INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Avaliação morfofuncional de pele humana conservada em glicerol e submetida à radiação gama: estudo em camundongos atômicos

Fabiana de Andrade Bringel

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:

Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor

SÃO PAULO

2011

A DEUS,

“Eu pedi Força. E Deus me deu dificuldades para me fazer forte...

Eu pedi Sabedoria. E Deus me deu problemas para eu resolver...

Eu pedi Prosperidade. E Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar...

Eu pedi Coragem... E Deus me deu perigo para eu superar...

Eu pedi Amor... E Deus me deu pessoas com problemas para eu ajudar...

Eu pedi Favores. E Deus me deu Oportunidades...

Eu não recebi nada do que pedi.

Mas eu recebi tudo de que precisava...

Autor desconhecido

A meus pais Sinval e Dione

... por serem meu suporte, exemplos de amor, de união, de
coragem, de força e pela oportunidade da vida.

A minha sogra Maria José

... por ter assumido o papel de mãe durante as minhas ausências.

A meu esposo Carlos

... pela paciência, persistência, compreensão, apoio, amor
e por ser pai dos meus filhos.

A meus filhos Guilherme e Breno

... por serem o sentido da minha vida e meus maiores objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares e À Fundação de Medicina Tropical

Pela oportunidade concedida.

À Prof. Dra. Monica Beatriz Mathor

Pelo carinho, apoio, incentivo, persistência, paciência, pelo exemplo de profissionalismo e pelos ensinamentos que foram essenciais para a elaboração da tese e para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Eddy Segura Pino

Cujos conselhos e ensinamentos foram essenciais para a construção dessa tese.

Ao Dr. Cesar Isaac

Pela colaboração com os procedimentos cirúrgicos, recomendações e por transmitir seus conhecimentos dentro da área médica.

Ao Prof. Dr. Anderson Zanardi de Freitas

Pela colaboração com informações e análises por Tomografia de Coerência Óptica.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ferreira de Oliveira

Pelas valiosas informações e colaboração nas análises histológicas.

A todos os funcionários do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares em especial ao Sr. Fernando Moreira e ao Prof. Dr. José Carlos Bressiani

Por todo apoio concedido.

Aos meus mestres: Profa. Dra. Nanci do Nascimento, Prof. Dr. Luís Antônio Albiac Terremoto, Prof. Dr. Afonso Rodrigues de Aquino, Prof. Dr. Alberto Saburo Todo e Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

À técnica Maria Neide Ferreira Mascarenhas

Pela dedicação e carinho com que cuidou dos “nossos” animais.

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira

Pela valiosa ajuda na irradiação das amostras de pele humana.

Aos meus amigos e companheiros do IPEN: Daniele Yoshito, Tiago Luis de Almeida, Antonio Carlos Martinho Junior, Silvana Cereijido Altran, Stefany Plumeri Santin, Bianca da Silva Sufi, Selma Cecília Bourroul, Fernando Augusto Neves Soares e Rodrigo Crespo Mosca

Cuja colaboração, conselhos e amparo nas horas difíceis tornaram possíveis a conclusão dessa tese.

Aos meus amigos e companheiros da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins: André Machado de Senna, Rosa Maria Machado de Senna, Hebert Lima Batista, Adriane de Andrade, Luis Fernando D’Albuquerque e Castro, Valeria Rita Correa, Fernanda Villibor Xavier, Anelise Ribeiro P. Alencar, Anelise Kappes Marques, Sílvio Carneiro da Cunha Filho, Anette Kelsei Partata, Walter Ata Rodrigues Bittencourt Júnior, Ruth Cipriano Milhomem e Rosangela do Socorro Pereira Ribeiro

Pelo companheirismo, pelo apoio e por todos os momentos vivenciados juntos.

A toda equipe do Laboratório Cobra e do Laboratório de Anatomopatologia do Hospital e Maternidade Dom Orione da cidade de Araguaína/TO

Pelo carinho, solicitude e colaboração.

Ao Prof. Dr. Aparecido Osdimir Bertolin

Pela amizade, carinho, confiança, apoio e por tornar possível a concretização desse sonho.

Ao Prof. Nicolau Carvalho Esteves e ao Prof. Fábio Borges de Andrada

Pelo apoio incondicional, reconhecimento, pela minha formação como docente e oportunidade de colocar em prática todo conhecimento adquirido.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Duarte de Souza

Cuja oportunidade para o crescimento pessoal e profissional, apoio e conselhos jamais serão esquecidos.

Ao Prof. Dr. João Lopes Toledo Filho e ao Prof. Dr. Antônio Carlos Neder

Cujo carinho, apoio, conselhos foram essenciais para a realização dos meus ideais.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Econômicas, Humanas e de Saúde - ITPAC

Pela fraternal amizade, incentivo e cooperação.

A todos os meus alunos

Pela colaboração e compreensão.

“O segredo do sucesso é a constância do propósito”.

Benjamin Disraeli

AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DE PELE HUMANA CONSERVADA EM GLICEROL E SUBMETIDA À RADIAÇÃO GAMA: ESTUDO EM CAMUNDONGOS ATÍMICOS

Fabiana de Andrade Bringel

RESUMO

Extensas lesões na pele expõem o organismo a uma série de agentes agressores, dificultando a reparação espontânea da pele e muitas vezes levando o paciente a óbito. Nesse caso, se não houver áreas doadoras de autoenxertos, pode-se utilizar aloenxertos. Neste tipo de enxerto, os tecidos são processados em Bancos de Tecidos, onde se pode empregar a radiação ionizante como método de esterilização. De acordo com estudos *in vitro*, a radiação gama, em doses acima de 25 kGy, provoca desestruturação das fibrilas de colágeno I da derme conservada em glicerol na concentração de 85%, reduzindo significativamente a resistência à tração dos tecidos irradiados. Observações clínicas sugerem, ainda, integração mais rápida da derme humana, conservada em glicerol e submetida à radiação ionizante, com os tecidos do receptor, quando comparada à derme somente conservada em glicerol. Para verificar se essas alterações relatadas *in vitro*, comprometeriam o emprego *in vivo*, de amostras de pele humana, submetidas à radiação gama, foram realizados transplantes de peles humanas, irradiadas ou não, em camundongos Nude. A pele dos camundongos foi submetida à análise macroscópica, imagens de tomografia de coerência óptica, histologia e ensaios biomecânicos. Foi possível concluir que os enxertos irradiados a 25 kGy promoveram uma contração inicial maior, mas essa alteração não interferiu na dimensão da área final de reparação, ainda, os animais que receberam esses enxertos apresentaram mais rápido fechamento da ferida em comparação com os demais, além disso o emprego de enxertos irradiados (25 e 50 kGy) promoveu a formação de um processo de reparação mais organizado e sem efeitos significantes nas propriedades biomecânicas.

**MORPHOFUNCTIONAL EVALUATION OF HUMAN SKIN PRESERVED IN
GLYCEROL AND EXPOSED TO GAMMA RADIATION: A STUDY IN ATHYMIC
MICE**

Fabiana de Andrade Bringel

ABSTRACT

Extensive skin lesions expose the body to damaging agents, which makes spontaneous regeneration difficult and, in many cases, leads to the death of the patient. In such cases, if there are no donating areas for autograft, allografts can be used. In this type of graft, tissue is processed in tissue banks, where ionizing radiation can be used as a sterilization method. According to *in vitro* studies, gamma radiation, in doses higher than 25 kGy, induces alterations in tissue preserved in glycerol at 85%, significantly reducing the tensile strength of irradiated tissue. Clinical observation also suggests a faster integration of such human dermis with the receptor's tissue. In order to assess if the alterations observed *in vitro*, would compromise *in vivo* use, transplants of human tissue, irradiated or not, were performed in Nude mice. The skin of the mice was subjected to macroscopic analysis, optical coherence tomography imaging, histological and biomechanical assays. It was possible to conclude that grafts irradiated with 25 kGy promoted greater initial contraction, without alteration of the final dimensions of the repair area, also displaying a faster closing of the wound. Moreover, the use of irradiated grafts (25 and 50 kGy) enabled the formation of a more organized healing process without significant effects on biomechanical properties.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Biologia da pele humana	17
3.1.1 Epiderme	17
3.1.2 Lâminas basais e membranas basais	19
3.1.3 Derme	20
3.2 Fisiologia da pele	27
3.3 Propriedades biomecânicas da pele humana	28
3.4 Reparação tecidual	30
3.4.1 Reparação tecidual fisiológica	31
3.4.2 Reparação patológica	36
3.4.3 Enxertos	38
3.4.4 Reparação após o uso de enxertos autógenos	38
3.4.5 Reparação após transplante de pele alógena ou xenógena	40
3.5 Bancos de tecidos	41
3.5.1 Processamento e armazenamento	42
3.5.2 Tipos de esterilização de tecidos biológicos	43
3.6 Radiação ionizante	45
3.6.1 Raios gama e sua interação com a matéria	46
3.6.2 Esterilização por radiação ionizante	47
3.6.3 Doses apropriadas para esterilização de tecidos biológicos	48

3.6.4 Efeitos biológicos do uso de radiação ionizante na esterilização de tecidos	50
3.6.5 Irradiador de Cobalto-60 (^{60}Co)	53
3.7 Camundongos Nude	55
3.8 Comparação da reparação entre camundongos Nude e humanos	58
3.9 Cola de fibrina.....	60
3.10 Histologia.....	61
3.10.1 Microscopia de luz.....	62
3.11 OCT	62
3.12 Biomecânica	64
3.13 Análise Estatística.....	65
3.13.1 Análise de Variância (ANOVA)	65
3.13.2 Teste de Tukey.....	66
3.13.3 Correção de Bonferroni	66
3.13.4 Teste t para observações independentes	67
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
4.1 Materiais, instrumentos e equipamentos.....	69
4.1.1 Obtenção das amostras.....	69
4.1.2 Materiais, instrumentos e equipamentos para os ensaios in vivo.....	69
4.1.3 Equipamento utilizado para a avaliação por Tomografia de coerência óptica ..	73
4.1.4 Materiais e equipamentos utilizados para os ensaios biomecânicos.....	73
4.1.5 Histologia.....	74
4.2 Métodos.....	75
4.2.1 Preparação das amostras.....	76

4.2.2 Irradiação do material biológico	76
4.2.3 Separação dermoepidérmica.....	77
4.2.4 Protocolo cirúrgico.....	77
4.2.5 Sacrifício dos animais.....	78
4.2.6 Medição das áreas residuais da reparação.	79
4.2.7 Remoção das amostras de pele dos camundongos	79
4.2.8 Tomografia de coerência óptica (OCT).....	79
4.2.9 Ensaios biomecânicos de resistência à tração.....	80
4.2.10 Histologia.....	81
4.2.11 Tratamento estatístico e interpretação dos dados	82
5. RESULTADOS	83
5.1 Efeito da irradiação na separação dermoepidérmica com dispase a 2,5% (in vitro).....	83
5.2 Caracterização morfológica de pele ou derme humana transplantada em camundongos Nude.....	85
5.2.1 Caracterização morfológica de pele humana transplantada em camundongos Nude	85
5.2.1.1 Avaliação macroscópica	85
5.2.1.2 Avaliação das imagens de tomografia de coerência óptica (OCT)	89
5.2.1.3 Microscopia de luz dos cortes histológicos da pele de camundongos onde foi realizado transplante de pele humana	89
5.2.2 Caracterização morfológica de derme humana transplantada em camundongos Nude	92

5.2.2.1 Microscopia de luz dos cortes histológicos da pele de camundongos onde foram realizados transplantes de derme humana	92
5.3 Avaliação Biomecânica.....	92
5.3.1 Ensaio biomecânico com corpo de prova de 50 mm.....	94
5.3.2 Ensaio biomecânico com corpo de prova de 35 mm.....	96
6. DISCUSSÃO	98
7. CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXO A - Ofício do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	120
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN	121
ANEXO C – Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo	122

1. INTRODUÇÃO

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, correspondendo a 16% do peso corporal (Junqueira & Carneiro, 2004). É constituída pela epiderme e pela derme, que são unidas entre si por uma estrutura altamente especializada denominada membrana basal ou junção dermoepidérmica (Junqueira & Carneiro, 2004). A pele humana desempenha múltiplas funções: proteção, regulação da temperatura, percepção sensorial, excreção e síntese de vitamina D, colesterol e melanina (Gartner & Hiatt, 2007).

Extensas lesões na pele expõem o organismo a uma série de agentes agressores presentes no meio ambiente, comprometendo a sua recuperação. É o caso, de queimaduras graves, extensas e profundas, que destroem a epiderme, a derme e tecidos subcutâneos, dificultando a reparação espontânea da pele e muitas vezes, levando o paciente a óbito. A redução da mortalidade está, também, relacionada à eficácia da proteção precoce da região queimada, de modo a diminuir a perda de fluídos, evitar a hipotermia, possibilitar o controle de infecções (Herndon, 1997) e permitir a reparação adequada da pele (Borojevic & Serricella, 1999).

O fechamento da ferida é uma condição primordial na recuperação do paciente e quanto mais precoce a sua realização, mais chances de sobreviver o paciente terá. Se a extensão da lesão comprometer mais de 50% de superfície corporal queimada, com profundidade de 2° e de 3° graus, não haverá área doadora suficiente para se realizar o autoenxerto (enxerto obtido do mesmo indivíduo). Desse modo, é necessário o emprego de substitutos cutâneos, sintéticos ou biológicos (Barreto, 2006).

A grande demanda por materiais adequados na prática clínica, para uso como substitutos cutâneos eficientes, motivou pesquisas com novos materiais sintéticos e biológicos. Apesar dos avanços no campo da bioengenharia de tecidos, os aloenxertos (obtidos de indivíduos geneticamente diferentes, mas da mesma espécie) de pele têm sido preferencialmente utilizados na cobertura

temporária de queimaduras extensas e profundas, em detrimento dos curativos sintéticos ou de biomateriais. Dentre os materiais biológicos, o uso dos aloenxertos de pele, preservados em glicerol, resulta em efeitos benéficos semelhantes ao dos enxertos autógenos (Barreto, 2006).

A pele alógena é obtida de doador em morte encefálica (doador multiórgão) ou após parada cardíaca, disponibilizada em bancos de tecidos (Herson & Mathor, 2006).

Os Bancos de Tecidos devem garantir a integridade e esterilidade dos tecidos armazenados. Uma vez que os métodos convencionais de processamento para conservação dos tecidos (tais como: congelamento, liofilização, imersão em glicerol concentrado, etc.), não são esterilizantes, faz-se necessário adicionar ao processo algum método de esterilização (Herson & Mathor, 2006).

A radiação ionizante é um método de esterilização que não produz resíduos radioativos, não origina substâncias tóxicas e também não oferece risco de recontaminação, pois os tecidos podem ser esterilizados na embalagem final, além de serem irradiados à temperatura de armazenamento. Apesar de não haver necessidade de quarentena, período ao qual esse tecido deve ser submetido para liberação de resíduos químicos, como por exemplo, no caso de utilização do óxido de etileno, persiste a necessidade de liberação destes tecidos só após o resultado do teste de confirmação de esterilidade (Herson & Mathor, 2006).

Os efeitos da radiação variam de acordo com o tecido, com o tipo de irradiação, com a taxa de dose e com a dose a ele aplicada. Especificamente na pele, os efeitos da radiação ionizante podem provocar alterações como: morte das células (Trott *et al.*, 1999), alteração funcional na permeabilidade da camada córnea, aumento de diâmetro das fibrilas de colágeno (Leontiou *et al.*, 1993), modificação da arquitetura (Ottani *et al.*, 2001) e da organização molecular da fibrila de colágeno na derme irradiada (Tzaphlidou, 2002). Segundo Bourroul (2004), a radiação ionizante, em doses acima de 25 kGy, provoca, *in vitro*, significativa alteração na estrutura das fibrilas de colágeno tipo I da derme de pele conservada em glicerol concentrado. A degradação do colágeno interfere nas características biomecânicas da pele, uma vez que essa proteína fibrosa, inelástica e flexível é responsável pela integridade e resistência às tensões multidirecionais a que o tecido pode ser submetido (Ottanni *et al.*, 2001). Apesar das alterações detectadas *in vitro* (Bourroul, 2004) e observações clínicas

(Rosales *et al.*, 2004), não há publicações de estudos *in vivo* que demonstrem se essas modificações no sistema colágeno da derme poderiam comprometer a utilização da mesma como aloenxerto.

Ainda observações clínicas feitas por Herson¹ (2006) sugerem uma maior integração da derme humana, conservada em glicerol e submetida à radiação ionizante, com os tecidos do receptor, quando comparada à derme somente conservada em glicerol e não exposta à radiação ionizante, mas a falta de estudos complementares *in vivo* indica a necessidade de avaliação do comportamento, a médio e longo prazo, para confirmação desses resultados.

---

¹ HERSON, M.R. Utilização clínica de aloenxerto de pele humana glicerolada e irradiada. Comunicação pessoal [2006].

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características morfofuncionais de pele humana conservada em altas concentrações de glicerol e esterilizada por radiação ionizante de ^{60}Co , desepidermizada ou não, por meio de análise macroscópica, imagens de tomografia por coerência óptica, histologia e ensaios biomecânicos, após enxertos em camundongos Nude como modelo experimental.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biologia da pele humana

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Dependendo da espessura da epiderme, a pele é classificada como fina ou espessa. A pele espessa é encontrada na palma das mãos e na planta dos pés, sendo o restante do corpo protegido por pele fina. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, que não faz parte da pele, entretanto a mantém unida a órgãos subjacentes (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.1.1 Epiderme

A epiderme humana possui espessura de 0,07 a 0,12 mm e contribui pouco com as propriedades mecânicas da pele (Silver *et al.*, 2001). Ela é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Neste tecido são encontrados quatro tipos celulares: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel cujas funções são apresentadas na TAB. 1 (Rabe *et al.*, 2006). Os queratinócitos formam a maior população de células e estão distribuídos em quatro camadas na pele fina (FIG. 1A) e cinco camadas na pele espessa (FIG. 1B); os demais tipos celulares estão espalhados por entre os queratinócitos em locais específicos (Gartner & Hiatt, 2007).

TABELA 1 - Tipos celulares e suas respectivas funções (adaptado de Rabe *et al.*, 2006)

Tipo celular	Funções
Queratinócito	Barreira mecânica, produção de citocinas e sinalização celular
Melanócito	Síntese de pigmentos, proteção contra ações nocivas dos raios ultravioletas
Células de Langerhans	Apresentação de antígenos
Células de Merkel	Síntese de catecolaminas e sensibilidade tátil

FIGURA 1 – Corte de pele humana - microscopia de luz. Em (A) podem ser notadas as camadas histológicas de pele fina (coloração HE). Aumento: 400x. Em (B) podem ser notadas as camadas histológicas de pele espessa (coloração tricrômio). Aumento: 400x (adaptado de Slomianka, 2009).

A primeira camada da epiderme é conhecida como basal. Nela encontram-se células cilíndricas ou cubóides, basófilas, em íntimo contato com a membrana basal. Devido à presença de células-tronco, essa camada também é conhecida como germinativa. A camada basal é responsável pela renovação da epiderme, uma vez que juntamente com a camada seguinte (camada espinhosa), possuem queratinócitos com intensa atividade mitótica (Gartner & Hiatt, 2007). A variação da intensidade de multiplicação dessas células deve-se à predisposição genética, ao local, à idade da pessoa e a estímulos exógenos, o que permite a renovação fisiológica do epitélio e a re-epitelização de áreas cruentas, um processo que dura de 15 a 30 dias (Herson, 1999; Junqueira & Carneiro, 2004).

A camada espinhosa, formada por células desde poliédricas a pavimentosas, possui queratinócitos em mitose, mas em menor número que na camada anterior (Gartner & Hiatt, 2007). A presença de tonofilamentos e desmossomos tem importante função na manutenção da união entre as células da epiderme e na resistência ao atrito (Junqueira & Carneiro, 2004). Neste nível, são expressos os primeiros produtos da diferenciação celular definitiva, como a involucrina (Potten, 1974).

Na terceira camada, denominada granulosa, os queratinócitos assumem a forma pavimentosa e apresentam grânulos citoplasmáticos basófilos de queratoialina. O conteúdo desses grânulos é liberado por exocitose, formando uma camada de substância rica em lipídeos sobre a membrana plasmática, impedindo a nutrição das células da camada seguinte (camada lúcida) e impermeabilizando a epiderme (Gartner & Hiatt, 2007).

A camada lúcida, mais evidente na pele espessa, é constituída por uma delgada camada de células pavimentosas, acidófilas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas sofreram digestão por enzimas lisossômicas. No citoplasma dessas células podem ser observados numerosos filamentos de queratina (Junqueira & Carneiro, 2004).

Por fim, na camada mais superficial da epiderme, conhecida como camada córnea, os queratinócitos são pavimentosos e queratinizados, não apresentam núcleo nem organelas citoplasmáticas, mas apresentam numerosos filamentos de queratina. As células que estão mais afastadas da superfície ainda apresentam desmossomos, mas as mais superficiais não apresentam esse tipo de junção intercelular e por isso se desprendem facilmente da epiderme (Gartner & Hiatt, 2007).

3.1.2 Lâminas basais e membranas basais

Na junção dermoepidérmica há uma estrutura denominada lâmina basal. Essa estrutura só é visível por meio do microscópio eletrônico, aparecendo como uma camada elétron-densa cuja espessura é de 20-100 nm, formada por uma delicada rede de delgadas fibrilas (lâmina densa). As lâminas basais podem ainda apresentar camadas elétron-lucentes em um ou em ambos os lados da lâmina densa, chamadas de lâminas lúcidas. Os componentes principais das lâminas basais são: colágeno tipo IV, as glicoproteínas laminina e entactina e proteoglicanas. A composição molecular precisa desses componentes varia nos diversos tecidos e mesmo dentro do mesmo tecido. A lâmina basal se prende ao tecido conjuntivo por meio de fibrilas de ancoragem constituídas por colágeno tipo VII. Lâminas basais não só separam células epiteliais do tecido conjuntivo subjacente, mas também onde outros tipos celulares entram em contato com este, tais como células musculares, células adiposas e células de Schwann, além de estarem presentes também entre camadas epiteliais adjacentes ou muito

próximas, como nos alvéolos pulmonares e nos glomérulos renais (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os componentes das lâminas basais são secretados pelas células epiteliais, musculares, adiposas e de Schwann, em alguns casos, fibras reticulares, produzidas por células do tecido conjuntivo, estão intimamente associadas à lâmina basal, constituindo a lâmina reticular (Gartner & Hiatt, 2007).

As lâminas basais, dentre as suas várias funções, participam no processo de reparo, proliferação, diferenciação e migração celular; mantêm a polaridade e diferenciação das camadas celulares da pele, servem como barreira à metástase das células tumorais (Oliveira *et al.*, 2002) e à transferência de materiais; serve como suporte mecânico à epiderme; como estrutura de adesão dermoepidérmica (Briggaman & Wheeler, 1975); ligam-se a fatores de crescimento; influem no metabolismo celular e organizam as proteínas nas membranas plasmáticas de células adjacentes (Junqueira & Carneiro, 2004).

O nome membrana basal é usado para denominar uma camada situada abaixo de epitélios, visível ao microscópio de luz e que se cora pela técnica de ácido periódico-Schiff (PAS). A membrana basal é geralmente formada pela fusão de duas lâminas basais ou de uma lâmina basal e uma lâmina reticular por essa razão é mais espessa que uma lâmina basal isolada. Nem todos os pesquisadores concordam com o uso dos termos membrana basal e lâmina basal, e ambos são às vezes usados indiscriminadamente, causando bastante confusão (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.1.3 Derme

Abaixo da epiderme, encontra-se a derme, cuja espessura varia de 1 a 4 mm (Silver *et al.*, 2001), composta por tecido conjuntivo (FIG. 2). Do ponto de vista estrutural, os componentes do tecido conjuntivo podem ser divididos em: células residentes e migratórias, além de matriz extracelular. Algumas células deste tecido são formadas localmente (residentes) e permanecem no tecido conjuntivo (fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos e células adiposas). Os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e basófilos) são constituintes normais dos tecidos conjuntivos, vindos do sangue por migração (diapedese) através da parede de capilares e vênulas. O processo de diapedese aumenta durante as invasões locais de microorganismos, uma vez que os leucócitos são

células especializadas na defesa (Junqueira & Carneiro, 2004). As funções de cada um desses tipos celulares são apresentadas abaixo (TAB. 2).

TABELA 2 - Funções das células do tecido conjuntivo (Adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004)

Tipo celular	Atividade mais representativa	Função mais representativa
Fibroblasto	Produção de proteínas fibrosas e substância fundamental	Estrutural
Macrófago	Secreção de citocinas e outras moléculas para outras células	Defesa, fagocitose e apresentação de antígenos
Mastócitos e basófilos	Liberação de moléculas farmacologicamente ativas	Defesa (participação em reações alérgicas)
Plasmócito	Produção de anticorpos	Imunológica (defesa)
Célula adiposa	Estocagem de gordura neutra	Reserva de energia, produção de calor
Neutrófilo	Fagocitose de antígenos	Defesa
Eosinófilos	Participação em reações alérgicas; imunológica (defesa)	Defesa
Linfócitos (vários tipos)	Produção de células imunocompetentes	Imunológica (defesa)

A matriz extracelular é composta por líquido tecidual (extracelular), substância fundamental e fibras. A substância fundamental é um complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanas e proteoglicanas) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina, entre outras), que se liga a proteínas receptoras (integrinas) presentes na superfície de células, bem como a outros componentes da matriz, fornecendo, desse modo, força tênsil e rigidez à matriz. Além disso, preenche os espaços entre as células e fibras do tecido conjuntivo e, sendo viscosa, atua ao mesmo tempo como lubrificante e como barreira à penetração de microorganismos. As fibras do tecido conjuntivo são as elásticas, reticulares e colágenas. As fibras colágenas e redes

de fibras elásticas sustentam a derme e a une ao tecido subcutâneo ou hipoderme (Junqueira & Carneiro, 2004).

A superfície da derme é irregular, onde se observam saliências, as papilas dérmicas, que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme, aumentando a resistência a pressões e atrito do tecido. A mesma possui duas camadas de limites pouco distintos (FIG. 2): a papilar (superficial) e a reticular (profunda). A primeira camada, a derme papilar, é delgada, contém numerosos fibroblastos e abundante substância fundamental, formando as papilas dérmicas e é constituída por tecido conjuntivo frouxo, com fibras colágenas tipo III; fibras elásticas e fibrilas de colágeno tipo IV, essas últimas ligam a epiderme à derme; além das células habituais do tecido conjuntivo (Gartner & Hiatt, 2007). A camada papilar corresponde a 10% da espessura da derme. A camada reticular é mais espessa, contém tecido conjuntivo denso não-modelado, redes de fibras elásticas entrelaçadas a fibras colágenas tipo I, estas são mais espessas e dispostas, em sua maior parte, paralelamente à epiderme. Contém ainda, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e estruturas derivadas da epiderme (folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas) (Junqueira & Carneiro, 2004).

FIGURA 2 - Corte histológico de pele fina humana - microscopia de luz (coloração HE). Podem ser vistas as camadas papilar e reticular da derme (100x) (adaptado de Slomianka, 2009).

3.1.3.1 Colágenos

Os colágenos constituem uma família de proteínas produzidas por diferentes tipos de células (fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e osteoblastos). Essa família de proteínas é a mais abundante do organismo, representando 30% do seu peso seco. Os diferentes tipos de colágenos se distinguem entre si pela composição química, características morfológicas, distribuição, funções e patologias. De acordo com sua estrutura e função, eles podem ser classificados em colágenos que formam longas fibrilas, colágenos associados a fibrilas, colágenos que formam rede e colágenos de ancoragem (Sampaio & Rivitti, 2007).

A família dos colágenos é composta por mais de vinte tipos geneticamente diferentes, sendo que os colágenos mais frequentes na derme (FIG. 3) são os tipos I, II, III, IV, V, VI, VII, XII e XIII (Sampaio & Rivitti, 2007).

FIGURA 3 – Representação de alguns dos tipos de colágenos presentes na membrana basal (Oliveira-Júnior *et al.*, 2009).

O colágeno tipo I forma fibras espessas, mecanicamente estáveis e que são responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão. Essas fibras representam 80 a 90% do colágeno da derme (Sampaio & Rivitti, 2007).

O colágeno tipo II forma apenas fibrilas, estruturas que não são visíveis à coloração hematoxilina-eosina (HE). Essas fibrilas estão presentes logo abaixo da membrana basal (ou lâmina basal), aparentemente participando da fixação da epiderme à derme (Sampaio & Rivitti, 2007).

O colágeno tipo III corresponde de 8 a 12% do colágeno dérmico, concentrando-se na região papilar da derme e em contato com estruturas, tais como os vasos sanguíneos (Gartner & Hiatt, 2007; Junqueira & Carneiro, 2004; Sampaio & Rivitti, 2007). Esse tipo de colágeno forma fibras extremamente finas, também denominadas de fibras reticulares e que não são visíveis à coloração HE. Devido ao seu diâmetro reduzido e à disposição frouxa, essas fibras criam uma rede flexível em órgãos que são sujeitos a mudanças fisiológicas de forma ou volume, como as artérias, baço, útero e camadas musculares do intestino (Junqueira & Carneiro, 2004).

O colágeno tipo IV está presente nas membranas basais de todos os tecidos. Na pele, participa da estrutura da lâmina densa (Sampaio & Rivitti, 2007).

O colágeno tipo V está presente na lâmina densa, em distribuição paralela ao colágeno tipo IV. Também está presente na pele, ao nível de fibras colágenas intersticiais e nas membranas basais dos vasos cutâneos (Sampaio & Rivitti, 2007).

Colágeno tipo VI é, também, abundante na pele, sob a forma de microfibrilas (Sampaio & Rivitti, 2007).

Colágeno tipo VII é o maior componente das fibrilas de ancoragem, que se estendem da membrana basal à derme papilar (Sampaio & Rivitti, 2007).

Os colágenos XII e XIII existem em pequenas quantidades na pele e suas funções não são conhecidas (Sampaio & Rivitti, 2007).

A síntese do colágeno, proteína que forma 95% das fibras do tecido conjuntivo da derme (Sampaio & Rivitti, 2007), começa nos ribossomos, os quais estão aderidos à membrana plasmática e, a partir daí, crescem entrando no retículo endoplasmático rugoso (RER), onde se formam três cadeias polipeptídicas alfa, contendo aminoácidos terminais (pró-peptídeos). No RER, prolina e lisina sofrem hidroxilação, algumas lisinas são glicosiladas. Cada cadeia alfa se combina com mais duas outras formando uma molécula helicoidal de tripla fita ligada por pontes de hidrogênio (H) e denominada de pró-colágeno. O pró-colágeno é lançado para fora do RER em vesícula secretora que leva a molécula para o meio extracelular, nesse local, há remoção da sequência final (peptídeos de registro) da molécula de pró-colágeno pela enzima pró-colágeno peptidase sintetizada pela própria célula secretora do pró-colágeno (FIG. 4).

FIGURA 4 - Representação esquemática mostrando as etapas intracelulares da síntese de colágeno e a fibrilogênese que ocorre no espaço extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004).

Essa clivagem transforma o pró-colágeno solúvel em tropocolágeno insolúvel, o qual se agrega formando fibrilas de colágeno. Nos colágenos tipos I, II e III as moléculas de tropocolágeno se agregam em microfibrilas que se juntam para formar fibrilas. Nos colágenos dos tipos I e III as fibrilas se agregam para formar fibras e feixes de colágeno. O colágeno do tipo II forma fibrila, mas não forma fibra, enquanto o colágeno do tipo IV, presente nas lâminas basais, não forma fibrilas e nem fibras e sim, uma trama. A observação das fibras e feixes de colágeno é feita por meio de microscópio de luz e, as fibrilas de colágeno,

somente podem ser individualizadas com auxílio do microscópio eletrônico (Junqueira & Carneiro, 2004). (FIG. 5)

FIGURA 5 - Desenho esquemático onde se observa como as moléculas de tropocolágeno se agregam para formar fibrilas (1 a 3), fibras (4) e feixe (5) (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.1.3.2 Sistema elástico

As fibras elásticas são microfibrilas que, na derme papilar, orientam-se perpendicularmente à epiderme e, na derme reticular, mostram-se mais espessas e dispostas paralelamente à epiderme. As fibras elásticas maduras compõem-se de um núcleo central amorfo de elastina, circundado por um envoltório de microfibrilas tubulares de 10 nm de diâmetro, cujo componente principal é a fibrilina. A pele humana possui grande quantidade de fibras elásticas. Segundo Sampaio & Rivitti (2007), o sistema elástico da pele compreende os seguintes tipos de fibras elásticas:

1. Fibras oxitalânicas: são as mais superficiais e dispõem-se perpendicularmente à junção dermoepidérmica, estendendo-se até o limite entre a derme papilar e a reticular. São compostas por feixes de microfibrilas revestidos por elastina solúvel.
2. Fibras eulaunínicas: ocupam posição intermediária na derme, conectando as fibras elásticas da derme reticular. Possuem características intermediárias entre as fibras oxitalânicas e as fibras elásticas maduras, especialmente em relação à quantidade de elastina que possuem.

3. Fibras elásticas maduras: contêm cerca de 90% de elastina e ocupam a derme reticular, sendo as fibras elásticas que estão situadas na porção mais profunda da derme.

As fibras elásticas mais superficiais estão envolvidas, na ligação entre epiderme e derme e, as mais profundas, pelo seu maior teor de elastina, na absorção dos choques e distensões que se produzem na pele (Sampaio & Rivitti, 2007).

A elastina possui um similar, mas não idêntico conteúdo de aminoácidos, como os presentes no colágeno, o qual é de cerca de 33% glicina, 10-13% prolina e 24% alanina. Entretanto, é distinguido pela ausência de hidroxiprolina, metionina e outros aminoácidos (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.2 Fisiologia da pele

A pele desempenha múltiplas funções, dentre as quais, a mais importante é formar a barreira de proteção (impedindo a perda de líquidos, exercendo ação antimicrobiana, química, física, elétrica, térmica, etc.) às agressões externas. A camada córnea da epiderme protege contra a perda de água e contra o atrito. Através de suas terminações nervosas sensitivas, recebe constantemente informações sobre o ambiente e as envia ao sistema nervoso central. Por meio dos seus vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo, colabora na termorregulação do corpo. Suas glândulas sudoríparas participam da termorregulação e da excreção de várias substâncias. A epiderme produz melanina que tem função protetora contra os raios ultravioleta. Na pele se forma a vitamina D₃ pela ação da radiação ultravioleta do sol sobre precursores sintetizados no organismo (Junqueira & Carneiro, 2004).

A função de revestimento, diretamente relacionada às propriedades mecânicas da pele (elasticidade e plasticidade) envolve vários tipos de tecidos e líquidos, pois mantém a forma do corpo, permitindo movimentos sem que ocorra ruptura dos tecidos (Rabe *et al.*, 2006).

3.3 Propriedades biomecânicas da pele humana

As propriedades biomecânicas da pele variam entre diferentes indivíduos, regiões do corpo, e em diferentes idades, área doadora, orientação e dimensão do enxerto (Gouk *et al.*, 2008). Dependem principalmente das redes de fibras de colágeno e elastina, as quais constituem a matriz dérmica, com sua arquitetura entrelaçada e envolvida pela substância fundamental (Silver *et al.*, 2001).

A epiderme contribui pouco para as propriedades mecânicas, mas sua participação se deve às junções intercelulares e à tensão oferecida pelo citoesqueleto (Chistolini *et al.*, 1999).

Na derme, as fibras colágenas, que naturalmente se encontram espiraladas no estado de relaxamento, quando submetidas à força de tração, são estiradas na direção da força aplicada ao tecido, até um ponto limite em que as mesmas se alinham paralelamente umas às outras, aumentando a resistência à extensão adicional (Silver *et al.*, 2001).

As fibras elásticas da derme são, em parte, responsáveis pela tensão natural da pele. Quando essas fibras são submetidas ao estiramento excessivo crônico, podem sofrer fragmentação, o que resulta em perda da capacidade de retorno ao estado original, tornando a pele mais plástica (Silver *et al.*, 2001).

A substância fundamental, constituída por glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas, ocupa os espaços entre as fibras elásticas e colágenas, funcionando como lubrificante para esta microarquitetura móvel (Gartner & Hiatt, 2007).

Entremeadas às redes de colágeno e elastina estão outras três estruturas, os vasos sanguíneos, linfáticos e as fibras nervosas. Estas não contribuem para as propriedades físicas da pele, porém podem sofrer interferência quando as redes fibrosas são deformadas. Assim, sob tração excessiva continuada, a constrição dos vasos sanguíneos pode levar à necrose; a constrição dos nervos pode causar dor e a interrupção dos vasos linfáticos pode provocar edema. As redes fibrosas são transfixadas ainda por folículos pilosos, os quais provavelmente restringem a mobilidade da derme (Silver *et al.*, 2001).

Com fins descritivos as propriedades da pele são divididas em propriedades viscoelásticas, tensão cutânea e extensibilidade, dependendo da carga mecânica aplicada ao sistema.

Materiais elásticos recuperam sua dimensão ou forma inicial após uma deformação sem nenhum gasto energético. Por outro lado, materiais puramente plásticos cedem continuamente sob a ação de uma força e não retornam ao estado original espontaneamente após a retirada desta última, requerendo para isto uma força adicional. A pele apresenta uma combinação destas duas propriedades, sendo viscoelástica. Após uma deformação, retorna ao estado original pelo componente elástico; entretanto, nesta recuperação segue uma curva diferente, menos linear, devido ao consumo de parte da energia aplicada na pele. A energia é parcialmente dissipada no deslizamento das fibrilas de colágeno durante o alinhamento com a direção da força (Silver *et al.*, 2001).

O comportamento *stress-strain* (tração *versus* deformação) da pele é composto de três fases. Sob forças de tensão menores a rede fibrosa oferece pouca resistência à deformação, sendo o comportamento determinado predominantemente pelas fibras elásticas. Esta porção inicial, rápida e quase linear da curva, aparentemente envolve o alongamento das regiões flexíveis e espiraladas das moléculas de colágeno. A deformação puramente elástica inicial é seguida pela fase de deformação viscoelástica e finalmente uma fase puramente plástica. Sob forças de tensão intermediárias, as fibrilas de colágeno passam a oferecer resistência à deformação, predominando então o elemento plástico. Na zona de falha, ou seja, sob influência de forças elevadas, ocorre a desfibrilação do colágeno (Wilhelmi *et al.*, 1998).

Sob a ação de uma força constante, mantida através do tempo, a pele continua a esticar, conforme as fibras progressivamente se alinham concomitantemente ao deslocamento da substância intercelular. Esta extensibilidade, intrínseca e inerente, caracteriza o estiramento mecânico, sendo a magnitude proporcional à quantidade de fluido intersticial presente na derme (Wilhelmi *et al.*, 1998).

Por mecanismo semelhante, quando a pele é estirada a uma determinada distância, mantida constante, a força requerida para manter esta distância decresce gradualmente. Esta propriedade explica a possível melhora,

após algumas horas, de um retalho inicialmente suturado sob grande tensão (Wilhelmi *et al.*, 1998).

A tensão e a extensibilidade naturalmente existentes na pele são frequentemente confundidas e chamadas de “elasticidade”. Estas propriedades se interrelacionam, a pele se estende quando maior tensão é aplicada e, da mesma maneira, a pele estirada está sob maior tensão. Porém, são conceitos distintos e normalmente discutidos separadamente.

As tensões, às quais a pele é submetida, podem ser de origem estática ou dinâmica. Tensões estáticas são as naturalmente existentes na pele, dependentes das características estruturais dérmicas. As tensões dinâmicas são causadas pela combinação de forças relacionadas a ações musculares voluntárias, como o movimento das articulações e a mímica facial, e com a gravidade, as quais alteram a magnitude e a direção das tensões cutâneas locais. Os músculos da mímica facial, por exemplo, se inserem diretamente nas camadas profundas da pele. A pele se adapta ao encurtamento provocado pela contração muscular por meio da formação de rugas e sulcos perpendiculares ao eixo longo das fibras do músculo (Silver *et al.*, 2001).

Rupturas dérmicas ou estrias podem resultar quando a tensão é aplicada em velocidade maior que a capacidade de expansão cutânea. Ocorre frequentemente no abdome durante a gestação, na doença de Cushing, ou no “estirão” do crescimento. Não foi determinado se as fibras realmente se rompem ou simplesmente perdem o arranjo quaternário (Silver *et al.*, 2001).

A pele sã é extensível a fim de não limitar qualquer movimento possível ao sistema musculoesquelético. Na maioria das regiões, a pele se estende mais em determinadas direções que outras, assim como a tensão. Com o passar dos anos a habilidade da matriz de tecido elástico em retornar a pele do estado estendido ao completamente relaxado é gradualmente perdida, e a extensibilidade cutânea é substituída por flacidez, que cumpre a mesma função de permitir a liberdade de movimentos (Silver *et al.*, 2001).

3.4 Reparação tecidual

O corpo humano pode sofrer lesões devido a exposições a agentes físicos, químicos ou biológicos. O processo de reparação visa substituir os

componentes teciduais perdidos. O resultado dessa reparação depende da profundidade da lesão (Barreto, 2006).

Após lesão cutânea com perda de substância, podem ocorrer três tipos distintos de reparação tecidual apresentando aspectos histológicos, estéticos e funcionais diferentes, a saber: 1) quando somente a epiderme é lesionada, ocorre a regeneração com substituição por tecido idêntico ao original; 2) se a lesão atingir a superfície da derme, ocorrerá a restauração, processo que resulta na formação de tecido conjuntivo jovem, diferente do tecido de granulação, sem formação de cicatriz, preservando as estruturas dermoepidérmicas e mantendo as funções da pele; 3) entretanto se a lesão comprometer a epiderme, derme e anexos, ocorrerá a regeneração da epiderme e substituição da derme por tecido de granulação com formação de cicatrizes, não haverá neoformação dos anexos da pele, e ocorrerão severas alterações na inervação e vascularização, além de mudanças na coloração e nas características físicas da pele (Mariani *et al.*, 1995).

A reparação espontânea frequentemente evolui sem intercorrências, resultando em cicatriz plana, não endurecida, de limites precisos e não retraída. A este processo dá-se o nome de reparação tecidual fisiológica (Morris, 2001).

3.4.1 Reparação tecidual fisiológica

Didaticamente o processo de reparação pode ser dividido em 3 fases que se sobrepõem: inflamação, formação de tecido de granulação e fase de remodelagem da matriz (Balbino *et al.*, 2005) (FIG. 6).

FIGURA 6 – Fases da reparação de feridas (Isaac, 2007).

3.4.1.1 Fase inflamatória

Nessa fase ocorrem alterações nas junções e/ou nas células endoteliais, sendo que em alguns casos há ruptura dos vasos sanguíneos e hemorragia. Após a injúria, há vasoconstrição como resultado de descargas adrenérgicas por ação das células nervosas, tamponamento da lesão pela adesão e agregação plaquetária formando um trombo rico em plaquetas, que é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso. Esse trombo passa a capturar eritrócitos e por isso se torna conhecido por trombo vermelho. O trombo vermelho provoca a completa oclusão do vaso rompido e se torna arcabouço para a migração das células responsáveis pelo processo de reparação. As plaquetas são as primeiras a chegar à pele lesionada, se tornam ativadas e liberam mediadores químicos que promovem quimiotaxia de células envolvidas na resposta inflamatória. Os neutrófilos migram para a superfície da ferida e constituem uma barreira contra a penetração de microorganismos. Simultaneamente, há migração de monócitos que se convertem em macrófagos e continuam o processo de debridamento de detritos iniciado pelos neutrófilos, ainda produzem citocinas e fatores de crescimento, tal como o TGF. Este fator estimula os fibroblastos a produzir colágeno e fibronectina *in vitro* e *in vivo* e sua administração em animais promove a formação de tecido de granulação (Bolgiani, 2001; Balbino *et al.*, 2005)

A resposta inflamatória é favorecida pelos linfócitos T auxiliares que são ativados logo após a lesão. Estes então passam a identificar os antígenos de superfície dos corpos estranhos a partir das células apresentadoras de antígenos, tais como as células de Langerhans da pele e alguns tipos de macrófagos. Tanto os linfócitos quanto os macrófagos desaparecem das lesões maduras por meio de mecanismos desconhecidos (Morris, 2001).

3.4.1.2 Fase de formação do tecido de granulação

Nessa fase, com o aumento da produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. O tecido de granulação é composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido

hialurônico e colágenos tipos I, II e III (Balbino *et al.*, 2005). Mediadores químicos liberados por células endoteliais e por macrófagos promovem a reparação dos vasos sanguíneos lesionados, formação de microvasos na superfície da ferida e o restabelecimento do fluxo sanguíneo (Bolgiani, 2001; Balbino *et al.*, 2005).

Quando o tecido de granulação chega ao nível da epiderme, ele serve de substrato para migração das células epiteliais próximas à região da ferida (Balbino *et al.*, 2005). Na presença desse substrato, as células epiteliais da camada basal, que se encontram ativadas devido à perda da interação com as células adjacentes, modificam seu fenótipo, adquirem propriedades mitóticas e proliferam em direção ao centro da lesão (Balbino *et al.*, 2005).

Se existirem objetos ou tecidos desvitalizados na região, a reepitelização não se processará sobre essas estruturas (Cohen, 1962). Uma vez terminado esse processo, as células retornam ao seu fenótipo normal e ligam-se firmemente à membrana basal na junção dermoepidérmica (Schürch *et al.*, 2006).

Durante o reparo tecidual, há contração da ferida a fim de aproximar as margens da lesão (Balbino *et al.*, 2005). A expressão de proteínas contráteis, a síntese de matriz extracelular por miofibroblastos e a disposição dessas células no tecido de granulação, sugerem que esse tipo celular seja responsável pela produção da força que causa a contração da ferida (Grinnell, 1994). Essas células apresentam características comuns às células musculares lisas e aos fibroblastos, ou seja, feixes de microfilamentos de actina com corpos densos paralelos ao eixo maior da célula, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos (Schürch *et al.*, 1998). Sua origem ainda é controversa, podendo se originar dos fibroblastos, pericitos, células musculares lisas e de células mesenquimais presentes na derme e no tecido subcutâneo. Os miofibroblastos alinham-se com sua matriz recém construída ao longo do eixo radial da ferida formando ligações “célula-célula” e “célula-matriz” (fibronexus); esta construção de arcabouço gera tensão na superfície e contração da ferida (Powell *et al.*, 1999; Gabbiani, 2003). Além disso, esse tipo celular tem capacidade de sintetizar vários componentes da matriz extracelular, dentre eles podem ser citados os colágenos dos tipos I, III IV e V , glicoproteínas (Schürch *et al.*, 2006) e proteoglicanas, isto é, fibronectina, laminina e tenascina (Berndt *et al.*, 1994). Ainda, miofibroblastos secretam lisil-oxidase, uma enzima que inicia a primeira etapa da reação cruzada

entre o colágeno e a elastina, uma função crucial para a estabilização da matriz extracelular (Sommer *et al.*, 1993; Jourdan-Le Saux *et al.*, 1994).

O colágeno inicialmente produzido no tecido de granulação é do tipo III e esse tipo de colágeno está relacionado à plasticidade do tecido nas fases iniciais de reparação. Quando o tecido de granulação é reabsorvido, após o fechamento da ferida, os miofibroblastos desaparecem por apoptose e é possível identificar, bioquimicamente, um colágeno tipo I mais rígido (Schürch *et al.*, 2006).

Além dos miofibroblastos, há uma variedade de agentes farmacológicos, tais como prostaglandina F₁, bradicinina, serotonina, angiotensina, noradrenalina, adrenalina e vasopressina capazes de iniciar a contração (Schürch *et al.*, 2006).

Durante esse processo, os fibroblastos secretam grandes quantidades de colágeno que substituem gradativamente as macromoléculas da matriz extracelular (Balbino *et al.*, 2005).

3.4.1.3 Fase de remodelamento

Nessa fase, o leito da ferida vai sendo preenchido com mais fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica. Nos meses seguintes à dissolução da granulação, a maioria das células desaparece e a matriz é constantemente alterada, com eliminação rápida da maior parte de fibronectina e acúmulo gradual de feixes de colágeno tipo I, que aumenta a força tensiva da cicatriz (Morris, 2001). A resolução completa de uma ferida, somente é considerada depois de concluída a maturação e remodelação da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal. A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e depende da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela collagenase, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes.

Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido a organização das fibras acompanhar as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal.

Nesta fase, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas. Os linfócitos não são somente efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento. De forma notável, nesta etapa, essas células são atraídas para a região da ferida em igual número que os monócitos. Os eosinófilos aparecem nas últimas fases do reparo e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (Balbino *et al.*, 2005).

Durante o processo de reparo da ferida, o colágeno III começa a surgir entre o segundo e o terceiro dia, seguido de colágeno I que aparece entre o sexto e o sétimo dia (Betz *et al.*, 1992). O colágeno I é particularmente importante no processo de epitelização, visto que serve de base para adesão de células epiteliais. A síntese é máxima nas primeiras 2 semanas e o alinhamento e a deposição, em três a quatro semanas. Se a ferida é epitelizada antes de três semanas a formação de cicatriz é menor. A quantidade total de colágenos tipos I e III nas cicatrizes fisiológicas aumenta com o passar do tempo, porém a proporção entre eles não é constante. Essa proporção varia de 60% de colágeno III na primeira semana após o trauma para 28% em cicatrizes maduras (Horslev-Petersen *et al.*, 1988). Essa variação nas concentrações de colágeno tipo I e III tende a diminuir gradativamente até atingir a proporção normal, em aproximadamente, dois anos (Hayakawa *et al.*, 1979). A permanência da ferida aberta é um estímulo para formação de colágeno. A persistência de formação do colágeno levará à cicatrização hipertrófica (Bolgiani, 2001).

De acordo com Robins *et al.* (2003), a proporção de colágeno III em relação ao colágeno I em peles humanas, obtidas por biópsias consecutivas, é significativamente maior do que a encontrada nas biópsias iniciais, com maior aumento no período acima de 6 semanas e com decréscimo após 12 semanas, sendo que essa condição persiste por mais de 6 meses após a biópsia inicial.

Essas mudanças interferem nas características físicas e mecânicas do tecido, particularmente em termos de diâmetro das fibrilas e na resistência à tração.

3.4.2 Reparação patológica

Como já descrito, o reparo tecidual é um processo complexo, no qual diversos componentes interagem para que o resultado final seja satisfatório.

A adequada formação do tecido de granulação, para se conseguir uma reparação fisiológica, depende do equilíbrio entre a biossíntese e a degradação da matriz extracelular.

A reparação patológica pode ser decorrente da síntese excessiva de colágeno, o retardo ou ausência de degradação e remodelagem da matriz extracelular. Os exemplos típicos de situações em que o reparo não acontece são: úlceras venosas, arteriais ou linfáticas, e escaras por pressão. Quando ocorre um processo exacerbado de reparo, a cicatriz resultante é excessiva e, na maior parte, prejudica o correto desenvolvimento das funções fisiológicas da região atingida. São exemplos de reparo excessivo: quelóide, cicatriz hipertrófica, aderências e fibrose em diversos órgãos (Dvorak, 1986).

O quelóide caracteriza-se por ser uma lesão fibrosa elevada, que se estende além das margens das feridas de origem e, raramente, regride. Desenvolvem-se em média 3 meses após o trauma, ocorrendo, predominantemente, no lobo da orelha, ombros e tórax anterior. Sua ocorrência independe da mobilidade da área lesionada, podendo pequenos traumas causar grandes lesões (English & Shenefelt, 1999; Niessen *et al.*, 1999). Histologicamente os quelóides caracterizam-se por apresentar fibras colágenas grandes e espessas, compostas por numerosas fibrilas, apresentando poucos ou até mesmo nenhum miofibroblasto (Ehrlich *et al.*, 1994).

As cicatrizes hipertróficas são aquelas que crescem acima da superfície da pele, porém sem invadir as bordas da ferida original. São lesões fibrosas que sofrem habitualmente resolução espontânea, parcial ou total, com o passar do tempo. Desenvolvem-se aproximadamente 2 a 4 semanas após o trauma. Ocorrem predominantemente nas superfícies flexoras, estando intimamente relacionada ao movimento da região afetada, sendo que, o tamanho da lesão está normalmente relacionado à gravidade do trauma. A frequência é até quinze vezes maior em indivíduos de pele escura em comparação com

àqueles de pele clara (English & Shenefelt, 1999; Niessen *et al.*, 1999). Podem apresentar coloração avermelhada, prurido e retração. As lesões hipertróficas caracterizam-se pela presença de pequenos vasos sanguíneos, fibras colágenas pequenas e desordenadamente agrupadas em nódulos, sendo comum a presença de miofibroblastos (Ehrlich *et al.*, 1994).

A recidiva, após correção cirúrgica, é mais frequentemente encontrada no quelóide e mais rara na cicatriz hipertrófica (Berman & Bielely, 1995). Soma-se às diferenças já descritas, o fato de que sintomas como dor e prurido, embora sejam mais comum em quelóides, também podem aparecer em cicatrizes hipertróficas (Murray, 1994).

Há ainda um terceiro tipo de cicatriz excessiva, com as mesmas características das anteriores. Nesse grupo, as cicatrizes permanecem limitadas às bordas da lesão original como cicatrizes hipertróficas, porém comportam-se como quelóides: apresentam alto índice de recidiva após correção cirúrgica e não demonstram tendência à regressão espontânea (Muir, 1990).

Em cicatrizes anômalas, os linfócitos e macrófagos permanecem por um período mais longo que o normal. Em cicatrizes hipertróficas, o nível de linfócitos e macrófagos permanece alto durante 4 a 5 meses depois da lesão. Segundo Morris (2001), o controle dos linfócitos pode ser útil no tratamento de cicatrizes anômalas.

Nas cicatrizes excessivas, a quantidade de colágeno III permanece maior, quando comparada à pele normal ou à cicatriz fisiológica (Uitto *et al.*, 1985). A relação de proporcionalidade entre colágeno tipo III e tipo I na pele, em diferentes situações, é apresentada na TAB. 3, sendo maior em quelóides (Lee *et al.*, 1991).

TABELA 3 – Quantidade de colágeno tipo III em relação à quantidade de colágeno tipo I (Lee *et al.*, 1991).

Tecido	Relação colágeno III / colágeno I
Pele normal	0,17
Tecido de granulação (pós queimadura)	0,37 – 0,72
Quelóides	0,61

3.4.3 Enxertos

Enxerto é parte de um tecido vivo transplantado de uma área para outra, sem relação nutricional entre a área doadora e a receptora, no mesmo organismo ou em organismos distintos (Lofêgo Filho *et al.*, 2006).

Quanto à origem, os enxertos de pele podem ser classificados em autógenos (do próprio indivíduo), isógenos (entre indivíduos geneticamente idênticos), alógenos (entre indivíduos geneticamente diferentes, mas da mesma espécie) ou xenógenos (indivíduos geneticamente diferentes e de outra espécie) (Golcman & Golcman, 2002).

A reparação da ferida, após o transplante de pele, ocorre de maneira diferente dependendo da origem do enxerto.

3.4.4 Reparação após o uso de enxertos autógenos

A reparação da ferida, após o transplante autógeno de pele, se processa por dois eventos característicos e sequenciais: integração e contração.

3.4.4.1 Integração

As características clínicas da integração dos enxertos autógenos são: aderência, perfusão e viabilidade do segmento de pele transferido, o que depende obrigatoriamente de sua vascularização. Nas primeiras 24 horas após o transplante, dá-se início a fase de embebição plasmática, na qual o plasma, que transuda da área receptora, é absorvido pelo enxerto formando uma malha de fibrina que serve para sua fixação e nutrição. Na sequência, ocorre a fase inosculatória, onde pequenos capilares se anastomosam comunicando a superfície do enxerto a do leito receptor. O enxerto encontra-se ainda fragilmente fixado, podendo estar cianótico. O surgimento e proliferação de novos vasos é que irá garantir a sobrevivência da pele transplantada. A fase de revascularização ocorre do quinto ao sétimo dia do pós-operatório permitindo o fluxo sanguíneo verdadeiro (Franco & Cláudio-da-Silva, 2002; Golcman & Golcman, 2002). Ainda, de acordo com Yamagushi *et al.* (2000) há uma quarta fase na reparação dos enxertos cutâneos, denominada de fase de ativação dos queratinócitos. Os enxertos de espessura parcial (aqueles que contêm epiderme e parte da derme) por serem mais delgados, permitem melhor embebição na fase inicial da enxertia

e necessitam de menor suprimento sanguíneo a partir do leito subjacente. No entanto, a ocorrência da ativação dos queratinócitos pode vir a ser uma razão adicional que facilita a integração dos enxertos de espessura parcial quando comparados aos de espessura total (aqueles que contêm epiderme e toda a derme) (Yamagushi *et al.*, 2000).

3.4.4.2 Contração

Uma vez integrado ao seu leito receptor e a partir do décimo dia, a ação de miofibroblastos e proteínas contráteis promove a contração do enxerto. Esse processo pode durar seis meses e traz prejuízo cosmético. Os enxertos podem afetar a população de miofibroblastos na ferida, dependendo do percentual de derme enxertado. Em enxertos espessos, os miofibroblastos encontram-se em menor proporção, sendo a contração tecidual menos evidente (Rudolph, 1979).

A fibronectina, elemento de sustentação da matriz provisória, desaparece quando as fibras colágenas já se encontram orientadas. Em enxertos de espessura total, sua intensidade e distribuição são marcadas de forma menos evidente, desaparecendo precocemente em comparação aos enxertos de espessura parcial (Vande Berg & Rudolph, 1993). Tais observações revelam uma associação entre a presença de fibronectina e miofibroblastos, e desta com a contração dos enxertos (Lofêgo *et al.*, 2006).

Stephenson *et al.* (2000) realizaram um estudo cujo objetivo era avaliar a suposição de que os enxertos de pele humana de espessura total provocam mínima contração da feridas. Até então a contração dos enxertos de espessura total nunca havia sido mensurada em humanos. Cinquenta enxertos foram acompanhados por fotografias com mensuração da área da ferida, em seguimento de oito meses. Parâmetros avaliados, como idade, área doadora do enxerto e tamanho inicial do defeito, não mostraram diferenças significativas relacionadas à contração. Na presença de infecção, a contração foi de quase metade da área inicial, e, em sua ausência, enxerto/leito receptor contraíram-se em um terço da área inicial.

Yamagushi *et al.* (2000) também avaliaram a contração usando enxertos de diferentes espessuras em feridas com profundidades variadas. Feridas superficiais, cobertas com pele de espessura total, contraíram mais do que

se cobertas com pele de espessura parcial. Feridas que atingiam a fáscia muscular, se cobertas com epiderme pura ou enxerto de pele de espessura parcial, apresentavam contração maior do que se cobertas com pele de espessura total. Tais resultados sinalizam para a necessidade de ajustar a espessura do enxerto à profundidade da ferida.

3.4.5 Reparação após transplante de pele alógena ou xenógena

A cobertura temporária das feridas com pele cadavérica fresca ou armazenada, ou, ainda, pele animal, é de reconhecido valor em grandes queimados (Kreis *et al.*, 1992), e pode ser usada com o mesmo sucesso em cirurgia dermatológica e reconstrutiva (Davis & Arpey, 2000). Sua aplicação promove oclusão da ferida, e assim o ambiente permanece úmido, tendo sua granulação, neovascularização e conseqüentemente reparação aceleradas. Por serem fortemente imunogênicas, com o passar de alguns dias, são rejeitadas.

A pele alógena, quando enxertada, chega a ser, por um curto período, revascularizada. Ela sofre rejeição devido à presença de antígenos do doador que elicitam a reação imunológica (Lee, 2000). Sua rejeição é anunciada por uma vasodilatação seguida de circulação lentificada. Completa cessação do fluxo sanguíneo ocorre, na maioria dos aloenxertos de pele humana viável, entre sete e 10 dias. Ela então se torna seca e se desprende espontaneamente de seu sítio de implantação (Andrew *et al.*, 2002). O uso de aloenxertos de pele cadavérica é mais seguro e economicamente viável do que outras coberturas biológicas temporárias, como xenoenxerto porcino e membrana amniótica. Os aloenxertos apresentam rápida aderência e menor potencial de antigenicidade em comparação com as demais (Obeng *et al.*, 2001).

Essas coberturas temporárias muitas vezes são usadas com o intuito de preparar o leito da ferida para uma cobertura definitiva. Sobre áreas avasculares, como defeitos sobre ossos e cartilagem, esses enxertos aumentam dramaticamente a formação do tecido de granulação, aumentando a possibilidade de integração de um enxerto autógeno sequencial. Vários trabalhos demonstram a segurança do uso da pele cadavérica, isentando-a do risco de transmissão de agentes infecciosos viáveis (Laurence, 1987; Kealey, 1997). Para evitar o risco de transferência de doenças, os bancos de tecidos seguem protocolos rigorosos

quanto à captação, processamento e armazenamento de peles (Herson & Mathor, 2006).

Na prática dermatológica, os autoenxertos são os mais empregados por sua comodidade, segurança, baixo custo e capacidade de atuação como cobertura definitiva (Lofêgo *et al.*, 2006), entretanto essa não é a realidade de grandes queimados, como explicado no capítulo 1 (Introdução).

3.5 Bancos de tecidos

Um banco de tecidos é uma estrutura especializada que permite o processamento e a conservação de um ou vários tipos de tecidos doados para transplantes alógenos, disponibilizando para uso clínico enxertos seguros e de alta qualidade técnica (Herson *et al.*, 2001).

Especificamente, por banco de pele entende-se a estrutura cujas finalidades são: coleta, processamento, armazenamento e distribuição de tecido cutâneo ou seus componentes, preparados para seu uso como enxertos temporários ou definitivos (Herson *et al.*, 2001).

No Brasil, em 1956 foi criado o banco de pele no Hospital das Clínicas para tratamento dos pacientes atendidos pelo Centro de Queimados, cujo método de conservação empregado era o de refrigeração, o qual mantinha o material viável para uso somente até 21 dias. Em 2000, esse banco de pele foi incorporado ao Banco de Tecidos do Instituto Central, banco este resultante da parceria entre o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Divisão de Cirurgia Plástica e Queimaduras) e o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo (IPEN-CNEN/SP), originada por um projeto fomentado pela Agência Internacional de Energia Atômica (Herson, 2004).

Assim, foi possível a adequação da área física, a instalação de equipamentos e o treinamento de pessoal, resultando não somente na ampliação da estrutura física como também na possibilidade de ampliação das atividades do banco. Desse modo, o serviço do banco passou a abranger a conservação prolongada de enxertos de pele, tendo como metas o processamento e conservação de outros tecidos, como cartilagem, fáscia e âmnio humanos utilizando a esterilização por radiação ionizante (Herson *et al.*, 2001).

3.5.1 Processamento e armazenamento

A disponibilização de tecidos humanos para transplante foi regulamentada no Brasil, em fevereiro de 1997, pela Lei nº 9.434, cujo conteúdo estabelece critérios para a retirada de tecidos de doadores, *in vivo* ou *post mortem* (Herson, 2004).

Após a seleção de doadores de pele e a captação do tecido pela equipe médica especialmente treinada, o material é enviado ao Banco de Tecidos para o processamento e o armazenamento.

Em Bancos de Pele, devido à necessidade de iniciar os processos de conservação dos tecidos em até no máximo 24 horas após sua captação, a quarentena é realizada após o processamento e antes de sua liberação para uso clínico (Herson *et al.*, 2002).

Os enxertos de pele para uso como transplantes alógenos deverão ser submetidos a técnicas de conservação. Dentre essas técnicas, podem ser citadas: a refrigeração, a criopreservação e a exposição ao glicerol em altas concentrações (Herson *et al.*, 2002).

A refrigeração consiste na conservação dos enxertos em solução salina com antibióticos a 4 °C. Apesar de ser um método de conservação simples e economicamente vantajoso, no prazo de 14-21 dias, os tecidos perdem a viabilidade celular e entram em degeneração (Herson *et al.*, 2002).

A criopreservação se caracteriza pela manutenção dos tecidos à temperatura de -70 °C em ultracongelador elétrico ou -190 °C em recipientes com nitrogênio líquido, prolongando o período de viabilidade para seu uso. Para evitar ou diminuir a formação de cristais de gelo no interior celular, que seriam responsáveis pela ruptura de membranas celulares (lise celular e perda de viabilidade) e a desorganização da matriz extracelular, o material pode ser crioprottegido pela exposição ao dimetilsulfóxido (DMSO) ou ao glicerol em concentrações de 10% a 15%, em meio de cultura de células (ex.: Dulbecco). Apesar de aparentemente simples, o processo demanda mão-de-obra especializada, o que, somado ao custo desse equipamento e de sua manutenção, torna o método dispendioso. Sua grande vantagem é a preservação com manutenção da viabilidade celular em torno de 80% (Herson *et al.*, 2002).

O método de conservação em glicerol em altas concentrações, apesar de provocar morte celular, mantém a integridade anatômica dos tecidos. O

protocolo adotado pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas preconiza a conservação de enxertos em glicerol em concentração igual ou maior a 85%. Este tipo de conservação permite o armazenamento por até dois anos, desde que mantido sob refrigeração a 4 °C (Herson & Mathor, 2006).

Além de conservante, o glicerol em altas concentrações tem ação descontaminante. A eficácia da ação do glicerol relaciona-se à carga biológica inicial, para tanto, deve ser realizada a triagem sorológica cuidadosa do doador, o uso de processos de esterilização complementares ou descarte de materiais contaminados com bactérias Gram negativas devido ao potencial de geração de resíduos pirogênicos (Herson & Mathor, 2006).

3.5.2 Tipos de esterilização de tecidos biológicos

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, 2001).

Esterilização tem sido definida como o processo ou ato de inativar ou matar todas as formas de vida, em especial os microorganismos. 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 (TAB. 4), 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).

Os métodos de esterilização mais empregados são: calor, filtração, óxido de etileno, vapor de formaldeído, plasma de peróxido de hidrogênio, radiação ultravioleta e radiação ionizante, os quais têm suas vantagens e desvantagens resumidas na TAB. 4.

TABELA 4 - Vantagens e desvantagens dos métodos de esterilização (Martinho Junior, 2008).

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

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 é importante, pois evita desperdício de material, perda de rendimento em procedimentos e, mais importante, para produtos da área de saúde, evita várias complicações ao paciente.

A baixa tolerância da pele aos métodos de esterilização tradicionais, químicos (óxido de etileno, formalina) ou físicos (calor) torna sua esterilização de difícil execução, aumentando o valor das técnicas assépticas de coleta e processamento dos tecidos (Herson, 2004).

A esterilização dos tecidos pelo calor não deve ser recomendada, pois provoca a desnaturação de suas proteínas. O uso de óxido de etileno para esse fim requer monitoração, aeração e quarentena para liberação dos resíduos de gás dos tecidos, além de ser contraindicado devido aos efeitos tóxicos de seus

resíduos e dos produtos potencialmente cancerígenos, resultantes da reação do gás com componentes orgânicos (Possari, 2003).

O glicerol em altas concentrações atua como descontaminante de tecidos biológicos a longo prazo. Acima da concentração de 85%, a alta osmolaridade do glicerol impede a proliferação bacteriana, resultando em uma curva decrescente de população bacteriana até a sua potencial eliminação do tecido em 21 dias, exceto para a forma esporulada. Existem também evidências de sua ação virucida (Herson & Mathor, 2006).

A radioesterilização é um dos métodos de esterilização complementares que, aliado à conservação em glicerol contribui, entre outras vantagens, para reduzir o tempo de espera para a disponibilização dos tecidos para uso como enxertos alógenos (Ben-Bassat, 2005).

3.6 Radiação ionizante

A radiação ionizante é uma forma de radiação que tem energia suficiente para arrancar elétrons dos átomos e moléculas de forma a convertê-los em íons (Dahlan, 2001).

Existem dois tipos de radiações ionizantes:

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 (Dahlan, 2001).

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

Os tipos de radiações ionizantes mais empregados em processos industriais são a radiação gama, proveniente de fontes radioisotópicas tais como o cobalto-60 (^{60}Co) e o Césio-137 (^{137}Cs), e feixe de elétrons de alta energia proveniente de aceleradores (Dahlan, 2001).

Industrialmente, as fontes radioisotópicas são utilizadas quando um material volumoso precisa ser uniformemente irradiado. Os aceleradores de elétrons são usados quando há necessidade de irradiar grandes superfícies com pequenas espessuras (Colombo, 2004).

Radioisótopos, os quais são também 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, e é específica para cada radioisótopo (Dahlan, 2001).

A seguir será descrito apenas o tipo de Radiação Gama utilizado no processamento das amostras deste trabalho.

3.6.1 Raios gama e sua interação com a matéria

Os raios gama são emitidos por isótopos radioativos; representam o excesso de energia que é lançada pelos núcleos instáveis que decaem para formar elementos estáveis. São radiações eletromagnéticas de origem nuclear, com pequeno comprimento de onda, monoenergéticas ou com um pequeno número de energias discretas (Hall & Giaccia, 2006).

A interação da radiação gama com a matéria é essencial para a compreensão das mudanças química radioinduzidas, que são consequências diretas da absorção da energia pela matéria. Os três principais processos de absorção de raios gama são chamados de: Efeito Fotoelétrico, Efeito Compton e Produção de pares (IAEA, 2010).

No caso do ^{60}Co , a interação da radiação com a matéria se dá, principalmente pelo efeito Compton, no qual um fóton interage com um elétron livre ou com um elétron fracamente ligado a um átomo. Uma parte da energia do fóton incidente é transmitida ao elétron que é acelerado e ionizado; a outra parte da energia é utilizada na criação de outro fóton, com energia menor que a do fóton incidente (Hall & Giaccia, 2006).

A energia total transferida pela absorção Compton, em qualquer volume, é diretamente proporcional à densidade eletrônica do meio irradiado. O efeito Compton predomina para energias de fótons entre 1 e 6 MeV. O efeito Compton pode ser tratado como um choque elástico entre o fóton e o elétron (Hall & Giaccia, 2006).

3.6.2 Esterilização por radiação ionizante

A eficácia da utilização da radiação como método de esterilização é decorrente de: a) sua grande capacidade de penetração na matéria; b) sua alta eficiência em inativar microorganismos sem a ocorrência de grandes variações de temperatura; c) 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 os materiais biológicos sensíveis sejam esterilizados, sendo eficiente tanto à temperatura ambiente como em temperaturas abaixo de zero (Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2005).

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 o limite superior com cerca de 30 MeV. Entretanto, para evitar qualquer indução de radioatividade, a qual pode ocorrer se a energia de radiação ultrapassar 12 MeV, o uso de energia 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 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 capazes de iniciar outros processos de mesma característica.

Quando um elétron de 1 MeV passa através da matéria 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-os entidades altamente excitadas. Somente alguns deles decompõem-se em radicais livres, os quais atacam suas adjacências (Dziedzic-Goclawska, 2001).

A Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) promove e incentiva o uso da radiação ionizante com o propósito de esterilização de materiais biológicos. O apoio da Agência resultou no desenvolvimento de

programas nacionais e internacionais em bancos de tecidos com o objetivo de realizar a aplicação de radiação ionizante para a esterilização de tecidos para aloenxertos (Dziedzic-Goclawska, 2001).

3.6.3 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 (por exemplo, D_{10} , para radioesterilização) e do nível de garantia de esterilidade (SAL: *Secutity Assurance Level*) necessário (Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2005). 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 resistência à radiação ionizante que cada patógeno contaminante apresenta. O valor de D_{10} , usualmente expresso em kGy, é a dose de radiação necessária para reduzir a população microbiana inicial em 90%.

O conceito de SAL é derivado de estudos sobre a cinética da 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 da esterilização, em relação à inativação viral, tem sido conduzidos para HIV-1 e HIV-2. As doses de radiação necessária para reduzir a carga viral de HIV-1 em 90% (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, será necessária a redução de 9 $\log_{10}$. Assumindo um valor de D_{10} de 4 kGy, será necessária uma dose de 36 kGy, e com um D_{10} de 5,6 kGy a dose será superior a 50 kGy (Conway & Tomford, 1992)

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 DMSO, os quais aumentam a resistência 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 radorresistentes do que bactérias em forma vegetativa, o fungo mais resistente pode ser tão resistente quanto um esporo bacteriano, enquanto os vírus são, geralmente, mais resistentes do que bactérias (Dziedzic-Goclawska, 2001).

A eficiência da radiação ionizante em inativar vírus em tecidos coletados a partir de doadores cadavéricos não é bem documentada, os resultados são frequentemente confusos e o mecanismo de reação viral é incerto (Dziedzic-Goclawska, 2001).

Segundo Dziedzic-Goclawska *et al.* (2005) apesar da dose recomendada para a esterilização de tecidos biológicos ser de 25 kGy, o Banco de Tecidos Central em Warsaw usa, desde 1963, doses de $33 \pm 3,3$ kGy para a esterilização dos seus tecidos. Essa mesma dose é usada em outras unidades regionais de Bancos de Tecidos da Polônia.

Pelo fato dos contaminantes poderem variar largamente de um doador para outro, torna-se muito difícil, senão impossível, determinar a resistência e a quantidade inicial dos microorganismos no tecido coletado. Quando os microorganismos são desconhecidos e não puderem ser detectados diretamente, recomenda-se que o valor de D_{10} utilizado seja o de organismos mais radorresistentes.

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, 2001).

Por outro lado, baixas doses de radiação geram danos que diversas bactérias têm capacidade de reparar, tornando-as ainda mais resistentes (Yusof, 2001).

De acordo com a norma ISO 11.137, mesmo um tecido apresentando *bioburden* igual a zero, exige-se que este venha a ser esterilizado com a dose

mínima para garantir a real esterilidade, a qual é igual a 15 kGy (ISO 11.137-2: 2006).

3.6.4 Efeitos biológicos do uso de radiação ionizante na esterilização de tecidos

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes se caracterizam pela capacidade de alterar as moléculas de um meio biológico, tanto no que se refere à estrutura das macromoléculas orgânicas como à composição química das mesmas (Biral, 2002).

Após a ionização e quebra de uma ligação química, ocorrem recombinações e rearranjos da macromolécula alvo e das moléculas do meio. Dessa forma, a ionização poderá dar origem tanto a fragmentos de moléculas, como provocar uma alteração da macromolécula original através da inserção de novos íons ou radicais livres nas ligações químicas quebradas (Biral, 2002).

As estruturas de macromoléculas são normalmente mantidas por ligações químicas mais fracas que as ligações covalentes, chamadas pontes de hidrogênio. Por meio da quebra das pontes de hidrogênio, uma proteína pode perder parte da sua estrutura secundária ou terciária, o que pode levar à perda de sua atividade biológica. Da mesma forma, o surgimento de ligações cruzadas, inter e intramoleculares, podem vir a acontecer como consequência da exposição a radiações ionizantes, dependendo da dose e taxa de dose utilizadas (Dziedzic-Goclawska, 2001).

Esse efeito é particularmente importante, pois implica em alterações na derme humana de pele conservada em glicerol concentrado. Segundo Bourroul (2004), a radiação ionizante em doses acima de 25 kGy no irradiador de ^{60}Co e em doses maiores que 5 kGy no irradiador de elétrons, provoca significativa alteração das fibrilas de colágeno tipo I da derme. Essas alterações resultam na diminuição das propriedades biomecânicas do tecido em relação à resistência à tração, devido à quebra das cadeias peptídicas e aumento da solubilidade do colágeno tipo I.

Apesar de todas as macromoléculas e estruturas de uma célula estarem sujeitas às alterações provocadas pelas radiações ionizantes, considera-se como potencialmente deletéria a interação das mesmas com as fitas de DNA,

localizadas no núcleo, o que inibe a replicação destas e gera erro na síntese das proteínas, levando à morte celular (Dziedzic-Goclawska, 2001).

Quando ocorre uma alteração química da macromolécula devido a ionizações provocadas, diz-se que ocorreu uma “ação direta”. Estima-se, no entanto, que boa parte dos danos causados a uma célula pela radiação ionizante (70% dos efeitos biológicos) ocorre pelo efeito da chamada “ação indireta”, proporcionada através de radicais hidróxidos ($\cdot\text{OH}$) produzidos em meio aquoso.

No mecanismo indireto, a presença do oxigênio potencializa o dano. Peróxidos, assim como seus radicais, são produzidos pela reação do oxigênio com os radicais hidróxidos, que são altamente reativos e, apesar de possuírem vida curta, provocam diversos danos no DNA. Podem ocorrer também entrecruzamentos entre as fitas e dano às bases ou nas moléculas de açúcar do DNA, o que inibe sua síntese e gera erro na síntese de proteínas, levando à morte celular (Dziedzic-Goclawska, 2001).

Considera-se, em termos de escala de tempo envolvida, que a interação da radiação ionizante com as moléculas do meio, aconteça num intervalo de tempo na ordem de 10^{-18} segundos (estágio físico), que o aparecimento de radicais livres dê-se após 10^{-13} segundos (estágio físico-químico) e que os radicais livres, quimicamente instáveis, tenham um tempo de vida de aproximadamente 10^{-5} segundos (estágio químico). Dessa forma, os radicais livres têm um período de trânsito relativamente longo dentro do meio celular e, portanto, maior probabilidade de ocasionar efeitos nas macromoléculas existentes (Biral, 2002).

É fato que, normalmente, existem radicais livres no meio intracelular, produto das diversas reações metabólicas de uma célula. Todos os componentes de uma célula, incluindo as fitas de DNA, já se encontrariam sujeitos à constante ação de radicais livres. Considera-se, no entanto, que a interação da radiação com o DNA, através de uma ação direta, seja potencialmente muito mais danosa, especialmente devido ao maior depósito de energia que as partículas carregadas apresentam no final de sua trajetória. Além disso, todos os sistemas biológicos são mais radiosensíveis na presença de oxigênio. Especialmente verdadeiro para danos provocados por partículas de baixo LET (transferência linear de energia) (fóton e elétrons), a presença de oxigênio dissolvido no meio celular não apenas torna permanente os danos químicos ocasionados pelos radicais livres,

como também possibilita a formação de radicais livres com características ainda mais reativas (Biral, 2002).

O principal efeito da radiação na pele glicerolada ocorre de modo direto, uma vez que o glicerol penetra na pele, se liga à água e a sequestra (Huang *et al.*, 2004; Ross & Kearney, 2004), dessa maneira, age como um radioprotetor quando a pele é irradiada (Bourroul *et al.*, 2002), reduzindo o efeito indireto da radiação por formação de radicais livres no meio aquoso (Rooney *et al.*, 2008).

3.6.4.1 Efeitos *in vitro* da radiação gama em enxertos de pele humana.

No estudo realizado por Bourroul (2004), a irradiação, com raios gama a 25 kGy, de amostras de pele humana conservadas em altas concentrações de glicerol (> 85%), para utilização como aloenxertos, não apresentam diferenças significativas quanto ao módulo de elasticidade em relação às amostras não irradiadas. Nesse estudo, as amostras irradiadas apresentaram módulo de elasticidade de cerca de 80% (com um desvio padrão de mais de 10%) do valor do módulo de elasticidade das amostras não irradiadas, enquanto as amostras de pele irradiadas a 50 kGy com raios gama ou a 25 kGy com feixe de elétrons, mostraram diferenças significantes entre os valores do módulo de elasticidade quando comparadas com as amostras não irradiadas, comprometendo as propriedades biomecânicas deste tecido. As amostras submetidas ao feixe de elétrons apresentaram módulo de elasticidade com cerca de 60% do valor do módulo de elasticidade das amostras não irradiadas. Ainda segundo a autora, por meio de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar que as alterações nas fibras de colágeno tipo I da derme consistiam na perda da estriação característica, indicando a desestruturação da periodicidade das moléculas de tropocolágeno nas fibrilas das amostras irradiadas (aspecto de "espirais que desenrolam"). De acordo com a autora, essa observação indica que a radiação ionizante pode ter agido nas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, afrouxando a agregação das moléculas de tropocolágeno e que o aumento das alterações observadas ocorre em função da dose e também em função do tipo de irradiação.

Em derme decelularizada (Alloderm), com 5% de unidade residual incorporada durante o corte das amostras, a radiação gama nas doses de

2 a 30 kGy, à temperatura ambiente, causa mudanças estruturais visíveis e essas alterações são causadas tanto pela ação direta da radiação gama, quanto pelos radicais livres derivados da radiólise, segundo o trabalho publicado por Gouk *et al.* (2008). De acordo com os esses autores, as modificações são dose-dependentes e consistem em: maior condensação, tamanho e espessura das fibras colágenas (devido à reticulação intra e intermolecular); aumento de fibras colágenas danificadas; formação de orifícios, especialmente da camada papilar; perda da transição entre a derme papilar e derme reticular; diminuição da estabilidade térmica e da taxa de expansão da derme; desnaturação protéica e molecular o que provoca diminuição da estabilidade da matriz extracelular e rápida degradação da derme; com dose maior que 15 kGy, há diminuição significativa da elasticidade e declínio gradual na resistência à tração, os fibroblastos e as novas fibras colágenas se tornam bem alinhados e a derme é remodelada rapidamente por fibroblastos. Essas modificações na arquitetura tridimensional, biomecânicas e nas propriedades bioquímicas provocam alterações nas funções biológicas da derme.

3.6.5 Irradiador de Cobalto-60 (^{60}Co)

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

As fontes de ^{60}Co são fontes seladas que apresentam o núcleo radioativo de cobalto em um compartimento hermeticamente fechado, que não tem contato direto com os materiais externos. O ^{60}Co utilizado nas fontes de irradiação é obtido pelo bombeamento com nêutrons do metal ^{59}Co cobalto. O ^{60}Co sofre decaimento com meia vida de 5,27 anos para o isótopo estável ^{60}Ni com emissão de dois fótons gama com energias de 1,17 e 1,33 MeV e emissão de partícula β , que não atinge o material a ser irradiado pois é barrada pela blindagem da fonte (Dahlan, 2001).

A irradiação com ^{60}Co é realizada, no Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP),

por meio do irradiador multipropósito tipo compacto e do irradiador Gammacell. O irradiador multipropósito é utilizado para o processamento de lotes em escala industrial, pois permite a irradiação de grande quantidade e volume de material (Calvo, 2005). No presente trabalho, optou-se pela utilização do irradiador Gammacell em virtude do pequeno número de amostras e pela uniformidade de dose (FIG. 7). Esse tipo de irradiador possui 48 lápis de ^{60}Co de 20 cm de altura que circundam internamente a câmara primária totalmente isolada; essa disposição do material radioativo garante uniformidade de dose numa altura de 10 cm do material pois as regiões superior e inferior do cilindro recebem uma dose 15% menor. As amostras são colocadas na câmara secundária, com dimensões limitadas a altura de 206 mm e diâmetro de 152 mm e volume total de 3,7 litros. A câmara secundária desce até a meia altura da fonte por um sistema de elevador em 2,8 seg. Dentro da câmara secundária podem ser colocados atenuadores de dose, de chumbo, com diferentes espessuras para 50%, 70% e 90% de atenuação. O tempo de irradiação, determinado pela taxa de dose do irradiador, é programado no painel de controle e o término da irradiação ocorre automaticamente. As taxas de dose do irradiador são calculadas mensalmente devido ao decaimento do ^{60}Co (Silva, 2002).

FIGURA 7 - Irradiador de ^{60}Co Gammacell-220. (1) câmara primária; (2) câmara secundária com recipiente para amostras e (3) painel de controle.

3.7 Camundongos Nude

Um dos modelos mais utilizados em pesquisa é o camundongo mutante espontâneo atímico, também conhecido na literatura como camundongo Nude. O animal não apresenta timo ou possui timo rudimentar, sendo assim portador de deficiência de imunidade celular por linfócitos-T, tolerando a integração de transplantes de doadores não-histocompatíveis e até mesmo de transplantes xenogenéticos. Trata-se de mutação de um gene recessivo autossômico, situado no cromossomo 11. Nesse caso, o acasalamento se faz entre machos nu/nu X fêmea Nu/nu (ou nu/+). As fêmeas têm que ser heterozigotas, pois a ausência de pêlos impede que mantenham os filhotes aquecidos e a produção de leite é menor. Os animais são menores que os respectivos não mutantes, crescem mais lentamente, apresentam defeitos de ossificação, são menos férteis e apresentam maior mortalidade. A imunodeficiência torna esses animais vulneráveis e com alto grau de morbidade, sendo esse um fator limitante para alguns tipos de pesquisas. O camundongo atímico tem sido mais utilizado em estudos de neoplasias e cicatrizes normais e patológicas (Shetlar *et al.*, 1991).

A pele de camundongos Nude é mais delgada que a pele humana e, embora seja constituída por duas camadas distintas, a epiderme e a derme, essas camadas apresentam diferenças peculiares. A epiderme é composta somente por três a quatro camadas de células com camada córnea mais fina. A derme não é diferenciada em derme papilar e reticular, como ocorre em humanos, não sendo normalmente encontradas células inflamatórias (McGown *et al.*, 1987). Os camundongos Nude não apresentam glândulas sudoríparas, mas possuem glândulas sebáceas e folículos pilosos. Apesar da presença de folículos pilosos, esses animais não apresentam pelos, devido à sua deficiente queratinização, o que os torna muito frágeis para saírem dos folículos pilosos (Köpf-Maier *et al.*, 1990, Mecklenburg *et al.*, 2005) (FIG. 08).

FIGURA 8 - Corte de pele fina - microscopia de luz (coloração HE). Pele humana (A) e (B) onde podem ser vistas as várias camadas da epiderme e derme (100x e 400x). Pele do camundongo (C) e (D) onde também podem ser vistas as camadas da pele (100x e 400x).

A proporção de colágeno I e III em derme normal de ratos é de 86:14, respectivamente (Pataridis *et al.*, 2008) e em tecido de granulação removido de ratos adultos é proporcional (Merkel *et al.*, 1988).

Esses animais, diferente do que ocorre com outros camundongos imunodeficientes ou atímicos, mostram um processo de reparação sem ou quase nenhuma cicatriz visível. O processo assemelha-se ao processo de reparação em fetos mamíferos pela expressão de: altos níveis de ácido hialurônico, baixo nível de colágeno (determinado pela pouca quantidade de hidroxiprolina), baixo nível de inflamação, baixo nível de citocinas pró-inflamatórias, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF- β), e fator de crescimento transformante (TGF- β 1) e a ausência de linfócitos T (Colwell *et al.*, 2003; Dang *et al.*, 2003).

Gawronska-Kozak *et al.* (2006), compararam o processo cicatricial após injúria em camundongos Nude atímicos, *wild type* (C57BL/6J) que caracterizaram o grupo controle, camundongos com severa imunodeficiência - células T e B (Rag, Scid), atímicos neonatos e adultos timectomizados (C57BL/6J) e camundongos tratados com o imunossupressor ciclosporina A. As análises das amostras foram realizadas após 7 e 24 dias da biópsia incisional (3 cm) na região dorsal dos animais. De acordo com esses autores, somente camundongos atímicos Nude mostraram, além das características mencionadas no parágrafo anterior, aumento estatisticamente significativo no módulo de elasticidade nas amostras de pele injuriadas quando comparadas às amostras de pele intacta. Os autores concluíram que camundongos atímicos Nude provêm um novo modelo para estudo da influência do sistema imunológico na regeneração tecidual.

O ácido hialurônico, a principal glicosaminoglicana da matriz extracelular, é considerado um marco do processo de regeneração em pele de fetos de mamíferos e anfíbios. Em feridas de fetos, ele promove a migração de fibroblastos o qual influencia tanto na quantidade quanto no tipo de colágeno produzido na resposta inflamatória moderada. A matriz extracelular de feridas de fetos é rica em ácido hialurônico e permanece assim durante o período de reparação (Gawronska-Kozak *et al.*, 2006). A característica imunológica que distingue um camundongo Nude de outros modelos imunodeficientes é a baixa resposta imunológica à injúria de pele como é manifestada pela ausência de células CD8 no sangue periférico e baixo nível de citocinas pró-inflamatórias (TGF- β 1 e PDGF- β). Fetos mamíferos, até o terceiro trimestre de gestação, que são submetidos a incisões de pele, podem ter o processo de reparação dos tecidos sem formação de cicatrizes, pois acima desse período aparecem os linfócitos T. A ausência dos linfócitos T em camundongos Nude resulta em melhor resistência à ruptura da ferida e deposição de colágeno em resposta a injúrias teciduais, quando comparados com camundongos normais (Barbul *et al.*, 1989a; 1989b; Barbul & Regan, 1990; Barbul & Regan, 1995).

3.8 Comparação da reparação entre camundongos Nude e humanos

Vários estudos têm demonstrado que, após a injúria tecidual, a reparação de feridas em camundongos Nude, que receberam transplante de pele humana, mimetiza o processo observado *in situ*. Desse modo, a utilização de camundongos Nude representa uma ferramenta valiosa para o estudo da reparação, uma vez que sem comprovação *in vivo*, não seria permitido o estudo clínico em humanos (Démarchez *et al.*, 1986; Démarchez *et al.*, 1987).

Embora o processo cicatricial em camundongos Nude possa ser comparado ao que ocorre em humanos e tenha sua validade científica, é importante ressaltar, a influência do sistema imunológico na reparação de feridas.

Segundo Barbul *et al.* (1989a), os linfócitos T desempenham um dupla função na reparação de feridas: estimulação precoce de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, e um papel contra-final, que pode ser responsável pela realização ordenada da reparação.

A presença de macrófagos é essencial para o início e manutenção da atividade de fibroblastos na região da ferida. Os linfócitos T não parecem ser necessários para o início do processo de reparação, este pode ocorrer na ausência desse tipo de célula, entretanto a presença do sistema imunológico com células T intactas é essencial para o desenvolvimento normal do processo cicatricial, indicando que as células T provavelmente têm ação regulatória sobre a atividade de macrófagos (Regan & Barbul, 1994).

Embora a mecanismo de ação dos linfócitos no processo inflamatório não seja ainda muito bem esclarecido, há evidências de que essas células controlam a reparação de feridas. Quando a função dos linfócitos T é estimulada por hormônio de crescimento, vitamina A e arginina, provoca aumento na resistência à ruptura da ferida e aumento na deposição de colágeno, enquanto que a supressão provocada por esteróides, ácido retinóico, citral e ciclosporina A, ocasiona acentuada alteração no processo de reparação (Regan & Barbul, 1994).

Evidências diretas do envolvimento de linfócitos no controle da reparação de feridas são apresentadas por estudos, *in vivo*, que compararam os efeitos da depleção linfocitária com os parâmetros de reparação de feridas. A depleção seletiva de todas as células T provoca marcante diminuição da

resistência à ruptura da ferida e concentração de hidroxiprolina (Peterson *et al.*, 1987; Barbul *et al.*, 1989c; Efron *et al.*, 1990). A depleção simultânea de linfócitos T supressores e citotóxicos causam evidente melhora na reparação no período de 2 a 4 semanas após a injúria e ainda provoca significativo aumento na resistência à ruptura da ferida e síntese de colágeno (Efron *et al.*, 1990).

Um apoio adicional para esses achados é fornecido pela pesquisa com camundongos Nude (Barbul *et al.*, 1989c). Esses animais têm uma profunda deficiência de células T e mostram uma melhora significativa na resistência à ruptura de feridas e na deposição de colágeno em resposta à injúria, quando comparado com animais com timo normal. A reconstituição de células T em camundongos Nude, por meio de injeção de linfócitos T, resultou na diminuição significativa da resistência à ruptura quando comparado com os controles normais.

Além disso, os linfócitos T têm sido associados à formação de tecido fibrótico e cicatrizes hipertróficas (Castagnoli *et al.*, 2002). Para que ocorra um processo de reparo privilegiado, ou seja ausência de cicatrizes, é necessário que ocorra uma diminuta inflamação (Szpadarska *et al.*, 2003). Embora a rápida resposta do sistema imunológico a injúrias provenientes do meio interno ou externo seja essencial para manutenção da saúde, tem sido discutido que quanto mais rápida for a resposta inflamatória a injúrias, mais rápida é a reparação, mas ao mesmo tempo o processo não ocorre de forma ordenada o que pode provocar a formação de cicatrizes (Bayat *et al.*, 2003).

Quanto à reparação tecidual, no estudo de Gawronska-Kozak *et al.*, (2006), camundongos Nude que receberam uma incisão dorsal de 3 cm de comprimento com espessura completa, apresentaram 7 dias após, fechamento completo das feridas. Não foi observada formação de crosta, nem macro e nem microscopicamente. A área das feridas era menor e mais estreita e a epiderme, que recobria as feridas, era mais delgada em comparação com áreas não lesionadas do mesmo animal. Após 24 dias, em outros modelos animais, é possível observar mudanças nítidas, macro e microscopicamente, na área da ferida, mas em camundongos Nude, a aparência da área lesionada é semelhante a da área não lesionada. A organização espacial das fibras de colágeno da derme difere entre a pele intacta e a pele em processo de reparação em outros modelos animais, ou seja, a pele não lesionada é composta por fibras de colágeno

paralelas, longas e regulares; enquanto na pele onde ocorre a formação de cicatrizes, as fibras são curtas e desorganizadas.

Segundo Rossio-Pasquier (1999), com o período de 7 a 15 dias, após a injúria tecidual em camundongos Nude que haviam recebido enxerto de pele humana, foi possível observar abaixo da crosta um tecido de granulação, rico em vasos sanguíneos e células. Por meio de observações microscópicas foi observado que as células e as fibras de colágeno estavam dispostas paralelamente à superfície. Por volta do 11º dia, era possível notar, por imunohistoquímica, a presença de colágeno tipo I e a migração da epiderme das bordas em direção ao centro da ferida. No período de 3 a 6 semanas, havia intensa remodelação tecidual, as feridas estavam reepitelizadas e havia eliminação da crosta. Com 8 semanas após a injúria, o tecido de granulação praticamente havia desaparecido e havia completa formação tecidual.

Em roedores o processo de reparação, não estará estável e maduro antes de completar 80 dias após a injúria tecidual, enquanto em humanos, isso não ocorre antes de 6 meses (Ferguson & O’Kane, 2004).

3.9 Cola de fibrina

Um dos adesivos teciduais utilizados em cirurgias é a cola de fibrina. O material utilizado nos experimentos foi o TissueBond® fornecido pelo Instituto de Hematologia do Nordeste (IHENE).

Esse adesivo tecidual é composto por fibrinogênio e plasma, derivados de sangue humano e mimetiza os últimos passos da cascata de coagulação. Sua absorção se dá com o mínimo de reação tissular em um período de 30 a 50 dias em seres humanos. Esse adesivo age positivamente favorecendo a reparação da ferida cirúrgica, porque produz hemostasia local e estimula o fluxo de macrófagos com formação de fatores como a angiotensina, que liberados favorecem a angiogênese, induz a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno (Prado Filho *et al.*, 2008), possui efeito tóxico e carcinogênico desprezíveis e é biodegradável, sendo que 20% de sua massa original são desintegrados por fibrinólise, em 72 horas, após a aplicação (Silva *et al.*, 2007). Pelo fato desse material ser, em parte, derivado do sangue humano, ocorrem restrições ao seu uso por haver risco de transmissão de doenças virais, além de possuir alto custo

e sofrer desnaturação, quando em contato com álcool ou iodo. Dentre as indicações para uso desse adesivo, podem ser citados o emprego em vedação de linhas de suturas e nos orifícios dos pontos, reforço de linhas de sutura por grampeadores, queimaduras, para hemostasia local, suturas gastrintestinais e vasculares, fixação de enxertos cutâneos, na superfície radicular de reimplante dentário tardio, tratamento periodontal, ressecção de linfangiomas, fistula gastrojejunal, transplante de córnea, cirurgia endonasal e em fístula anal (Silva *et al.*, 2007).

3.10 Histologia

A histologia é o estudo dos tecidos do corpo e de como estes tecidos se organizam para constituir órgãos. Os tecidos são constituídos por células e matriz extracelular. O tamanho pequeno das células e dos componentes de matriz torna a histologia dependente do uso de microscópios. No microscópio de luz, a imagem pode ser examinada por feixe de luz transmitido através do corte. Considerando que tecidos e órgãos são normalmente espessos demais para permitir a passagem de luz, estes necessitam sofrer uma série de tratamentos prévios para então poderem ser seccionados por meio de instrumentos de grande precisão chamados micrótomos. Esses tratamentos incluem: 1) fixação: para evitar a digestão dos tecidos por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por bactérias e para preservar a estrutura e a composição molecular, os tecidos são imersos em soluções fixadoras, tais como formaldeído a 4% ou glutaraldeído; 2) desidratação: a água é extraída utilizando diversos banhos de soluções crescentes de etanol em água (etanol de 70% a etanol de 100%); 3) clareamento: utiliza-se o xilol para tornar os tecidos transparentes ou translúcidos, além disso, por ser miscível tanto em etanol quanto em parafina, facilita a penetração dessa última; 4) inclusão: os fragmentos de tecidos são infiltrados com parafina para adquirirem consistência rígida, a fim de facilitar a obtenção de secções delgadas; 5) microtomia: os blocos de parafina são levados ao micrótomo, onde são seccionados por uma lâmina de aço ou de vidro de modo a fornecer cortes de 1-10 μm de espessura, em seguida os cortes são desparafinizados em água aquecida, onde são depositados sobre lâminas de vidro; 6) coloração: para a realização dessa etapa o corte deve ser banhado em

xilol para remoção final da parafina e imerso em soluções decrescentes de etanol até que seja hidratado, somente então os corantes são empregados para não só tornar evidentes os vários componentes dos tecidos, como também para facilitar a distinção entre eles. Dentre todos os corantes, a combinação de hematoxilina e eosina (HE) é a mais comumente utilizada, sendo que a hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas e a eosina, por outro lado, cora o citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa; 7) Montagem: o corte é novamente desidratado em soluções crescentes de etanol, banhado em xilol, recebe uma gota do meio de montagem (geralmente Bálsamo do Canadá) e é coberto com lamínula (Junqueira & Carneiro, 2004; Gartner & Hiatt, 2007). Desta maneira os cortes histológicos estão prontos para a sua visualização microscópica.

3.10.1 Microscopia de luz

O microscópio de luz é composto de partes mecânicas e ópticas. O componente óptico consiste em três sistemas de lentes: condensadora, objetiva e ocular. O condensador concentra o feixe de luz e o projeta em direção ao espécime. A objetiva amplia a imagem do espécime e a projeta em direção à ocular, que novamente amplia a imagem e a projeta em direção à retina, em uma tela, em um negativo fotográfico ou em um detector (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.11 OCT

A Tomografia de Coerência Óptica (do inglês Optical Coherence Tomography – OCT) é uma tecnologia de obtenção de imagens em escalas microscópicas (Huang *et al.*, 1991). Por ser uma técnica óptica, a OCT fornece imagens de alta resolução, *in vivo* e de um modo não destrutivo, proporcionando informações sobre a microestrutura do tecido, que podem não ser obtidas por meio de outras técnicas utilizadas (Fujimoto *et al.*, 1995; Freitas *et al.*, 2006).

A configuração da OCT é geralmente montada com um interferômetro de Michelson e esta estrutura pode ser dividida nas seguintes partes essenciais para o funcionamento do sistema: fonte de luz, sistema de digitalização e detector de luz (Freitas *et al.*, 2006).

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 recombinações 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 superlumincente compacta, a resolução é de 10 a 20 μm . Se fontes alternativas, como pulsos ultracurtos de laser, são utilizados, a resolução 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 quando um feixe de luz é lançado no tecido e os perfis da reflexão de diversas posições transversas são gravados no computador. O resultado é uma representação bidimensional da secção transversa do tecido. Esta representação pode então ser constituída com cores falsas ou em coloração branca, tons de cinza, até a coloração preta. Onde, a cor branca corresponde a um alto coeficiente de espalhamento na amostra (alta densidade) e a cor preta um baixo coeficiente de espalhamento (menor densidade). Pelo fato da luz sofrer forte espalhamento na maioria dos tecidos, a profundidade de obtenção de imagens é limitada a poucos milímetros. A OCT possui um potencial para funcionar como um tipo de “biópsia óptica” onde a morfologia pode ser avaliada diretamente, em tempo real e sem necessidade de qualquer preparação prévia das estruturas a serem estudadas (Fujimoto *et al.*, 1995).

3.12 Biomecânica

Os estudos biomecânicos em tecidos moles podem ser realizados em equipamentos específicos, tais como: BTC-2000^{TM} (Surgical Research Laboratory, Inc., Nashville, TN, EUA), Cutometers SEM 575 Skin Elasticity Meter® (Courage and Khazaka, Köln, Alemanha), KRATOS® K5002 (Kratos Equipamentos Industriais Ltda, São Paulo, Brasil) e a Máquina Universal de Ensaios Instron (Instron, Inc., Norwood, EUA). O equipamento escolhido para os ensaios biomecânicos da presente pesquisa foi a Máquina Universal de Ensaios Instron, modelo 5567, do CTR/IPEN. Esse aparelho possui câmara para ensaios a temperaturas de -70 °C a 250 °C, célula de carga de 1 kN e 10 kN, com escala de velocidade de 0,0001 até 500 mm por minuto e conjunto de garras adequadas para materiais rígidos, semirrígidos e não-rígidos, além disso, possui sistema pneumático de ajuste de garras para fixação das amostras. Na Máquina Universal de Ensaios Instron, podem ser realizados ensaios de tração, compressão e flexão. O sistema de comando e aquisição de dados é composto por microcomputador PC, programa Bluehill® 2 e impressora DeskJet série 830C (Hewlett-Packard Development Company, São Paulo, Brasil), (Instron do Brasil, 2009) como mostrado na FIG. 9.

FIGURA 9 - Máquina Universal de Ensaio Instron com (A) sistema pneumático de ajuste de garras, (B) microcomputador com programa Bluehill® 2 e (C) conjunto de garras.

3.13 *Análise Estatística*

3.13.1 *Análise de Variância (ANOVA)*

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

Considerando uma variável de interesse com média μ e variância σ^2 , têm-se dois estimadores de σ^2 (Hall, 2006):

S_B^2 dispersão entre os grupos (onde B significa *Between*) e;

S_W^2 dispersão dentro dos grupos (onde W significa *within*)

A variância das médias amostrais é dada por:

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

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

Assim, o teste de análise de variância de Fisher (F) é aplicado para:

$$F = \frac{S_B^2}{S_W^2} \quad (\text{Eq. 2})$$

3.13.2 Teste de Tukey

O método de Tukey é um complemento à ANOVA e permite estabelecer a diferença mínima significativa, ou seja, a menor diferença de médias de amostras que deve ser tomada como estatisticamente significativa, em determinado nível. Essa diferença (d.m.s.) é dada por:

$$\text{d. m. s.} = q \sqrt{\frac{\text{QMR}}{r}} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde q é um valor dado em tabela, QMR é o quadrado médio do resíduo da análise de variância e r é o número de repetições de cada tratamento (Vieira, 2003).

De acordo com esse teste (Eq. 3), duas médias são estatisticamente diferentes toda vez que o valor absoluto da diferença entre elas for igual ou superior ao valor da d.m.s. (Vieira, 2003).

O método de Tukey protege os testes de um aumento no nível de significância devido ao número de comparações efetuadas (Callegari-Jacques, 2003).

3.13.3 Correção de Bonferroni

Segundo Callegari-Jacques (2003), o procedimento de Bonferroni consiste em corrigir o valor de α , calculando-se:

$$\alpha_{\text{Bonf}} = \frac{\alpha}{m} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde α é o nível de significância global do experimento e m é o número de comparações a serem realizadas.

A correção de Bonferroni (Eq. 4) é usada em muitos testes estatísticos. No caso das comparações múltiplas realizadas após a ANOVA, o procedimento consiste em calcular uma diferença entre médias usando a equação (Eq. 5):

$$t_{\text{Bonf}} = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{QM \text{ Resíduo} \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Este valor é comparado com o valor de t crítico, para o alfa corrigido de Bonferroni (α_{Bonf}) e $GL = GL \text{ Resíduo}$ da tabela da ANOVA. Se t_{Bonf} for maior do que $t_{\alpha_{\text{Bonf}}; GL \text{ Resíduo}}$, rejeita-se $H_0: \mu_A = \mu_B$.

A correção de Bonferroni não requer que as várias comparações sejam independentes, o que é uma vantagem. A desvantagem é que produz um teste mais conservador do que o Tukey, embora isso possa ser corrigido usando o procedimento sequencial de Holm para a correção de Bonferroni (Callegari-Jacques, 2003).

3.13.4 Teste t para observações independentes

Foi proposto o teste t para comparar a média de dois grupos entre si, tanto do módulo de elasticidade, resistência à tração, quanto da contração tecidual.

O teste de hipótese: $H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$

$$H_0: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

foi aplicado entre a média dos valores do módulo de elasticidade do grupo controle ($\bar{x}_1$) e do grupo irradiado ($\bar{x}_2$) de cada unidade amostral.

O teste considerou a independência das amostras e variâncias desconhecidas e diferentes. Dessa forma aplicou-se o teste t dado pela equação (Eq. 6). A diferença entre as médias está indicada na expressão (Eq. 7) e a variância da diferença das médias está indicada na expressão (Eq. 8). O cálculo do grau de liberdade está representado na equação (Eq. 9):

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{s_d^2}} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\bar{d} = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$S_d^2 = \left(\frac{s_1^2}{n_1} \right) + \left(\frac{s_2^2}{n_2} \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

$$g = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{\frac{n_1}{n_1-1}} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{n_2}{n_2-1}}} \quad (\text{Eq. 9})$$

A região crítica tem a forma: $RC = \{t \in R : t < -t_c \dots t > t_c\}$

Após os cálculos, procura-se o valor de t_c (t crítico) na tabela de valores de t , ao nível de significância estabelecido de 1% e com “ g ” graus de liberdade. Toda vez que o valor absoluto de t calculado for igual ou maior do que o valor da tabela, conclui-se que a diferença entre as médias é significativa e a H_0 deve ser rejeitada (Vieira, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo *in vivo*, em modelo animal, é uma sequência do trabalho *in vitro* intitulado “Preservação e esterilização por radiação de pele humana para banco de tecidos” de responsabilidade da mesma pesquisadora, Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do IPEN sob parecer número 14/CEPA-IPEN/SP em 08 de Março de 2007 (Anexo B) e pelo CEP do ICB sob parecer número 772 de 11 de Abril de 2007 (Anexo C).

4.1 Materiais, instrumentos e equipamentos

4.1.1 Obtenção das amostras

Foram obtidas amostras de pele humana de doador multiórgãos, retiradas com dermatômetro elétrico, conservadas em glicerol concentrado (mínimo 85%). As amostras foram cedidas pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo disponibilizadas somente peles que foram descartadas para utilização em transplantes (Anexo A), como preconizado na Portaria nº 2.600 de 21 de outubro de 2009 (Brasil, Portaria nº 2.600, 2009).

4.1.2 Materiais, instrumentos e equipamentos para os ensaios *in vivo*

4.1.2.1 Preparação das amostras

Para mensurar a espessura da amostra de pele foi utilizado o paquímetro universal série 536 (Mitutoyo Sul Americana Ltda, São Paulo, Brasil) enquanto as dimensões das amostras das tiras de pele foram mensuradas com régua de aço inoxidável (Endo Keiki, Niigata, Japão). O corte das amostras foi feito com lâmina de bisturi nº 15. Em seguida as amostras foram seladas termicamente em embalagem de polietileno (Whirl-Pak® Write-On Bag, Nasco, Fort Atkinson, Wisconsin, EUA) onde foi fixado o selo indicador de irradiação (WPC Polímeros Ltda, São Paulo, Brasil).

Todas as amostras foram manipuladas com equipamento individual de proteção, isto é, luvas de procedimento, máscaras cirúrgicas e avental, em laboratório adequado. Os instrumentos cirúrgicos (pinça, bisturi, tesoura) e frascos foram lavados com sabão especial 'Extran', em seguida embalados em envelope grau cirúrgico e autoclavados. O material plástico, que não suporta autoclavagem, foi embalado adequadamente e esterilizado com radiação ionizante a 25 kGy.

O excedente de pele descartado após os experimentos foi mergulhado em frasco tampado com hipoclorito de sódio. O descarte final foi feito em saco plástico apropriado e, o material foi autoclavado. Após esse procedimento, realizado no próprio laboratório, o material foi embalado em saco branco e depositado em "container" próprio para descarte de material biológico de acordo com a NBR 12809 (ABNT, 1993), que dispõe sobre o manuseio de resíduos de serviços de saúde e a Portaria Estadual CVS-01 de 18 de Janeiro de 2000, que estabelece que a unidade (laboratório de pesquisa) deve instituir ações para garantir o princípio da biossegurança nos programas de garantia de qualidade (Estado de São Paulo, Portaria CVS-01, 2000).

4.1.2.2 Irradiador de Cobalto-60

As amostras foram irradiadas em irradiador de ^{60}Co (irradiador Gammacell-220, Nordion Inc., Quebec, Canadá), do Laboratório de Fontes Intensas de Radiação, unidade do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR, IPEN-CNEN/SP), à temperatura de 2 a 8 °C, com atividade, no momento da irradiação, de 3.484,292 Ci e taxa de dose 2,88 kGy/h.

4.1.2.3 Separação dermoepidérmica

Para esse procedimento foram utilizados: solução salina a 0,9%, solução de dispase a 2,5% (Protease Neutra – grau II, Boehringer-Mannheim, Alemanha) em DMEM (GIBCO™, Invitrogen Corporation, nº de catálogo 12800-058, EUA), DMEM acrescido de antibiótico-antimicótico (penicilina G sódica 10.000 unidades/ml, sulfato de estreptomicina 10.000 µg/ml, anfotericina B

25 µg/ml - GIBCO™, Invitrogen, nº de catálogo 15240-062, EUA) e fluxo laminar vertical (TROX® Brasil Ltda, 219780-1-1, série FLV classe II 1-KE, Brasil).

4.1.2.4 Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico foram utilizados cabo para bisturi nº 3 (Erwin Guth Ltda, São Paulo, Brasil), lâmina de bisturi nº 15 (Solidor, São Paulo, Brasil), tesouras cirúrgicas com pontas rombas e agudas (Erwin Guth Ltda, São Paulo, Brasil), pinça de dissecação anatômica (Erwin Guth Ltda, São Paulo, Brasil), régua (Endo Keiki, Niigata, Japão), clipador permanente (Ethicon Endo-Surgery, Ohio, EUA), clip cirúrgico LT 100 (Ethicon Endo-Surgery Inc., Cincinnati, Ohio, EUA), placas de petri em vidro fundo plano (Perfecta Curitiba, Paraná, Brasil), estante para tubos de centrifugação com fundo cônico (Alfa Produtos Hospitalares e laboratoriais, São Paulo, Brasil), tubos de centrifugação com fundo cônico (Alfa Produtos Hospitalares e Laboratoriais, São Paulo, Brasil), caneta marcadora (Labmarkers, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), seringas com agulhas (Terumo Medical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil); solução miorelaxante de cloridrato de xilazina a 2% (kensol®, König do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil); solução anestésica injetável de cloridrato de ketamina 5% (Vetanarcol®, König do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), adaptador para a aplicação da cola de fibrina (TissueBond®, Recife, Pernambuco, Brasil), cola de fibrina (TissueBond®, Recife, Pernambuco, Brasil), cateter intravenoso 16GA (Insys/BD, Becton Dickinson Company, São Paulo, Brasil), solução fisiológica estéril, gaze vaselinada (Curatec Age 30 Rayon, Johnson & Johnson Medical Inc., New Brunswick, New Jersey, EUA), curativo micropore (3M do Brasil, São Paulo, Brasil), curativo Bioclusive (Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio para Saúde Ltda, São Paulo, Brasil), UTI para os primeiros cuidados com os camundongos após a enxertia constituída de madeira com leito de algodão e controle térmico com lâmpada de 60 W. O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar (TROX® Technik, 219780-1-1, classe II A-1, TROX do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) na sala de biossegurança do biotério do Centro de Biotecnologia do IPEN.

4.1.2.5 Sacrifício dos animais

Para o sacrifício dos animais foi utilizada câmara de gás carbônico (Beira Mar, modelo GSCO₂, São Paulo, Brasil) com cilindro de gás carbônico (White Martins, São Paulo, Brasil) acoplado (FIG. 10).

FIGURA 10 - Câmara de CO₂ para sacrifício animal.

4.1.2.6 Medição da área de reparação

Para medir a área de reparação, após 21 e 90 dias, foi utilizada balança analítica com precisão de quatro casas decimais (modelo AB304-S, Mettler Toledo, São Paulo, Brasil) (FIG. 11) e papel celofane para a cópia das áreas cicatriciais.

FIGURA 11 - Balança analítica utilizada para a pesagem das cópias das áreas de reparação.

4.1.3 Equipamento utilizado para a avaliação por Tomografia de coerência óptica

Para avaliação do espalhamento de luz foi utilizado o equipamento OCP930SR (Thorlabs, Newton, New Jersey, EUA) acoplado a um microcomputador para captura e armazenamento das imagens (FIG 12). De acordo com o fabricante o aparelho obtém imagens com a profundidade aproximada de 1,6 mm e tem resolução de 6,2 μm .

FIGURA 12 – Para a realização da análise por tomografia de coerência óptica foram utilizados o aparelho OCP930SR (A) e um microcomputador para captura e armazenamento das imagens (B).

4.1.4 Materiais e equipamentos utilizados para os ensaios biomecânicos

4.1.4.1 Faca e prensa para corte dos corpos de prova

Para o corte do corpo de prova foram utilizadas duas facas de aço em formato padrão de halteres (*'dumbbells'*) montadas em suporte de madeira (Atual Facas Ltda, São Paulo, Brasil), com dimensões padronizadas (ASTM D638-08, 2003). A primeira faca possuía comprimento total de 50 mm, extensômetro com largura de 4 mm e comprimento de 20 mm e a segunda faca tinha comprimento total de 35 mm, extensômetro com largura de 4 mm e comprimento de 5 mm. O corte foi feito com auxílio de prensa hidráulica (Specac, série 21602, Cranston,

Rhode Island, EUA) com carga de 2000 kg (FIG. 13). As facas e os equipamentos foram higienizados com álcool etílico 70% antes e após sua utilização.

FIGURA 13 – Para a confecção do corpo de prova foram utilizadas: (A) faca de corte e (B) prensa hidráulica.

4.1.4.2 Ensaios de resistência à tração

Os ensaios de resistência à tração foram realizados na Máquina Universal de Ensaio (Instron, modelo 5567, São Paulo, Brasil), do CTR/IPEN à temperatura de 23 °C e umidade relativa do ar de 50%, com garras adequadas para materiais não rígidos.

4.1.5 Histologia

4.1.5.1 Microscópio de luz

As amostras foram fixadas no Laboratório de Procedimentos do Centro de Biotecnologia do IPEN-CNEN/SP e a confecção das lâminas histológicas foi realizada no laboratório de histopatologia do Hospital e Maternidade Dom Orione (Araguaína, TO). As observações das lâminas e o registro fotográfico foram realizados em microscópio de luz (modelo Alphaphot-2, Nikon Inc., EUA) (ocular de 10x e objetiva de 40x), dotado de câmera fotográfica digital (DSC-W350, Sony Eletronics Inc., China).

4.2 Métodos

As seqüências de procedimentos realizados está representada na figura abaixo (FIG.14)

FIGURA 14 - Fluxograma da metodologia empregada no estudo.

4.2.1 Preparação das amostras

Foram selecionadas amostras de pele com espessuras homogêneas, sendo que as amostras gliceroladas, que foram submetidas à separação dermoepidérmica para o enxerto de derme humana, tinham espessura de 0,40 a 0,60 mm. As espessuras foram determinadas por meio de paquímetro com precisão de 0,05 mm.

As tiras de pele selecionadas foram cortadas com dimensões de aproximadamente 2,0 x 2,0 cm e seladas termicamente em embalagem dupla de polietileno. Na embalagem interna foi fixado o selo indicador de irradiação (FIG. 15).

FIGURA 15 - Amostras de pele seladas em embalagem dupla de polietileno. Indicador laranja identifica o material não irradiado e o indicador vermelho, material irradiado.

4.2.2 Irradiação do material biológico

As amostras foram acondicionadas em recipiente cilíndrico de poliuretano (14 cm de diâmetro e 20 cm de altura) para o irradiação com raios gama. Para a manutenção da temperatura entre 2 e 8 °C, foram adicionados pequenos pacotes de gelo dentro do recipiente, acima e abaixo das amostras, assim como os dosímetros de polimetilmetacrilato Red Perpex que foram distribuídos uniformemente.

Todas as amostras foram divididas em três grupos: 1) grupo controle (não irradiado), 2) grupo irradiado com dose de 25 kGy e, 3) grupo irradiado com

dose de 50 kGy. Enquanto os grupos 2 e 3 foram submetidos à irradiação, o grupo 1 foi mantido sob refrigeração.

4.2.3 Separação dermoepidérmica

Os fragmentos de pele humana do grupo controle e dos grupos experimentais (irradiados a 25 kGy e a 50 kGy) foram retirados da solução de glicerol e lavados por 15 minutos em solução salina a 0,9% por 3 vezes. Foram então colocados em solução de dispase a 2,5% em DMEM, a temperatura de aproximadamente 35 °C até a separação completa entre derme e epiderme. Os fragmentos dérmicos foram removidos da solução de dispase, lavados 2 vezes por 15 minutos com salina a 0,9% e armazenados em DMEM acrescido de antibiótico-antimicótico. Todo o trabalho foi realizado em capela de fluxo laminar, mantendo as condições de biossegurança. Ao final do procedimento as dermes foram armazenadas a 4 °C até a utilização no terceiro experimento *in vivo*.

4.2.4 Protocolo cirúrgico

Para o preparo da cola de fibrina, as seringas contendo plasma ou fibrinogênio foram descongeladas em Banho Maria a 37 °C e inseridas ao adaptador fornecido pelo fabricante para que quantidades iguais, tanto de plasma quanto de fibrinogênio, fossem dispensadas simultaneamente sobre os tecidos e a cola de fibrina pudesse coagular em aproximadamente 5 segundos. O preparo desse material foi imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico.

Após irradiação, as amostras de pele foram submetidas a três banhos de 15 minutos cada, com solução salina 0,9% estéril, para retirada do glicerol e recuperação das características físicas normais do tecido, simulando as condições rotineiras de uso no centro cirúrgico.

Foram utilizados, no primeiro experimento, 75 camundongos Nude, de ambos os sexos, com idade entre 8 a 10 semanas, fornecidos pelo Biotério do Centro de Biotecnologia do IPEN. Uma ferida, medindo 1,5 x 1,5 cm, foi criada cirurgicamente, localizada na região dorsal média de cada animal, os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos quanto ao tratamento a ser realizado. Os enxertos empregados em cada grupo foram: grupo 1 – controle: pele humana mantida nas condições iniciais, ou seja, não irradiada; grupo 2 – pele irradiada

com dose de 25 kGy; grupo 3 – pele irradiada com dose de 50 kGy. Os enxertos foram mantidos nos leitos cirúrgicos por meio de Liga Clips de titânio LT100 e cola de fibrina. Foram protegidos contra a desidratação com gaze vaselinada e curativo micropore. No 3º, 7º, 21º e 90º dia as áreas enxertadas foram observadas e fotografadas, sendo que no 7º dia, os clips de titânio que ainda não haviam se soltado espontaneamente, foram removidos com o auxílio de pinças, as bordas ressecadas foram removidas e sobre o enxerto remanescente foi aplicada vaselina. Foram sacrificados 15 animais de cada grupo no terceiro, sétimo e vigésimo primeiro dias após a colocação dos enxertos, para observação histológica. Foram sacrificados 30 animais (10 de cada grupo) no nonagésimo dia após a cirurgia para a realização dos ensaios biomecânicos de resistência à tração com corpo de prova de 50 mm. Todos os protocolos foram autorizados e conduzidos de acordo com os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelas normativas do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do IPEN.

No segundo momento cirúrgico foram utilizados 30 animais. As dimensões e a localização da ferida foram idênticas as do primeiro momento cirúrgico. Estes animais foram utilizados para o teste de tração com corpo de prova de 35 mm, sendo divididos em 3 grupos, receberam os mesmos tratamentos descritos acima e sacrificados no nonagésimo dia após a cirurgia.

Para o experimento com enxerto de derme humana, o procedimento cirúrgico seguiu o protocolo acima descrito, porém utilizando a pele desepidermizada *in vitro*. Neste experimento foram utilizados 15 animais, divididos aleatoriamente nos 3 grupos de estudo. Os enxertos foram mantidos nos leitos cirúrgicos por meio de Liga Clips de titânio LT100 e cola de fibrina. Foram protegidos contra a desidratação com gaze vaselinada e curativo de poliuretano e sacrificados após 7 dias, para observação histológica.

4.2.5 Sacrifício dos animais

Para o sacrifício, a câmara de CO₂ recebeu uma pré-carga de gás carbônico por 30 segundos, após esse procedimento, os animais foram colocados no interior da câmara que foi fechada em seguida; a válvula do cilindro que armazena o gás foi reaberta, por cerca de 60 segundos; esperou-se de 3 a 5 minutos para o animal parar de se mover e de respirar.

4.2.6 Medição das áreas residuais da reparação.

As áreas residuais da reparação foram medidas após 21 e 90 dias. Para esse procedimento as áreas foram copiadas em papel transparente (celofane). Para calibração do peso e sua conversão em área, foram recortados 10 fragmentos de celofane com área de 1 cm^2 , estes fragmentos foram pesados, obtendo-se peso médio de 0,0061 g. As demais áreas foram obtidas pesando as respectivas cópias e empregando-se uma equação simples de proporcionalidade (FIG 16).

FIGURA 16 - Medição da área residual. Em (A) área no camundongo. Em (B) cópias das áreas em papel celofane.

4.2.7 Remoção das amostras de pele dos camundongos

As peles foram removidas por incisão com lâmina de bisturi nº 15 e divulsão com tesoura de ponta romba, sendo mantidas em solução fisiológica até a análise por meio da técnica de tomografia de coerência óptica (OCT) ou realização dos cortes dos corpos de prova para ensaios biomecânicos. Para a confecção dos cortes histológicos, as amostras foram imediatamente fixadas em paraformaldeído a 4%.

4.2.8 Tomografia de coerência óptica (OCT)

Foram analisadas, pela técnica de OCT, 2 amostras de cada grupo experimental e do grupo controle de pele de camundongo, após 90 dias do enxerto (FIG. 17). As análises foram realizadas no Centro de Lasers e Aplicações do IPEN-CNEN/SP, sob supervisão do Dr. Anderson Zanardi de Freitas, no

equipamento OCP930SR. O sistema de OCT utiliza como fonte óptica um led superluminucente, com largura espectral de 100 ± 5 nm e centrado em 930 nm, com potência de 2 mW na amostra. A luz foi focalizada na amostra com 3 cm de distância focal, após retirada do excesso de solução fisiológica da superfície das amostras. As imagens adquiridas foram armazenadas em microcomputador e posteriormente comparadas entre si.

As áreas analisadas foram tanto as que receberam o enxerto de pele humana, quanto as não lesionadas, de cada um dos animais. Após a análise, as amostras foram novamente mantidas em solução fisiológica a 0,9% até a realização dos cortes dos corpos de prova.

FIGURA 17 – Análise da pele do camundongo por tomografia de coerência óptica.

4.2.9 Ensaios biomecânicos de resistência à tração

Após o sacrifício dos animais e a remoção das peles, estas foram mantidas em solução salina 0,9% estéril até que fossem feitos os cortes dos corpos de prova. Para a realização dos cortes, as amostras de pele foram apoiadas em placa de acrílico com a epiderme voltada para cima; sobre ela foi colocada a faca com a parte cortante voltada para a pele e o corte foi feito com auxílio da prensa hidráulica.

Os ensaios de resistência à tração foram realizados segundo a norma ASTM D638-08 (2003) na Máquina Universal de Ensaios Instron, com módulo de carga de 1 kN, à temperatura ambiente de aproximadamente 23 °C e umidade relativa do ar de 50%. Nos ensaios, o corpo de prova foi fixado a uma distância de

27 mm entre garras, para os corpos de prova de 50 mm e de 5 mm para os corpos de prova de 35 mm, e submetido à tração até a ruptura da amostra. A velocidade de deslocamento das garras foi de 20 mm/min. As amostras que escaparam das garras durante a tração foram descartadas.

Os gráficos foram obtidos com o programa Bluehill® 2 da Máquina de Ensaio Instron, apresentando a curva da relação entre a tensão de tração aplicada e a deformação correspondente da amostra.

A resistência à tração na ruptura é representada pela tensão ou “stress” (σ , em MPa) que é a razão entre força aplicada (F, em N) e a área da secção transversal (A, em mm²) (Eq. 10) (Canto & Pessan, 2003):

$$\sigma = F/A \quad (\text{Eq. 10})$$

A deformação ou “strain” (ε , em mm/mm) da amostra é o resultado da variação do comprimento (L) pelo comprimento inicial (L1):

$$\varepsilon = L/L1 \quad (\text{Eq. 11})$$

sendo que, $L = L2 - L1$ e L2 é o comprimento final.

Os dados para os cálculos do módulo de elasticidade e resistência à tração foram obtidos dos gráficos correspondentes a cada amostra, onde o módulo de elasticidade (E) foi calculado na porção linear da curva, dividindo-se a variação de tensão correspondente a uma secção do segmento ($\Delta\sigma$), pela correspondente variação de alongamento ($\Delta\varepsilon$) (Eq. 11 e 12):

$$E = \Delta\sigma/\Delta\varepsilon \text{ ou } E = (\sigma_2 - \sigma_1)/(\varepsilon_2 - \varepsilon_1). \quad (\text{Eq. 12})$$

4.2.10 Histologia

4.2.10.1 Preparo das lâminas

As amostras foram fixadas em paraformaldeído (4% em tampão Cacodilato de sódio - pH 7,2) por 72 horas, lavadas em PBS (3 vezes por 10 minutos cada), desidratadas em soluções crescentes de álcool (de 70% até álcool absoluto) e diafanizadas com xilol. Em seguida foram imersas em parafina e mantidas em estufa. Os cortes foram realizados no micrótomo, com blocos de parafinas endurecidos e esfriados com gelo, na espessura final de 5 μm . Os cortes foram colocados em banho-maria (40 °C) e em seguida distendidos em lâminas de vidro apropriadas para microscopia de luz. As lâminas secaram em

estufa a 56 °C. Em seguida foi feita a desparafinização com xilol e hidratação com banhos subsequentes de álcool absoluto até a solução diluída de 70%. A coloração se processou mergulhando as lâminas em cubetas com corantes hematoxilina e eosina e ao final, em água para remoção do excesso dos corantes. Os procedimentos descritos foram realizados no laboratório de histopatologia do Hospital e Maternidade Dom Orione de Araguaína/TO e Laboratório Cobra/TO.

As observações das lâminas em microscópio de luz e registro fotográfico foram realizadas segundo descrito no item 4.1.5.1.

4.2.11 Tratamento estatístico e interpretação dos dados

Inicialmente foi realizada análise exploratória dos dados. As medidas estatísticas de tendência central e medidas de variabilidade foram calculadas para os grupos controle e para cada um dos grupos experimentais. Os testes estatísticos empregados foram o teste de significância *t de Student*, a análise de variância (ANOVA) seguida dos testes de Tukey e de Bonferroni para comparação da média do módulo de elasticidade, resistência à tração e contração tecidual dos grupos experimentais comparada à média do grupo controle. O nível de significância foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da irradiação na separação dermoepidérmica com dispase a 2,5% (*in vitro*)

Neste procedimento foi observada possibilidade e o tempo necessário para a separação com dispase a 2,5% das amostras irradiadas em relação ao controle.

A separação dermoepidérmica, *in vitro* (FIG. 18), no grupo controle se iniciou com 26 minutos (FIG. 18) e foi concluída com 50 minutos (FIG 19-A e 20-A). Nos grupos de 25 kGy (FIG. 19-B) e 50 kGy (FIG. 19-C) ela se iniciou com 34 minutos, sendo que no grupo de 25 kGy esta foi concluída em 60 minutos (FIG. 20-B) e no grupo de 50 kGy, ela foi concluída com 90 minutos (FIG. 20-C). Nos dois grupos irradiados, mesmo após a segunda incubação, houve a necessidade de raspagem mecânica para que houvesse a completa separação dermoepidérmica, sendo que no grupo de 50 kGy houve maior dificuldade para concluir a separação. Mesmo após a raspagem cuidadosa, resquícios de epiderme permaneceram nos grupos de 25 kGy e 50 kGy (FIG. 20). Quando esses grupos foram comparados entre si, o grupo de 50 kGy ainda apresentava maior quantidade de resquícios de epiderme.

FIGURA 18 – Separação dermoepidérmica com dispase a 2,5%.

FIGURA 19 - Pele humana após a primeira incubação com dispase a 2,5%. Em (A) é evidente a ausência de epiderme no grupo de 0 kGy. Em (B), é evidente a presença de resquícios de epiderme próximo às bordas no grupo de 25 kGy. Em (C), permanece maior quantidade de epiderme nas bordas no grupo de 50 kGy.

FIGURA 20 - Pele humana após a segunda incubação com dispase a 2,5%. Em (A) observa-se a remoção completa da epiderme que já havia ocorrido durante a primeira incubação. Em (B), quase não é possível notar resquícios da epiderme humana no grupo de 25 kGy. Em (C), é nítida a permanência de resquícios de pele humana principalmente nas bordas do enxerto.

5.2 Caracterização morfológica de pele ou derme humana transplantada em camundongos Nude

Com o intuito de caracterizar a pele humana após o transplante, foram efetuados experimentos tanto com pele parcial quanto com derme humana, preservadas em alta concentração de glicerol, irradiadas e reidratadas.

5.2.1 Caracterização morfológica de pele humana transplantada em camundongos Nude

Foram avaliados: aparência macroscópica e tamanho da área de reparação com 3, 7, 21 e 90 dias após o procedimento cirúrgico; imagem de tomografia de coerência óptica após 7 dias e avaliação histológica com 3, 7 e 21 dias.

5.2.1.1 Avaliação macroscópica

Após a cirurgia dos animais, as feridas foram avaliadas em cada um dos grupos experimentais e do grupo controle (FIG. 21). Nos três primeiros dias após a cirurgia, algumas feridas apresentaram pouco exsudato, mas a maioria estava seca em todos os grupos experimentais. Durante a evolução da reparação do 7º ao 90º dia, não houve a formação de edema e nem infecção, sendo que os enxertos dos três grupos experimentais apresentaram aderência, boa coaptação das bordas, notando-se uma evolução asséptica, não diferindo entre os grupos avaliados. No 7º dia, as bordas das feridas apresentaram-se ressecadas em todos os grupos experimentais. No 21º dia após a cirurgia, todas as feridas apresentaram-se com crostas secas e descamantes e o tamanho da área da ferida era menor. No 90º dia, as bordas das lesões que se fundiram na linha média, produziram uma camada epitelial delgada e contínua.

FIGURA 21 - Aspecto macroscópico das feridas e áreas de reparação dos animais dos grupos experimentais com 3, 7, 21 e 90 dias após o enxerto de pele humana.

As áreas de reparação foram medidas após 21 e 90 dias do procedimento cirúrgico. Nos animais sacrificados após 21 dias do transplante, foi possível observar uma área de reparação menor nos animais que receberam enxerto de pele humana irradiada a 25 kGy, como mostrado na TAB. 5, onde são apresentadas as médias dos valores das áreas de reparação tanto em centímetros quadrados, quanto em porcentagem da área inicial.

TABELA 5 – Número de amostras e médias dos valores das áreas (A) de reparação $\pm$ desvio médio após 21 dias do transplante de pele humana.

Grupo	Número de amostras	Média da A de reparação (cm ²)	Média da A de reparação (%)
0 kGy	5	1,9760 $\pm$ 0,2129	34,00 $\pm$ 0,58
25 kGy	5	0,9020 $\pm$ 0,0948*	27,25 $\pm$ 1,61*
50 kGy	5	1,8660 $\pm$ 0,0986	34,88 $\pm$ 2,58

ANOVA One-way confirmada com post hoc de Tukey. *p<0,05

A análise de variância (ANOVA) mostrou diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). O teste de Tukey, para diferenciação das médias, indicou que há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (0 kGy) x 25 kGy e os grupos 25 kGy x 50 kGy, indicando uma menor área de reparação no grupo de 25 kGy (FIG. 22).

FIGURA 22 – Representação gráfica dos valores da área (A) de reparação após 21 dias do transplante de pele humana. Os resultados são expressos em valores médios ($\pm$ DM). ANOVA One-way confirmada com post hoc de Tukey. *p<0,05.

Nos animais sacrificados após 90 dias, foi possível observar regiões mais espessas no centro da ferida, em alguns camundongos dos grupos transplantados com pele irradiada (25 e 50 kGy) e somente em 1 camundongo do grupo controle.

Após 90 dias, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as áreas, quando os grupos foram comparados. Os valores da área de reparação, em porcentagem da área inicial e em centímetros quadrados, são apresentados na TAB. 6.

TABELA 6 – Número de amostras e média dos valores das áreas (A) de reparação $\pm$ desvio médio após 90 dias do transplante de pele humana.

Grupo	Número de amostras	Média da A de reparação (cm ²)	Média de A de reparação (%)
0 kGy	7	0,3101 $\pm$ 0,0432	13,78 $\pm$ 1,91
25 kGy	10	0,2329 $\pm$ 0,0259	10,35 $\pm$ 1,15
50 kGy	10	0,2407 $\pm$ 0,0221	10,70 $\pm$ 0,98

A análise de variância (ANOVA) mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando os grupos foram comparados, indicando que todos apresentaram menor área de reparação após 90 dias, em comparação com a área inicial, mas quando os grupos experimentais foram comparados entre si e comparados com o grupo controle, o teste de Tukey não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação à área de reparação da ferida nesse período (FIG. 23).

Figura 23 - Valores da área (A) de reparação após 90 dias do transplante de pele humana. Os resultados são expressos em valores médios ($\pm$ DM). Valor de $*p < 0,05$ (ANOVA).

5.2.1.2 Avaliação das imagens de tomografia de coerência óptica (OCT)

Duas amostras de cada grupo experimental e do grupo controle foram analisadas por meio da técnica de OCT quanto à homogeneidade do espalhamento de luz e quanto à distinção entre epiderme e derme. As diferenças entre a pele não lesionada e os grupos experimentais podem ser observadas na FIG. 24.

FIGURA 24 – Imagens obtidas por OCT da pele do camundongo Nude. Em (A) não lesionada do camundongo Nude. Em (B) interface da área de reparação onde foi transplantado enxerto de pele humana não irradiada (controle) x pele do camundongo Nude. Em (C) interface da área de reparação onde foi transplantado enxerto de pele humana irradiado a 25 kGy x pele do camundongo Nude. Em (D) interface da área de reparação onde foi transplantado enxerto de pele humana irradiado a 50 kGy x pele do camundongo Nude. Resolução 1024 x 512 pixels.

A melhor resposta de reparação, caracterizada por apresentar área com maior espalhamento de luz, maior homogeneidade na interface da área de reparação com a pele original do camundongo (↖), maior distinção entre epiderme e derme (↗), foi observada nos animais que receberam enxertos irradiados, sendo ainda mais evidente no grupo de 50 kGy (FIG. 24-D).

5.2.1.3 Microscopia de luz dos cortes histológicos da pele de camundongos onde foi realizado transplante de pele humana

Na avaliação por microscopia de luz dos cortes histológicos da pele removida dos camundongos após 3 dias do transplante, foi possível visualizar a presença de intenso infiltrado inflamatório, pouca organização tecidual, mas

evidente migração dos tecidos do camundongo das bordas em direção ao centro da ferida, além da presença do enxerto íntegro (FIG. 25).

FIGURA 25 - Pele do camundongo Nude com enxerto de pele humana - microscopia de luz (coloração HE). Sacrifício após 3 dias do enxerto. Epiderme (EC) e derme (DC) do camundongo Nude migram sob a pele humana (PH). (A) Grupo de 0 kGy; (B) grupo de 25 kGy; grupo de 50 kGy. Aumento: 100x.

No material obtido dos animais sacrificados após 7 dias da colocação do enxerto, foi possível observar desprendimento da epiderme humana com migração da derme do camundongo Nude sobre a derme humana somente em 1 das bordas de 60% das lâminas do grupo controle (enxerto não irradiado), com o grupo onde o enxerto foi irradiado a 25 kGy, a migração aconteceu em ambas as bordas de 54,5% das lâminas e com o grupo onde o enxerto foi irradiado a 50 kGy, isso ocorreu somente em 1 das bordas de uma das lâminas (FIG. 26).

FIGURA 26 - Pele do camundongo Nude com enxerto de pele humana - microscopia de luz. Sacrifício após 7 dias do enxerto. Epiderme do camundongo Nude (EC) migra sobre a provável derme humana (PDH). Derme do camundongo (DC). (A) Grupo de 0 kGy; (B) Grupo de 25 kGy e (C) grupo de 50 kGy. Aumento: 100x.

Na FIG. 27 podem ser observadas as imagens dos locais onde a pele do camundongo migrou sob ou entre a pele humana.

FIGURA 27 - Pele do camundongo Nude com enxerto de pele humana - microscopia de luz. Sacrifício após 7 dias do enxerto. Em (A) epiderme do camundongo Nude (EC) migra sob a pele humana (PH) no grupo de 50 kGy. Em (B) a epiderme do camundongo migra entre as fibras conjuntivas da provável derme humana (PDH) no grupo de 50 kGy. Aumento: 100x.

Quando o tempo de sacrifício foi de 21 dias após o transplante, pouco se pôde notar de resquícios do enxerto. Entretanto, é valiosa a observação que no grupo controle houve fechamento completo da ferida em 16% das lâminas, no grupo com enxerto irradiado a 25 kGy, isso ocorreu em 40% das lâminas e no grupo com enxerto irradiado a 50 kGy, não houve fechamento da ferida (FIG. 28).

FIGURA 28 - Pele do camundongo Nude com enxerto de pele humana - microscopia de luz. Sacrifício após 21 dias do enxerto de pele humana. Em (A) epiderme do camundongo Nude (EC) migra sob a pele humana (PH) no grupo de 0 kGy. Em (B) houve fechamento completo da ferida no grupo de 25 kGy. Em (C) não houve fechamento da ferida no grupo de 50 kGy. Aumento de 100x.

5.2.2 Caracterização morfológica de derme humana transplantada em camundongos Nude

Com o objetivo de se verificar a influência da epiderme na incorporação do enxerto, os camundongos foram transplantados com derme humana e o processo de reparação foi avaliado por meio de análise histológica após 7 dias.

5.2.2.1 Microscopia de luz dos cortes histológicos da pele de camundongos onde foram realizados transplantes de derme humana

Foi observado intenso infiltrado de células inflamatórias na pele dos animais deste grupo, com migração da pele do camundongo sob o enxerto, tendo sido este irradiado ou não (FIG. 29).

FIGURA 29 - Pele do camundongo Nude com enxerto de derme humana - microscopia de luz. Sacrifício após 7 dias do enxerto de derme humana. Em (A), no grupo de 0 kGy; em (B), no grupo de 25 kGy e em (C), no grupo de 50 kGy, a epiderme do camundongo Nude (EC) migra sob a derme humana (DH), ocorrendo o movimento centrípeto das bordas das feridas, mas sem oclusão das mesmas. Aumento de 100x.

5.3 Avaliação Biomecânica

A avaliação biomecânica da pele do camundongo onde foi transplantada pele humana, irradiada ou não, foi realizada por meio da comparação do módulo de elasticidade (em MPa) e resistência à tração para cada uma das amostras, com a pele não lesionada, como controle animal.

Na FIG. 30 é ilustrado, como exemplo, o gráfico correspondente a amostra nº 1 do grupo de 25 kGy obtida após 90 dias do procedimento cirúrgico, submetida ao teste de resistência à tração, onde o segundo segmento da curva (indicado pela seta) representa uma pequena resistência da amostra após o pico

máximo do valor de “stress”. Esse segundo segmento da curva é observado em 62,5% das amostras do grupo de 25 kGy, 37,5% das amostras do grupo de 50 kGy e no grupo de 0 kGy, isso não ocorreu.

FIGURA 30 - Gráfico obtido com o software Bluehill® 2 para a amostra nº 1 do grupo de 25 kGy com 90 dias após o procedimento cirúrgico. A reta em azul (/) foi construída manualmente para evidenciar a parte linear da curva.

A fim de se verificar a exequibilidade do teste, foi realizado um ensaio biomecânico como teste piloto, tanto para a obtenção dos valores de tensão de tração quanto do módulo de elasticidade, em peles dos animais do grupo controle, 25 kGy e 50 kGy, após 21 dias do transplante de pele humana.

Embora os valores do módulo de elasticidade e tensão de tração tenham sido semelhantes nos grupos controle ($E = 2,66$ MPa; $\sigma = 0,48$ MPa) e 25 kGy ($E = 2,85$ MPa; $\sigma = 0,40$ MPa) e superiores ao grupo de 50 kGy ($E = 2,33$ MPa; $\sigma = 0,26$ MPa), o local de ruptura variou nas amostras testadas. Na amostra do grupo não irradiado houve ruptura na pele do camundongo; no grupo de 25 kGy, ocorreu no enxerto de pele humana e no grupo de 50 kGy, ocorreu na interface pele do camundongo x enxerto. Embora o número de amostras tenha sido pequeno e não pudesse ser comparado por meio de testes estatísticos, o experimento serviu para verificar que com 21 dias após a colocação do enxerto, a ferida ainda se encontra em processo de reparação e esta poderia interferir nos resultados obtidos.

Por este motivo, optou-se por aumentar o número de amostras e repetir os ensaios biomecânicos com 90 dias após o transplante de pele humana utilizando amostras obtidas com as facas de corte de 50 mm e 35 mm.

5.3.1 Ensaio biomecânico com corpo de prova de 50 mm

Na TAB. 7 pode se visualizar os resultados referentes às médias dos valores de tensão de tração e do módulo de elasticidade com corpo de prova de 50 mm, onde parte corresponde à pele do animal e parte corresponde ao enxerto humano.

TABELA 7 - Número de amostras, médias dos valores de tensão de tração (σ , em MPa) e do módulo de elasticidade (E, em MPa) $\pm$ desvio médio após 90 dias do transplante de pele humana (corpo de prova de 50 mm) nos diferentes grupos.

Grupo	Número de amostras	Média σ (MPa)	Média E (MPa)
Pele não lesionada	9	0,88 $\pm$ 0,08	2,33 $\pm$ 0,11
0 kGy	4	0,71 $\pm$ 0,09	2,29 $\pm$ 0,29
25 kGy	4	0,69 $\pm$ 0,15	2,46 $\pm$ 0,62
50 kGy	4	0,94 $\pm$ 0,27	2,81 $\pm$ 0,47

No grupo de 0 kGy, em 3 amostras houve ruptura da pele não lesionada do camundongo e em 1, a ruptura foi na interface pele do camundongo não lesionada x área de reparação. No grupo de 25 kGy, em 1 amostra, a ruptura ocorreu na pele do camundongo, em 1 amostra, ocorreu na interface entre a pele do camundongo e área de reparação e em 2 amostras houve ruptura na área de reparação. No grupo de 50 kGy, 2 amostras romperam na interface e 2 amostras romperam na pele não lesionada do camundongo.

O módulo de elasticidade das peles de camundongos Nude (peles não lesionadas), de peles que receberam enxertos não irradiados, irradiados a 25 kGy e a 50 kGy, foi comparado e é apresentado na FIG. 31

FIGURA 31 - Módulo de elasticidade (E) das peles não lesionadas de camundongos Nude que receberam enxertos não irradiados, irradiados a 25 kGy e a 50 kGy. Valores expressos em média $\pm$ desvio médio.

O gráfico a seguir mostra os valores de resistência à tração da pele do camundongo (pele não lesionada), da pele que recebeu o enxerto não irradiado e irradiado a 25 kGy e 50 kGy (FIG. 32).

FIGURA 32 – Resistência à tração (σ) das peles não lesionadas de camundongos Nude que receberam enxertos não irradiados, irradiados a 25 kGy e a 50 kGy. Valores expressos em média $\pm$ desvio médio.

Os resultados obtidos por meio de avaliação do módulo de elasticidade e de resistência à tração não se apresentaram diferentes estatisticamente quando o teste ANOVA foi aplicado, mas o Teste F mostrou que as variâncias foram estatisticamente diferentes quando o grupo 25 kGy e 50 kGy foram comparados com a pele não lesionada.

5.3.2 Ensaio biomecânico com corpo de prova de 35 mm

Na TAB. 8 pode se visualizar os resultados referentes às médias dos valores de tensão de tração e do módulo de elasticidade com corpo de prova de 35 mm, onde a região exposta à tração foi somente a região de reparação da ferida e foi possível observar o módulo de elasticidade e resistência à tração da região de interesse.

TABELA 8 - Número de amostras, médias dos valores de tensão de tração (σ , em MPa) e do módulo de elasticidade (E, em MPa) $\pm$ desvio médio após 90 dias do transplante de pele humana (corpo de prova de 35 mm) nos diferentes grupos.

Grupo	Número de amostras	Média σ (MPa)	Média E (MPa)
Pele não lesionada	27	1,48 $\pm$ 0,14	0,99 $\pm$ 0,10
0 kGy	7	1,37 $\pm$ 0,25	1,62 $\pm$ 0,35
25 kGy	10	1,17 $\pm$ 0,13	1,14 $\pm$ 0,15
50 kGy	10	1,45 $\pm$ 0,20	1,51 $\pm$ 0,25

Com base nos dados apresentados na TAB. 8, foram montados os gráficos comparativos apresentados nas FIG. 33 e FIG. 34 nos quais se visualiza a correlação entre os valores do módulo de elasticidade e da resistência à tração, respectivamente, tanto do grupo de amostras de pele não lesionadas, quanto do grupo de amostras irradiadas com raios gama nas doses de 25 kGy e 50 kGy.

Não há diferenças estatisticamente significativas quando há comparação da resistência à tração, mas a pele dos camundongos que receberam enxertos irradiados a 25 kGy apresenta tendência a ser menor que os demais grupos.

FIGURA 33 – Resistência à tração (σ) das peles dos camundongos (não lesionadas, com enxertos não irradiados e com enxertos irradiados a 25 kGy e 50 kGy). Valores expressos em média $\pm$ desvio médio.

As peles dos camundongos que receberam enxertos irradiados a 25 kGy apresentaram elasticidade semelhante à pele não injuriada e, embora não seja estatisticamente diferente aos demais grupos, apresenta tendência de ser menor.

FIGURA 34 - Módulo de elasticidade (E) das peles dos camundongos (não lesionadas, com enxertos não irradiados e com enxertos irradiados com 25 kGy e 50 kGy).

6. DISCUSSÃO

A proteção de feridas cutâneas extensas e profundas, como as causadas por queimaduras, é um processo necessário para impedir a perda hídrica e protéica, evitar hipotermia, diminuir o risco de contaminação (Herndon, 1997) e permitir a reparação adequada da pele (Borojevic & Serricella, 1999).

No Brasil, no mês março de 2010 foram registradas 7.564 internações por queimaduras resultantes da exposição à corrente elétrica, fogo e substâncias quentes, resultando em 155 óbitos. Em 2011, nesse mesmo mês, foram registradas 7.730 internações, resultando em 169 óbitos. Segundo a localização, a maior incidência de óbitos no Brasil, nesse período, foi na região sul (47), seguida pelas regiões sudeste (38), nordeste (35), norte (27) e centro-oeste (22). O valor total dispendido para tratamento de queimados foi de R\$ 8.592.608,80 e a média de internação hospitalar foi de 5,1 dias (MS, 2011).

O tratamento de queimaduras demanda, aos cofres públicos um alto custo com internações, além de colaborar para o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes.

O fechamento precoce da ferida é uma condição primordial para a recuperação do paciente. Se as feridas forem extensas, pode não haver áreas doadoras de autoenxertos. Métodos alternativos se baseiam na utilização de substitutos cutâneos sintéticos ou biológicos, como os aloenxertos obtidos de Bancos de Tecidos (Barreto, 2006).

Uma vez que durante a captação, o processamento ou o armazenamento dos tecidos, mesmo que os procedimentos sejam realizados em meio asséptico e haja cuidado rigoroso na triagem dos doadores, os aloenxertos podem apresentar risco contaminação, há a necessidade de se adicionar ao processo métodos de esterilização, como a radiação ionizante.

A radiação gama pode provocar, *in vitro*, alterações dose-dependentes na derme, tais como: reticulação intra e intermolecular, reorganização das fibrilas, aumento da espessura e da largura das fibras colágenas, desnaturação protéica e molecular, fragmentação (despolimerização) e desorganização da estrutura secundária (Cheung *et al.*, 1990, Leontiou *et al.*, 1993; Tzaphlidou *et al.*, 1997), diminuição da estabilidade da matriz, rápida degradação da derme e mudança no

padrão de orientação das fibras colágenas, e essas alterações influenciam na adesão e no repovoamento por fibroblastos, além da deposição de novo colágeno (Gouk *et al.*, 2008). Segundo Bourroul (2004), com doses maiores que 25 kGy, essas modificações interferem na elasticidade e na capacidade da pele em resistir à tração.

Para verificar se essas alterações relatadas *in vitro*, comprometeriam o emprego *in vivo*, de amostras de pele humana submetidas à radiação gama, foram realizados transplantes de peles humanas, irradiadas ou não, em camundongos Nude. Em paralelo, foram realizados transplantes de derme humana para analisar se a ausência da epiderme promoveria uma reparação similar à pele total (derme mais epiderme).

O motivo de se realizar também enxertos de derme foi baseado nas informações obtidas durante o procedimento de desepidermização *in vitro*. Nesse procedimento foi possível observar maior adesão dermoepidérmica nas amostras de pele irradiadas quando comparadas ao controle (pele não irradiada), ainda mais visível naquelas irradiadas a 50 kGy, sendo que a separação dermoepidérmica no grupo controle (enxerto não irradiado) ocorreu mais precocemente em relação aos grupos de 25 e 50 kGy, respectivamente 50, 60 e 90 minutos e que nos grupos irradiados houve necessidade de raspagem mecânica para completar a remoção da epiderme, esta foi ainda mais vigorosa no grupo de 50 kGy do que no de 25 kGy. Mesmo tendo sido realizada raspagem mecânica cuidadosa, ainda sobraram resquícios de epiderme nos grupos irradiados, sendo maior no grupo de 50 kGy do que no de 25 kGy. (FIG. 18 a 20).

Confirmando os achados *in vitro*, Herson (1999) descreve que a separação dermoepidérmica em pele humana não irradiada ocorre entre 45 e 60 minutos, proporcionais à espessura dérmica do fragmento.

A maior adesão entre a epiderme e a conjuntivo também foi observada por Paggiaro (2011) em seu estudo, *in vitro*, com membrana amniótica. De acordo com esse autor, após a desepitelização ainda permanecem algumas células epiteliais de tecidos irradiados a 25 kGy em ^{60}Co . Apesar das características inerentes a cada tecido, a membrana amniótica apresenta uma estrutura muito semelhante à pele humana.

Devido à dificuldade de se realizar a desepidermização nas amostras de pele irradiadas, foi levantada a hipótese de que a permanência da epiderme nos enxertos seria barreira para a migração dos tecidos do camundongo.

O primeiro experimento consistiu no enxerto de pele humana, irradiada ou não. Nesse experimento, os animais que receberam os enxertos foram sacrificados após 3, 7, 21 e 90 dias do procedimento cirúrgico. Esses tempos foram baseados nas fases do processo de reparação que ocorre na pele do animal.

Com o sacrifício após 3 dias, apesar da presença de exsudato em algumas feridas, a maioria estava seca. Após o 7º até o 90º dia do procedimento cirúrgico o processo de reparação ocorreu de forma normal, ou seja, não houve formação de edema e nem infecção, sendo que os enxertos dos três grupos experimentais apresentaram aderência, boa coaptação das bordas da ferida, notando-se uma evolução asséptica; não diferindo entre os grupos avaliados (FIG. 21). No 7º dia após o procedimento cirúrgico, as bordas do enxerto estavam ressecadas, estas foram removidas e sobre as feridas, foi aplicada vaselina. Até este momento, não havia diferenças nítidas em relação aos grupos avaliados. Com 21 dias, as áreas de reparação eram evidentemente diferentes entre os grupos, dado confirmado pela mensuração das áreas (TAB. 5). Com 21 dias, o grupo de 25 kGy apresentou maior contração do que os demais grupos (FIG. 22), resultando em prejuízo estético. Com 90 dias, todos os animais apresentaram completo fechamento das feridas e, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas nas áreas finais de todos os grupos (FIG. 23), os que receberam enxertos de pele irradiada aparentavam maior contração e menor área (TAB. 6). Sendo que no grupo irradiado a 25 kGy os efeitos, aparentemente, foram mais intensos (FIG. 21 e 22). Além disso, foram observadas regiões mais espessas no centro da ferida, em alguns camundongos dos grupos transplantados com pele irradiada (25 e 50 kGy) e somente em 1 camundongo do grupo controle. Essas áreas mais espessas poderiam ser resquícios do enxerto e que possivelmente seriam reabsorvidos pelo próprio animal durante a evolução do processo de reparo.

A contração, ocorrida nesse período se deve ao aparecimento de miofibroblastos e formação de fibronexus que provocam tensão na superfície e contração da ferida (Powell *et al.*, 1999; Gabbiani, 2003).

Para avaliar a organização do processo de reparo, após 7 dias do transplante de pele humana, foram feitas análises por meio da técnica de OCT, onde foi possível observar maior distinção entre epiderme e derme na região que recebeu os enxertos irradiados e os animais que receberam enxertos irradiados a 50 kGy apresentam área cicatricial com maior espalhamento de luz, maior homogeneidade, maior distinção entre epiderme e derme, indicando uma melhor reparação. Enquanto no grupo que recebeu enxerto não irradiado, a área de reparação apresentou-se menos homogênea (FIG. 24).

Embora, possa produzir menos detalhes microestruturais que a microscopia de luz, devido aos múltiplos espalhamentos de luz e à limitação quanto à profundidade de obtenção de imagens (Fujimoto *et al.*, 1995), os resultados obtidos pela técnica do OCT podem ser comparados com os obtidos por microscopia de luz a uma profundidade de aproximadamente 600 μm , com a vantagem de não conter artefatos provocados pelo processamento histológico (Pan *et al.*, 1996), mas a avaliação dos resultados obtidos é dificultada por não existir, até o momento, dados comparativos na literatura. A análise morfológica é limitada, mas apesar disso, o OCT é uma ferramenta eficaz para visualização das estruturas da pele como a epiderme, derme papilar e anexos cutâneos (Mongensen *et al.*, 2008).

Com a finalidade de verificar se as informações obtidas, por meio de avaliação macroscópica e por meio da técnica de OCT, poderiam ser correlacionadas às microscópicas, foram processados fragmentos de pele retirados dos camundongos após 3, 7 e 21 dias do transplante de pele humana, irradiada ou não.

Na análise histológica das peles dos camundongos que foram sacrificados após 3 dias do procedimento cirúrgico, foi possível visualizar a presença de intenso infiltrado inflamatório, pouca organização tecidual, mas evidente migração centrípeta dos tecidos do camundongo, além da presença do enxerto íntegro sem diferenças nítidas entre os grupos (FIG. 25). Com o tempo de 7 dias, foi possível observar que no grupo controle (0 kGy) houve migração da epiderme do camundongo Nude sobre a provável derme humana somente em uma das bordas de 60% das lâminas, com o grupo onde o enxerto foi irradiado a 25 kGy, a migração aconteceu em ambas as bordas de 54,5% das lâminas e com o grupo de 50 kGy, isso ocorreu somente em uma das bordas de uma das

lâminas (FIG. 26 e 27). Esse comportamento diferente da migração dos tecidos dos camundongos em direção ao enxerto, foi inicialmente correlacionado a presença ou ausência da epiderme do enxerto, visto que nos grupos irradiados a separação dermoepidérmica foi mais difícil, principalmente no grupo de 50 kGy.

Após 21 dias, o fechamento das feridas, observado histologicamente, onde o enxerto empregado havia sido irradiado com 25 kGy, foi mais rápido do que no grupo onde o enxerto não foi irradiado, evidenciado pelo movimento centrípeto das bordas da ferida, entretanto, nas feridas onde foi inserido enxerto irradiado a 50 kGy, não houve fechamento (FIG. 28). Essa característica observada no grupo de 50 kGy pode estar correlacionada aos efeitos da radiação, relatados em estudos *in vitro*, ou seja à desestruturação da fibrila de colágeno do enxerto (Bourroul, 2004), à degradação da matriz extracelular, e por ter havido uma reparação mais lenta, a deposição do novo colágeno foi mais organizada, resultando em uma melhor reparação, entretanto mais lenta (Gouk *et al.*, 2008).

Em humanos, a permanência da ferida aberta é um estímulo para formação de colágeno e a persistência de formação do colágeno pode provocar a cicatrização hipertrófica (Bolgiani, 2001). Se os dados obtidos nos animais fossem reproduzidos em humanos, neste caso, poderíamos ter um processo de reparação mais rápido e com menor chance de formação de cicatrizes excessivas com enxertos de pele irradiada a 25 kGy.

Para que fosse possível verificar se a presença da epiderme dificultaria a migração dos tecidos do camundongo, foram feitos transplantes de derme humana, irradiadas ou não, e os animais foram sacrificados após 7 dias do procedimento cirúrgico.

Nesse experimento foi possível observar um intenso processo inflamatório, ainda maior que no grupo onde foi empregado o enxerto de pele, sendo que em todos os grupos avaliados, a epiderme do camundongo migrou sob a derme humana em direção ao centro da ferida, mas sem oclusão da mesma (FIG. 29).

Embora a princípio tenha sido levantada a hipótese que a permanência da epiderme humana tenha sido barreira para a migração dos tecidos do camundongo, essa não foi confirmada com o emprego de derme humana, pois também não foi observada integração, do enxerto dérmico em relação ao enxerto dermoepidérmico, com os tecidos do animal, seja irradiado ou não.

Estes dados não refletem a experiência do nosso grupo de pesquisa, em transplantes de derme humana, onde foi observada integração do enxerto, porém a diferença básica entre os experimentos foi a presença de queratinócitos cultivados *in vitro* sobre esta derme.

A diferença observada entre enxerto de derme humana, com ou sem queratinócitos cultivados, pode estar relacionada à sobrevivência de células humanas e ao fato destas secretarem sua própria matriz. Ainda, a presença de queratinócitos pode induzir, por meio de fatores indutores, a migração de células do hospedeiro (Rossio-Pasquier *et al.*, 1999).

As alterações dérmicas, provocadas pela radiação gama, também são descritas por Gouk *et al.* (2008) em estudo realizado com Alloderm® irradiada com doses entre 2 a 30 kGy. Os autores relatam que os fibroblastos e as novas fibras colágenas se tornam bem alinhados. Segundo os autores, fibroblastos parecem ser capazes de “sentir” as modificações radioinduzidas na derme decelularizada e apresentam uma interação célula x matriz diferente. Derme decelularizada e irradiada é remodelada rapidamente por fibroblastos após a irradiação. A radiação gama não afeta a proliferação de fibroblastos *in vitro*, entretanto, a diminuição da estabilidade da matriz, a rápida degradação da derme e o padrão de orientação das fibras colágenas influenciam a adesão e o repovoamento por fibroblastos, além da deposição de novo colágeno.

Se essas observações forem extrapoladas para a pele humana, então a radiação gama até 30 kGy provocaria alterações teciduais que promoveriam condições para a cobertura, rápido fechamento e, rápida síntese de colágeno e migração de células para o leito da ferida.

Para avaliar se essas alterações observadas poderiam influenciar as propriedades biomecânicas da pele dos camundongos Nude, submetida ou não à irradiação, foram realizados ensaios comparando o módulo de elasticidade e a resistência à tração.

Inicialmente foi realizada a avaliação de 1 amostra de cada grupo experimental, após 21 dias do procedimento cirúrgico, para verificar se com esse tempo de reparação, a pele poderia ser submetida aos ensaios biomecânicos. Os resultados obtidos não foram conclusivos e estes podem ter sido influenciados pela reparação incompleta, pois segundo Gawronska-Kozak *et al.* (2006), amostras de pele de camundongos Nude sacrificados após 24 dias da injúria

tecidual apresentam um significativo aumento do módulo de elasticidade (cerca de 2,28 vezes maior), espessura menor, maior deformação e menor resistência à tração, quando comparado também com amostras de pele não lesionada. Esses autores correlacionam os resultados de elasticidade e tensão de tração com o alto nível de ácido hialurônico e menor quantidade de fibras colágenas em amostras de pele lesionada. Por este motivo, optou-se por aumentar o número de amostras e refazer os testes após o término do processo de reparação da pele do animal.

De acordo com Ferguson & O’Kane (2004), o processo de reparação em roedores não está estável e maduro antes de completar 80 dias após a injúria tecidual, por esta razão, as propriedades biomecânicas da pele do restante dos camundongos foram avaliadas após 90 dias do transplante de pele humana.

Para verificar se a reparação tecidual após a utilização de enxertos, irradiados ou não, provocaria alterações nas propriedades biomecânicas após 90 dias, foram confeccionados corpos de prova com 50 e com 35 mm.

Com os corpos de prova de 50 mm, os resultados obtidos por meio de avaliação do módulo de elasticidade e de resistência à tração não se apresentaram diferentes estatisticamente, mas houve grande dispersão nas medidas obtidas pelos ensaios de tração (FIG. 31 e 32). A presença de pele sadia do animal na região submetida à tração pode ter contribuído para esses resultados e foi, por isso que se optou por repetir o experimento com corpos de prova de 35 mm.

Na maioria das amostras de pele dos camundongos que receberam transplantes de peles irradiadas a 25 kGy e em muitas das amostras do grupo de 50 kGy, que foram submetidas ao teste de resistência à tração, o segundo segmento da curva do gráfico de tração versus deformação (FIG. 30), representa uma pequena resistência da amostra após o pico máximo do valor de “stress” (tração), resistência essa devido à ruptura da epiderme ter ocorrido após a da derme, sugerindo que também haja alterações intercelulares na epiderme.

Com o corpo de prova de 35 mm, a região que foi submetida aos ensaios biomecânicos continha somente a área de reparação da pele do camundongo. A pele dos camundongos que receberam enxertos irradiados a 25 kGy apresentaram elasticidade semelhante à pele não injuriada e, embora não seja estatisticamente diferente aos demais grupos, esta apresenta tendência a ser menor (FIG. 34).

Quanto à resistência à tração, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os animais dos grupos avaliados, mas a pele dos camundongos que receberam enxertos irradiados a 25 kGy apresentaram tendência a ter menor resistência que os demais grupos (FIG. 33). Isso pode estar relacionado à rápida oclusão e à contração excessiva da ferida durante os estágios iniciais da reparação.

Segundo Gouk *et al.* (2008), a radiação gama provoca despolimerização, via quebra das cadeias peptídicas do colágeno, e isso é demonstrado pelo declínio gradual da resistência à tração e ao ligeiro aumento da elasticidade do tecido com dose maior de radiação

Bourroul (2004) em seu estudo *in vitro* também não encontrou diferenças significantes estatisticamente entre a pele irradiada a 25 kGy e a pele não irradiada.

O mesmo fenômeno foi observado após seu transplante em camundongos Nude, pois nas condições desse experimento, a área que recebeu o enxerto irradiado com 25 kGy não apresenta diferenças nas propriedades biomecânicas quando comparada à pele irradiada com a mesma dose.

Considerando a resistência microbiana e a utilização de protetores, tal como o glicerol, que aumentam a resistência à radiação, Bancos de Tecidos como os da Polônia têm preconizado doses acima ($33 \pm 3,3$ kGy) da recomendada para esterilização de tecidos (25 kGy).

Estudos *in vitro* mostram que doses maiores do que 25 kGy (Bourroul, 2004; Gouk *et al.*, 2008), utilizadas para eliminar microorganismos mais radorresistentes, provocam significativa redução da resistência à tração, acarretando uma maior fragilidade do tecido. Entretanto como observado *in vivo*, essas alterações não inviabilizam o uso de enxertos irradiados com 25 e 50 kGy. Quando se compara os resultados obtidos com enxertos irradiados com essas doses, embora os irradiados com 25 kGy tenham provocado um fechamento mais rápido da ferida, também provocaram alterações estéticas mais pronunciadas, enquanto os enxertos irradiados com 50 kGy, apesar de desencadearem um fechamento mais lento da ferida, estes permitiram resultados mais favoráveis quanto à organização tecidual e aparência estética da área de reparação.

Embora o modelo animal utilizado nessa pesquisa tenha um comportamento imunológico diferente do humano, é descrito na literatura como o

animal de escolha para estudo sobre reparação após a utilização de enxertos humanos (Démarchez *et al.*, 1986; Démarchez *et al.*, 1987; Mecklenburg *et al.*, 2005, Gawronska-Kozak *et al.*, 2006), além das características mencionadas no capítulo 3, possibilita que alguns dos resultados obtidos com o uso desse modelo animal possam ser extrapolados para humanos, principalmente em estudos comparativos, como as respostas entre enxertos irradiados em relação aos não irradiados.

7. CONCLUSÕES

- Macroscopicamente, os enxertos irradiados a 25 kGy promoveram uma contração inicial maior com 21 dias, não sendo observada diferença quanto às dimensões da área final de reparação entre os camundongos Nude dos grupos experimentais, após 90 dias.
- De acordo com as observações durante o emprego da técnica de OCT, pode-se concluir que o processo de reparação está mais organizado na pele que recebeu enxertos irradiados.
- Segundo observações histológicas, com a utilização de enxertos irradiados a 25 kGy, houve uma redução no tempo de fechamento da ferida em relação ao controle com enxertos não irradiados, já com enxertos irradiados a 50 kGy, foi observado o efeito inverso, não havendo fechamento das feridas, após 21 dias.
- Por meio de comparações histológicas entre as peles dos camundongos que receberam enxertos de pele ou de derme humana, submetidas ou não à irradiação, foi possível concluir que a ausência da epiderme não auxiliou a integração do enxerto.
- Como um estudo comparativo, entre enxertos irradiados ou não, pode-se concluir que houve uma aceleração no processo de reparação, quando foram utilizados enxertos irradiados com 25 kGy, sem alterações biomecânicas na organização final do tecido.
- Considerando a elasticidade e a tração, nas condições deste estudo, as peles dos camundongos que receberam enxertos irradiados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparadas à pele não lesionada ou às que receberam enxertos não irradiados.
- Embora o camundongo Nude seja um dos modelos *in vivo* mais utilizados, a resposta de reparação é diferente da reparação de humanos adultos, sendo então necessário que os resultados obtidos sejam confirmados em um modelo animal com resposta de reparação semelhante à de humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, B.; LAM, P.K.; LAU, H. Allogenic skin: transplant or dressing? **Burns**, v. 28, p. 358-366, 2002.

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. **Radiat. Phys. Chem.**, 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.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Manuseio de resíduos de serviços de saúde**. Rio de Janeiro: ABNT, 1993. (NBR 12809).

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. **Standard testes methods for tensile properties**. Philadelphia, 2003. (ASTM D638-08).

BALBINO, C.A; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BARBUL, A.; BRESLIN, J.R.; WOODYARD, JP. The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. **Ann. Surg.**, v. 209, p. 479-483, 1989a.

BARBUL, A.; SHAW, T.; ROTTER, S.M.; EFRON, J.E.; WASSERKRUG, H.L.; BADAWY, S.B. Wound healing in Nude mice: a study on the regulatory role of lymphocytes in fibroplasia. **Surgery**, v. 105, p. 764-769, 1989b.

BARBUL, A.; SHAW, T.; FRANKEL, H.; EFRON, J.E.; WASSERKRUG, H.L. Inhibition of wound repair by thymic hormones. **Surgery**, v. 106, p. 373-377, 1989c.

BARBUL, A.; REGAN, M.C. The regulatory role of T lymphocytes in wound healing. **J. Trauma**, v. 30, p. 97-100, 1990.

BARBUL, A.; REGAN, M.C. Immune involvement in wound healing. **Otolaryngol. Clin. North. Am.**, v. 28, p. 955-968, 1995.

BARRETO, M.G. Enxerto de pele homólogo. In: LIMA JÚNIOR, E. M.; SERRA, M.C.V.F. (ED.). **Tratado de queimaduras**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. cap. 62, enxerto de pele homólogo. p. 431-435.

BAYAT, A; MCGROUTHER, D.A.; FERGUSON, M.W. Skin scarring. **B.M.J.**, v. 326, p. 88-92, 2003.

BEN-BASSAT. Performance and safety of skin allografts. **Clin. Dermatol.**, v. 23, p. 365-375, 2005.

BERMAN, B.; BIELEY, H.C. Keloids. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 33, n. 1, p.117- 123, 1995.

BERNDT. A.M.; KOSMEHL, H.; KATENKAMP, D.; TAUCHMANN, V. Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's disease in associated with fibronectin, laminin, collagen type IV and tenascin extracellular matrix. **Pathobiology**, v. 92, p. 55-58, 1994.

BETZ, P.; NERLICH, A.; WILSKE, J.; TÜBEL, J.; WIEST, I.; PENNING, R.; EISENMENGER, W. The time-dependent rearrangement of the epithelial basement membrane in human skin wounds immunohistochemical localization of collagen IV e VII. **Int. J. Legal. Med.**, v. 93, p. 105, 1992.

BIRAL, A.R. **Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos**. Florianópolis: Insular, 2002. cap. 7, efeitos biológicos das radiações. p. 99-119.

BOLGIANI, A.N. El rol de los substitutos biosinteticos de la piel. In: PHILLIPS, G.O. (Ed.). **Radiacion Y operacion de Banco de Tejidos**. Perú: Printing service, 2001.

BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia**, v. 2, n. 7, p. 16-18, 1999.

BOURROUL, S.C.; HERSON, M.R.; PINO, E.S.; MATHOR, M.B. Sterilization of skin allografts by ionizing radiation. **Cell. Mol. Biol.**, v. 48, n. 7, p. 803-807, 2002.

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

BRASIL, Portaria nº 2.600 de 21 de outubro de 2009. Aprova o regulamento técnico do Sistema Nacional de Transplantes. D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de outubro de 2009. Disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=77&data=30/10/2009>. Acesso em: 17 fev. 2011.

BRIGGAMAN, R.; WHEELER, C.E. The epidermal-dermal junction. **J. Invest. Dermatol.**, v. 54, n. 1, p. 71-84, 1975.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: 2003. 255p.

CALVO, W. A. P. **Desenvolvimento do sistema de irradiação em um irradiador multipropósito de cobalto-60 tipo compacto**. 2005. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CANTO, L.B.; PESSAN, L.A. Resistência à tração, flexão e compressão. In: CANEVAROLO JUNIOR, S.V. (Ed.). **Técnicas de caracterização de polímeros**. Artliber, 2003. p. 341-360.

CASTAGNOLI, C.; STELLA, M.; MAGLIACANI, G. Role of T-lymphocytes and cytokines in post-burn hypertrophic scars. **Wound Rep. Reg.**, v. 10, p. 107-108, 2002.

CHEUNG, D.T.; PERELMAN N.; TONG, D.; NIMNI, M.E. The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alphachains and cross-linked native fibers. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 24, p. 581-589, 1990.

CHISTOLINI, P.; DE ANGELIS, G.; DE LUCA, M.; PELLEGRINI G.; RUSPANTINI, I. Analysis of the mechanical properties of in vitro reconstructed epidermis: preliminary results. **Med. Biol. Eng. Comput.**, v. 37, p. 670-672, 1999.

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

COHEN, S. Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. **J. Biol. Chem.**, v. 237, p. 1555-1562, 1962.

COLOMBO, M.A.S. **Estudo do efeito da radiação ionizante sobre as propriedades mecânicas da poliamida 6,6**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

COLWELL, A.S.; LONGAKER, M.T.; LORENZ, H.P. Fetal wound healing. **Front. Biosci.**, v. 8, p. 1240-1248, 2003.

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.; TOMFORD, W. Radiosensitivity of human immunodeficiency virus type I infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 14, p. 978-979, 1992.

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

DANG, C.; TING, K.; SOO, C.; LONGAKER, M.T.; LORENZ, H.P. Fetal wound healing current perspectives. **Clin. Plast. Surg.**, v. 30, p. 13-23, 2003.

DAVIS, D.A.; ARPEY, C.J. Porcine heterografts in dermatologic surgery and reconstruction. **Dermatol. Surg.**, v. 26, p. 76-80, 2000.

DÉMARCHEZ, M.; SENDEL, P.; PRUNIÉRAS, M. Wound healing of human skin transplanted onto the Nude mouse: an immunohistological study of the reepithelialization process. **Dev. Biol.**, v. 113, p. 90–96, 1986.

DÉMARCHEZ, M.; HARTMANN, D.J.; HERBAGE, D.; VILLE, G.; PRUNIÉRAS, M. Wound healing of human skin transplanted onto the Nude mouse: an immunohistological and ultrastructural study of the epidermal basement membrane zone reconstruction and connective tissue reorganization. **Dev. Biol.**, v. 121, p. 119–1297, 1987.

DVORAK, H.F. Tumors: wounds that do not heal. **N. Engl. J. Med.**, v. 315, n. 26, p. 1650-1659, 1986.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A. Aplicacion de la radiacion ionizante para esterilizar aloinjertos de tejido conectivo. In: PHILLIPS, G. O. (Ed.). **Radiacion Y operacion de Banco de Tejidos**. Perú: Printing service, 2001.

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

EFRON, J.E.; FRANKEL, H.L.; LAZAROU, S.A.; WASSERKRUG, H.L.; BARBUL, A. wound healing and T lymphocytes. **J. Surg. Res.**, v. 48, p. 460-463, 1990.

EHRlich, H.P.; DESMOULIERE, A.; DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I.K.; COMPTON, C.C.; GARNER, W.L.; KAPANCI, Y.; GABBIANI, G. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. **Am. J. Pathol.**, v.145, n.1, p.105-113, 1994.

ENGLISH, R.S.; SHENEFELT, P.D. Keloids and hypertrophic scars. **Dermatol. Surg.**, v. 25, n. 8, p. 631-638, 1999.

ESTADO DE SÃO PAULO. CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde. PORTARIA CVS-01, de 18 de Janeiro de 2000. Diário oficial do Estado de São Paulo. Volume 110, Número 35, São Paulo, 19 de fevereiro de 2000. Disponível em: < <http://www.cvs.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 13 mar. 2011.

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.

FERGUSON, M.W.J.; O'KANE, S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 359, n. 1445, p. 839-850, 2004.

FRANCO, D.; CLAUDIO-DA-SILVA, C.S. Enxertos, retalhos e implantes. In: FRANCO, T. **Princípios de cirurgia plástica**. São Paulo: Ateneu; 2002. p.87-106.

FREITAS, A.Z.; AMARAL, M.M.; RAELE, M.P. Optical Coherence Tomography: development and applications. In: BREZINSKI, M. **Optical Coherence Tomography: principles and applications**. Elsevier, 2006, p. 409-432.

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

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 500-503, 2003.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap. 14p, tegumento. p. 253-266.

GAWRONSKA-KOZAK, B.; BOGACKI, M.; RIM, J.; MONROE, W.T.; MANUEL, J.A. Scarless skin repair in immunodeficient mice. **Wound Rep. Reg.**, v. 14, p. 265-276, 2006.

GOLCMAN, B.; GOLCMAN, R. Principais tipos e indicações de enxertos. In: GADELHA, A.R.; COSTA, I.M. (Ed.). **Cirurgia dermatológica em consultório**. São Paulo: Atheneu; 2002. p. 285-91.

GOUK, S.S.; LIM, T.M.; TEOH, S.H.; SUN, W.Q. Alteration of human acellular tissue matrix by gamma irradiation: histology, biomechanical property, stability, *in vitro* cell repopulation, and remodeling. **J. Biomed. Mater. Res.: Appl. Biomater.**, v. 84B, p. 205–217, 2008.

GRINNELL, F. Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. **J. Cell Biol.**, v. 124, p. 401-404, 1994.

HALL, A. O. ANOVA. 2006. Disponível em:
<<http://www2.mat.ua.pt/pessoais/AHall/Bioestat%EDstica/Bioestat%EDstica.htm>>.
Acesso em: 18 jan. 2010.

HALL, E.J; GIACCIA, A.J. **Radiobiology for the Radiologist**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott-Wilkins Publishers, 2006. p. 5-15.

HAYAKAWA, T.; HASHIMOTO, Y.; MYOKEI, Y.; AOYAMA, H.; IZAWA, Y. Changes in type of collagen during the development of human post-burn hypertrophic scars. **Clin. Chim. Acta**, v. 93, p. 119, 1979.

HERNDON, D.N. Perspectives in the use of allograft. **Burn Care & Rehabilitation**, v. 18, 1997. Supplement 6.

HERSON, M.R. **Estudo da composição in vitro de substituto cutâneo dermoepidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena**. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

HERSON, M.R.; MATHOR, M. B.; FERREIRA, M. C. Bancos de Pele I: aspectos gerais e administrativos, planta física e controles de qualidade. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 1, n.1, p. 35-40, 2001.

HERSON, M.R.; MATHOR, M. B.; FERREIRA, M. C. Bancos de Pele II: seleção de doadores – captação, processamento e armazenamento dos tecidos. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 2, n.2, p. 15-21, 2002.

HERSON, M.R. Bancos de Pele. In: LIMA JÚNIOR, E.M.; SERRA, M.C.V.F. (Org.). **Tratado de Queimaduras**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2004. v. 1. p. 615-624.

HERSON, M.R.; MATHOR, M.B. Banco de Tecidos. In: GARCIA, V.D; ABBUD FILHO, M.; NEUMANN, J.; PESTANA, J.O.M (Ed.). **Transplante de órgãos e tecidos**. 2. ed. São Paulo: Segmento Farma, 2006. p. 174-185.

HORSLEV-PETERSEN, K.; KIM, K.Y.; PEDERSEN, L.R.; BENTSEN, K.D.; ULDBJERG, N.; OXLUND, H.; GARBARSCHE, C.; HAHN, E.G.; SCHUPPAN, D.; LORENZEN, I. Serum aminoterminal type III procollagen peptide. Relation to biosynthesis of collagen type III in experimentally induced granulation tissue in rats. **APMIS**, v. 96, n. 9, p. 793-804, 1988.

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.

HUANG, Q.; PEGG, D.E.; KEARNEY, J.N. Banking of non-viable skin allografts using high concentrations of glycerol or propylene glycol. **Cell Tissue Bank**, v. 5, p. 3-21, 2004.

INSTRON DO BRASIL. Sistemas de teste de modelo de mesa Série 5560. 2009. Disponível em: <<http://www.Instron.com.br/wa/products/universalmaterial/5560.aspx>>. Acesso em: 12 mar. 2009.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Radiation biology: a handbook for teacher and students**. Viena, Austria, 2010.

ISAAC, C. **Estudo in vitro da ação da pentoxifilina em fibroblastos oriundos de cicatrizes hipertróficas pós-queimadura e de pele não-cicatricial**. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina – USP, 2007.

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: 12 mar. 2011.

JOURDAN-LE SAUX, C.; GLEYZAL, C.; GARNIER, J.M.; PERALDI, M.; SOMMER, P.; GRIMAUD, J.A. Lysyl oxidase cDNA of myofibroblast from mouse fibrotic liver. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 199, p. 587-592, 1994.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 18, pele e anexos. p. 358-370.

KEALEY, G.P. Disease transmission by means of allograft. **J. Burn Care Rehabil.**, v. 18, p. 10-11, 1997.

KÖPF-MAIER, F.; MBONEKO, V.F.; MERKER, H.J. Nude mice are not hairless. **Acta Anat.**, v. 139, p. 178-190, 1990.

KREIS, R.W.; HOEKSTRA, M.J.; MACKIE, D.P.; VLOEMANS, A.F.; HERMANS, R.P. Historical appraisal of the use of skin allografts in the treatment of extensive full skin thickness burns at the Red Cross Hospital Burns Centre, Beverwijk, The Netherlands. **Burns**, v. 18, suppl 2 (S19-22), 1992.

LAURENCE, J.C. Allografts as vectors of infection. **Lancet**, v. 1, p. 1218, 1987.

LEE, K.S.; SONG, J.Y.; SUH, M.H. Collagen mRNA expression detected by in situ hybridization in keloid tissue. **J. Dermatol. Sci.**, v. 2, p. 316, 1991.

LEE, K.H. Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application. **Yonsei Med. J.**, v. 41, p. 774-779, 2000.

LEONTIOU, I.; MATTHOPOULOS, D.P.; TZAPHLIDOU, M. The effect of gamma irradiation on collagen fibril structure. **Micron**, v. 24, n.1, p. 13-16, 1993.

LOFÊGO FILHO, J.A.; DADALTI, P.; SOUZA, D.C.; SOUZA, P.R.C.; SILVA, M.A.L.; TAKIYA, C.M. Enxertia de pele em oncologia cutânea. **An. Bras. Dermatol.**, v. 81, n. 5, p. 465-472, 2006.

MARIANI, U.; GOMEZ, D.S.; CARVALHO, D.A.; FERREIRA, M.C. The tegument resulting from the healing of Burns. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo**, May-June, v. 50, n. 3, p. 140-146, 1995.

MARTINHO JUNIOR, A.C. **Estudo dos efeitos físicos, químicos e estruturais ocasionados pela radiação ionizante e preservação em cartilagem costal humana**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

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/variancia/index.php>. Acesso em 18 jan. 2010.

MCGOW, E.L.; VAN RAVENSWAAY, T.; DUMLAO, C.R. Histologic changes in Nude mouse skin and human skin xenografts following exposure to sulfhydryl reagents: arsenicals. **Toxicologic Pathology**, v. 15, n. 2, p. 149, 1987.

MECKLENBURG, L.; TYCHSEN, B. P.; PAUS, R. Learning from nudity: lessons from the Nude phenotype. **Exp. Dermatol.**, v. 14, p. 797-810, 2005.

MERKEL, J.R.; DIPAOLO, B.R.; HALLOCK, G.G.; RICE, D.C. Type I and type III collagen content of healing wounds in fetal and adult rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 187, n. 4, p. 493-497, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Morbidade hospitalar do SUS por causas externas. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sih/eidescr>. Acesso em: 8 abr. 2011.

MONGENSEN, M.; MORSY, H. A.; THRANE, L.; JEMEC, G.B.E. Morphology and epidermal thickness of normal skin imaged by Optical Coherence Tomography. **Dermatology**, v. 217, p. 14-20, 2008.

MORRIS, J.P. **Oxford textbook of surgery**. 2. Ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. cap. 6, wound healing. p. 137.

MUIR, I.F. On the nature of keloid and hypertrophic scars. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 43, p.61, 1990.

MURRAY, J.C. Keloids and hypertrophic scars. **Clin. Dermatol.**, v. 12, p. 27, 1994.

NIESSEN, F.B.; SPAUWEN, P.H.M.; SCHALKWIJK, J. KON, M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 104, n. 5, p. 1435-1458, 1999.

OBENG, M.D.; MCCAULEY, R.L.; BARNETT, J.R.; HEGGERS, J.P.; SHERIDAN, K.; SCHUTZLER, S.S. Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. **Burns**, v. 27, p. 267-271, 2001.

OLIVEIRA-JÚNIOR, I.S. LARINGE. Universidade Federal de São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/laringe/membrana.htm>. Acesso em: 8 de mar. 2011.

OLIVEIRA, M.D.C.; SOUZA, L.B.; LEÃO, P.P.; FREITAS, R.A. Estudo imuno-histoquímico de componentes da membrana basal em cistos odontogênicos. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 16, n. 2, 2002.

OTTANI, V.; RASPANTI, M.; RUGGERI, A. Collagen structure and functional implications. **Micron**, v. 32, p. 251-260, 2001.

PAGGIARO, A.O. **Efeitos de radiação ionizante em membranas amnióticas gliceroladas como substrato para o cultivo de epitélio humano**. 2011. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAN, Y.; LANKENAU, E.; WELZEL, J.; BIRNGRUBER, R.; ENGELHARDT, R. Optical coherence-gated imaging of biological tissues. **IEEE J. Quantum Elec.**, v. 2, n. 4, p. 1029–1034, 1996.

PATARIDIS, S.; ECKHARDT, A.; MIKÚLIKOVÁ, K.; SEDLÁKOVÁ, P. MIKSÍK, I. Identification of collagen types in tissues using HPLC-MS/MS. **J. Sep. Sci.**, v. 31, p. 3483-3488, 2008.

PETERSON, J.M.; BARBUL, A.; BRESLIN, R.J.; WASSERKRUG, H.L.; EFRON, G. Significance of T lymphocytes in wound healing. **Surgery**, v. 102, p. 300-305, 1987.

POSSARI, J.F. **Esterilização por óxido de etileno**. São Paulo: látria, 2003.

POTTEN, C.R. The epidermal proliferative unit. The possible role of the central basal cell. **Cell Tissue Kinet.**, v. 7, p. 77-88, 1974.

POWELL, D.W.; MIFFLIN, R.C.; VALENTICH, J.D.; CROWE, S. E.; SAADA, J.I.; WEST, A.B. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 277, p. 1-19, 1999.

PRADO FILHO, O.R.; FAGUNDES, D.J.; NIGRO, A.J.T.; BANDEIRA, C.O.P.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y. Estudo morfológico da anastomose esôfago-esofágica cervical com adesivo de fibrina, em cães. **Acta Scientiarum Health Science**, Brasil, 24 abr. 2008. Disponível em: <http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciHealthSci/article/view/2488/1665>. >. Acesso em: 18 jan. 2009.

RABE, J.H.; MAMELAK, A.J.; MCELGUNN, P.J.S.; MORISON, W.L.; SAUDER, D.N. Photoaging: mechanisms and repair. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 55, n. 1, p. 1-19, 2006.

REGAN, M.C.; BARBUL, A. The cellular biology of wound healing. In: SCHLAG, G.; REDL, H. (Ed.). **Wound healing**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 4-5.

ROBINS, S.P.; MILNE, G.; DUNCAN, A.; DAVIES, C.; BUTT, R.; GREILING, D.; JAMES, I.T. Increased skin collagen extractability and proportions of collagen type III are not normalized after 6 months healing of human excisional wounds. **J. Invest. Dermatol.**, v. 121, n. 2, p. 267-272, 2003.

ROONEY, P.; EAGLE, M.; HOGG, P.; LOMAS, R.; KEARNEY, J. Sterilisation of skin allograft with gamma irradiation. **Burns**, v. 34, p. 664-673, 2008.

ROSALLES, M.A.; BRUNTZ, M.; ARMSTRONG, D.G. Gamma-irradiated human skin allograft: a potential treatment modality for lower extremity ulcers. **Int. Wound J.**, v. 1, p. 201-206, 2004.

ROSSIO-PASQUIER, P.; CASANOVA D.; JOMARD, A.; DÉMARCHEZ, M. Wound healing of human skin transplanted onto the Nude mouse after a superficial excisional injury: human dermal reconstruction is achieved in several steps by two different fibroblast subpopulations. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 291, p. 591-599, 1999.

ROSS, A.; KEARNEY, J.N. The measurement of water activity in allogeneic skin grafts preserved using high concentration glycerol or propylene glycol. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, p. 37-44, 2004.

RUDOLPH, R. Inhibition of myofibroblasts by skin grafts. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 63, p. 473, 1979.

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

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

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007. cap. 1, pele normal: anatomia e fisiologia. p. 1-37.

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, A.; GABBIANI, G. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 22, p. 141-147, 1998.

SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T.A.; GABBIANI, G. Miofibroblast, In: MILLS, S.E. (Ed.). **Histology for pathologists**. 3. Ed. Philadelphia: Lippincott-Wilkins Publishers, 2006. p. 129-160.

SHETLAR, M.R.; SHETLAR, C.L.; KISCHER, C.W.; PINDUR, J. Implants of keloid and hypertrophic scars into the athymic Nude mouse: changes in the glycosaminoglycans of the implants. **Connect. Tissue Res.**, v. 26, p. 23-26, 1991.

SILVA, L.G.A. **Aplicações de Fontes Intensas de Radiação**. São Paulo: IPEN. [Apostila ...], 2002.

SILVA, L.S.; FIGUEIRA NETO, J.B.; SANTOS, A.L.Q. Utilização de adesivos teciduais em cirurgias. **Biosci. J.**, v. 23, n. 4, p. 108-119, 2007.

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

SLOMIANKA, L. Blue Histology - Integumentary System. School of Anatomy and Human Biology - The University of Western Australia, Ago. 2009. Disponível em: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/integumentary/integum.htm#l_abdermis>. Acesso em: 7 mar. 2011.

SOMMER, P.; GLEYZAL, C.; RACCURT, M.; DELBOURG, M.; SERRAR, M.; JOAZEIRO, P.; PEYROL, S.; KAGAN, H.; TRACKMAN, P.C.; GRIMAUD, J.A. Transiente expression of lysil oxidase by liver myofibroblasts in murine schistosomiasis. **Lab. Invest.**, v. 69, p.460-470, 1993.

STEPHENSON, A.J.; GRIFFITHS, W.R.; LA HAUSSE-BROWN, T.P. Patterns of contraction in human full thickness skin grafts. **Br. J. Plast. Surg.**, v. 53, p. 397-402, 2000.

SZPADERSKA, A.M.; ZUCKERMAN, J.D.; DIPIETRO, L.A. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. **J. Dent. Res.**, v. 82, p. 621-626, 2003.

TROTT, K.R.; SHIRAZI, A.; HEASMAN, F. Modulation of accelerated repopulation in mouse skin during irradiation. **Radiother. Oncol.**, v. 50, p. 261-266, 1999.

TZAPHLIDOU, M.; KOUNADI, E.; LEONTIOU, I.; MATTHOPOULOS, D.P.; GLAROS, D. Influence of low doses of gamma-irradiation on mouse skin collagen fibrils. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 71, p. 109-115, 1997.

TZAPHLIDOU, M. Collagen as a model for the study of radiation induced side effects: use of image processing. **Micron**, v. 33, p. 117-120, 2002.

UITTO, J.; PEREJDA, A.J.; ABERGEL, R.P.; CHU, M.L.; RAMIREZ, F. Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 5935, 1985.

VANDE BERG, J.S.; RUDOLPH, R. Immunohistochemistry of fibronectin and actin in ungrafted wounds and wounds covered with full- and split-thickness skin grafts. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 91, p. 684-692, 1993.

VIEIRA, S. **Bioestatística – tópicos avançados**. Rio de Janeiro: Campus; 2003, cap. 2. p. 12-50.

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

WILHELMI, B.J.; BLACKWELL, S.J.; MANCOLL, J.S.; PHILLIPS, L.G. Creep vs. stretch: a review of the viscoelastic properties of skin. **Ann. Plast. Surg.**, v. 41, n. 2, p. 215-9, 1998.

YAMAGUSHI, Y.; HOSOKAWA, K.; KAWAI, K.; INOUE, K.; MIZUNO, K.; TAKAGI, S.; OHYAMA, T.; HARAMOTO, U.; YOSHIKAWA, K.; ITAMI, S. Involvement of keratinocyte activation phase in cutaneous graft healing: comparison of full thickness and split-thickness skin grafts. **Dermatol. Surg.**, v. 26, p. 463-468, 2000.

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

**ANEXO A - Ofício do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das
Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

Ao Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Nesta

São Paulo, 16 de dezembro de 2006

Prezados Senhores:

Vimos por meio desta confirmar a disponibilidade do Banco de Tecidos do Instituto Central – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da USP, em ceder lâminas de pele humana conservadas em glicerol para utilização no trabalho de pesquisa “Estudo “in vivo” de substituto dermo-epidérmico humano constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica submetida à radiação ionizante”, pesquisadora responsável: Dra. Monica Beatriz Mathor.

Todo tecido ora processado pelo Banco foi doado segundo normas aprovadas pelo Sistema Nacional de Transplantes – Ministério da Saúde, obedecendo rotinas de triagem de doadores e processamento compatíveis com padrões internacionalmente aceitos.

O tecido a ser liberado pelo Banco para a finalidade de pesquisa, conforme consta em sua proposta de trabalho, consiste em material considerado inadequado para uso clínico devido a características que fogem a determinado padrão estabelecido (ex.: brechas na triagem do doador, contaminações bacterianas, etc.), mas consideradas não relevantes para o uso em experimentos como o proposto no projeto acima citado.

Respeitosamente,

Dra. Marisa R. Herson
Médica Responsável

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN **Parecer - Projeto Nº 14/CEPA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa "ESTUDO *IN VIVO* DE SUBSTITUTO CUTÂNEO DERMÓ-EPIDÉRMICO HUMANO CONSTITUÍDO POR EPITÉLIO DE QUERATINÓCITOS CULTIVADOS SOBRE BASE DÉRMICA ALÓGENA SUBMETIDA À RADIAÇÃO IONIZANTE" de responsabilidade do pesquisador 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 CEPA .

São Paulo, 08 de março de 2007

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEPA-IPEN

ANEXO C – Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 11 de abril de 2007.

PARECER 772/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 74ª reunião realizada em 10.04.07, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Estudo in vivo de substituto cutâneo dermo-epidérmico humano constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena submetida à radiação ionizante".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **10 de abril de 2008**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
PROF. DR. SERGIO FERREIRA DE OLIVEIRA
Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento
Instituto de Ciências Biomédicas - USP