dos resultados obtidas nos ensaios de compressão comparada com a variação dos resultados dos ensaios de tração refletem a característica biomecânica de resistência à compressão da cartilagem, em detrimento à resistência à tração da mesma, sendo que esta última não é uma propriedade específica deste tecido (vide Considerações Gerais item 3.5).

Em seus ensaios, Feng et al. (2001) mediram a pressão necessária, em MPa, para que a cartilagem sofresse deformação permanente. Transformando-se as cargas máximas compressivas de Newtons (N) para Megapascal (MPa), o que é feito dividindo-se o valor em N por 100, obtivemos uma carga compressiva média de $7,75 \pm 2,34\text{ MPa}$ para as amostras preservadas em glicerol e $7,02 \pm 1,83\text{ MPa}$ para amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esses dados estão muito próximos aos resultados obtidos por Feng et al. (2001), os quais apresentaram uma carga igual a $8,29 \pm 0,98\text{ MPa}$ para o rompimento das amostras. Assim, mesmo as amostras não tendo sido testadas até seu rompimento neste trabalho, os dados nos permitem verificar que o ponto de ruptura das amostras ficaria muito próximo do

obtido por Feng et al. (2001), uma vez que diversas amostras romperam-se antes da compressão de 50%, o que sugere que seu ponto de ruptura é próximo de uma compressão de 50% em sua espessura. As FIG. 5.3.3.1 e FIG. 5.3.3.2 apresentam as curvas obtidas automaticamente pelo *software* Bluehill® onde a FIG. 5.3.3.1 representa uma amostra que não se rompeu antes da sua compressão em 50% e a FIG. 5.3.3.2 representa uma amostra que se rompeu antes de ser comprimida de 50%. Note que na FIG. 5.3.3.2 a curva do gráfico tem seu ponto máximo quando a extração compressiva é de apenas 46,8% (2,34 mm), ao passo que para sua compressão em 50% deveria ser igual a 2,5 mm. A seguir, a curva inicia uma queda na carga compressiva, denotando que a força compressiva diminui em virtude de uma falha no material que está sendo testado.

As amostras controle (0 kGy) congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram uma carga compressiva média igual a $701,63 \pm 183,78\text{ N}$ (Apêndice C item a). O fato de não serem mostradas as extensões máximas em carga compressiva se deve ao fato de um travamento no *software* Bluehill® no momento da análise, o que culminou com a perda de todos os dados. Entretanto, os dados expostos na coluna Carga máxima compressiva foram anotados a mão antes do fechamento do programa e são expostos na tabela. Já as amostras controle (0 kGy) preservadas em glicerol apresentaram uma carga compressiva média igual a $775,54 \pm 234,31\text{ N}$ (Apêndice C item b). A FIG. 5.3.4.1.1-a,b representa os gráficos relativos aos dados apresentados no Apêndice C item a e item b. A amostra G0-03 apresentou uma extração máxima em carga compressiva igual a 2,01 mm, o que significa que essa amostra suportou a carga máxima quando a amostra foi comprimida de 2,01 mm, falhando logo em seguida (Apêndice C item b). Esse fato foi apresentado também por outras amostras, como pode ser observado nos Apêndice C item c (amostras C15-03b e C15-03c), item d (amostra G15-05), item e (amostra C25-04a), item f (amostra G25-01b), item g (C50-01a, C50-01b, C50-02 e C50-04) e item h (amostras G50-05a e G50-05b).

As amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiadas com 15 kGy apresentaram uma carga compressiva média igual a $545,79 \pm 73,66\text{ N}$ (Apêndice C item c). Realizando sua

comparação com seu respectivo controle, notamos uma redução da carga compressiva média da ordem de 22,21% (FIG. 5.3.4.2.2). As amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 15 kGy apresentaram uma carga compressiva média igual a $513,08 \pm 161,38$ N (Apêndice C item d). Ao compararmos a carga média compressiva das amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 15 kGy com suas amostras controle (0 kGy) verificamos uma redução de 33,84% (FIG. 5.3.4.2.2). A FIG. 5.3.4.1.1-c,d representam os gráficos dos dados apresentados no Apêndice C itens c e d, respectivamente.

As amostras congeladas a -70 °C apresentaram uma carga compressiva média igual a $447,22 \pm 174,42$ N (Apêndice C item e). Por outro lado as amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 25 kGy apresentaram uma carga compressiva média igual a $312,09 \pm 79,21$ N (Apêndice C item f). Na FIG. 5.3.4.1.1-e,f podemos observar os gráficos obtidos quando se plotam os dados do Apêndice C itens e e f, respectivamente. Ao se comparar as cargas compressivas médias das amostras irradiadas com 25 kGy com seu controle observamos uma redução de 59,76% para as amostras preservadas em glicerol e 36,26% para as amostras congeladas a -70 °C (FIG. 5.3.4.2.2).

Diferentemente do observado com os ensaios de tração, nos ensaios de compressão, a dose de 50 kGy não representa a dose onde ocorre maior redução das propriedades compressivas, uma vez que tanto as amostras congeladas a -70 °C como as preservadas em glicerol apresentaram uma redução de 32,25% e 56%, respectivamente (FIG. 5.3.4.2.2) em relação ao seu controle, as quais são menores do que as encontradas para a dose de 25 kGy (36,26% e 59,76%, respectivamente). Assim, as amostras congeladas a -70 °C apresentaram uma carga compressiva média igual a $475,38 \pm 132,28$ N e as amostras preservadas em glicerol apresentaram uma carga compressiva média igual a $341,32 \pm 105,66$ N (Apêndice C itens g e h). A FIG. 5.3.4.1.1-g,h representam os gráficos dos dados do Apêndice C itens g e h, respectivamente.

Pela Análise Estatística dos resultados obtidos nos ensaios de compressão, podemos notar que as amostras congeladas a -70 °C apresentam uma diferença estatisticamente

significativa ($p < 0,05$), quando comparadas ao grupo controle (0 kGy), somente quando irradiadas com dose de 25 kGy (TAB. 5.4.3.1), o que pode ser decorrente da grande heterogeneidade das amostras utilizadas nos ensaios, como pode-se verificar nos ensaios termogravimétricos, uma vez que as amostras irradiadas com 50 kGy não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para o grupo controle (0 kGy). Por outro lado, amostras preservadas em glicerol apresentam uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando irradiadas com doses de 25 e 50 kGy, não havendo diferença estatística nas amostras irradiadas com 15 kGy.

Por meio dos resultados obtidos em nossos experimentos concluímos que a irradiação não afeta drasticamente as proteoglicanas, uma vez que a sua degradação seria refletida numa grande diminuição das propriedades compressivas, como relatado por Torzilini et al. (1997) e citadas no item 3.7.1.1. Além disso, a cartilagem caracteriza-se como um tecido radio-resistente, assim como descrita por Cornelissen et al. (1996). De acordo com Mann et al. (2005), diversos tecidos músculos esqueléticos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e criopreservados estão sendo irradiados com doses de 50 kGy, situação na qual a eficácia biomecânicas e integridade biológica, bem como a eficácia clínica, são mantidas.

Os resultados obtidos em nossos experimentos biomecânicos nos permitem concluir que existe grande influência da escolha do método de preservação com as alterações mecânicas provocadas no tecido cartilaginoso, uma vez que mesmo amostras não irradiadas (0 kGy) apresentaram grande variação de resultados quanto às propriedades tênses (FIG. 5.3.2.2.1 e FIG. 5.3.4.2.1). Essas observações são apoiadas pela Análise Estatística, onde se observa na TAB. 5.4.1.1 que há uma diferença estatisticamente significativa entre as formas de preservação da cartilagem.

De acordo com Dziejcz-Goclawska (2000), as alterações induzidas nos tecidos esterilizados por radiação ionizante podem ser diminuídas com a escolha de métodos de preservação adequados àquele tipo de tecido. Os resultados biomecânicos de tração e

compressão sugerem que as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ comportam-se mecanicamente melhor do que as amostras preservadas em altas concentrações de glicerol. Dziejcz-Goclawska et al. (2005) relatam que a eficácia dos enxertos ósseos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é superior aos liofilizados. Os enxertos ósseos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ são avaliados como muito bom em 83% dos casos, 10% como bom, 6% como satisfatório e somente 1% como insatisfatório. Já os enxertos liofilizados tem sua eficácia classificadas como muito boa em 37% dos casos, satisfatória em 54% e insatisfatória em 9%. Como o processo de liofilização também consiste na remoção do conteúdo de água do tecido, assim como no uso de altas concentrações de glicerol, guardadas as devidas particularidades, pode-se fazer uma analogia entre essas duas formas de preservação, embora tenha-se conhecimento de que a liofilização é um técnica mais drástica do que a preservação em altas concentrações de glicerol. De acordo com os mesmo autores, suas análises clínicas e dados experimentais indicam que os enxertos ósseos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e irradiados possuem propriedades osteoindutivas melhores do que aqueles que foram liofilizados e irradiados. Embora este trabalho seja sobre as propriedades da cartilagem, os dados indicam grande similaridade, entre nossos resultados e os encontrados por Dziejcz-Goclawska et al. (2005) para o tecido ósseo, quanto as formas de preservação do tecido.

Ainda em relação aos métodos de preservação, Salai et al. (2000) avaliaram os efeitos da criopreservação de tecidos ósseos e cartilagosos por períodos prolongados. De acordo com seus resultados, mesmo em enxertos preservados a mais de 5 anos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, não há diferenças histológicas qualitativas ou diferenças biomecânicas quantitativas entre as amostras preservadas por longos períodos e o grupo controle. Isto indica que o congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é uma eficiente forma de preservação e que os tecidos podem ser utilizados mesmo após 5 anos de armazenamento, o que evita o descarte desnecessário de enxertos biológicos. Fabriciani et al., (1997), compararam as técnicas de criopreservação e congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e concluíram que o congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é preferível à criopreservação, uma vez que os enxertos foram incorporados adequadamente ao receptor e

não foram encontradas diferenças histológicas significativas entre as duas formas de preservação. Assim, a preferência às cartilagens congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se deveu a fato desta forma de preservação ser simples e permitir o estoque ilimitado de tecidos com um risco de transmissão de doenças diminuído. Além disso, os autores concluíram que a presença de células (condrócitos) viáveis no enxerto não afeta significativamente a remodelação do tecido após o implante, o que é de importância fundamental para este trabalho, uma vez que a técnica de irradiação das amostras elimina a possibilidade de que exista qualquer célula viável no enxerto, sendo uma das principais causas da diminuição da imunogenicidade no receptor (Dziedzic-Goclawska, 2000).

Somando-se o fato de que os enxertos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ podem ser armazenados por longos períodos sem perdas significativas em sua estrutura com os resultados biomecânicos desse trabalho, verifica-se que o congelamento a entre -70 e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ deve ser preferível à preservação em altas concentrações de glicerol. Entretanto, esta técnica requer uma infra-estrutura mais complexa, necessitando de congeladores especiais e um sistema elétrico secundário com gerador. Em instalações que não possuam esse sistema, há a necessidade de cilindros de CO_2 de segurança, os quais entram em ação devido à falhas na rede elétrica, por exemplo. Por outro lado, a preservação em altas concentrações de glicerol é extremamente simples, necessitando, não obrigatoriamente⁵, de apenas uma geladeira comum ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o próprio glicerol, que é um insumo de baixo custo. Todavia, como pode-se verificar nesse trabalho, os resultados obtidos com as amostras preservadas em glicerol não são satisfatórios para altas doses de radiação (25 e 50 kGy), o que não ocorre quando as amostras são congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os nossos achados sobre a preservação a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em comparação à outras formas de preservação da cartilagem são corroborados por Fabricini et al. (1997), que referem que o congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é preferível à outras formas de preservação.

5 O termo não necessariamente faz referência ao fato de que amostras de tecidos humanos preservados em altas concentrações de glicerol podem ser mantidos em temperatura ambiente.

Por outro lado, o uso de enxertos de cartilagem irradiadas em cirurgias plásticas reconstrutivas permanece controverso, uma vez que a reabsorção deste tecido ocorre de diferentes formas, a qual que parece estar principalmente ligada ao tipo de estrutura que se deseja reconstruir (Komender et al., 2001; Burke et al., 2004). A rápida reabsorção desse tecido é a principal razão para a falha dos tratamentos que empregam a utilização enxertos (Komender et al., 2001). Komender et al. (2001) e Burke et al. (2004) indicam que, aparentemente, o uso de cartilagem para reconstrução de orelha é menos favorável do que outros tipos de reconstruções, como por exemplo a reconstrução do maxilar e do nariz. Dessa forma, estudos que visem avaliar *in vivo* a utilização de cartilagem irradiada como tecido de sustentação devem ser levados em consideração a fim de avaliar as possíveis causas dessa rápida reabsorção desse enxerto quando utilizado principalmente na reconstrução de orelhas.

No presente trabalho, tanto o estudo termogravimétrico como o de Tomografia por Coerência Óptica (OCT) são inéditos e, portanto existem diversos aspectos a serem analisados. Assim, estudos futuros serão realizados com essas duas técnicas para um melhor conhecimento das propriedades químicas e estruturais da cartilagem humana.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de termogravimetria, concluímos que não existe correlação entre a dose de irradiação, bem como o tipo de preservação utilizado, com as curvas de saída de água da cartilagem, uma vez que em todas as amostras (tanto congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, como preservadas em altas concentrações de glicerol) as curvas termogravimétricas sempre se situaram dentro dos limites dos controles. Por outro lado, observa-se uma tendência a uma saída de água mais homogênea em amostras irradiadas com 50 kGy.

Em relação aos resultados biomecânicos de tração e compressão da cartilagem, a dose de 15 kGy não afeta as propriedades mecânicas deste tecido, podendo ser utilizada tanto para amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, como para amostras preservadas em altas concentrações de glicerol ($> 98\%$). Por outro lado, as amostras congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ comportam-se melhor que as preservadas em glicerol, quando irradiadas com doses de 25 e 50 kGy. Entretanto, dependendo da estrutura a ser reconstruída, amostras preservadas em glicerol e irradiadas com 25 kGy podem ser utilizadas de acordo com a decisão médica.

Dessa forma, concluímos que a cartilagem congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pode ser esterilizada com doses de até 50 kGy, ao passo que cartilagens preservadas em altas concentrações de glicerol podem ser esterilizadas com doses de até 25 kGy.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAN, M. & COOPER, J. **Biomechanics of Human Movement**. McGraw-Hill. Boston, 1995.

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

AKIZUKI, S., MOW, V.C., MULLER, F., PITA, J.C., HOWELL, D.S., MANICOURT, D.H. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. **Journal of Orthopaedic Research**, v.4, p. 379-392, 1986.

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

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

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

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

ANDERSON, W.B.; HUCK, P.M.; DIXON, D.G.; MAYFIELD, C.I. Endotoxin Inactivation in Water by Using Medium-Pressure UV Lamps. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n°5, p. 3002-3004, 2003.

ARAÚJO, M. M., MARIN-HUACHACA, N. S., MANCINI-FILHO, J., DELINCEE, H.,

VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Identification of irradiated refrigerated pork with DNA comet assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, p. 183-185, 2004.

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

ARMSTRONG, C. G., LAI, W. M. and MOW, V. C. An analysis of the unconfined compression of articular cartilage. **Journal of Biomechanics Engineering**, v. 106, p. 165-173, 1984.

ATHANASIOU, K. A., ROSENWASSER, M. P., BUCKWALTER, J. A., MALININ, T. I. and MOW, V. C. Interspecies comparisons of *in situ* intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, p. 330-340, 1991.

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

BADER, D. L., KEMPSON, G. E., EGAN, J., GILBEY, W. and BARRET, A. J. The effects of selective matrix degradation on the short-term compressive properties of adult human articular cartilage. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1116, p. 147-154, 1992.

BASSER, P. J., SCHNEIDERMAN, R., BANK, R. A., WACHTEL, E. and MAROUDAS, A. Mechanical properties of the collagen network in human articular cartilage as measured by osmotic stress technique. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 351, p. 207-219, 1998.

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

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

BOURROUL, S.A. **Caracterização dos efeitos da radiação ionizante em pele humana**

para aloenxertos. 2004. Tese (Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

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

BOSTON, OFFICE OF INSPECTOR GENERAL. Oversight of Tissue Banking. Department of Health and Human Services, Report n. OEI-01-00-00441, janeiro de 2001. Disponível em <<http://oig.hhs.gov/oei/reports/oei-01-00-00441.pdf>>. Acesso em 31 de março de 2005.

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

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

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

BRASIL, Portaria nº 263, de 31 de março de 1999. A utilização de tecidos, órgãos ou partes do corpo humano para fins científicos somente será permitida depois de esgotadas as possibilidades de sua utilização em transplantes. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 05 de abril de 1999. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1019&word> =>. Acesso em: 28/08/2006.

BRASIL, Lei nº 10211, de 23 de março de 2001. Altera dispositivos da Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997, que "dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento". D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 24 de março de 2001. Disponível em: <

legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=471&word=>. Acesso em: 28/08/2006.

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

BRASIL, Resolução RDC 220 de 29 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 29 de dezembro de 2006. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25456&word=>>>. Acesso em: 05/01/08.

BUCKWALTER, J. A., HUNZIKER, E. B., ROSENBERG, L. C., COUTTS, R., ADAMS, M. and EYRE, D. Articular cartilage: Composition and Structure. In: Woo, S. L. and BUCKWALTER, J. A. **Injury and repair of the musculoskeletal soft tissue**, 2ª ed. Park Ridge, American Academy of Orthopedic Surgeons, 1991.

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

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

BURKE, A. J. C., WANG, T. D. & COOK, T. A. Irradiated Homograft Rib Cartilage in Facial Reconstruction. **Archives of Facial plastic Surgery**, v. 6, p. 334-341, 2004.

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

CANTO, L. B. & PESSAN, L. A. Resistência à tração, flexão e compressão. In: CANEVAROLO Jr, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**, Ed. Artliber, 2003,

p. 341 a 360.

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

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

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

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

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

COMPER, W. D. & LAURENT, T. C. Physiological function of connective tissue polysaccharides. **Physiological Reviews**, v. 58, p. 255-315, 1978.

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

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

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

CORNELISSEN, M., THIERENS, H. & RIDDER, L. DE. Effects of ionizing radiation on cartilage: Emphasis on effects on the extracellular matrix. **Scanning Microscopy**, v.10, n. 3, p.883-840, 1996.

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

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

DIAS, D. B. **Estudo da Caracterização de espumas de polietileno reticulado pelo processo de irradiação com feixe de elétrons**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

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

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

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

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

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

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

EISENBERG, S. R. & GRODZINSKY, A. J. The kinetics of chemically induced non-equilibrium articular cartilage and corneal stroma. **Journal of Biomechanical**

Engineering, v. 109, p. 79-89, 1987.

ENOKA, R. **Neuromechanical Basis of Kinesiology. Human Kinetics**. Champaign, IL, 1988.

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

FANARO, G. B., ARAÚJO, M. M., THOMAZ, F. S., DUARTE, R. C., VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Comparison of Treatment in Soybean Grains between ⁶⁰Co and E-beams Applications. In: **International Nuclear Atlantic Conference**, Santos, 2007.

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

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

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

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

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

FUKUNAGA, T., YAMASHIRO, T., OYA, S., TAKESHITA, N., TAKIGAWA, M., TAKANO-YAMAMOTO, T. Connective tissue growth factor mRNA expression pattern in

cartilages is associated with their type I collagen expression. **Bone**, v.33, p.911-918, 2003.

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

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

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

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

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

GUILAK, F., RATCLIFFE, A., LANE, N., ROSENWASSER, M. P. and MOW, V. C. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 12, p. 474-484, 1994.

GRODZINSKY, A. J. Eletromechanical and physicochemical properties of connective tissue. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 9, p. 133-199, 1983.

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

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

HALL, A. O. ANOVA. 2006. Disponível em:

<http://www2.mat.ua.pt/pessoais/AHall/Bioestat%EDstica/Bioestat%EDstica.htm>.

Acesso em 28 de janeiro de 2008.

HALL, S. **Biomecânica Básica**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1991.

HAM, A. W. **Histologia**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1969.

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

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

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

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

HAVIKO, T. & LAASIK, P. 40 years of tissue banking in Estonia. **Cell and Tissue Banking**, v. 2, p.173-177, 2001.

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

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

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

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

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

HERSON, M.R., MATHOR, M.B., PEDRAZA, J.M. The impact of the International Atomic Energy Agency (IAEA) programme on radiation and tissue banking in Brazil. **Cell and Tissue Banking**, - To be published. (2008) .

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

HUANG, D., SWANSON, E. A., LIN, C. P., SCHUMAN, J. S., STINSON, W. G., CHANG, W., HEE, M. R., FLOTE, t., GREGORY, K., PULIAFITO, C.A. Optical coherence tomography, **Science**, v. 254, p.1178-1181, 1991.

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

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

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

INSTRON DO BRASIL, Sistemas de teste de modelo de mesa Série 5560. 2008. Disponível em: <http://www.instron.com.br/wa/products/universal_material/5560.aspx>. Acesso em 05 de janeiro de 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KATZ, E. P., WATCHEL, E. J. and MAROUDAS, A. Extrafibrillar proteoglycans osmotically regulate the molecular packing of collagen in cartilage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 882, p. 136-139, 1986.

KAUR, C. Histology of cartilage. In: PHILLIPS, G. O. **Radiation and Tissue Banking**, v. 05. World Scientific, 2001.

KEMPSON, G. E. Mechanical properties of articular cartilage. In: **Freeman, M. A. R. Adult articular cartilage**, London, Pitman Medical, p. 333-413, 1979.

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

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

KOMENDER, J., MARCZYNSKI, W., TYLMAN, D., MALCZEWSKA, H., KOMENDER, A., SLADOWSKI, D. Preserved tissue allografts in reconstructive surgery. **Cell and Tissue Banking**, v. 2, p. 103-112, 2001.

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

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

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

LAI, W. M., HOU, J. S. and MOW, V. C. A triphasic theory for the swelling and deformations behaviours of articular cartilage. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 113, p. 245-258, 1991.

LAI, W. M., MOW, V. C. and ZHU, W. Constitutive modeling of articular cartilage and biomacromolecular solutions. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 115, p. 474-480, 1993.

LANIR, Y. Biorheology and fluid flux in swelling tissues, I. Bicomponent theory for small deformations, including concentration effects. **Biorheology**, v. 24, p. 173-187, 1987.

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

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

LI, C.M., HO, Y.R., LIU, Y.C. Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 100(5), p.350-351, 2001.

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

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

MANN, D.M., BERTENSHAW, G., PEARCE, R., FORNG, R.Y., LIN, J., TOWCIMAK, N., MULCAHY, K. High doses of gamma irradiation are both necessary and feasible when sterilizing allograft tissues with gamma radiation. **American Association of Tissue Banks. 29th Annual Meeting**, Hollywood, Florida, 2005.

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

MAROUDAS, A. I. Biophysical chemistry of cartilaginous tissue with special reference to solute and fluid transport. **Biorheology**, v. 12, p. 233-248, 1975.

MAROUDAS, A. I. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and

degenerate cartilage. **Nature**, v. 260, p. 808-809, 1976.

MAROUDAS, A. I., WATCHEL, E., GRUSHKO, G., KATZ, E. P. and WEINBERG, P. The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1073, p. 285-294, 1991.

MASSAD, E. & SILVEIRA, P.S.P. Disciplina de Métodos Quantitativos em Medicina. *Análise de Variância*. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2003. Disponível em: <<http://www.dim.fm.usp.br/variância/index.php>>. Acesso em 28 de janeiro de 2008.

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

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

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

McGINNIS, P. **Biomechanics of Sports and Exercise. Human Kinetics**. Champaign, IL, 1999.

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

MOW, V. C., KUEI, S. C., LAI, W. M. and ARMSTRONG, C. G. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression. Theory and experiments. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 102, p. 73-84, 1980.

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

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

MYERS, E. R., LAI, W. M. and MOW, V. C. A continuum theory and an experiment for the ion-induced swelling behavior of articular cartilage. **Journal of Biochemical Engineering**, v. 106, p. 151-158, 1984.

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

NIST/SEMATECH. e-Handbook of Statistical Methods. 2003. In: <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>>. Acesso em 30 de janeiro de 2008.

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

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

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

PEARLE, A. D., WARREN, R. F. and RODEO, S. A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. **Clinical Sports Medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2005.

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

PEREIRA, B. P. Some principles of biomechanical structural and material properties In: PHILLIPS, G. O. , NATHER, A. **Advances in tissue banking v. 5 The Scientific Basis of Tissue Transplantation**, World Scientific, 2001.

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

POOLE, A.R., WEBBER, C., PIDOUX, I., CHOI, H., ROSENBERG, L.C. Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues. **Journal of Histochemical and Cytochemical**, v.34(5), p.619-625, 1986.

POSSARI, J.F. **Esterilização por óxido de etileno**. 1^a Ed. São Paulo, SP.: Iátria, 2003i.

POSSARI, J.F. **Esterilização por vapor de baixa temperatura e formaldeído**. 1^a Ed. São Paulo, SP.: Iátria, 2003ii.

POSSARI, J.F. **Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio**. 1^a Ed. São Paulo, SP.: Iátria, 2005.

PRUSS, A., KAO, M., GOHS, U., KOSCIELNY, J., VERSEN, R. Von, PAULI, G. Effects of Gamma radiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-contaminated viruses. **Biologicals**, v. 30, p. 125-133, 2002.

RÄSÄNEN, T. & MESSNER, K. Regional variation of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 31, p. 519-524, 1996.

ROTH, V., MOW, V. C. The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. **Journal of Bone and Joint Surgery-American**, v. 62, p. 1102-1117, 1980.

ROSENBERG, L.C., CHOI, H.U., POOLE, A.R., LEWANDOWSKA, K. CULP, L.A. Biological roles of dermatan sulphate proteoglycans. **Ciba Foundation Symposium**, v.124, p.47-68, 1986.

RUSSEL, A.D. Principles of antimicrobial activity. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, 1991, p. 29-58.

RUTALA, W.A. & WEBER, D.J. Disinfection and Sterilization in Health Care Facilities: What Clinicians Need to Know. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 702-709, 2004.

SADDEMI, S.R., FROGAMENI, A.D., FENTON, P.J., HARTMAN, J. HARTMAN W. Comparison of perioperative morbidity of anterior cruciate ligament autograft versus allografts. **Arthroscopy**, v.9, p. 519-524, 1993.

SAGE, H. The evolution of elastin: Correlation of functional properties with protein structure and phylogenetic distribution. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 74B, p. 373-380, 1983.

SAGE, H. & GRAY, W.R. Studies on the evolution of elastin. I. Phylogenetic distribution. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 64B, p. 313-327, 1979.

SALAI, M., BROSH, T., KELLER, N., PERELMAN, M. and DUDKIEWITZ, I. The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: A microbiological, histological and mechanical study. **Cell and Tissue Banking**, v. 01, p. 69-73, 2000.

SALVATORE, F., HERZOG, W., WU, J. Z. and LA ROSA, G. A method to estimate the elastic properties of the extracellular matrix of articular cartilage. **Journal of Biomechanic**, v.37, p. 401-404, 2004.

SHECHMEISTER, I.L. Sterilization by ultraviolet irradiation. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, 1991, p. 553-565.

SHELTON, W.R., TREACY, S.H., DUKES, A.D., use of allografts in knee reconstruction: I. Basic science aspects and current status. **Journal of American Acadademy of Orthopaedic Surgeons**, v.6, p. 165-168, 1998.

SILVERMAN, G.J. Sterilization and preservation by ionizing irradiation. In: BLOCK, S.S. (Ed). **Disinfection, sterilization and preservation**, 4th Ed. Malvea, PA.: Lea & Febiger, p. 566-579, 1991.

SIMONDS, R.J., HOLMBERG, S. D., HURWITZ, R.L., COLEMAN, T.R.,

BOTTENFIELD, S., CONLEY, L.J., KOHLENBERG, S.H., CASTRO, K.G., DAHAN, B.A., SCHABLE, C.A. et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. **New England Journal of Medicine**, v.326(11), p. 726-732, 1992.

STRAUCH, B. & WALLACH, G. Reconstruction with irradiated homograft costal cartilage. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v.111 (7), p.2405-2411, 2003.

The IAEA Radiation and Tissue Banking Program i: General Information about the IAEA Program. Disponível em <http://www.int-tissuebank.com/> . Acesso em 05 de janeiro de 2008.

The IAEA Radiation and Tissue Banking Program ii: IAEA Training Programme in Radiation and Tissue Banking. Distance Learning: The IAEA/NUS Curriculum. Disponível em <<http://www.int-tissuebank.com>>. Acesso em 05 de janeiro de 2008.

THOMAS, G. J. & DAVIES, M. The organisation of the extracellular matrix. In: PHILLIPS, G. O. **Radiation and Tissue Banking**, vol. 05. World Scientific, 2001.

TIMPL, R. Macromolecular organization of basement membranes. **Current Opinion in Cell Biology** v. 8, p. 618-624, 1996.

TOOLE, B. Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation. In: HAY, E.D. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, 2^a. ed., New York, Plenum Press, 1991.

TOOLE, B. P., JACKSON, G., GROSS, J. Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 69(6), p. 1384-1386, 1972.

TORZILINI, P. A., ARDUINO, J. M., GREGORY, J. D. and BANSAL, M. Effect of proteoglycan removal on solute mobility in articular cartilage. **Journal of Biomechanics**, v. 30, p. 895-902, 1997.

VAJARADUL, Y. Bangkok biomaterial center: 15 years experience in tissue banking. **Cell and Tissue banking**. v. 1, p. 229-239, 2000.

VANGSNESS JR, C.T., GARCIA, I.A., MILLS, C.R., KAINER, M.A., ROBERTS, M.R. And MOORE, T.M. Allograft Transplantation in the Knee: Tissue Regulation, Procurement, Processing, and Sterilization. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 31(3), p. 474-481, 2003.

VANGSNESS JR, C.T, TRIFFON, M.J., . Soft tissue for allograft reconstruction of the human knee: A survey of the American Association of Tissue Banks. **The American Journal of Sports Medicine**, v.24, p. 230-234, 1996.

VILLAVICENCIO, A.L.C.H. **Avaliação dos efeitos da radiação ionizante de ^{60}Co em propriedades físicas, químicas e nutricionais dos feijões *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata***. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, 1998.

WATANABE, H. Cartilage proteoglycan aggregate: structure and function. **Clinical Calcium**, v. 14(7), p.9-14, 2004.

WIGHT, T.N., HEINERGDARD, D. AND HASCALL, V.C. Proteoglycans: Structure and function. In: HAY, E.H. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, New York, Plenum Press, 1991.

WONG, M., WUETHRICH, P., BUSCHMANN, M. D., EGGLI, P. and HUNZIKER, E.B. Chondrocyte biosynthesis correlates with local tissue strain in statically compressed adult articular cartilage. **Journal of Orthopaedic research**, v. 15, p. 189-196, 1997.

WU, J. Z. & HERZOG, W. Elastic anisotropy of articular cartilage is associated with the microstructures of collagen fibers and chondrocytes . **Journal of Biomechanics**, v. 35, p. 931-942, 2002.

YAHIA L.H, DROUIN G, ZUKOR D. The irradiation effect on the initial mechanical properties of meniscal grafts. **Biomedical Materials and Engineering**. v.3(4), p. 211-21, 1993.

YAMADA, K. M. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: HAY, E.H. **Cell Biology of Extracellular Matrix**, New York, Plenum Press, 1991.

YESSIAN, M.R. Oversight of Tissue Banking Office of general the general department of

health and human services, 2001. Disponível em <<http://www.oig.hhs.gov/>>. Acesso em 12 de janeiro de 2008.

YIM, C. J. & CARLSON, E. R. Mandibular reconstruction using bone allografts In: PHILLIPS, G. O., VERSEN, R. Von, STONG, D. M., NATHER, A. **Advances in tissue Banking** v. 4, World Scientific, 2000, p.15-148.

YUSOF, N. Effect of radiation on microorganisms Mechanism of radiation sterilization. In: **Advances in tissue Banking**. v. 4, World Scientific, 2001, p.342-357.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Apêndice A- quadro detalhado de amostras.

Identificação	Dose	Sexo	Idade no momento do óbito (anos)
<i>Amostras Congeladas a -80°C</i>			
C0-01	0 kGy	Feminino	44
C0-02	0 kGy	Feminino	33
C0-03	0 kGy	Masculino	40
C0-04	0 kGy	Masculino	38
C0-05	0 kGy	Masculino	33
C15-01	15 kGy	Feminino	20
C15-02	15 kGy	Feminino	22
C15-03	15 kGy	Feminino	29
C15-04	15 kGy	Masculino	41
C15-05	15 kGy	Masculino	40
C25-01	25 kGy	Feminino	43
C25-02	25 kGy	Masculino	37
C25-03	25 kGy	Feminino	43
C25-04	25 kGy	Masculino	30
C25-05	25 kGy	Masculino	43
C50-01	50 kGy	Feminino	45
C50-02	50 kGy	Masculino	45
C50-03	50 kGy	Masculino	24
C50-04	50 kGy	Feminino	40
C50-05	50 kGy	Masculino	35
<i>Amostras em Glicerol</i>			
G0-01	0 kGy	Feminino	44
G0-02	0 kGy	Feminino	33
G0-03	0 kGy	Masculino	40
G0-04	0 kGy	Masculino	38
G0-05	0 kGy	Masculino	33

G15-01	15 kGy	Feminino	20
G15-02	15 kGy	Feminino	22
G15-03	15 kGy	Feminino	29
G15-04	15 kGy	Masculino	41
G15-05	15 kGy	Masculino	40
G25-01	25 kGy	Feminino	43
G25-02	25 kGy	Masculino	37
G25-03	25 kGy	Feminino	43
G25-04	25 kGy	Masculino	30
G25-05	25 kGy	Masculino	43
G50-01	50 kGy	Feminino	45
G50-02	50 kGy	Masculino	45
G50-03	50 kGy	Masculino	24
G50-04	50 kGy	Feminino	40
G50-05	50 kGy	Masculino	35

Média de idade

36,25 anos

APÊNDICE B

Apêndice B- Valores obtidos nos ensaios de tração.

Amostra	tração de Ruptura (MPa)	Média (MPa)	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
<i>a</i>				
C0-01a	3,05			
C0-01b	2,33			
C0-02	1,06			
C0-03a	3,07			
C0-03b	1,62			
C0-04	1,19			
C0-05	2,18	2,07	0,82	39,60
<i>b</i>				
G0-01	4,46			
G0-02	5,21			
G0-03	3,39			
G0-04	2,57			
G0-05	2,13	3,55	1,28	36,13
<i>c</i>				
C15-01a	3,89			
C15-01b	1,58			
C15-02	3,14			
C15-03a	3,60			
C15-03b	1,96			
C15-04a	1,86			
C15-04b	3,15			
C15-04c	1,43			
C15-05a	3,60			
C15-05b	1,60	2,58	0,97	37,75
<i>d</i>				
G15-01	5,78			
G15-02a	3,59			
G15-02b	3,83			
G15-02c	5,34			
G15-03	3,42			

G15-04a	4,84			
G15-04b	2,61			
G15-05	5,48	4,36	1,15	26,40
<i>e</i>				
C25-01	1,16			
C25-02	2,74			
C25-03	2,62			
C25-04	3,22			
C25-05a	1,76			
C25-05b	3,23	2,46	0,83	33,86
<i>f</i>				
G25-01a	2,36			
G25-01b	1,16			
G25-02	1,22			
G25-03	2,46			
G25-04	2,87			
G25-05	2,81	2,15	0,77	35,72
<i>g</i>				
C50-01	1,36			
C50-02	2,03			
C50-03	1,08			
C50-04	1,59			
C50-05a	1,42			
C50-05b	2,27	1,63	0,45	27,39
<i>h</i>				
G50-01	0,55			
G50-02	2,36			
G50-03	1,23			
G50-04	0,69			
G50-05	1,38	1,24	0,72	57,68

APÊNDICE C

Apêndice C- Valores obtidos nos ensaios de compressão.

Amostra	Carga máxima copsressiva (N)	Extração máxima em carga compressiva (mm)	Média (N)	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação (%)
<i>a</i> ⁵					
C0-01a	514,43	-			
C0-01b	491,41	-			
C0-02a	827,63	-			
C0-02b	809,97	-			
C0-03	970,75	-			
C0-04	742,83	-			
C0-05	554,41	-	701,63	183,78	26,19
<i>b</i>					
G0-01	473,43	2,51			
G0-02	1050,01	2,49			
G0-03	670,09	2,01			
G0-04	713,56	2,51			
G0-05	970,59	2,51	775,54	234,31	30,21
<i>c</i>					
C15-01	696,89	2,51			
C15-02	531,27	2,51			
C15-03a	556,61	2,50			
C15-03b	565,91	2,36			
C15-03c	493,57	2,30			
C15-04a	461,97	2,51			
C15-04b	494,88	2,50			
C15-04c	449,40	2,51			
C15-04d	558,50	2,49			
C15-05a	556,06	2,50			
C15-05b	639,67	2,51	545,79	73,66	13,50

⁵ Obs.: Os dados representados com o símbolo - não puderam ser obtidos devido a um travamento inesperado do software de controle do equipamento Instron. Os dados que foram mostrados foram anotados à mão antes do fechamento completo do programa.

d

G15-01	557,84	2,49			
G15-02	599,29	2,51			
G15-03	350,71	2,51			
G15-04	344,54	2,51			
G15-05	713,00	2,34	513,08	161,38	31,45

e

C25-01	310,07	2,51			
C25-02	749,21	2,50			
C25-03a	618,68	2,51			
C25-03b	407,70	2,51			
C25-04a	438,41	2,38			
C25-04b	300,07	2,49			
C25-05	306,42	2,51	447,22	174,42	39,00

f

G25-01a	297,84	2,51			
G25-01b	370,82	2,42			
G25-02	339,13	2,51			
G25-03	223,98	2,51			
G25-04	222,69	2,51			
G25-05	418,07	2,51	312,09	79,21	25,38

g

C50-01a	341,22	2,20			
C50-01b	342,84	1,78			
C50-02	548,65	1,95			
C50-03a	542,05	2,51			
C50-03b	628,77	2,51			
C50-04	595,72	2,30			
C50-05	328,40	2,51	475,38	132,28	27,83

h

G50-01	283,49	2,51			
G50-02	363,14	2,51			
G50-03	403,08	2,50			

G50-04	156,32	2,51			
G50-05a	395,66	2,39			
G50-05b	446,23	2,09	341,32	105,66	30,96

APÊNDICE D

Apêndice D- Análise de variância com Método de Tukey para tração e formas de preservação.

Modelo Geral Linear: tração versus preservação; dose

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Preservação	fixado	2	0 1
dose	fixado	4	0 15 25 50

Análise de Variância para tração, usando SS ajustado para os testes

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
preservação	1	7,4862	5,2074	5,2074	6,17	0,017*
dose	3	26,9538	29,8806	9,9602	11,81	0,000**
preservação*dose	3	13,1202	13,1202	4,3734	5,18	0,004**
Erro	45	37,9625	37,9625	0,8436		
Total	52	85,5227				

Simulação de Tukey

Resposta à variável tração

Todos os pares entre os níveis de preservação

preservação= 0 subtraída de:

Nível preservação	Diferença de médias	SE de Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
1	0,6424	0,2586	2,485	0,0168**

Simulação de Tukey

Resposta à variável tração

Todos os pares entre os níveis de dose

dose = 0 subtraída :

Nível dose	Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
15	0,659	0,3461	1,905	0,2403
25	-0,511	0,3776	-1,353	0,5349
50	-1,378	0,3868	-3,563	0,0047**

dose = 15 subtraído de:

Nível	Diferença	SE da	Valor P
-------	-----------	-------	---------

dose	de Média	Diferença	Valor T	Ajustado
25	-1,170	0,3432	-3,410	0,0073**
50	-2,038	0,3532	-5,768	0,0000**

dose = 25 subtraída de:

Nível	Diferença	SE da	Valor P
dose	de Média	Diferença	Ajustado
50	-0,8673	0,3842	-2,257 0,1236

Teste de Tukey Simultâneo

Resposta à variável tração

Todos os pares de comparação entre os níveis Preservação*dose

preservação = 0

dose = 0 subtraída de:

Nível	Diferença	SE da	Valor P
preservação*dose	de Média	Diferença	Ajustado
0 15	0,5096	0,4526	1,126 0,9476
0 25	0,3836	0,5110	0,751 0,9947
0 50	-0,4464	0,5110	-0,874 0,9870
1 0	1,4806	0,5378	2,753 0,1335
1 15	2,2898	0,4754	4,817 0,0004**
1 25	0,0752	0,5110	0,147 1,0000
1 50	-0,8294	0,5378	-1,542 0,7806

preservação = 0

dose = 15 subtraída de:

Nível	Diferença	SE da	Valor P
preservação*dose	de Média	Diferença	Ajustado
0 25	-0,126	0,4743	-0,266 1,0000
0 50	-0,956	0,4743	-2,016 0,4833
1 0	0,971	0,5031	1,930 0,5384
1 15	1,780	0,4357	4,086 0,0041**
1 25	-0,434	0,4743	-0,916 0,9830
1 50	-1,339	0,5031	-2,662 0,1615

preservação = 0

dose = 25 subtraída de:

Nível	Diferença	SE da	Valor P
preservação*dose	de Média	Diferença	Ajustado
0 50	-0,830	0,5303	-1,565 0,7678
1 0	1,097	0,5562	1,972 0,5110
1 15	1,906	0,4960	3,843 0,0084**
1 25	-0,308	0,5303	-0,581 0,9989
1 50	-1,213	0,5562	-2,181 0,3821

preservação = 0

dose = 50 subtraída de:

Nível	Diferença	SE da	Valor P
preservação*dose	de Média	Diferença	Ajustado
1 0	1,9270	0,5562	3,4648 0,0239*
1 15	2,7363	0,4960	5,5162 0,0001**
1 25	0,5217	0,5303	0,9837 0,9745

1	50	-0,3830	0,5562	-0,6886	0,9969
---	----	---------	--------	---------	--------

preservação = 1

dose = 0 subtraída de:

Nível		Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
1	15	0,809	0,5236	1,546	0,7788
1	25	-1,405	0,5562	-2,527	0,2108
1	50	-2,310	0,5809	-3,977	0,0057**

preservação = 1

dose = 15 subtraída de:

Nível		Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
1	25	-2,215	0,4960	-4,465	0,0013**
1	50	-3,119	0,5236	-5,957	0,0000**

preservação = 1

dose = 25 subtraída de:

Nível		Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
1	50	-0,9047	0,5562	-1,627	0,7321

* efeito ou diferença significativa ao nível de $P \leq 0,05$

** efeito ou diferença significativa ao nível de $P \leq 0,01$

APÊNDICE E

Apêndice E- Análise de variância com Método de Tukey para Compressão e formas de preservação.

Modelo Geral Linear: Compressão *versus* preservação; dose

Fator	Tipo	Níveis	Valores
Preservação	fixado	2	0 1
dose	fixado	4	0 15 25 50

Análise de Variância para Compressão, usando SS ajustado para os testes

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Preservação	1	67301	41497	41497	2,00	0,164
dose	3	906627	967798	322599	15,53	0,000**
Preservação*dose	3	90812	90812	30271	1,46	0,239
Erro	46	955396	955396	20769		
Total	53	2020137				

Simulação de Tukey

Resposta à variável Compressão

Todos os pares entre os níveis de dose

dose = 0 subtraída de:

Nível	Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
dose				
15	-209,1	57,37	-3,646	0,0037
25	-358,9	58,20	-6,167	0,0000
50	-330,2	58,20	-5,674	0,0000

dose = 15 subtraída de:

Nível	Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
dose				
25	-149,8	55,84	-2,682	0,0480
50	-121,1	55,84	-2,169	0,1474

dose = 25 subtraída de:

Nível	Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
dose				
50	28,69	56,70	0,5061	0,9572

Teste de Tukey Simultâneo

Resposta à variável Compressão

Todos os pares de comparação entre os níveis Preservação*dose

preservação = 0

dose = 0 subtraída de:

Nível		Diferença	SE da		Valor P
preservação*dose		de Média	Diferença	Valor T	Ajustado
0	15	-155,8	69,68	-2,237	0,3501
0	25	-254,4	77,03	-3,303	0,0361
0	50	-226,3	77,03	-2,937	0,0883
1	0	73,9	84,39	0,876	0,9868
1	15	-188,6	84,39	-2,234	0,3512
1	25	-389,5	80,18	-4,858	0,0004
1	50	-360,3	80,18	-4,494	0,0012

Preservação = 0**dose = 15 subtraída de:**

Nível		Diferença	SE da		Valor P
preservação*dose		de Média	Diferença	Valor T	Ajustado
0	25	-98,6	69,68	-1,415	0,8459
0	50	-70,4	69,68	-1,011	0,9705
1	0	229,7	77,73	2,956	0,0846
1	15	-32,7	77,73	-0,421	0,9999
1	25	-233,7	73,14	-3,195	0,0475
1	50	-204,5	73,14	-2,796	0,1212

Preservação = 0**dose = 25 subtraída de:**

Nível		Diferença	SE da		Valor P
preservação*dose		de Média	Diferença	Valor T	Ajustado
0	50	28,2	77,03	0,366	1,0000
1	0	328,3	84,39	3,891	0,0072
1	15	65,9	84,39	0,780	0,9934
1	25	-135,1	80,18	-1,685	0,6963
1	50	-105,9	80,18	-1,321	0,8862

Preservação = 0**dose = 50 subtraída de:**

Nível		Diferença	SE da		Valor P
preservação*dose		de Média	Diferença	Valor T	Ajustado
1	0	300,2	84,39	3,557	0,0184
1	15	37,7	84,39	0,447	0,9998
1	25	-163,3	80,18	-2,037	0,4697
1	50	-134,1	80,18	-1,672	0,7046

Preservação = 1**dose = 0 subtraída de:**

Nível		Diferença	SE da		Valor P
preservação*dose		de Média	Diferença	Valor T	Ajustado
1	15	-262,5	91,15	-2,880	0,1007
1	25	-463,4	87,27	-5,311	0,0001
1	50	-434,2	87,27	-4,976	0,0003

Preservação = 1**Dose = 15 subtraída de:**

Nível		Diferença	SE da		Valor P
preservação*dose		de Média	Diferença	Valor T	Ajustado

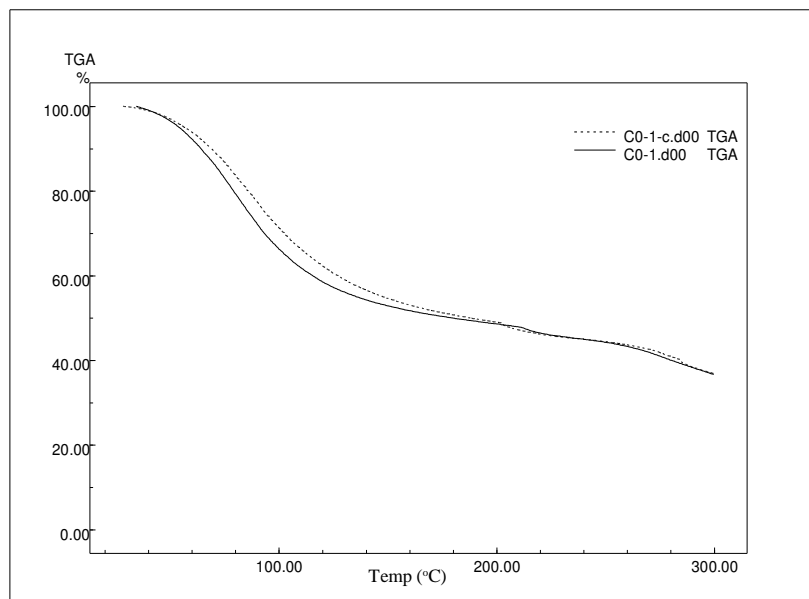
1	25	-201,0	87,27	-2,303	0,3140
1	50	-171,8	87,27	-1,968	0,5135

Preservação = 1
dose = 25 subtraída de:

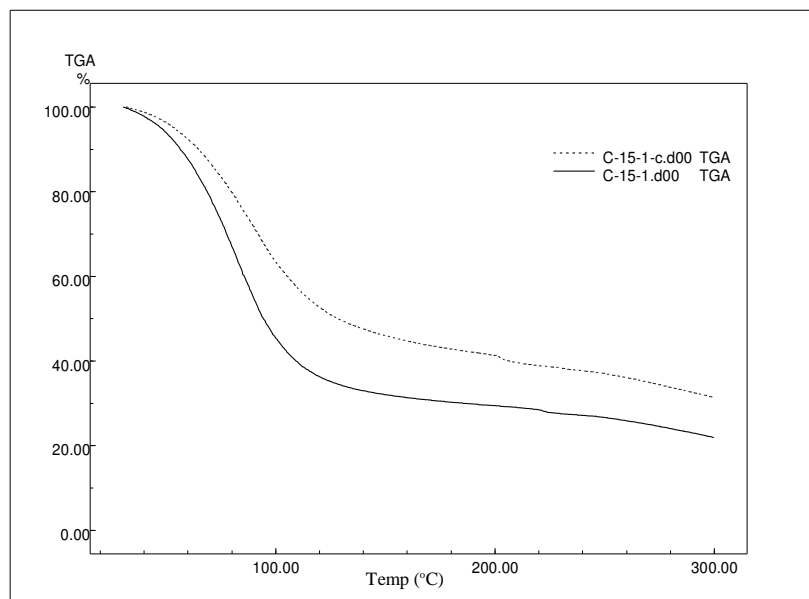
Nível		Diferença de Média	SE da Diferença	Valor T	Valor P Ajustado
1	50	29,23	83,21	0,3513	1,000

APÊNDICE F

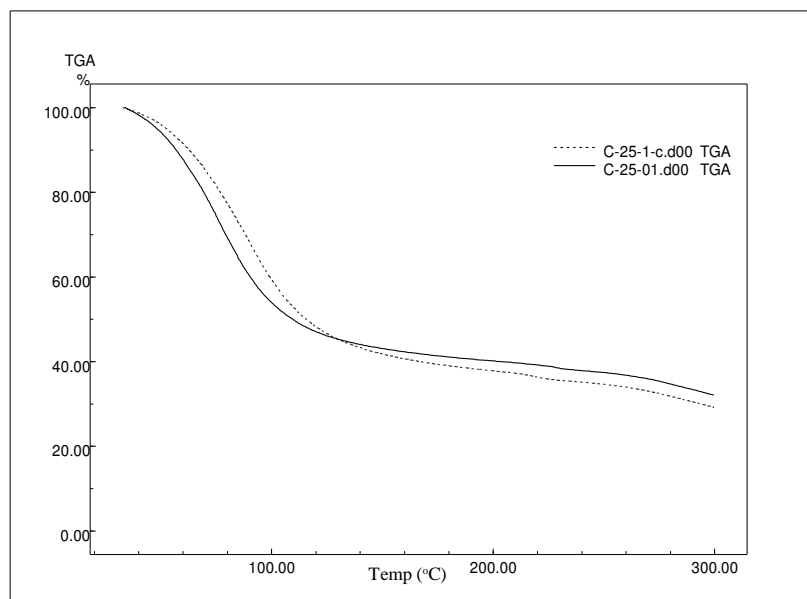
Apêndice F- Curvas termogravimétricas das amostras congeladas a -70°C provenientes dos doadores número 01 (a, b, c, d), 03 (e, f, g, h) e 05 (i, j, k, l).



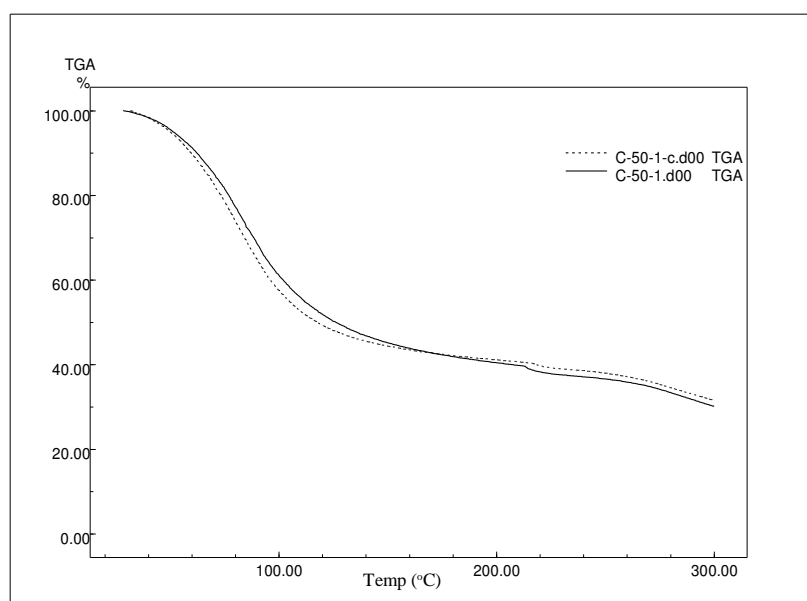
a- Curvas termogravimétricas do doador final 01 não irradiadas (controle). Linha cheia amostra controle e linha tracejada controle específico.



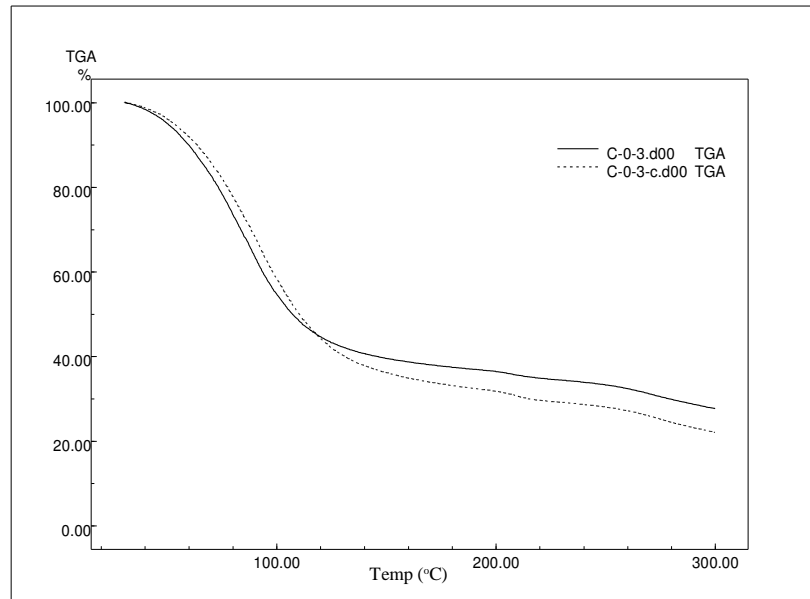
b- Curvas termogravimétricas dos doadores final 01, irradiada com 15 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



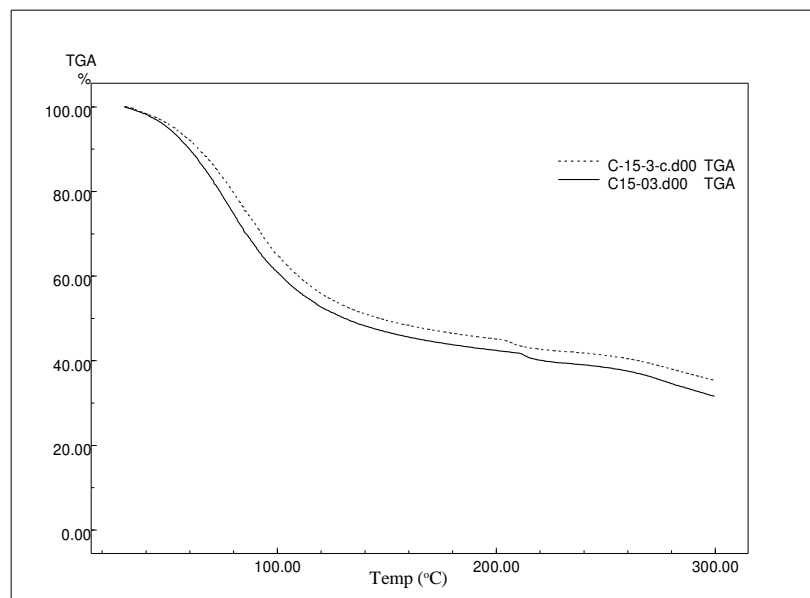
c- Curvas termogravimétricas dos doadores final 01, irradiada com 25 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



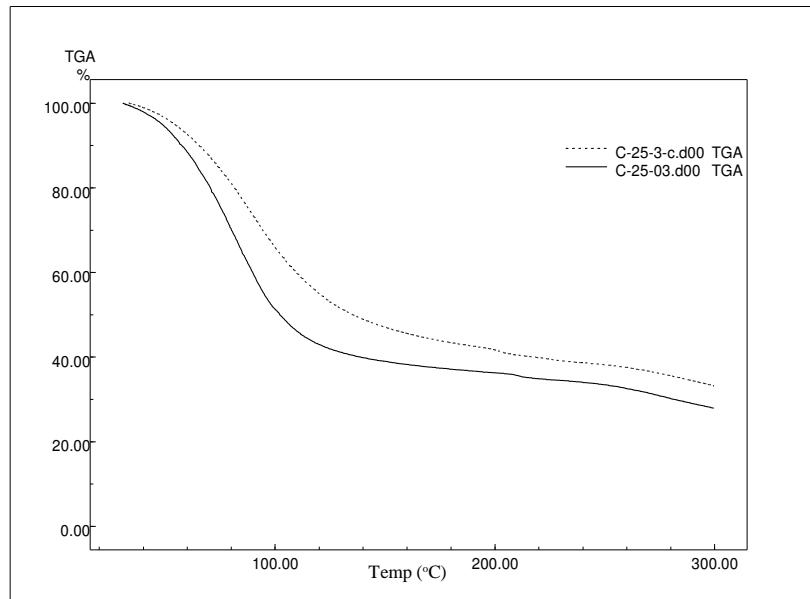
d- Curvas termogravimétricas dos doadores final 01, irradiada com 50 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



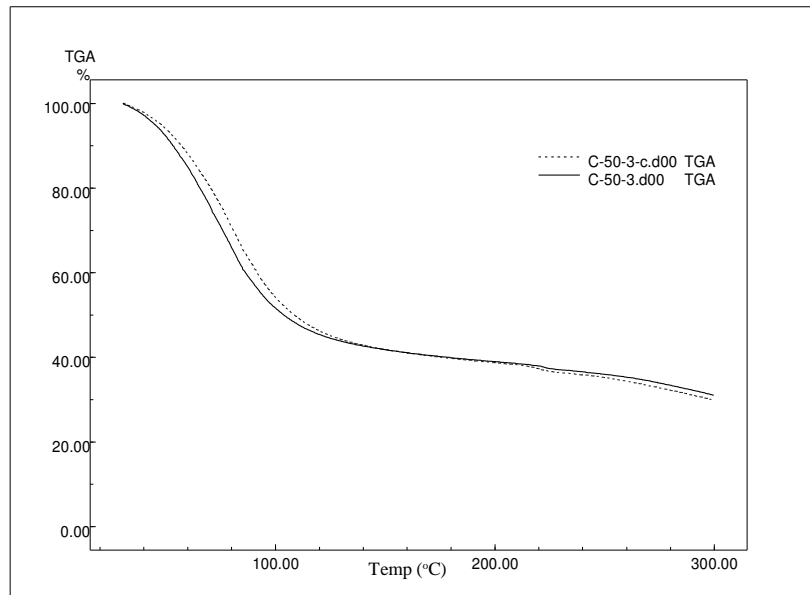
e- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, não irradiada (controle). A linha cheia representa a amostra não irradiada e a linha tracejada o controle específico.



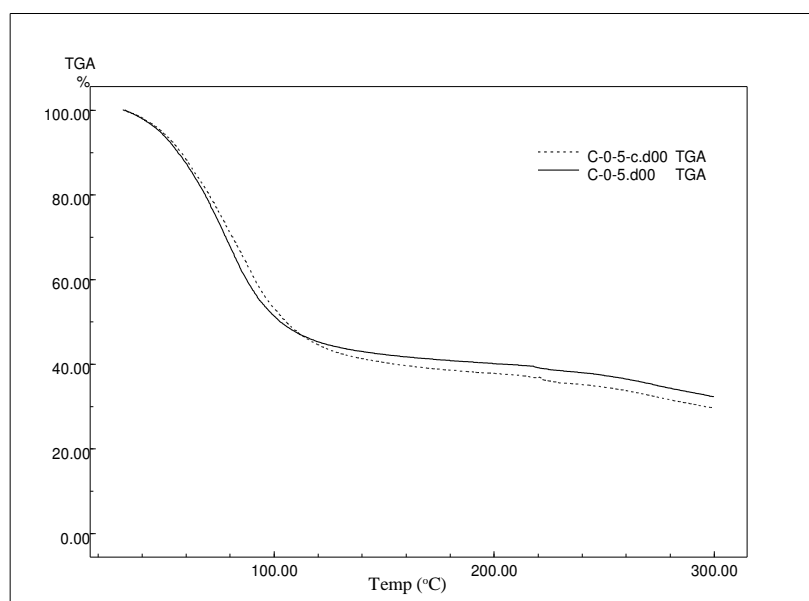
f- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, irradiada com 15 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



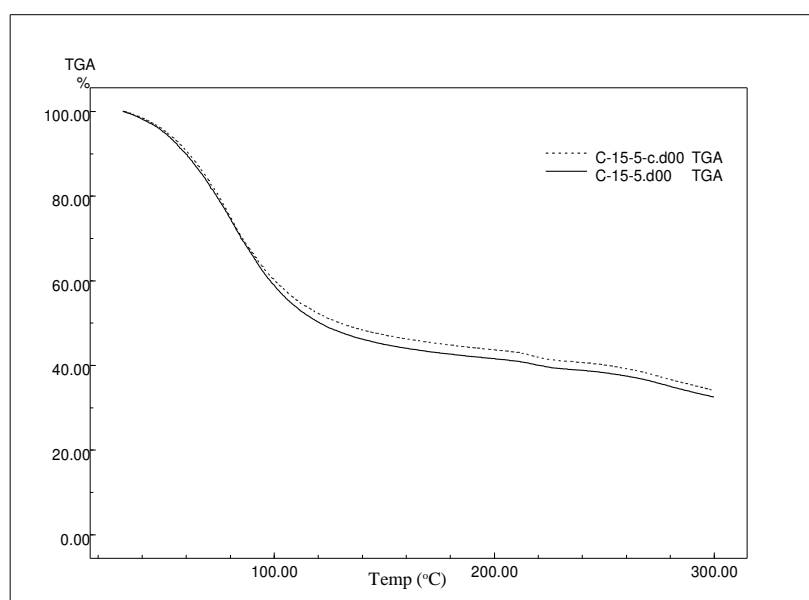
g- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, irradiada com 25 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



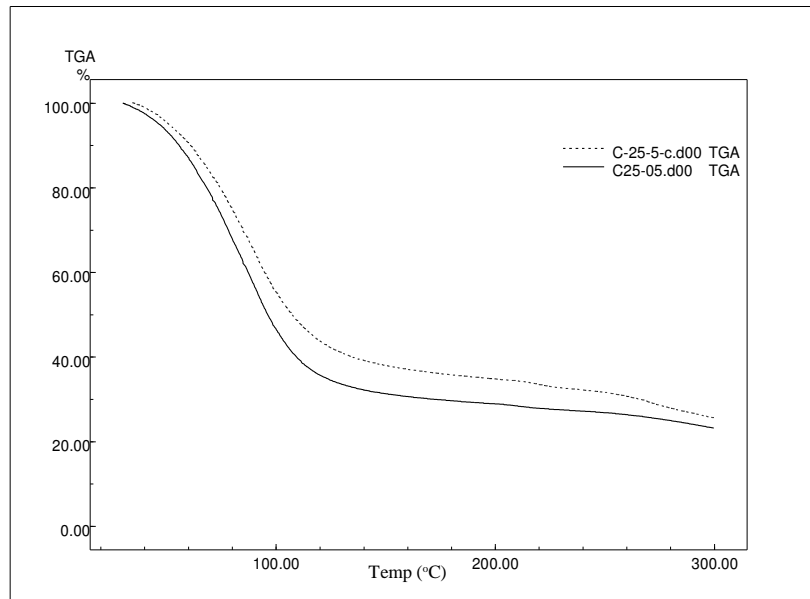
h- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, irradiada com 50 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



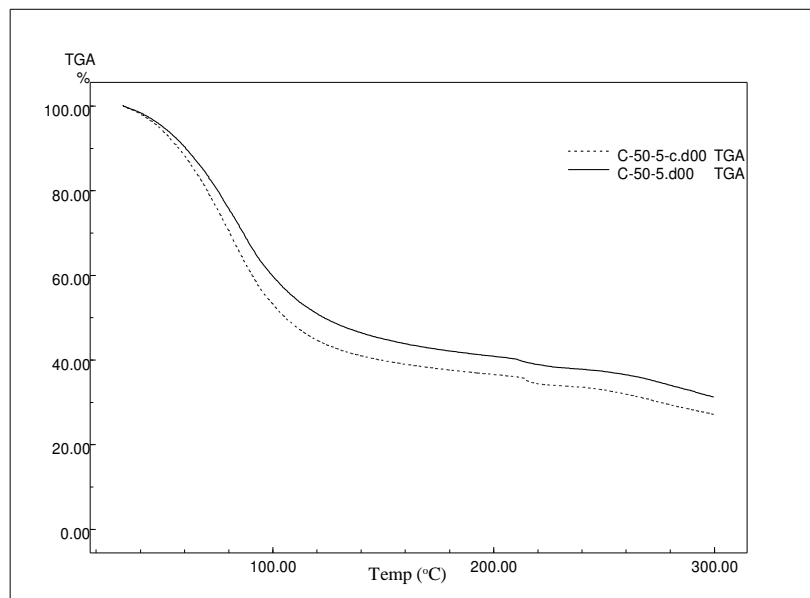
i- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, não irradiada (controle). A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



j- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, irradiada com 15 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



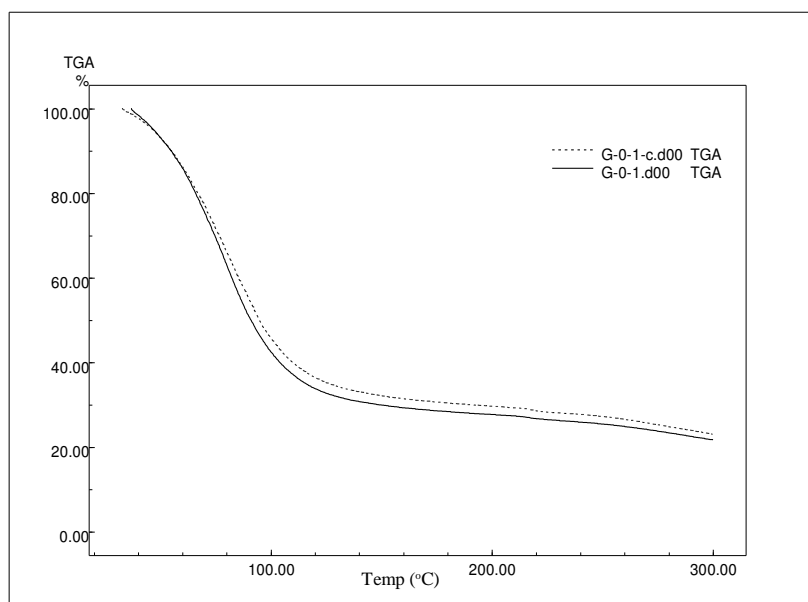
k- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, irradiada com 25 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



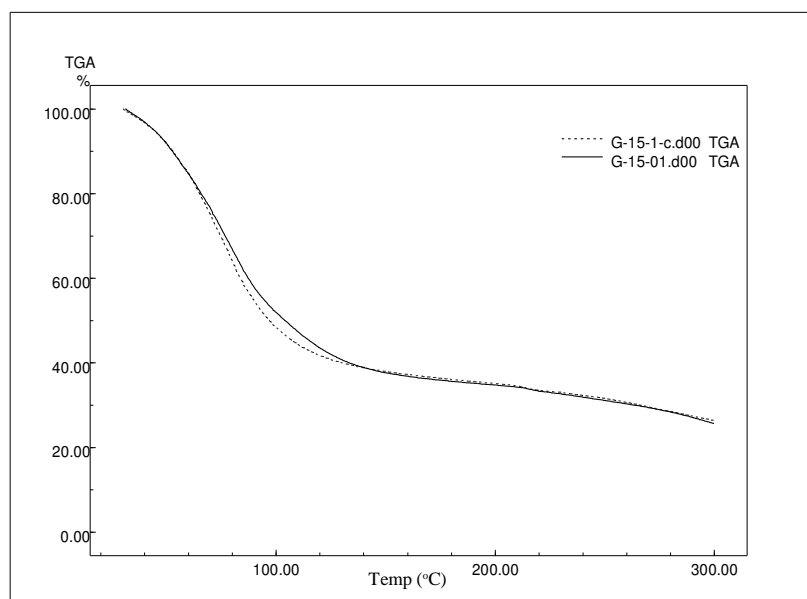
l- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, irradiada com 50 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.

APÊNDICE G

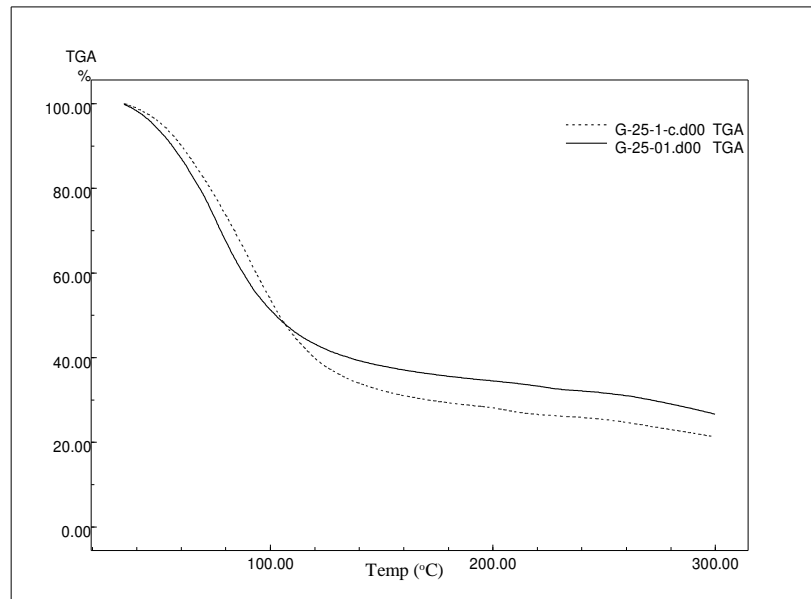
Apêndice G- Curvas termogravimétricas das amostras preservadas em glicerol provenientes dos doadores número 01 (a, b, c, d), 03 (e, f, g, h) e 05 (i, j, k, l).



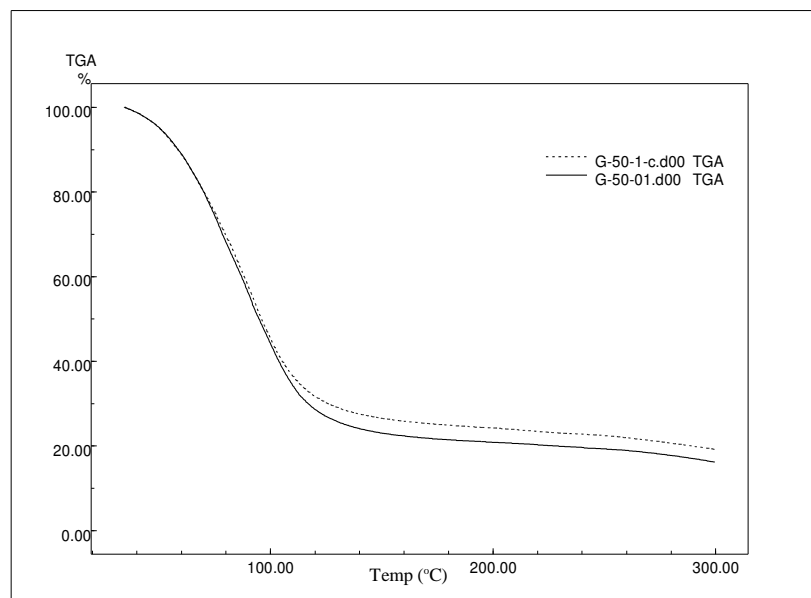
a- Curvas termogravimétricas do doador final 01 não irradiadas (controle). Linha cheia amostra controle e linha tracejada controle específico.



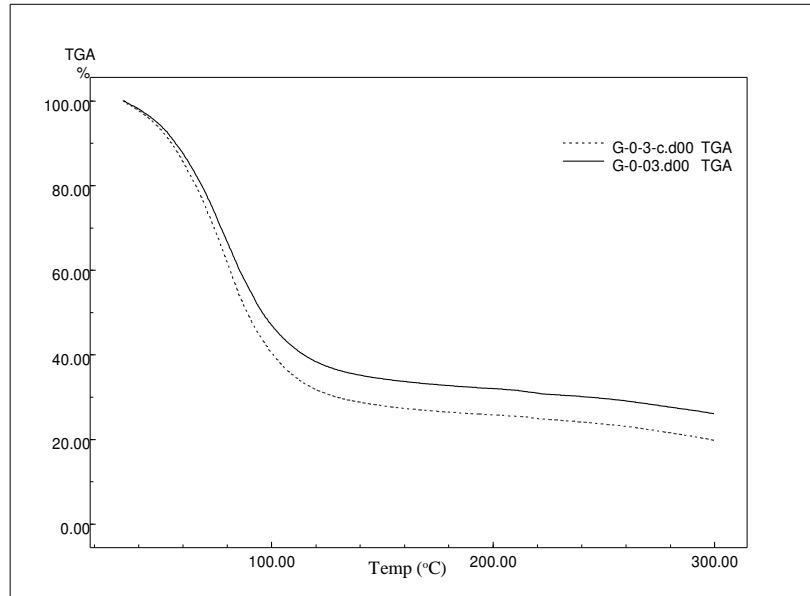
b- Curvas termogravimétricas dos doadores final 01, irradiada com 15 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



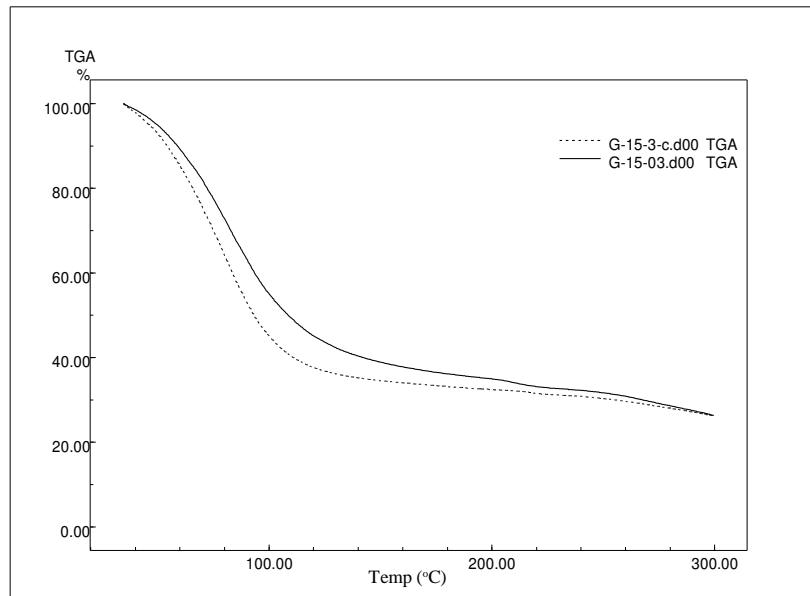
c- Curvas termogravimétricas dos doadores final 01, irradiada com 25 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



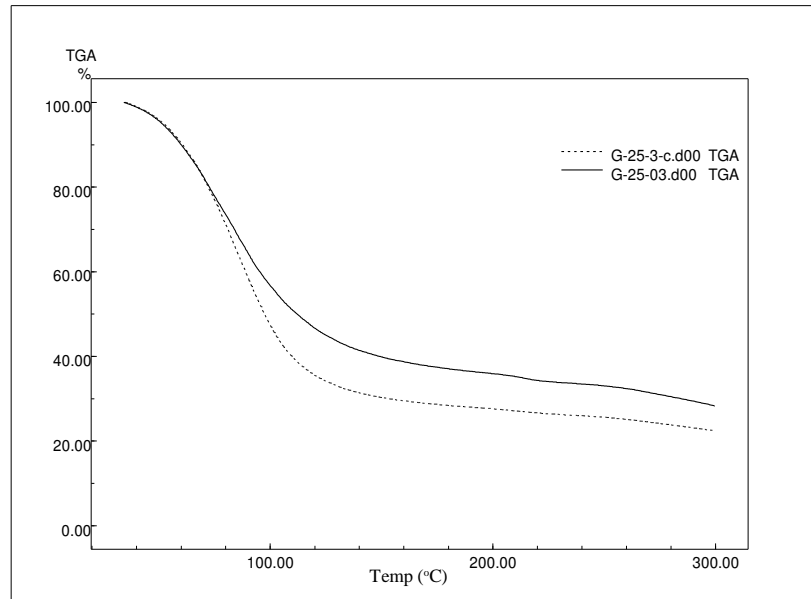
d- Curvas termogravimétricas dos doadores final 01, irradiada com 50 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



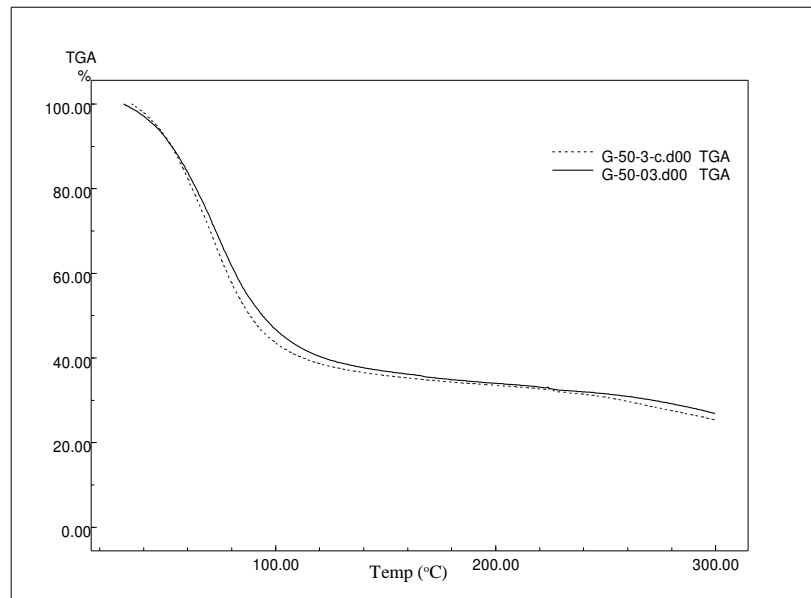
e- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, não irradiada (controle). A linha cheia representa a amostra não irradiada e a linha tracejada o controle específico.



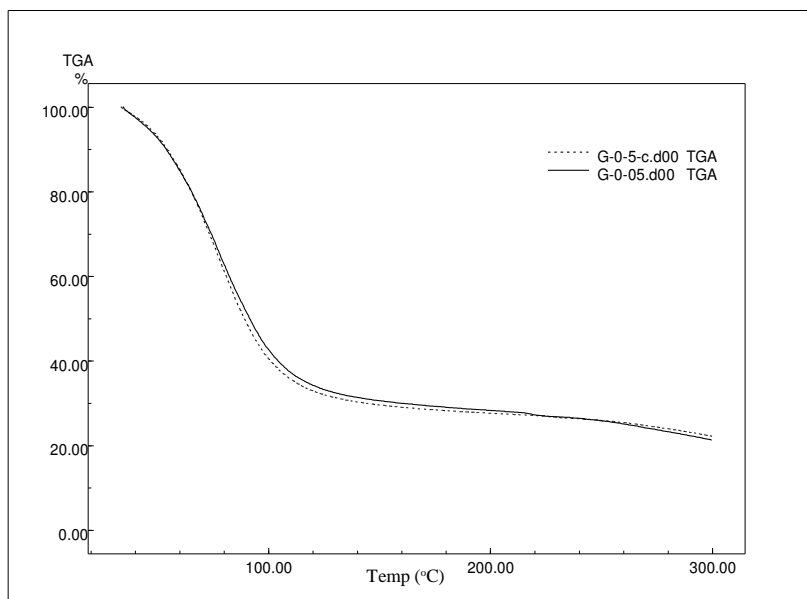
f- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, irradiada com 15 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



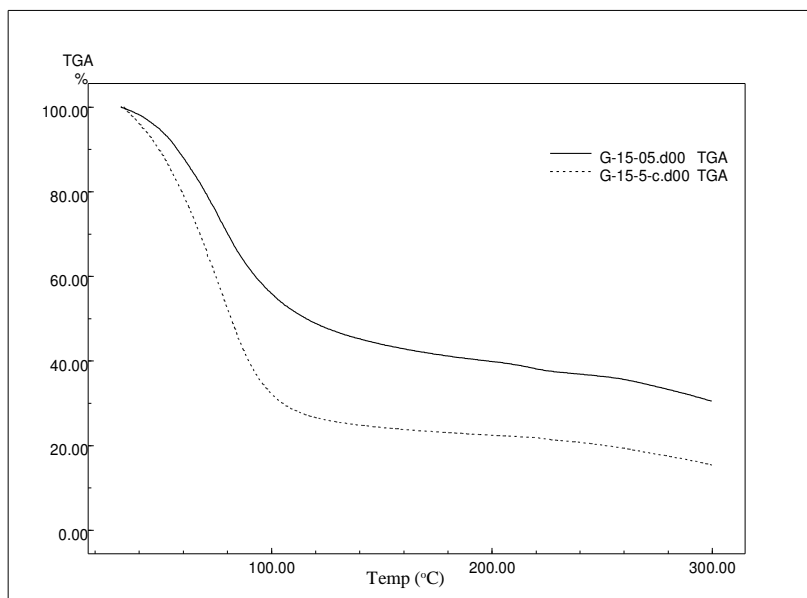
g- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, irradiada com 25 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



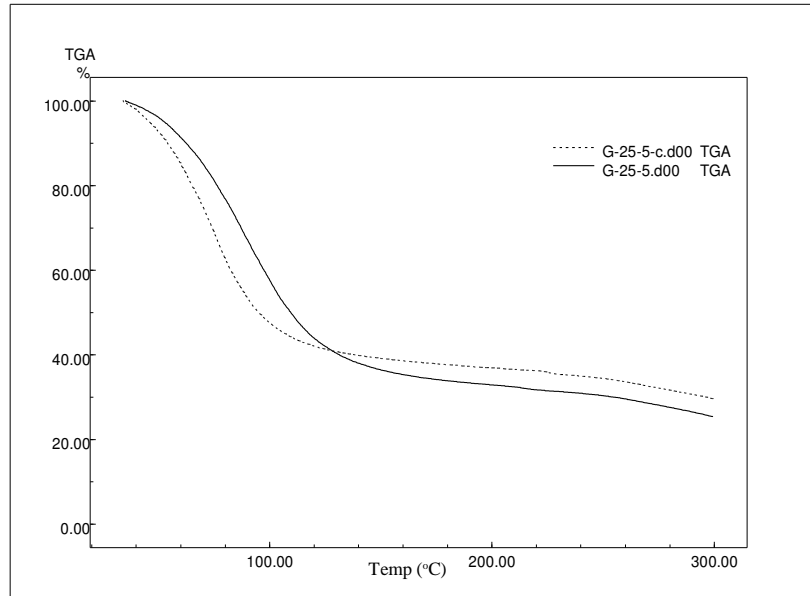
h- Curvas termogravimétricas dos doadores final 03, irradiada com 50 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



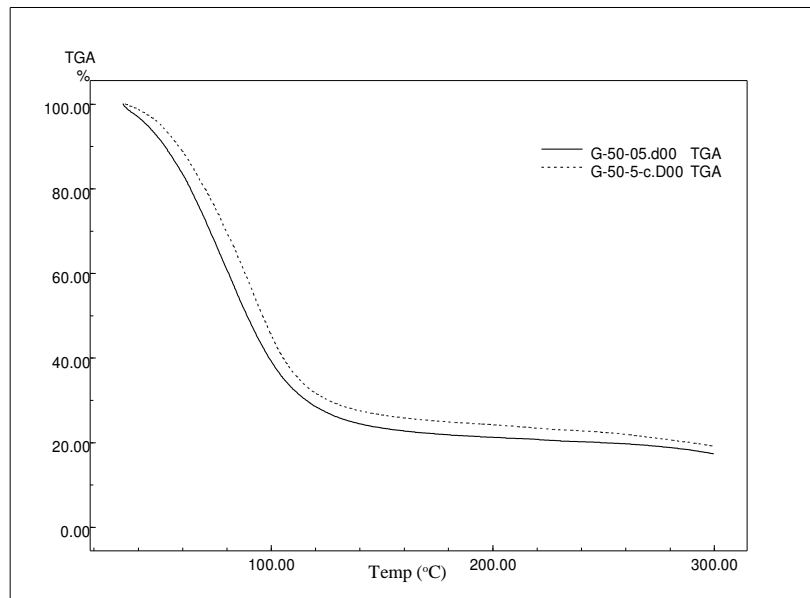
i- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, não irradiada (controle). A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



j- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, irradiada com 15 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



k- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, irradiada com 25 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.



l- Curvas termogravimétricas dos doadores final 05, irradiada com 50 kGy. A linha cheia representa a amostra irradiada e a linha tracejada o controle específico.

ANEXOS

ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética do Serviço de Verificação de Óbitos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SVO-FMUSP).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL

**Manifestação prévia a respeito dos aspectos técnicos
relacionados ao estudo para pesquisa científica**

Título da pesquisa: Estudo dos efeitos da radiação ionizante em cartilagem costal humana.

Responsável: Antonio Carlos Martinho Junior

Em relação aos aspectos técnicos relacionados ao estudo para pesquisa científica mencionada acima, informamos não haver impedimento do ponto de vista técnico e nem risco de mutilação.

São Paulo, 27 de março de 2007

Assinatura manuscrita em tinta azul, com uma letra inicial 'C' muito grande e decorativa.

Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci

ANEXO B- Aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen).



Parecer - Projeto Nº 105/CEP-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa "**Estudo dos efeitos da radiação ionizante em cartilagem costal**", de responsabilidade da pesquisadora **Dra. Mônica Beatriz Mathor** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho, em CD ou disquete, deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 11 de maio de 2005

Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira
Coordenadora do CEP-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Travessa "R", Nº 400 - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Telefone: (011) 3816-9381 - Fax (011) 3816-9123
E-mail: mmvieira@ipen.br