



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**MODELO DE RADIONECROSE CUTÂNEA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS
NUDE (Nu/Nu) PARA DESENVOLVIMENTO DE TERAPIAS REGENERATIVAS
BASEADAS EM SUBSTITUTOS DERMO-EPIDÉRMICOS HUMANOS**

RODRIGO CRESPO MOSCA

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

Orientadora:
Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor

**São Paulo
2014**

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

***Modelo de Radionecrose Cutânea Induzida em
Camundongos Nude (Nu/Nu) para Desenvolvimento de
Terapias Regenerativas Baseadas em Substitutos Dermo-
Epidérmicos Humanos***

Rodrigo Crespo Mosca

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

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Monica Beatriz Mathor

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo

2014

Dedico este trabalho a minha família:

A minha Mãe **DINIAN**, fonte inspiradora, incentivadora e sempre presente em toda minha vida. Nos momentos difíceis me deu força para continuar e não desistir. Educou-me com muito carinho, compreensão e amor. Discorreria um livro só para falar o quanto AMO VOCÊ! Obrigado Mãe.

A minha Irmã **GUTA**, que me ajuda em tudo, se esforça para me deixar tranquilo, me ensina a viver. Desde criança é minha companheira, amiga e também “mãe”. E no momento mais difícil da minha vida, mostrou para mim o valor de ter uma família unida. TE AMO Guta.

Ao meu Pai **OSWALDO**, que proporcionou este momento, pois me “obrigou” a estudar, mostrando o quanto poderia ser importante, não medindo esforços para que isto fosse possível. Cobrando-me todos os dias, e fazendo com que me superasse sempre. AMO VOCÊ Pai.

Ao meu cunhado **ANDRÉ**, um homem generoso, amigo e companheiro. Ajudou-me a ser uma pessoa melhor. Parte essencial de nossa família. Obrigado por tudo que fez por mim, AMOR FRATERNAL.

Ao meu sobrinho e afilhado querido que tanto amo neste mundo, **PEDRO**. Filho, você é minha alegria, e por você, o titio caminha firme e forte. Porque nunca vou esquecer que no meu momento de tristeza, me disse ao telefone: Eu te amo titio Rô, nós somos super amigos, você o Super-Homem e eu o Batman... AMO MUITO VOCÊ Pedro!

Na vida existem certos momentos, que se sente muito a falta de alguém, a ponto de querer tirá-lo de seus sonhos e reviver momentos inesquecíveis... A você meu amigo, meu irmão, **SKINNER** (*in memorian*) saudades...

E também ao **HOMMER** (*in memorian*), meu primeiro camundongo irradiado, que sofreu para que eu pudesse avançar com esta pesquisa. Perdoe-me e obrigado. Agora você deve estar feliz ao lado do Skinner e do Pingo em paz.

Sei que sem vocês eu não seria absolutamente nada. Não conseguiria descrever em tão pouco espaço tudo o que fizeram por mim, por isso deixo aqui uma mensagem: **AMO TODOS VOCÊS INCONDICIONALMENTE.**

E a vocês que são como se fossem da família:

Aos meus Grandes Amigos e irmãos **Giuliano Alleva, Flavio Javarini, Eduardo Santana de Moura e Fabio Teixeira de Carvalho**. Vocês são incríveis, espetaculares e principalmente AMIGOS. Difícil descrever o amor que sinto por vocês. Amigos que não me abandonaram nunca e ainda acham tempo para me quererem bem. Como nós dizemos um aos outros: Vocês são OS caras!

A minha grande amiga, confidente e companheira **Stefany Plumeri Santin**, o que falar de você hein? Ajudou-me profissionalmente, pessoalmente e ainda esteve ao meu lado sempre que precisei de algo. Guardo no coração esta amizade.

A minha irmãzinha **Bianca Sufi**, e estendo o agradecimento a toda sua família (d. Adelina, s. Valdomiro e Carlos Sufi) por me acolherem sempre tão bem, serem meus amigos e minha família. **Deus** colocou vocês em minha vida!

A minha BFF (best friend forever) **Caroline Ferraz**, confidente, parceira e que com sua alegria, faz dos meus dias mais tristes se tornarem alegres. E estendo também a todos os seus familiares que me acolheram com muito amor nos almoços dominicais de família.

Agradecimentos especiais:

A **Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)** pela bolsa de fomento a mim concedida durante a vigência desta tese, assim como a **International Atomic Energy Agency (IAEA)** pelo recurso dispensado neste projeto e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão do Projeto Universal 2010.

A minha orientadora e também amiga, Prof^a. Dr^a. **Monica B. Mathor**, que me ajudou a elaborar esta tese com muito esforço para que tudo fosse possível. Quando parecia não haver mais solução, recorria a sua imensa sabedoria.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. **Carlos Alberto Zeituni**. Mestre no que faz amigo e camarada. Sempre sorridente, não me deixou esmorecer. Junto com a Prof^a. Dr^a. **Maria Elisa Rostelato** me deram forças suficientes para concluir este trabalho.

A Prof^a. **Andrea Mantesso**, por fazer com que este trabalho fosse realizado. Cedeu-me seu laboratório para as pesquisas, ensinou-me como proceder e ainda como amiga me ajudou muito. Muitíssimo obrigado.

Ao meu “co-orientador” e grande amigo **Cesar Isaac**, que me norteou, me deu conselhos, elaborou idéias, se preocupou com meus resultados e ainda achou tempo para ser meu amigo.

A **Silvana Cerejido Altran** que foi incrível comigo. Sem você eu não teria aprendido absolutamente nada de cultura celular, não teria conseguido realizar meus experimentos e não conseguiria concluir minha tese. Divido os louros desta tese com você!

A **Neide Ferreira Mascarenhas** junto com a **Mara Reis** e **Cecilia Ferreira** responsáveis pelo Biotério do IPEN a me concederem a honra de trabalhar com vocês e passaram-me o valor do cuidado com o bem estar do animal de experimentação.

Ao colega **Danilo Cardenuto Ferreira** pela elaboração da dosimetria do irradiador panorâmico para meus experimentos.

A **Dayane Piffer Luco** amiga e companheira de laboratório que me ajudou com o “maldito” cultivo de células.

A **Daniela Steffens**, incansável... Cedeu seu tempo, parte de seu trabalho, além de ajudar com seu conhecimento para que este trabalho fosse possível. Obrigado!

Ao “seu” **Nelson Mendes Alves**, amigo, paciente e companheiro de pesquisas.

Ao meu amigo, companheiro e parceiro de “bandex” **Henrique Perez Ferreira**. Amizade sincera e verdadeira.

Leonardo Dalla Porta Dornelles grande ser humano! Obrigado por toda a ajuda dispensada a mim!

A minha “estagiária” e amiga **Teresa Raquel de Moraes Andrade**, que me ajudou e muito nas fases cruciais desta tese. Obrigado!

A **Bianca Genesi**, **Marcelly Uemura**, **Fernando Neves Soares**, colegas de laboratório!

A **Eluara O. Alvarega** por me ajudar no manejo e cuidados dos camundongos em todas as fases do experimento. Meu muito obrigado!

Aos eng. **José Jorge Ambiel, Sergio Sá e Sergio Prado** que me ajudaram no desenvolvimento, construção e elaboração das patentes do Irradidor com Fontes de Cobalto-60.

Ao **José Carlos Sabino** da Divisão de Desenvolvimento (Oficina – IPEN) que sempre me ajudou a por em pratica executar minhas ideias malucas.

A todos os funcionários da Divisão de Desenvolvimento (Oficina – IPEN) que contribuíram na execução dos meus inventos.

A **Claudia Regina Nolla** incentivadora e me segurou para não cair nos momentos mais difíceis. Amizade!

Ao **Marcos Cardoso** obrigado pela paciência e carinho.

Aos Eng. **Elizabeth S. R. Somessari e Carlos Gaia da Silveira** pela disposição, ajuda e compreensão em irradiar matérias, tecidos e meus animais. Trabalho árduo. Muito obrigado.

A **Cibele Pelissari** que me ajudou na inclusão dos tecidos para histologia, nas análises histológicas e nas “benditas” fotografias. Muitíssimo obrigado.

A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes em minha vida. Sintam meu abraço de agradecimento!

E por ultimo, mas não em ordem, um agradecimento especial a DEUS. Tanto orei para ser feliz, e ao invés de me dar à felicidade, fez com que eu trilhasse um caminho tortuoso, difícil, muitas vezes escuro e sombrio, porem sempre estive ao meu lado me dando forças para continuar em frente. Soube colocar no meu caminho as pessoas certas nos momentos exatos, mesmo que eu precisasse sofrer, pois sem isso, não descobriria a verdadeira felicidade... de ter uma FAMILIA incrível e AMIGOS!

Tantas vezes Te reneguei para descobrir que sem você, eu não sou nada...

Obrigado a todos que de uma maneira ou outra estão presentes na minha vida. E a você que esta lendo esta tese, que possa servir de inspiração para seu trabalho, e um alento à humanidade.

RESUMO

MODELO DE RADIONECROSE CUTÂNEA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS *NUDE* (Nu/Nu) PARA DESENVOLVIMENTO DE TERAPIAS REGENERATIVAS BASEADAS EM SUBSTITUTOS Dermo-EPIDÉRMICOS HUMANOS

A incidência de neoplasias tem aumentado expressivamente nos últimos anos e o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, aumentará de forma significativa a estatística desta enfermidade nas doenças mundiais. O tratamento das neoplasias geralmente consiste do uso singular ou combinado entre a quimioterapia, cirurgia e radioterapia dependendo da etiologia do tumor. Nos casos onde a radioterapia é empregada, além dos efeitos terapêuticos da radiação, podem ocorrer complicações específicas e, na pele, estas complicações podem se apresentar com uma expressão clínica que varia desde o eritema cutâneo até a radionecrose, sendo este último o efeito adverso com maior gravidade. O tratamento para a radionecrose consiste no desbridamento das áreas necróticas e recobrimento do leito cirúrgico. Os enxertos autólogos são mais comumente usados para este recobrimento, entretanto quando grandes áreas são afetadas, os aloenxertos são uma alternativa de tratamento oclusivo e ainda, com a adição de queratinócitos e células mesenquimais derivadas da gordura (ADSC), torna-se uma alternativa por seu conhecido papel imunomodulatório e regenerativo. Neste sentido, visando simular os efeitos adversos da radionecrose, foi criado um modelo animal de radionecrose cutânea induzida em camundongos *Nude* (Nu/Nu) para o desenvolvimento de terapias regenerativas baseadas em substitutos dermo-epidérmicos humanos contendo, queratinócitos e ADSC, que se mostrou eficiente como tratamento oclusivo. Além disso, com este modelo animal de radionecrose estabelecido, novas possibilidades de tratamento de enfermidades envolvendo regeneração cutânea, podem ser testadas.

Palavras-Chaves: Radioterapia, Radionecrose, Radiodermite, ADSC, Queratinócitos.

ABSTRACT

RADIONECROSIS SKIN MODEL INDUCED AN ATHYMIC MOUSE NUDE (Nu/Nu) FOR DEVELOPMENT OF DERMAL-EPIDERMAL HUMAN SUBSTITUTE BASED REGENERATIVE THERAPY

The neoplasms incidence has increased significantly in recent years and continued population growth and aging will increase the statistics of this illness in the world's diseases. The cancer treatment usually consists in individual or combined use of chemotherapy, surgery and radiotherapy depending on the etiology of the tumor. In cases where radiotherapy is used in addition to the therapeutic effects of radiation, specific complications can occur, and in the skin, these complications can be present with a clinical expression ranging from erythema to radionecrosis, and this latter being the adverse effect with greater severity. The radionecrosis treatment consists in debriding necrotic areas and covering the surgical wounds. Autologous grafts are most commonly used for this covering, however when large areas are affected, allografts can be used for occlusive treatment and the keratinocytes and adipose derived stem cells (ADSC) addition becomes an alternative, due to the knowing for immunomodulatory and regenerative response. For that reason, aiming to simulate the radionecrosis adverse effects, an animal model of induced cutaneous radionecrosis was created, in athymic mouse *Nude* (Nu/Nu), for developing regenerative therapies based on human dermal-epidermal substitutes containing keratinocytes and ADSC, which proved occlusive as an efficient treatment, furthermore, having this radionecrosis animal model established, new possibilities for treatment of diseases involving dermal regeneration, can be tested.

Key-Words: Radiotherapy, Radionecrosis, Radiodermatitis, ADSC, Keratinocytes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	28
2.1 GERAL	28
2.2 ESPECÍFICO	28
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
3.1 A PELE HUMANA	29
3.1.1 EPIDERME	29
3.1.1.1 QUERATINÓCITOS	30
3.1.1.2 CÉLULAS DE LANGERHANS	33
3.1.2 DERME	33
3.1.2.1 CAMADA PAPILAR	34
3.1.2.2 CAMADA RETICULAR	35
3.1.2.3 FIBROBLASTOS	35
3.1.2.4 COLÁGENO	36
3.1.2.5 HIPODERME	38
3.1.2.6 MEMBRANA BASAL	38
3.1.3 CÉLULAS-TRONCO	39
3.1.3.1 CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO (ADSC)	41
3.2 INCIDENCIA DO CÂNCER NO BRASIL	42
3.2.1 A RADIOTERAPIA COMO FORMA DE TRATAMENTO AO CÂNCER	42
3.2.1.1 EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NO SER HUMANO	44
3.2.1.1.1 DOSE ABSORVIDA	45
3.2.1.1.2 DOSE EFETIVA	46
3.2.1.1.3 TAXA E FORMA DE EXPOSIÇÃO	47
3.2.1.1.4 INTERAÇÃO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES NOS TECIDOS	49
3.2.1.2 EFEITOS ADVERSOS DA RADIOTERAPIA E SUA REPARAÇÃO FISIOLÓGICA	51
3.2.1.3 TRATAMENTO DAS COMPLICAÇÕES NA TELETERAPIA	56
3.3 USO DE ALOENXERTOS DE PELE CADAVERICA EM QUEIMADURAS	57
3.4 MODELO ANIMAL	58

3.5 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	60
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 DESENVOLVIMENTO DA RADIONECROSE EM CAMUNDONGOS <i>Nude</i> (Nu/Nu) UTILIZANDO IRRADIADOR COM FONTE DE COBALTO-60	63
4.1.1 GEOMETRIA DE IRRADIAÇÃO E DOSIMETRIA	64
4.1.2 DESENVOLVIMENTO DA GEOMETRIA DE IRRADIAÇÃO E DOSIMETRIA PARA IRRADIAÇÃO DO CAMUNDONGO <i>Nude</i> (Nu/Nu)	66
4.1.2.1 DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO DO SUPORTE DE CAMUNDONGO <i>Nude</i> (Nu/Nu) PARA IRRADIAÇÃO	66
4.1.2.2 DESENVOLVIMENTO DO ARRANJO PARA IRRADIAÇÃO DO CAMUNDONGO <i>Nude</i> (Nu/Nu)	67
4.1.2.3 MEDIDAS DE TAXA DE DOSE NO ARRANJO PARA IRRADIAÇÃO DO CAMUNDONGO <i>Nude</i> (Nu/Nu)	68
4.2 MODELO ANIMAL	69
4.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL	73
4.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO PARA ISOLAMENTO CELULAR	73
4.3.2 ASSEPSIA E MANUSEIO DO EXCEDENTE CIRÚRGICO	73
4.3.3 OBTENÇÃO DE QUERATINÓCITOS PELA TÉCNICA DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA	73
4.3.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DA GORDURA (ADSC)	75
4.3.5 SEPARAÇÃO DERMO-EPIDÉRMICA	77
4.3.6 CONSTRUÇÃO DO SUBSTITUTO DERMO-EPIDÉRMICO POVOADO POR QUERATINÓCITOS E ADSC NO SISTEMA AR-LÍQUIDO	79
4.4 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	82
4.5 ESTUDO <i>IN VIVO</i> ENTRE DIFERENTES FORMAS DE INTERVENÇÃO PARA RESOLUÇÃO DA RADIONECROSE	83
4.6 DESENVOLVIMENTO DO IRRADIADOR COM FONTES DE COBALTO-60	86
5 RESULTADOS	91
5.1 DOSIMETRIA DO IRRADIADOR PANORÂMICO PARA DESENVOLVIMENTO DA RADIONECROSE EM CAMUNDONGOS <i>Nude</i> (Nu/Nu)	91
5.1.1 DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE RESPOSTA ESTÁVEL DA SONDA DOSIMÉTRICA E EXATIDÃO	91
5.1.2 CURVA DE SENSIBILIDADE	92
5.1.3 MAPEAMENTO DA TAXA DE DOSE DA FONTE DE COBALTO-60 PARA DESENVOLVIMENTO DA RADIONECROSE EM CAMUNDONGOS <i>Nude</i> (Nu/Nu) .	94
5.1.4 CONSTRUÇÃO DO PROTÓTIPO DO SUPORTE DE CAMUNDONGO PARA MEDIDA DA TAXA DE DOSE NO ARRANJO	95

5.1.5 MEDIDAS DE TAXA DE DOSE NO ARRANJO PARA IRRADIAÇÃO DO DORSO DO CAMUNDONGO	96
5.2 MODELO ANIMAL	98
5.3 CONSTRUÇÃO DO SUBSTITUTO DERMÓ-EPIDÉRMICO POVOADO POR QUERATINÓCITOS E ADSC	102
5.4 ESTUDO <i>IN VIVO</i> ENTRE DIFERENTES FORMAS DE INTERVENÇÃO PARA RESOLUÇÃO DA RADINECROSE	109
5.5 CONSTRUÇÃO DO IRRADIADOR COM FONTES DE COBALTO-60	121
5.6 MANIPULAÇÃO DO COBALTO-60	123
6 DISCUSSÃO	125
7 CONCLUSÃO	137
8 REFERENCIAS	139
9 ANEXOS	147

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- °C – Graus Celsius
- ADSC - *Adipose Derived Stem Cells* (Células Mesenquimais Derivadas da Gordura)
- APC – *Antigen-Presenting Cell* (Células Apresentadoras de Antígeno)
- ABP – Avidina-Biotina-Peroxidase
- DAB – 3.3 Tetra-Hidrocloro de Diaminobenzidina
- Bq – Becquerel
- C – Coulombs
- Ci – Curie
- CNEN/SP – Comissão Nacional de Energia Nuclear / São Paulo
- COEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CTR – Centro de Tecnologia das Radiações
- D10 – Nomenclatura adotada em nossos laboratórios para o meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Acido Desoxirribonucleico)
- E – Energia
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido Etilenodiaminotetracético)
- EGF – *Epithelial Grow Factor* (Fator de Crescimento Epitelial)
- eV – Eletron-Volt

- FEV – Fração Estromal Vascular
- FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- FOUSP – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
- GBq – Giga Becquerel
- Gy – Gray
- H⁺ – Hydron (forma catiônica do átomo de hidrogênio)
- Ham's F12 – Meio de Ham.
- HE – Hematoxilina e Eosina.
- HK – *Human Keratinocytes* (Queratinócitos Humanos)
- IAEA - *International Atomic Energy Agency* (Agencia Internacional de Energia Atômica)
- IARC – *International Agency for Research for Cancer* – Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
- ICHC – Instituto Central do Hospital das Clínicas
- ICRP – *International Commission on Radiological Protection* (Comissão Internacional de Proteção Radiológica)
- ICRU – *International Commission on Radiation Units and Measurements* (Comissão Internacional de Unidades e Mensuração em Radiação)
- IL – *Interleukin* (Interleucina)
- INCA – Instituto Nacional de Câncer
- INF- γ – Interferon-Gama
- IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
- J – Joule
- K⁻ – Meio de cultura próprio para cultivo de queratinócitos isento de EGF
- K⁺ – Meio de cultura próprio para cultivo de queratinócitos, acrescido de EGF

- kDa – Kilo Dalton
- keV – Kilo Elétron-Volt
- KGF – *Keratinocyte growth factor* (Fator de crescimento de queratinócitos)
- K-SFM – *Keratinocyte serum free medium* (meio de cultura livre de queratinócitos)
- LC – *Langerhans Cells* (Células de Langerhans)
- LPFP – Laboratório de Produção de Fontes para Radioterapia
- M – Massa
- M-CSF – *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator de Crescimento Estimulador de Macrófago)
- MeV – Mega Eletron-Volt
- MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo de Maior Histocompatibilidade)
- MO – Medula Óssea
- MSC – *Mesenchymal Stem Cells* (Células-Tronco Mesenquimais, hoje conhecidas como Células Estromais Multipotentes)
- NCI – *Nacional Cancer Institute* (Instituto Nacional do Câncer)
- OH⁻ – Hidroxila (diatômicos anions dos átomos de hidrogênio e oxigênio)
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- p53 – Fosfoproteína (Antígeno Tumoral Celular)
- PAP – Peroxidase-Anti-Peroxidase
- PGE – Prostaglandina
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- PVC - Policloreto de Vinila
- Q – Carga Elétrica

- R - Röntgen
- rad - *Radiation Absorbed Dose* (Dose Absorvida de Radiação)
- rem - *Radiation Equivalent for Men* (Radiação Equivalente para o Homen)
- RPM – Rotações por minuto
- SFB – Soro Fetal Bovino
- Sv – Sievert
- TGF- β – *Transforming growth factor beta* (Transformador do fator de crescimento beta)
- TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
- USP – Universidade de São Paulo
- wR – Fator de Ponderação da Radiação
- μ Ci – micro Curie
- μ g – micrograma
- μ L – microlitro

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Imagem de radionecrose cutânea. Mulher de 89 anos de idade, que passou por uma cirurgia de câncer uterino, há 40 anos, seguido de 50 Gy de radioterapia em uma área de 10 x 10 cm. Uma radionecrose de 5 x 10 cm acometeu a paciente expondo a fáscia muscular, bem como pele, gordura e osso.244
- FIGURA 2** – Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que reveste a pele esquematizado, onde temos representado pelas linhas coloridas: **A** – Camada Basal (entre a linha contínua preta e a linha tracejada azul escura); **B** – Camada Espinhosa (entre a linha tracejada azul escura e a linha tracejada amarela); **C** – Camada Granular (entre a linha tracejada amarela e a linha tracejada azul clara); **D** – Camada Lúcida (entre a linha tracejada azul clara e a linha tracejada verde); **E** – Camada Córnea (entre a linha tracejada verde e a linha contínua preta). Técnica HE.311
- FIGURA 3** – Imagem do tecido conjuntivo frouxo (camada papilar da derme), onde temos representados: **A** – Núcleos de fibroblastos (em grande quantidade); **B** – Fibras colágenas finas dispostas irregularmente. Técnica de HE344
- FIGURA 4** – Imagem do tecido conjuntivo denso não modelado (camada reticular da derme), onde temos representados: **A** – Núcleos de fibroblastos (em pouca quantidade); **B** – Fibras colágenas grossas dispostas irregularmente. Técnica HE355
- FIGURA 5** – Derme da pele corada seletivamente para fibras elásticas. As fibras elásticas (**A**) escuras se entremeiam entre as fibras colágenas (**B**) coradas em rosa-pálido. As fibras elásticas são responsáveis pela elasticidade da pele..366
- FIGURA 6** – Sonda dosimétrica em posição, onde a parte sensível do diodo encontra-se voltada para o eixo central da mesa.655
- FIGURA 7** – Desenho esquemático do protótipo do suporte para camundongo.666
- FIGURA 8** – Desenho esquemático do protótipo do suporte para o camundongo (patente em processo de análise do INPI) onde em (**A**) a linha vermelha representa o corte seccional para visualização da parte interna do protótipo (**B**).67
- FIGURA 9** – Desenho esquemático com a vista superior (1) e lateral (2) da mesa do irradiador panorâmico contendo o arranjo idealizado para blindagem do camundongo *Nude* (Nu/Nu) onde **A** – são os blocos de chumbo, **B** - fonte de Cobalto-60, **C** – eixo de metal, **D** – protótipo do suporte de camundongo animal (patente em processo de análise do INPI) e **E** – cilindro anexo por onde a pele do dorso do animal será distendida e fixada.68
- FIGURA 10** – Desenho Esquemático da vista superior do arranjo na mesa do irradiador panorâmico (**A**) com o protótipo do suporte de camundongo animal em posição com os pontos dosimétricos definidos e em (**B**). 69
- FIGURA 11** – Observação, por meio da microscopia óptica de luz invertida com filtro azul (40x), da colônia de queratinócitos (→ **SETA**).....755
- FIGURA 12** – Observação, por meio da microscopia óptica de luz invertida com filtro azul (40x), das ADSC.....77

FIGURA 13 – Sequencia realizada para a desepidermização da pele (A, B, C e D) para posterior glicerolação (E) e acondicionamento das matrizes em embalagem dupla de polietileno (F1 – Controle) para posterior irradiação conforme o grupo (F2 – 25 kGy e F3 – 50 kGy).....	79
FIGURA 14 – Fluxograma do protocolo do comparativo <i>in vitro</i> entre a irradiação das dermes em relação ao controle não irradiado e com a variável do numero de células.....	811
FIGURA 15 – Mesa cirúrgica auxiliar montada (A) onde se encontram as seringas hipodérmicas preparadas com solução diluída em solução salina a 0,9% de Xilazina e Cetamina; os fios de sutura de nylon 4.0; instrumentais cirúrgicos e gazes bem como os suportes para camundongos (patente em processo de análise do INPI) e seus respectivos cilindros de quartzo que foram previamente irradiados no acelerador de elétrons do IPEN e em (B) com os três camundongos anestesiados.....	833
FIGURA 16 – Projeto inicial do irradiador utilizando-se do tarugo de chumbo com 40 cm de espessura e com os locais delineados para as fontes de Cobalto-60 (A → SETA) (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 026).....	87
FIGURA 17 – Projeto do irradiador com o sistema porta-fontes (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 027) em posição (A) e ampliação do sistema porta-fontes (B).	88
FIGURA 18 – Proteção adicional articulada em forma de cruz, de 40 cm de chumbo, para o sistema porta-fontes (A); tampos nas extremidades (B). Em um dos tampos, pode-se notar o corte (C) para a inserção do suporte de animais (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 028) e três sistemas de duplo cadeado (D).	89
FIGURA 19 – Desenho do sistema de suporte do animal (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 028) com o orifício central na placa (A), e os orifícios ao longo de seu comprimento (B). Na caixa de suporte do animal notam-se os orifícios laterais (C), as prensas rosqueáveis (D) e os trilhos laterais (E).	90
FIGURA 20 – Carrinho de transporte do irradiador com fontes de Cobalto-60.....	90
FIGURA 21 – Variação da resposta do diodo de silício a irradiação de Cobalto-60 no irradiador panorâmico. A pré-dose é necessária para estabilização da resposta do diodo de silício, onde é evidenciado a homogeneidade da radiação da fonte de Cobalto-60 na distância de 10 cm a taxa de 2,18 Gy/min.....	922
FIGURA 22 – Teste de reprodutibilidade de resposta para a mesma taxa de dose de 2,18 Gy. Corrente gerada no diodo em função do tempo a 10 cm da fonte.....	92
FIGURA 23 – Variação da taxa de dose (Gy/min) com a distância (cm).	933
FIGURA 24 – Curva de sensibilidade do diodo nas posições 10, 20, 30 e 40 cm no irradiador panorâmico.....	944
FIGURA 25 – Mapa de dose do irradiador panorâmico a distância de 10 cm da fonte de Cobalto-60	95
FIGURA 26 – Protótipo do suporte de camundongo (patente em processo de análise do INPI).	966

- FIGURA 27** – Diferentes visualizações (**A**, **B**, **C** e **D**) do protótipo do suporte do animal em posição para determinação da taxa de dose (**patente em processo de análise do INPI**).....97
- FIGURA 28** – Vista oblíqua (**A**), vista perpendicular a fonte de Cobalto-60 (**B**) e vista superior (**C**) do camundongo inserido no suporte com sua pele distendida e fixada, (→ **SETA**) fixado no na blindagem de chumbo98
- FIGURA 29** – Acompanhamento fotográfico por 20 dias após a irradiação no dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) com 43,4 Gy em dose única, utilizando-se do irradiador panorâmico.....99
- FIGURA 30** – Acompanhamento fotográfico por 12 dias após a irradiação no dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) com 108 Gy em dose única, utilizando-se do irradiador panorâmico.....100100
- FIGURA 31** - Acompanhamento fotográfico por 60 dias após a irradiação no dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) com 86,8 Gy em dose única, utilizando-se do irradiador panorâmico..... 1011
- FIGURA 32** – Análise histológica do substituto dermo-epidérmico (350.000 céls/cm² de HK + ADSC) após 7 dias – sistema imerso As imagens **A** (10x) e **B** (40x) representam o controle – derme glicerolada; **C** (10x) e **D** (40x) representam a derme irradiada a 25 kGy; **E** (10x) e **F** (40x) representam a derme irradiada a 50 kGy. Barra de escala 5 µm..... 1033
- FIGURA 33** – Análise histológica do substituto dermo-epidérmico (350.000 céls/cm² de HK + ADSC) após 21 dias – sistema ar-líquido As imagens **A** (10x) e **B** (40x) representam o controle – derme glicerolada; **C** (10x) e **D** (40x) representam a derme irradiada a 25 kGy; **E** (10x) e **F** (40x) representam a derme irradiada a 50 kGy. Barra de escala 5 µm..... 1055
- FIGURA 34** – Análise histológica do substituto dermo-epidérmico após 21 dias no sistema ar-líquido. As imagens **A** (10x) e **B** (40x) representam o substituto dermo-epidérmico com 300.000 céls/cm² de HK e ADSC; as imagens **C** (10x) e **D** (40x) representam o substituto dermo-epidérmico com 400.000 céls/cm² de HK e ADSC; as imagens **E** (10x) e **F** (40x) representam o substituto dermo-epidérmico com 600.000 céls/cm² de HK e ADSC. Barra de escala 5 µm..... 107
- FIGURA 35** – Análise imunohistoquímica com anticorpos AE1/AE3 para marcação de citoqueratina (em marrom). em **A** (10x) e **B** (40x). Barra de escala 5 µm.....109
- FIGURA 36** – Acompanhamento fotográfico dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) no 14º dia, onde caracterizou-se a radionecrose, conforme a divisão dos grupos citados na **TABELA 8 (item 4.5)**. Os animais 13, 8 e 5 morreram antes de completar os 14 dias após irradiação. 1111
- FIGURA 37** – Acompanhamento fotográfico da dissecação da pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) após 48 horas da caracterização da radionecrose nos grupos de 1 a 5..... 113
- FIGURA 38** – Análises histológicas dos grupos 1 a 5, 48 horas após a intervenção cirúrgica da radionecrose. (**A**, **C**, **E**, **G**, **I** – 10x); (**B**, **D**, **F**, **H**, **J** – 40x). Barra de escala 5 µm. 114

- FIGURA 39** – Acompanhamento fotográfico da dissecação da pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) após 7 dias da caracterização da radionecrose nos grupos de 1 a 5..... 116
- FIGURA 40** – Análises histológicas dos grupos 1 a 5, 7 dias após a intervenção cirúrgica da radionecrose. (**A, C, E, G, I** – 10x); (**B, D, F, H, J** – 40x). Barra de escala 5 μ m 117
- FIGURA 41** – Análises macroscópicas dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) dos grupos 1, 2, 4 e 5. 119
- FIGURA 42** – Vista frontal do irradiador com fontes de Cobalto-60 (patente pendente sob o número - BR 10 2012 026), apoiado sobre o carrinho de transporte (**A**) e em uma vista mais aproximada evidenciando a proteção adicional (**B**) sobre o sistema porta-fontes (**patente pendente sob o número – BR 10 2012 027**) 121
- FIGURA 43** – Vista frontal do irradiador com fontes de cobalto-60 (patente pendente sob o número - BR 10 2012 026) com a proteção de chumbo adicional erguida (**A**) e em uma vista mais aproximada com o sistema porta-fontes (**B**) em posição (**patente pendente sob o número – BR 10 2012 027**)..... 122
- FIGURA 44** – Uma visão do recorte (**A**) em um dos tampos do irradiador de Cobalto-60 (**patente pendente sob o número – BR 10 2012 026**) e neste recorte o sistema de suporte do animal (**patente pendente sob o número – BR 10 2012 028**) inserido (**B**)..... 122
- FIGURA 45** – Sistema de suporte do animal (**patente pendente sob o número – BR 10 2012 028**)..... 123

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação, características e localização das principais fibras colágenas	37
TABELA 2 – Valores do fator de ponderação (w_R) em Sv para tecido ou órgão definido na ICRP 26 e ICRP 60	47
TABELA 3 – Relação entre a dose absorvida e a sintomatologia em exposições agudas localizadas	49
TABELA 4 – Diferentes tipos de radiação, suas propriedades e efeitos sobre a pele	55
TABELA 5 – Classificação das radiodermites de acordo com o Instituto Nacional de Cancer (NCI – USA)	56
TABELA 6 – Divisão dos 24 camundongos <i>Nude</i> (Nu/Nu) em grupos controle e intervencionista.....	71
TABELA 7 – Padrão de radionecroses encontrados após 14 dias da irradiação dos camundongos <i>Nude</i> (Nu/Nu) a 86,8 Gy.....	84
TABELA 8 – Descrição dos grupos criados a partir do padrão de radionecroses formada.....	85
TABELA 9 – Divisão dos grupos para análises histológicas após 48 horas e 7 dias....	86
TABELA 10 – Taxa de dose e dose em uma hora de irradiação no arranjo para dosimetria de irradiação do camundongo, obtidas com diodo de silício	98
TABELA 11 – Aspecto clínico do padrão de radionecroses após 14 dias da irradiação dos camundongos <i>Nude</i> (Nu/Nu) a 86,8 Gy.....	110
TABELA 12 – Classificação proposta para modelo animal de radionecrose	132

1 INTRODUÇÃO

Segundo o último relatório de 2013 da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer IARC/OMS, a incidência de neoplasias cresceu mais que 20% na última década. No Brasil são esperados 576 mil novos casos, enquanto que no mundo, espera-se para 2030, 27 milhões de novos casos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, aumentará de forma significativa o impacto do câncer nas enfermidades mundiais. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de baixo e médio desenvolvimento onde, segundo a IARC/OMS, ocorrerão metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos [1,2].

Dentre as possibilidades de tratamento do câncer, a radioterapia é uma das modalidades utilizadas durante o período de sua evolução. O tratamento com radioterapia pode ser dividido em dois métodos, braquiterapia e radioterapia por feixe externo. Radioterapia por feixe externo utiliza diferentes fontes de radiação, como raios-X e emissão de fótons (ex.: aceleradores lineares ou fonte de Cobalto-60) [3]. A finalidade da radioterapia é aplicar radiação ionizante na região em que se deseja tratar a neoplasia, aumentando a mortalidade celular e, conseqüentemente, extinguindo a massa tumoral existente. Entretanto, além dos efeitos terapêuticos da radiação, podem ocorrer complicações específicas que se apresentam sobre a pele, tecido subcutâneo, mucosas, músculos, vasos e ossos com expressão clínica que variam de acordo com a atividade proliferativa celular do órgão envolvido [4].

Nos tecidos com alta atividade proliferativa celular, como a pele, as manifestações clínicas de lesão após a irradiação, aparecem em curto período de tempo [4]. Quando estas complicações ocorrem, podem se apresentar com

expressão clínica que varia desde o eritema cutâneo até a radionecrose (**FIGURA 1**), sendo este o efeito adverso com maior gravidade [5].



FIGURA 1 – Imagem de radionecrose cutânea. Mulher de 89 anos de idade, que passou por uma cirurgia de câncer uterino, há 40 anos, seguido de 50 Gy de radioterapia em uma área de 10 x 10 cm. Uma radionecrose de 5 x 10 cm acometeu a paciente expondo a fáscia muscular, bem como pele, gordura e osso [6].

A radionecrose é caracterizada pela sequência: irradiação, hipóxia, hipovascularização e hipocelularidade dos tecidos. A radiação ionizante pode causar comprometimento do endotélio, hialinização e trombose dos vasos. Suas manifestações clínicas podem se apresentar logo após a radioterapia ou anos após o término desta [4].

O tratamento da radionecrose envolve inicialmente avaliação da gravidade da lesão, podendo ser conservador e paliativo, utilizando-se de câmara hiperbárica ou uso de soluções tópicas antimicrobianas e antiinflamatórias, ou ambas combinadas [7] quando a lesão não tiver comprometimento vascular. Em casos de maior

extensão, o tratamento cirúrgico é proposto com o desbridamento da área necrosada e recobrimento com retalho ou enxertos autólogos. Porém em ambos os casos a solução não chega a ser satisfatória, pois o momento adequado para a reconstrução pode ser de difícil decisão, uma vez que a lesão é um fenômeno progressivo, irreversível e dependente do grau de comprometimento vascular [5].

Estas expressões clínicas na pele podem causar a perda de água e proteínas, permitindo que bactérias invadam os tecidos subjacentes. Quando há solução de continuidade extensa, estas precisam ser ocluídas o mais cedo possível [7].

Um grande número de abordagens para os primeiros cuidados das alterações da pele foram propostas [8]. Na maioria, o objetivo era a redução dos efeitos secundários. A evidência para estas medidas, no entanto, é variável e os benefícios para os pacientes com diferentes tipos de câncer são incertos [9]. Os tratamentos de queimaduras de pele por radiação continuam a ser um problema não resolvido, que limita a eficácia da terapia antineoplásica e reduz a qualidade de vida desses pacientes [10]. Até a presente data, nenhum tratamento eficaz foi identificado e nenhum procedimento de rotina de cuidados de suporte foi estabelecido [11].

O recobrimento das áreas afetadas se faz necessário para diminuir o risco de morte ao paciente e aumentar qualitativamente sua expectativa de vida. O uso de substitutos cutâneos sintéticos ou biológicos, como os aloenxertos obtidos de Bancos de Tecidos tem um papel importante neste aspecto [12].

Entretanto os aloenxertos de pele cadavérica acabam sendo rejeitados, entre 7 a 10 dias, devido à falta de suprimento sanguíneo o que torna seu aspecto seco, escuro e enrijecido além de exacerbar a reação imunológica do receptor devido à

presença de antígenos do doador, desprendendo espontaneamente do leito cirúrgico [13,14].

Células mesenquimais derivadas da gordura (ADSC - *Adipose Derived Stem Cells*) possuem potencial imunomodulatório mediante um contato direto com um tecido alógeno ou autólogo e desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuarão sobre as células do sistema imunológico, além do mais, as ADSC apresentam propriedades supressoras de células T, envolvidas na resposta imunológica e linfocitária o que pode diminuir ou excluir a rejeição de enxertos alógenos [15,16].

Matrizes dermo-epidérmicas povoadas por queratinócitos e ADSC já foram estudadas *in vitro* [17], porém ainda não foram descritas na literatura para o tratamento de radionecroses, apesar de estudos indicarem que podem se diferenciar em queratinócitos [15] e a mistura de fibroblastos com ADSC em uma estrutura tridimensional *in vitro* pode formar uma camada epidermal com marcadores de queratina 10 [18].

Até o momento, a abordagem para os primeiros cuidados das alterações da pele tem como objetivo a redução dos efeitos secundários [8]. A evidência para estas medidas, no entanto, é variável e os benefícios para os pacientes com diferentes tipos de câncer são incertos [9]. Há algumas evidências que sugerem que o uso de certos cremes esteróides tópicos e cremes ácidos tópicos tem um efeito radioprotetor, além de evidência limitada para apoiar o uso de sucralfato, creme de Trolamina, *Aloe Vera*, creme de camomila para a prevenção de reações cutâneas agudas de radiação [8]. Os tratamentos de queimaduras de pele por radiação continuam a ser um problema não resolvido, que limita a eficácia da terapia

antineoplásica e reduz a qualidade de vida desses pacientes [10]. Até a presente data, nenhum tratamento eficaz foi identificado e nenhum procedimento de rotina de cuidados de suporte foi estabelecido [11].

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Obter um modelo de radiodermite e radionecrose cutânea no dorso de camundongos *Nude* (Nu/Nu), para o desenvolvimento de terapias regenerativas baseadas em substitutos dermo-epidérmicos humanos.

2.2 ESPECÍFICO

- Desenvolver a radionecrose em camundongos *Nude* (Nu/Nu) utilizando irradiador com fontes de Cobalto-60.
- Determinar os parâmetros de obtenção *in vitro* do substituto dermo-epidérmico humana a partir de pele glicerolada, irradiada e repovoada por queratinócitos e ADSC.
- Estudo *in vivo* entre diferentes formas de intervenção para resolução da radionecrose.

Em adição, foi construído um irradiador com fontes colimadas de Cobalto-60 de dimensões reduzidas, capaz de causar um ponto focal de radionecrose em animais de pequeno porte.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 A PELE HUMANA

A pele é um órgão complexo que abrange toda a superfície corporal, inclusive contínua com as mucosas que forram os orifícios do corpo. Também é responsável por 16% do peso total do corpo adulto sendo conseqüentemente, o maior órgão do corpo, exercendo múltiplas funções como a de proteção contra as agressões físicas, químicas e biológicas. Tem uma elaborada estrutura, associando os tecidos de diversas origens (epitelial, conjuntivo, vascular, muscular e nervoso), que estão organizados em três camadas: a **epiderme** (e seus anexos associados: folículos pilos, sebáceos e glândulas sudoríparas); a **derme**, separadas da epiderme na junção dermo-epidérmica e, a **hipoderme**, que não faz parte da pele, servindo apenas de união com os órgãos adjacentes. Na junção dermo-epidérmica há uma estrutura denominada **lamina basal** [19,20].

Embriologicamente, a epiderme e seus anexos são de origem ectodérmica, considerando que a derme e hipoderme são de origem mesodérmica [19,20].

3.1.1 EPIDERME

A epiderme é um epitélio estratificado pavimentoso e queratinizado que se renova continuamente. A estratificação é mantida graças à presença de tonofilamentos e desmossomas que unem os citoplasmas dessas células [21]. Ela é constituída de vários tipos celulares, sendo que, a maioria (90 a 95%) corresponde aos **queratinócitos** enquanto que a minoria (5 a 10%) corresponde principalmente

aos melanócitos, às **células de Langerhans**, e às células de Merkel. As células epidérmicas estão dispostas em camadas contínuas, compreendendo: a camada basal (única camada), as células espinhosas ou camada espinhosa (5 a 15 camadas), a camada granular (1 a 3 camadas), a camada lúcida (única camada) e a camada córnea ou corneificada (5 a 10 camadas), subdivididas em uma profunda (camada compacta) e uma superficial, que faz parte da camada mais externa de células descamativas queratinizadas do estrato córneo. Em algumas áreas do corpo, como a região palmo-plantar uma camada adicional, o estrato lúcido, pode ser visto entre as camadas granular e córnea (**FIGURA 2**). A epiderme também contém dois tipos distintos de unidades estruturais, isto é, a parte superficial das glândulas sudoríparas écrinas e folículos pilosos. Estes também são feitos de células epiteliais, mas têm suas próprias propriedades biológicas (matéria de renovação, diferenciação e resposta aos estímulos externos), refletidas por um aspecto histológico particular [19,20,21,22].

A epiderme, por não possuir vasos sanguíneos, apresenta espaços intercelulares, preenchidos por substância intersticial, por onde ocorrem as trocas entre as células [20].

A espessura da epiderme varia de acordo com o número de camadas de células e o local revestido por ela, sendo mais espessa nas regiões palmares e plantares (1,0 a 1,5 mm) e mais fina nas pálpebras (0,4 a 0,8 mm) [19,20,21,22].



FIGURA 2 – Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que reveste a pele esquematizado, onde temos representado pelas linhas coloridas: **A** – Camada Basal (entre a linha contínua preta e a linha tracejada azul escura); **B** – Camada Espinhosa (entre a linha tracejada azul escura e a linha tracejada amarela); **C** – Camada Granular (entre a linha tracejada amarela e a linha tracejada azul clara); **D** – Camada Lúcida (entre a linha tracejada azul clara e a linha tracejada verde); **E** – Camada Córnea (entre a linha tracejada verde e a linha contínua preta). Técnica HE. Adaptado de [23].

3.1.1.1 QUERATINÓCITOS

Os queratinócitos são células epiteliais, derivadas do ectoderma (originam-se das divisões mitóticas de células-tronco da camada basal), submetidos a um processo de diferenciação bioquímica e morfológica (queratinização). Sua morfologia varia de acordo com a camada da epiderme, onde são observados. Na camada basal os queratinócitos são colunares ou cúbicos, possuindo um citoplasma basofílico e um núcleo grande. Os queratinócitos basais se alinham perpendicularmente à membrana subjacente por estruturas de fixação especial, os hemidesmossomos, pelos quais são ancorados. Estes são conectados às células adjacentes por vários tipos de junções intercelulares (incluindo abertura e junções aderentes), sendo as mais características, denominadas desmossomos. O intervalo entre mitoses nos queratinócitos basais é de seis dias e o ciclo biológico completo

destas células é de aproximadamente vinte e oito a trinta dias e nem todos, proliferam ao mesmo tempo [19,20,21,22]. Os queratinócitos da camada basal e os das camadas granular, contem também organismos lamelares (também conhecidos como organismos Odland, queratinossomos ou membrana de revestimento granulada), com uma estrutura característica interna, que são envolvidas no processo de descamação e formação de uma camada lipídica pericelular agindo como uma barreira contra a penetração de substâncias estranhas [19].

No estrato espinhoso, os queratinócitos apresentam formato poligonal ou ligeiramente achatado. Nestas camadas, tem início à produção de pequenos prolongamentos de citoqueratina chamados tonofilamentos, que reforçam a adesão intercelular, aumentando a resistência da pele ao atrito [24,25].

Na camada granulosa, os queratinócitos apresentam forma poligonal. No citoplasma dessas células estão presentes grânulos grosseiros de queratohialina, proteína constitucional do material interfilamentoso presente na camada córnea [24,25].

Na camada córnea, os queratinócitos eosofílicos que eventualmente vertem à superfície da pele, contribuem para a função de barreira [19].

O citoesqueleto (citoqueratina) dos queratinócitos é essencialmente feito de queratina, que são proteínas fibrosas, solúveis em água e pertencentes à família dos filamentos intermediários. Pelo menos 20 polipeptídeos distintos da queratina epidermal foram bem caracterizados e classificados de acordo com seu peso molecular e seu pH, que incluem: Tipo I (K9- K20) com peso molecular baixo (entre 40 a 56,5 kDa) ou com pH ácido ($\text{pH} < 5,5$) e Tipo II K (K8-K1) com peso molecular alto (entre 52 a 67 kDa) com pH neutro-básico ($\text{pH} > 6$) [19].

3.1.1.2 CÉLULAS DE LANGERHANS

As Células de Langerhans (LC) tem como características possuírem um corpo arredondado com processos dendríticos, originárias de células CD34⁺ (moléculas de sialomucinas que é expressa em células – tronco hematopoiéticas primitivas) precursoras hematopoiéticas da medula óssea, do sangue do cordão umbilical ou do sangue periférico e extremamente móveis [19,26].

Os processos dendritos presentes em seu corpo se estendem entre os queratinócitos adjacentes aderindo-se por meio de uma ligação hemofílica entre as moléculas caderina-E, presente na superfície de ambos os tipos de células [19]. O seu espectro funcional compreende a captação do antígeno e capacidade de processamento, capaz de ativar as células T nativas (nunca expostos a antígenos) e desencadear a resposta imunológica primária, das quais são realizados nos órgãos linfoides [19,27], além de atuarem na indução da tolerância imunológica, fundamental no caso da transplantação [28].

3.1.2 DERME

A derme é um tecido conjuntivo de suporte, compressível e elástico, onde se apoia a epiderme, e seus anexos além dos plexos vasculares e nervosos, conferindo resistência mecânica à pele. Sua composição consiste de células, fibras elásticas, fibras colágenas, fibras de reticulina (elemento pré-colágeno) e substância intersticial. Sua espessura varia consideravelmente com a localização anatômica e sua estrutura fina varia um pouco dependendo da profundidade (**camada papilar** ou **camada reticular**) [19,20].

3.1.2.1 CAMADA PAPILAR

A camada papilar é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo (projeções cônicas voltadas para cima) formando as papilas dérmicas, alternando com cristas epiteliais epidérmicas, aumentando a superfície de contato entre a derme e epiderme e permitindo uma melhor aderência entre essas camadas. Contém várias células (**fibroblastos**, dendrócitos dérmicos, mastócitos), vasos e terminações nervosas. Constituído de **fibras colágenas (FIGURA 3)** dispostas em feixes frouxos e de finas fibras elásticas alongadas perpendicularmente à junção dermo-epidérmica [19,20]. Ao nível das extremidades (ou seja, os dedos), a papila dérmica contém corpúsculos tácteis, terminações nervosas especializadas atuando como mecano-receptores [19].

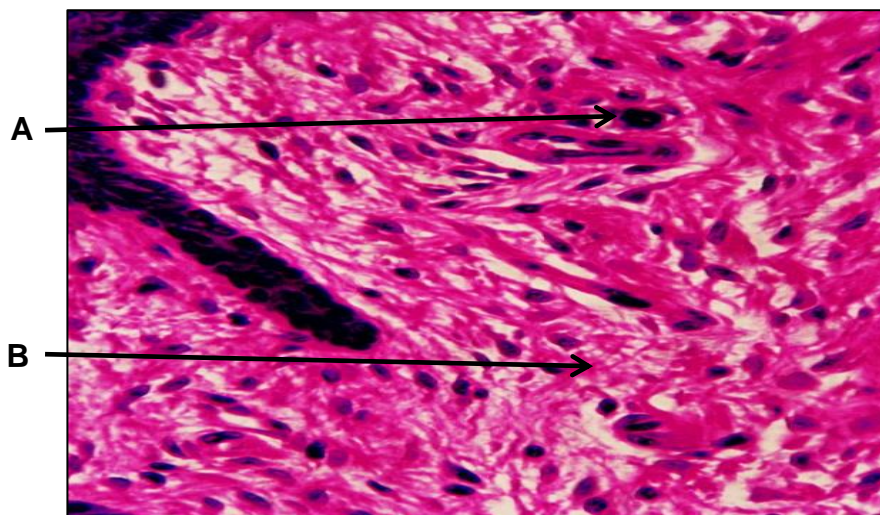


FIGURA 3 – Imagem do tecido conjuntivo frouxo (camada papilar da derme), onde temos representados: **A** – Núcleos de fibroblastos (em grande quantidade); **B** – Fibras colágenas finas dispostas irregularmente. Técnica HE [20].

3.1.2.2 CAMADA RETICULAR

A camada reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, composta de feixes grossos de colágeno [19,20] (**FIGURA 4**). A rede elástica também é mais grossa. Esta camada contém a parte profunda dos anexos cutâneos, vascular e plexos nervosos [19].

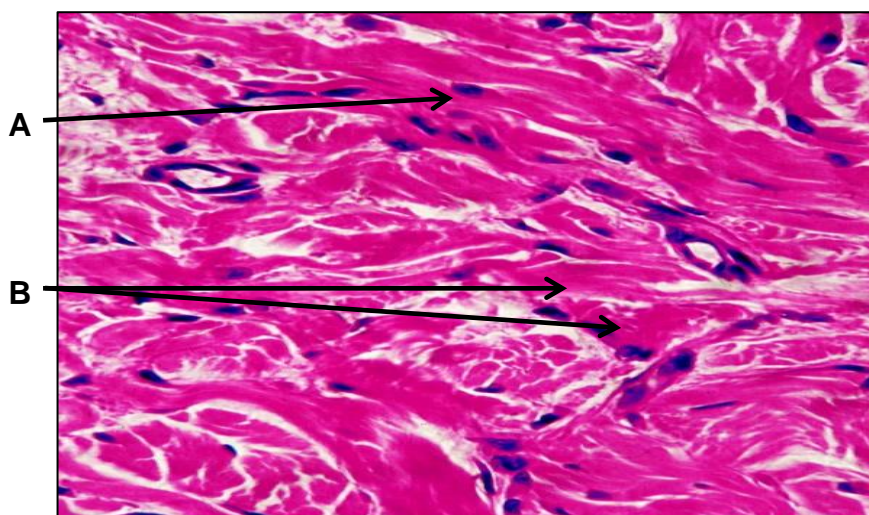


FIGURA 4 – Imagem do tecido conjuntivo denso não modelado (camada reticular da derme), onde temos representados: **A** – Núcleos de fibroblastos (em pouca quantidade); **B** – Fibras colágenas grossas dispostas irregularmente. Técnica HE [20].

3.1.2.3 FIBROBLASTOS

Os fibroblastos apresentam prolongamentos citoplasmáticos, núcleo eucromático e nucléolo evidente e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular [20]. Originam-se de células mesenquimatosas indiferenciadas; são estimulados a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização [29]. Durante situações patológicas ou fisiológicas organizam as fibras colágenas e estão

diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico da derme [30].

3.1.2.4 COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano representando 30% do total das proteínas existentes. A molécula básica do colágeno é o monômero tropocolágeno, fibra constituída por três cadeias de aminoácidos com peso molecular em torno de 300 kDa. As fibras colágenas (**FIGURA 5**), compostas de glicina, prolina e hidroxiprolina são mais frequentes no tecido conjuntivo, apresentando aproximadamente 1000 aminoácidos em cada cadeia e peso atômico da ordem de 95 kDa. Na pele, o colágeno encontra-se organizado basicamente em camadas laminares de fibrilas, trançado em diversos ângulos [20,31].

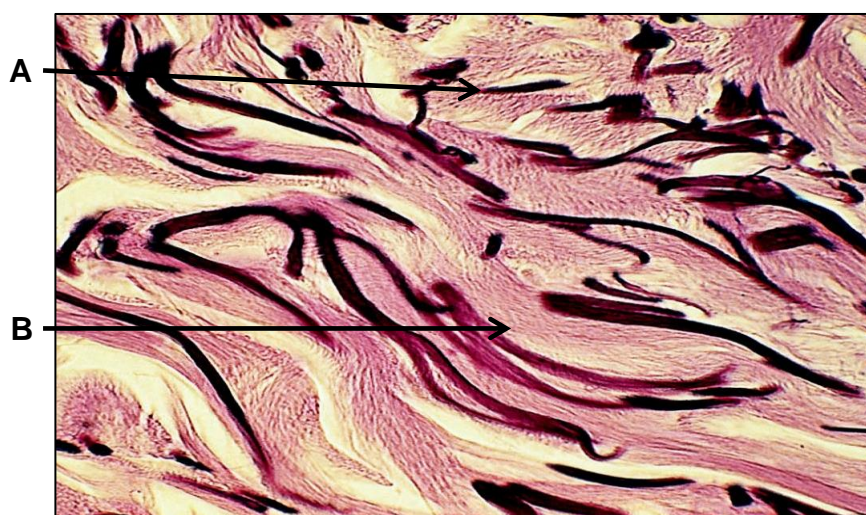


FIGURA 5 – Derme da pele corada seletivamente para fibras elásticas. As fibras elásticas (**A**) escuras se entremeiam entre as fibras colágenas (**B**) coradas em rosa-pálido. As fibras elásticas são responsáveis pela elasticidade da pele [20].

O colágeno tipo I tem como principal característica, formar fibrilas e é o mais abundante no organismo, tendo três cadeias peptídicas, onde duas são idênticas entre si (α -1) e uma é diferente (α -2). A diferença entre as cadeias α -1 e α -2 está na sequência de aminoácidos (tropocolágeno). O colágeno tipo II está envolvido na formação de cartilagem hialina e cartilagem elástica; o tipo III é responsável pela formação das fibras reticulares. Neste colágeno, cada molécula de tropocolágeno é formada por três cadeias α -1. Na membrana basal temos principalmente o colágeno tipo IV, disposto na forma de uma rede entrelaçada enquanto que na derme reticular, temos agrupamentos de feixes paralelos unidos transversalmente. O colágeno tipo V, está envolvido na formação de pele, ossos, tendões e ligamentos. Os colágenos associados a fibrilas são os tipos IX e XII, que promovem ligações entre fibrilas e entre outros componentes da matriz [31,32,33] (**TABELA 1**).

TABELA 1 – Classificação, características e localização das principais fibras colágenas

Tipo	Característica	Localização
I	Formador de fibrilas longas	Presente nos ossos, tendões e pele.
II	Formador de fibrilas longas	Presente nos discos intervertebrais, olhos e cartilagem.
III	Formador de fibrilas longas	Presente na pele, aorta, pulmões.
IV	Formador de redes	Presente nas lentes da cápsula ocular e glomérulos.
V	Formador de fibrilas longas	Presente nos ossos, tendões e sangue.
X, XI e XII	Associados a fibrilas	Presente na cartilagem.

Adaptado de [32,33,34].

3.1.2.5 HIPODERME

É formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes e responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia [20].

Funcionalmente, além de depósito nutritivo de reserva, a hipoderme participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes [35].

3.1.2.6 MEMBRANA BASAL

Na superfície de contato entre as células epiteliais e o tecido conjuntivo subjacente encontra-se a lamina basal. Essa estrutura é 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 [20].

3.1.3 CÉLULAS-TRONCO

O conceito de células-tronco surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 com a observação da presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Essas colônias eram derivadas de uma única célula, a célula-tronco [36]. A partir da década de 70, novas pesquisas demonstraram a capacidade de auto-renovação e diferenciação de células adultas caracterizando assim as células-tronco mesenquimais [36] hoje conhecidas como células estromais multipotentes (MSC) [37].

As MSC são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular, órgãos parenquimatosos e da polpa dentaria de dentes decíduos [15,16,37,38].

As MSC caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular, *in vitro*, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras [15,36,37,38], sendo utilizadas em engenharia tecidual para uma gama de terapias gênicas e síndromes congênitas [37]. Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* (auto renovação) e pela manutenção de todos os tecidos do organismo [38]. Embora possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias, apresentam grandes vantagens, levando-se em conta a facilidade de isolamento destas células e sua capacidade de propagação em cultura [38].

As MSC exibem morfologia fibroblastoide [36,37,38], adesão em substrato plástico e auto renovação, além da capacidade de diferenciação celular [38]. Também expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual [38].

Um dos mecanismos conhecidos de diferenciação celular das MSC é a fusão com a célula adulta-alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula adulta a qual se uniu [37].

Seu potencial imunomodulatório mediante um contato direto das MSC com um tecido (allogênico ou autólogo) ou mediante a interação parácrima com o interferon-gama ($\text{INF-}\gamma$), produzido pelas células imune do organismo, desencadeiam a liberação de diversos fatores solúveis que atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas apresentadoras de antígeno - APC). Também é notado que MSC interferem na diferenciação, maturação e ativação das APC por meio da produção de IL-6 e de fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF). Além disso, a liberação de prostaglandina E- 2 (PGE-2) pelas MSC inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e de $\text{INF-}\gamma$ e estimula a produção de citocina anti-inflamatória IL 10 [38]. Além do mais, as MSC apresentam propriedades supressoras de células T, envolvidas na resposta imunológica e linfocitária o que pode diminuir ou excluir a rejeição de enxertos alógenos [15,16].

As MSC podem ser divididas segundo sua origem, como por exemplo, em células mesenquimais derivadas da gordura (ADSC) [36], às quais foram foco desta pesquisa.

3.1.3.1 CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO (ADSC)

O tecido adiposo é um tipo especial de conjuntivo onde observa-se a predominância de células adiposas (adipócitos). Há duas variedades de tecido adiposo: o **tecido adiposo unilocular (amarelo)** representa quase a totalidade dos tecidos adiposos nos seres humanos [20], constituído de adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e também pela fração estromal vascular (FEV) [16]. Apresenta septos de conjuntivo, que contem vasos e nervos, e destes septos partem as fibras reticulares (colágeno III) que vão sustentar as células adiposas e o **tecido adiposo multilocular (pardo)** que tem como função produzir energia e calor, sendo formado durante a gestação do feto e não mais durante seu desenvolvimento pós-natal [20]. O primeiro acumula-se em certas regiões do corpo, dependendo da alimentação, regulação dos hormônios e gênero [20] e alvo das cirurgias de lipoaspiração ou lipossucção [39]. Por meio do tratamento enzimático com colagenase na FEV isolada do lipoaspirado obtido de cirurgias de lipoaspiração, obtém-se às ADSC [16].

3.2 INCIDENCIA DO CANCER NO BRASIL

Segundo relatório de 2008 da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) / OMS, o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento onde, segundo a IARC/OMS, ocorrerá metade dos novos casos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer [40]. De acordo com a publicação Estimativa 2014 (INCA) – Incidência de Câncer no Brasil sugerem 576 mil casos novos da doença e os cânceres mais incidentes na população brasileira neste ano serão: pele não melanoma (182 mil); próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil). Ao todo estão relacionados na publicação os 19 tipos de câncer mais incidentes, sendo 14 na população masculina e 17 na feminina [2].

3.2.1 A RADIOTERAPIA COMO FORMA DE TRATAMENTO AO CANCER

A radioterapia é o tratamento realizado por meio do emprego de radiações ionizantes visando liberar uma dose precisa a um definido volume tumoral com um mínimo de dano possível aos tecidos vizinhos sadios [41].

Um das formas de tratamento radioterápico usada é a teleterapia que, consiste na terapia a curta distância, com a fonte emissora de radiação [42] se encontrando a cerca de 1 metro de distância do paciente [43], utilizando-se de fontes radioativas de origem nuclear, como os aparelhos de Cobalto-60 ou

aceleradores lineares, que produzem radiação por meio da aceleração de elétrons [42].

Fontes de Cobalto-60 são largamente usadas em teleterapia por possuírem liberação de fótons de alta energia (decaimento β – para ^{60}Ni e liberação de fótons γ de 1,17 MeV e 1,33 MeV), com relativa longa meia-vida (aproximadamente 5,27 anos), alta especificidade de atividade e facilidade em sua produção [44]. Entretanto, como consequência do decaimento radioativo, as fontes de alta atividade (centenas de GBq), dos aparelhos de Cobalto-60 diminuem de intensidade na taxa de 1,1% ao mês. Depois de 5,27 anos, que é o valor da meia-vida do Cobalto-60, o tempo de exposição do paciente ao feixe é maior em relação ao inicial para que seja atingida a mesma dose [45].

A teleterapia é realizada geralmente com mais de um feixe de radiação, a fim de conseguir uma distribuição uniforme no alvo, sendo a dose tão baixo quanto possível, nos tecidos sadios ao seu redor. A ICRU nº 50 [46] recomenda uma dose alvo de uniformidade entre +7% e -5% da dose administrada a um ponto bem definido do alvo prescrito [44].

Antes do início da teleterapia, um planejamento do tratamento é realizado. São definidos os locais a serem tratados e a melhor estratégia a ser seguida, que incluem decisões relativas à dose, o intervalo do tratamento assim como a data de início e o horário das aplicações. A dose total é fracionada em aplicações diárias, cinco vezes por semana, durante cinco a seis semanas [42].

Em todo o mundo, por volta da metade de todos os pacientes com tumores recebe a radioterapia como principal forma de tratamento ou como parte combinada para o tratamento [40]. Dependendo da combinação de tratamentos, dos tipos, das dosagens e da frequência de utilização dos agentes químico e/ou radioterápicos, severas complicações podem surgir, principalmente devido ao fenômeno de **interação das radiações ionizantes nos tecidos**. Na literatura, cerca de 40% dos pacientes oncológicos submetidos a esse tipo de tratamento, na área de cabeça e pescoço, apresentam complicações orais e 90% apresentam problemas na pele apesar dos resultados terem sido substancialmente melhorados ao longo dos anos [47], principalmente com o advento de novas técnicas de localização de tumores e a relação com os órgãos circundantes, que permitem um melhor planejamento para a aplicação da radioterapia, coincidindo com normas de qualidade TEC DOC 1151 [48] e TRS 430 [49] da IAEA [50].

3.2.1.1 EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NO SER HUMANO

O efeito das radiações ionizantes em um indivíduo depende basicamente da **dose absorvida** (alta ou baixa), **dose efetiva**, **taxa de exposição** (única ou fracionada) e da **forma da exposição** (corpo inteiro ou localizada). Qualquer dose absorvida, inclusive das doses provenientes de radiação natural, pode induzir ao câncer ou matar células. A questão é de probabilidade de dano, probabilidade de mutações precursoras de câncer e número de células mortas. Quanto maiores às taxas de dose e as doses absorvidas, maiores as probabilidades de dano, de mutações precursoras de câncer e de morte celular (**interação das radiações ionizantes nos tecidos**). Danos podem ser reparados; mutações podem tanto

representar falhas nos mecanismos de reparo como mecanismos de eliminação de células inviabilizadas pelo dano. A morte celular, resultante de quebras na molécula de DNA, da mesma forma que a eliminação de células mutantes, pode ser encarada como um mecanismo de eliminação de produtos inviabilizados pela presença de danos. A questão passa a envolver o número de células destruídas, o momento em que a morte celular ocorre, considerando o estágio de desenvolvimento do ser, e o gênero do indivíduo irradiado [44,51,52].

3.2.1.1.1 DOSE ABSORVIDA

Dose absorvida é uma quantidade não estocástica¹ aplicável tanto na forma direta e indireta das radiações ionizantes. Para as radiações ionizantes indiretas a energia é transferida a matéria em duas etapas. Na primeira etapa, a radiação ionizante transfere energia, em forma de energia cinética, para as partículas secundárias. Na segunda etapa, estas partículas energizadas, transferem parte desta energia cinética ao meio (resultando em dose absorvida) e a outra parte é perdida na forma de radiação (radiação de Bremsstrahlung e de aniquilação de pósitrons) [44].

Ela exprime a quantidade de energia que uma determinada quantidade de matéria absorveu da radiação ionizante. Uma unidade especial para a dose absorvida era o “rad”, que representa a quantidade de radiação que provoca a absorção de 10^{-5} Joule (J) de energia por grama de matéria, isto é, $1 \text{ rad} = 10^{-5} \text{ J/g}$

¹ Efeitos estocásticos - efeitos para os quais não existe um limiar de dose para sua ocorrência e cuja probabilidade de ocorrência é uma função da dose. A gravidade desses efeitos é independente da dose [Fonte - Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica – CNEN-NN-3.01: 2011, Setembro/2011 <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas/pdf/Nrm301.pdf>]

de matéria que absorveu a radiação. Atualmente a unidade no sistema internacional (SI) de dose absorvida é o Gray (Gy). Um Gy equivale à quantidade de radiação que provoca a absorção de 1 J por kg de matéria exposta à radiação, ou seja, $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg} = 100 \text{ rad}$ [41,51,53].

3.2.1.1.2 DOSE EFETIVA

Os danos biológicos a um órgão não dependem apenas da dose média recebida pelo órgão, mas também sobre o padrão da dose de distribuição resultante do tipo de radiação e energia (equivalente de dose efetiva). Para a mesma dose de radiação para um órgão, a partícula α causará maior dano em comparação com a radiação γ . Isto é porque os eventos de ionização produzidos por uma partícula α serão muito mais espaçados (densamente ionizantes) e, portanto há uma maior probabilidade de dano irreversível aos cromossomos e uma menor probabilidade de reparação tecidual. Conseqüentemente, a dose efetiva para órgãos é multiplicada por um fator de ponderação da radiação (w_R) para dar conta da eficácia da radiação emitida na indução efeitos na saúde. O resultado desta quantificação (soma ponderada das doses equivalentes efetivas em todos os tecidos e órgãos do corpo é chamado de dose efetiva [44]. Na **TABELA 2** os valores de w_R estão relacionados a radiosensibilidade para tecidos e órgãos [51].

A unidade de mensuração da dose equivalente efetiva é J/Kg, que tem o nome de Sievert (Sv) [44].

TABELA 2 – Valores do fator de ponderação (wR) em Sv para tecido ou órgão definido na ICRP 26 e ICRP 60

Órgão ou Tecido	Fator de Ponderação (wR)	
	ICRP 26 (Antiga)	ICRP 60 (Atual)
Gônadas	0,25	0,20
Medula óssea (vermelha)	0,12	0,12
Superfície óssea	0,03	0,01
Pulmão	0,12	0,12
Pele	#	0,01
Restantes*	0,30	0,05
# - não definido. * cérebro, intestino grosso superior, intestino delgado, rins, útero, pâncreas, vesícula, timo, adrenais e músculo.		

Adaptado de [44,51] e modificado pelo autor.

Assim, para as aplicações práticas, a ICRU 39 [54] introduziu grandezas operacionais mensuráveis relacionadas ao equivalente de dose efetiva, como Equivalente de Dose Ambiente, Equivalente de Dose Direcional e Equivalente de Dose Pessoal [51].

3.2.1.1.3 TAXA E FORMA DE EXPOSIÇÃO

Exposição é uma medida da quantidade de radiação α , β e γ necessária para libertar cargas positivas e negativas, por centímetro cúbico de ar, a pressão e temperatura normal. Sua unidade é o Coulomb por Kg. A unidade mais antiga é o R,

equivalente a $2,5 \times 10^{-4}$ C/kg [41,51]. Em radioterapia ela pode ser única ou fracionada, dependendo da necessidade [44,51].

Especificamente, o R é a quantidade de radiação necessária para produzir $1,610 \times 10^{12}$ pares de íons num centímetro cúbico de ar seco a 0°C. O R aplica-se apenas as radiações-X e Y, no ar até 3 MeV. No SI, o R foi substituído pelo Gy e 1 Gy corresponde a aproximadamente 100 R [41,51,53].

A intensidade da radiação (I) mede a quantidade de energia transferida por unidade de área exposta à radiação, na unidade de tempo. A intensidade I é proporcional à atividade da fonte radioativa, multiplicada pela energia da radiação incidente por unidade de área na unidade de tempo. No sistema SI a unidade de intensidade é $J \times m^{-2} \times s^{-1}$ [41,44,51,53]. A taxa de exposição corresponde à variação de dose efetiva com o tempo. É usualmente expressa em Sv/h [44,53].

Na **TABELA 3** estão relacionados os sintomas induzidos por exposições agudas localizadas [52].

TABELA 3 – Relação entre a dose absorvida e a sintomatologia em exposições agudas localizadas

Dose Absorvida (Gy)	Sintomatologia
0,3	Esterilidade temporária no homem.
3	Èsterilidade temporária na mulher.
Maior que 4	Epilação temporária.
Entre 6 a 12	Riodermite eritematosa que se manifesta oito dias após a exposição por dor e vermelhidão; frequentemente substituída por pigmentação acentuada. Esterilidade definitiva na mulher e no homem.
Entre 16 a 20	Epilação definitiva. Riodermite exudativa (bolhas, lesões) que regride em 5 ou 6 semanas.
Igual ou Maior que 25	Riodermite e radionecrose que se manifesta por um eritema precoce, dor e exudação; o processo evolui para uma ulceração do tecido.

Extraído de [52].

3.2.1.1.4 INTERAÇÃO DAS RADIAÇÕES IONIZANTES NOS TECIDOS

O efeito mais importante das radiações ionizantes em nível celular ocorre sobre o DNA podendo levar a dois tipos de danos: mutações gênicas e quebras [52] podendo ou não, inibir sua capacidade reprodutiva. Desde os conteúdos duplicados do DNA durante a mitose, as células com alto grau de atividade mitótica são mais radiosensíveis do que os com baixa taxa mitótica. A ação da radiação pode ser direta ou indireta. Na ação direta, a molécula de DNA é clivada, interferindo no processo de duplicação. No efeito indireto, a água é dissociada em dois elementos, H⁺ e OH⁻ (radicais livres), este último reage com a base do DNA, interferindo no processo de duplicação. Desde que a água representa a maior parte do conteúdo da

célula, o efeito indireto é proporcionalmente mais importante do que o efeito direto [55].

Em um indivíduo adulto, a grande maioria dos tecidos é constituída por células diferenciadas isto é, células que pouco se dividem ou que nunca o fazem. É o caso das células do tecido ósseo, das células do tecido muscular, de células do fígado, dos rins, dos pulmões e do coração. O caso extremo de diferenciação celular, com perda total da capacidade de divisão é o das células nervosas. Células que não se dividem podem acumular quebras de DNA e mutações celulares sem comprometimento das funções dos órgãos e tecidos que constituem. Células cuja taxa de divisão é alta, tornam-se mais vulneráveis à ação das radiações [52].

Quando uma lesão no DNA resultar em quebra da molécula, a célula passa a ter dificuldade em dividir o material genético entre as células filhas, que podem morrer após uma ou duas divisões subsequentes. Quanto maior o grau de diferenciação celular, menor a taxa de divisão e menores são as possibilidades de morte celular induzida pela radiação, portanto quanto menor a diferenciação celular maior a probabilidade de indução de morte por ação das radiações ionizantes. Desta forma, um tecido pode apresentar maior ou menor resistência às radiações, em função do grau de diferenciação das células que o constituem. Em um indivíduo adulto apenas alguns tecidos são constituídos por células cuja função é repor, através de divisões sucessivas, populações celulares cujo tempo médio de vida é da ordem de uma a duas dezenas de dias (elementos figurados do sangue e células de recobrimento da pele); as células responsáveis pela produção de óvulos e espermatozoides também se enquadram entre células altamente vulneráveis à ação das radiações ionizantes por possuírem, como característica funcional, uma alta taxa de divisão celular [52].

3.2.1.2 EFEITOS ADVERSOS DA RADIOTERAPIA E SUA REPARAÇÃO FISIOLÓGICA

As complicações oriundas da radioterapia ainda são frequentes. Reações agudas que acontecem durante o tratamento na maioria das vezes são reversíveis. Complicações posteriores (estágio crônico que podem ocorrer meses ou anos após a radioterapia) são normalmente irreversíveis, levando a incapacidade permanente e a uma perda na qualidade de vida [56**Erro! Indicador não definido.**].

Frente a agentes agressores físicos, químicos ou térmicos, a pele apresenta uma resposta inflamatória peculiar, sendo o primeiro evento, na fase aguda, a vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo através de arteríolas, capilares e vênulas com aumento da permeabilidade vascular. Este aumento leva a perda de líquido para o interstício, provocando concentração das hemácias no interior dos vasos com diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo, e assim, os leucócitos alinham-se na periferia do vaso, ocorrendo diapedese e migração destas células para o foco inflamatório. Estes fenômenos inflamatórios na fase aguda trazem consequências epidérmicas de espongiose, vesiculação intra-dermica, exocitose e exsudação [35].

Gradativamente estes fenômenos diminuem a intensidade estabelecendo as fases subaguda e crônica da inflamação. Na fase crônica a dermite repercute diferente sobre a camada germinativa, produzindo-se acantose, hiperqueratose e paraqueratose, que caracterizam dermatites liquenoides, psoriasiformes e eczemas crônicos [35]

Em situações onde há perda de substância com solução de continuidade da pele, o processo inflamatório inicia-se em diferentes níveis, dependendo da

superfície atingida. Se somente a epiderme sofrer solução de continuidade, a reparação ocorre por um tecido idêntico ao original. Quando a solução de continuidade adentra a derme, um tecido conjuntivo jovem, diferente do tecido de granulação, restaura a lesão, preservando as estruturas e funções dermo-epidérmicas da pele. No momento que há lesão com comprometimento da derme e epiderme com rompimento de vasos sanguíneos e anexos, ocorre a vasoconstrição, resultado de descargas adrenérgicas por ação das células nervosas, tamponamento da lesão pela adesão e agregação plaquetária, iniciando-se assim a cascata de coagulação formando um trombo rico em plaquetas, que é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso, que servirá inicialmente de matriz provisória para as células que desencadearão o processo de reparo tecidual [57,58].

Os neutrófilos oriundos da circulação são as primeiras células a alcançarem a região inflamada, sendo os tipos celulares predominantes entre o primeiro e segundo dias. Sua função principal neste processo é de eliminação de possíveis microorganismos pela fagocitose. As próximas células que surgem na região são os macrófagos derivados de monócitos (segundo ao quinto dia) que, ao contrário do papel desempenhado pelos neutrófilos, é o elemento mais crítico na indução do processo de reparo, pois além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de microorganismos pela fagocitose, após fagocitá-los e processá-los nos fagossomas, apresenta seus peptídios pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células T auxiliares. Desta forma, a fagocitose destas células atua como elo entre o sistema imune inato e o adaptativo. Além disso, é a célula mais eficiente na eliminação de fragmentos teciduais inclusive removendo pela fagocitose os neutrófilos que perderam função [57].

Com a presença local de macrófagos derivados de monócitos e a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles, a migração e ativação de fibroblastos é intensificada. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente (mas não exclusivamente) dos macrófagos, são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro. A fase final da cura de uma ferida é a maturação e remodelagem da matriz extracelular. É durante essa fase que a cicatriz adquire sua máxima resistência tênsil. A característica mais marcante desta fase do reparo é a grande e acelerada deposição de colágeno na região da ferida [57].

Já em situações onde a pele tem contato direto com agressões térmicas e nucleares, as mais severas das complicações, são as queimaduras, que é caracterizada pela desnaturação e destruição das proteínas nas células constituintes da pele, podendo ainda haver perda de substância e solução de continuidade da pele. A gravidade da queimadura depende da espessura da queimadura, o percentual de área de superfície corporal afetada e a localização da queimadura [58].

Queimaduras de espessura parcial podem ser classificadas como de primeiro grau ou de segundo grau. Uma queimadura de primeiro grau envolve apenas a epiderme, caracterizada por uma área avermelhada com dor leve a moderada. As funções da pele não são afetadas e geralmente, a reparação ocorre em menos de uma semana. Uma queimadura de segundo grau traz danos à epiderme e a derme, resultando na formação de bolhas, eritema, dor e edema. As bolhas se formam quando há a separação entre a epiderme e a derme e isto estão associadas com uma acumulo de fluido no interstício do tecido. Estruturas anexas (folículos pilosos e

glândulas sudoríparas) geralmente não são lesadas. A epiderme é regenerada pela migração de células a partir das bordas da ferida e do tecido epitelial presente nos folículos pilosos (caso não tenham sido destruídos). Queimaduras de segundo grau curam-se em cerca de 3-4 semanas, se não houver nenhuma infecção [59].

O tipo mais grave de queimadura é a de espessura total, também chamado de queimadura de terceiro grau. A epiderme, derme e as estruturas associadas são destruídas. Nenhuma dor é sentida na região de uma queimadura de espessura total, pois as terminações sensoriais dos nervos são destruídas. A pele só pode ser regenerada a partir dos bordos da ferida e, se a área da queimadura for grande, isto pode ser um processo lento. Existe uma perda constante de fluido corporal a partir da área danificada e a possibilidade de infecção é elevada [59].

Queimaduras causadas por radiação (radiodermites) apresentam diferenças marcantes do ponto de vista fisiopatológico, clínico e evolução em relação às queimaduras térmicas. Os diferentes tipos de radiação e interação com a pele são apresentados na **TABELA 4** [60]. A resposta da pele a níveis elevados de radiação geralmente segue um padrão característico determinado pela radiosensibilidade da população de células envolvidas e pelo padrão temporal de lesão e reparação. O curso de tempo pode variar dependendo das características das doses empregadas e a condição do paciente [61].

TABELA 4 – Diferentes tipos de radiação, suas propriedades e efeitos sobre a pele

Partícula	Carga	Ionização/Penetração	Efeitos sobre a Pele
A	2+	Ionização enorme (30.000 par de íons / cm no ar), pouca penetração [pode ser interrompida por folha de um papel (0,06 cm de alumínio)]	Não é capaz de penetrar na camada córnea da pele, mas se for mantida sob a pele ou no interior das cavidades do corpo é nocivo e letal.
B	1-	Menos ionizante (75 par de íons / cm no ar), maior alcance e penetração [pode ser interrompido por 1 cm de espessura alumínio].	Pode penetrar e causar danos mais intensos e localizados na pele.
Y	0	Ionização fraca (1,5 par de íons / cm no ar), a penetração extremamente grande.	Maior poder de penetração e alcance que é inversamente proporcional à densidade da substância exposta. Danos à pele são inversamente proporcional à energia de raios-X ou Y.
Raios-X	0	Baixa frequência e duração da onda longa, caso contrário, semelhante aos raios Y.	De acordo com a energia dos raios-X.

Adaptado de [60]

Dos critérios de radiodermite disponíveis atualmente, o que melhor relata é o Instituto Nacional do Câncer (NCI – USA). A classificação das radiodermites introduzida em 2003 de acordo com este critério é apresentada na **TABELA 5** [62].

TABELA 5 – Classificação das radiodermites de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (NCI – USA)

Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV (Radionecrose)
Eritema fraco ou descamação seca	Eritema de evolução moderada a rápida; descamação úmida e irregular, confinado a dobras e pregas da pele; edema moderado	Descamação úmida diferente dobras cutâneas e vincos; sangramento induzido por menor trauma ou abrasão	Necrose da pele ou ulceração da derme de espessura total; sangramento espontâneo a partir do sítio envolvido

Adaptado de [62].

3.2.1.3 TRATAMENTO DAS COMPLICAÇÕES NA TELETERAPIA

O uso de drogas anti-inflamatórias como a Benzidamina tem sido usado, pois reduz as concentrações do TNF- α e é eficaz na redução da intensidade e duração dos danos à pele e mucosa. Outros medicamentos sistêmicos para o alívio da dor, incluindo analgésicos opióides, foram usados em pacientes que receberam radioterapia, além de vários outros medicamentos aplicados localmente também terem sido investigados para prevenir ou tratar a mucosite, incluindo a vitamina E, sucralfato, clorexidina, substâncias anti-inflamatórias, citocinas, alprostadiol, dinoprostona, ácido fólico, enxaguatórios bucais e alopurinol. A maioria dos estudos que abordam o uso de medicamentos tópicos dizem respeito ao uso de sucralfato e clorexidina, também com resultados conflitantes [63]. A atuação de drogas citoprotetoras, esta relacionada principalmente a ação “scavenger” de radicais livres ou antioxidantes, que incluem a amifostina, prostaglandinas, ácido glutâmico, N-acetilcisteína e a vitamina E [64].

Além do uso de medicamentos e drogas citoprotetoras, alternativas como a câmara hiperbárica tem sido relatado, pois o oxigênio hiperbárico, em teoria, estimularia a angiogênese, proliferação de fibroblastos e osteoblastos e formação de colágeno nos tecidos irradiados, aumentando a concentração de oxigênio celular. A vantagem do uso de oxigênio hiperbárico como tratamento de rotina na gestão das extrações dentais em pacientes irradiados na cavidade oral ou na cabeça e pescoço é controversa, pois estudos recentes foram controversos aos dogmas postulados anteriormente onde o uso do oxigênio hiperbárico não trouxe benefício ao paciente [64].

3.3 USO DE ALOENXERTOS DE PELE CADAVERICA EM QUEIMADURAS

Queimaduras graves (extensas e/ou profundas) expõe o organismo a agentes agressores e pode comprometer a recuperação espontânea fisiológica da pele, aumentando significativamente a possibilidade de óbito, devido à perda de fluidos, hipotermia e falta de controle bacteriano [65]. O recobrimento das áreas afetadas se faz necessário para diminuir o risco de morte ao paciente e aumentar qualitativamente sua expectativa de vida. O uso de substitutos cutâneos sintéticos ou biológicos, como os aloenxertos obtidos de Bancos de Tecidos tem um papel importante neste aspecto [12].

A eficácia de um substituto de pele depende de vários fatores: **A)** biocompatibilidade, **B)** uniformidade na composição (quando preparado *in vitro*), **C)** controle da composição biológica e **D)** padronização. Além disso, espera-se que os materiais substitutivos possuam o mais alto grau de semelhanças estrutural e funcional com os aloenxertos. Alguns substitutos são encontrados no mercado

como: Integra[®], a primeira matriz de regeneração dérmica, composta por fibras colágenas bovinas, glicosaminoglicanos de tubarão e camada externa de silicone, Apligraf[®], com queratinócitos humanos; TransCyte[®], a partir de fibroblastos de neonatos; AlloDerm[®], a partir de matriz dérmica humana; Dermagraft[®], baseado em fibroblastos de neonatos humanos; Kollagen[®], de colágeno bovino; Epicel[®], de queratinócitos autólogos cultivados [66].

Sua integração ocorre por eventos sequenciais caracterizados pela aderência, perfusão e local a ser enxertado e a vascularização local. Nas primeiras 24 horas após o transplante, dá-se início à 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 “*inosculation*”, onde pequenos capilares se anastomosam comunicando a superfície do enxerto a do leito receptor e a fase de revascularização ocorre do quinto ao sétimo dia do pós-operatório permitindo o fluxo sanguíneo verdadeiro [67]. Entretanto os aloenxertos de pele cadavérica acabam sendo rejeitados, entre 7 a 10 dias, devido à falta de suprimento sanguíneo o que torna seu aspecto seco, escuro e enrijecido além de exacerbar a reação imunológica do receptor devido à presença de antígenos do doador, desprendendo espontaneamente do leito cirúrgico [13,14].

3.4 MODELO ANIMAL

A escolha do modelo animal em pesquisa deve atender pré-requisitos necessários à experimentação para que haja se possível, refinamento (*Refinement*) no sentido de reduzir o sofrimento do animal ao mínimo possível; a redução

(*Reduction*) do número de animais utilizados na pesquisa ou substituição (*Replacement*) no sentido de busca por métodos alternativos, que por fim, substituam os testes *in vivo*, introduzindo assim o programa e conceito dos **3R's** [68].

As diferenças encontradas entre a pele dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) – epiderme composta por três a quatro camadas de células com a camada córnea mais fina, tornando-a mais delgada e a derme papilar e reticular não diferenciada – e a pele dos seres humanos, não chega a ser um fator limitante a pesquisa [69].

O camundongo *Nude* (Nu/Nu) possui timo rudimentar, apresentando deficiência de imunidade celular por linfócitos-T, tolerando a integração de transplantes de doadores não-histocompatíveis e até mesmo de transplantes xenogênicos [70]. Entretanto este animal possui imunidade humoral (linfócitos-B) responsável pela proliferação e diferenciação na geração de plasmócitos, desencadeamento da resposta frente a microrganismos e antígenos [71], permitindo as reparações teciduais fisiológicas por meio da cascata do processo inflamatório [72].

A resposta tecidual em camundongos *Nude* frente a feridas cirúrgicas apresentam resolução em 7 dias [73], enquanto que em camundongos *Nude* que receberam enxerto de pele humana após injúria tecidual, entre 7 e 15 dias foi possível observar por meio de análises microscópicas, um tecido de granulação com uma formação de vasos sanguíneos [74].

3.5 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

A histologia é o estudo dos tecidos do corpo e de como estes tecidos se organizam para constituir órgãos. 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 [20].

A sequência para a preparação da lâmina é descrita a seguir:

- 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 seções 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. Desta maneira os cortes histológicos estão prontos para a sua visualização microscópica [20].

A imunohistoquímica é a metodologia que permite identificar moléculas em cortes ou camadas, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico [20,75].

Nos queratinócitos a marcação dos se dá por meio de suas citoqueratinas, uma família de proteínas solúveis em água, com pesos moleculares entre 40-70 kD, que formam o citoesqueleto das células epiteliais. Anticorpo monoclonal anti-citoqueratina humana, se destina a identificar qualitativamente, por microscopia de luz os dois epítomos presentes na maioria das citoqueratina [76,77].

Um dos anticorpos monoclonais utilizados para identificação qualitativa é o anticorpo monoclonal de camundongo anti-citoqueratinas humanas clones AE1/AE3. O anticorpo AE1/AE3 é uma mistura de dois anticorpos monoclonais que foram

obtidos por imunização de camundongos com queratina do calo humano². Anticorpo AE1 reage imunohistoquimicamente com um determinado antígeno presente na maioria da subfamília A de citoqueratinas, incluindo citoqueratinas com denominação de Moll 10, 13, 14, 15 16 e 19, enquanto que o anticorpo AE3 reage com a subfamília B de citoqueratinas de 1 a 8 [76,77].

A reação é visualizada por moléculas reveladoras, tais como fluorocromos, enzimas e partículas de ouro coloidal ou pelos vários sistemas de detecção. As técnicas imunoenzimáticas, utilizando-se de Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) e Avidina-Biotina-Peroxidase (ABP) são os métodos mais largamente empregados. Tanto no método PAP quanto ABP, a visualização da reação antígeno-anticorpo no tecido pode ser feita utilizando-se o 3.3 tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) que forma um precipitado insolúvel de cor marrom, visto ao microscópio ótico comum. Além da contra-coloração dos núcleos com hematoxilina onde detalhes citológicos são visualizados [78].

² Hiperplasia localizada no estrato córneo da epiderme, devido à pressão ou fricção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DA RADIONECROSE EM CAMUNDONGOS *Nude* (Nu/Nu) UTILIZANDO IRRADIADOR COM FONTE DE COBALTO-60

O experimento foi realizado no irradiador panorâmico, modelo FIS60-04, do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN/CNEN-SP. Este irradiador possui uma mesa de metal, com 1,20 m de altura e tampo quadrado com 1 m de aresta.

A mesa possui um orifício no centro, no qual atravessa um eixo de metal com 10 cm de diâmetro, que direciona um “lápis” de 20 cm de altura e preenchida com pastilhas de Cobalto-60. A fonte de Cobalto-60 fica inicialmente guardada em uma blindagem de chumbo, é movimentada para fora com auxílio de cabo de aço e motor elétrico, podendo se posicionar em alturas variáveis no eixo central. Este tipo de configuração aumenta o rendimento da fonte, através de uma maior utilização da radiação emitida, atingindo os produtos diretamente ou por espalhamento na sala. A configuração da fonte no centro da sala aumenta a capacidade volumétrica do irradiador com a irradiação simultânea de produtos de tamanhos e formatos variados. Posições bem definidas na mesa e em diferentes distâncias da fonte são utilizadas para a calibração deste irradiador. O campo de radiação sofre grande variação devido ao tamanho da fonte, geometria do irradiador e espalhamento da radiação proporcionando uma taxa de dose exclusiva para cada posição [79].

4.1.1 GEOMETRIA DE IRRADIAÇÃO E DOSIMETRIA

As taxas de dose do irradiador foram determinadas por meio de um diodo de silício SFH00206 (Siemens[®]), do tipo PIN envolto em uma proteção opaca para luz ambiente e conectado a um cabo elétrico, formando uma sonda dosimétrica. Esta sonda foi conectada na entrada do eletrômetro Keithley[®] modelo 617. A conexão GPIB repassa os dados do eletrômetro ao computador portátil com auxílio de um programa de aquisição de dados desenvolvido em LabVIEW[™]. A escolha pelo diodo de silício deve-se sua área útil de aproximadamente 7,5 mm², o que possibilita a detecção de variações nas taxas de doses em relação a pequenas mudanças de posicionamento, importantes para as medidas de taxa de dose no arranjo para irradiação dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) – **item 4.1.2.3**.

Entretanto antes de medir à taxa de dose é necessário a estabilização da resposta da sonda dosimétrica e exatidão das correntes geradas no volume sensível do diodo em função do tempo de exposição à radiação gama proveniente do irradiador. Para isso inicialmente o dosímetro foi posicionado 10 cm acima da mesa de irradiação e distante 10 cm do eixo central da mesa (**FIGURA 6**), em seguida, foram realizadas as conexões entre os equipamentos. Com todos os equipamentos conectados e ligados, aguardou-se 10 minutos para estabilização do sistema. Após este tempo, acionou-se o programa de aquisição de dados para medir a corrente de fuga por 10 minutos. Com o irradiador ligado e a fonte exposta na mesa, foi realizada a medida da taxa de dose. Este procedimento foi repetido dez vezes para estabilização da resposta do dosímetro e verificação da exatidão do mesmo, conforme protocolo da IAEA.

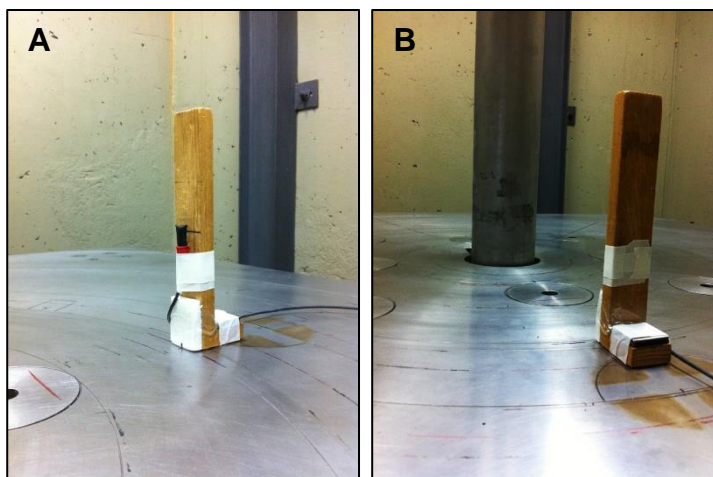


FIGURA 6 – Sonda dosimétrica em posição, onde a parte sensível do diodo encontra-se voltada para o eixo central da mesa.

A determinação pela distancia de 10 cm do eixo central da mesa, deve-se ao tamanho dos blocos de chumbo que foram usados para criar o arranjo para irradiação do camundongo *Nude* (Nu/Nu) – **item 4.1.2.2**.

Com a estabilização da resposta da sonda dosimétrica realizada, uma curva de sensibilidade da sonda foi criada. O diodo foi irradiado nas posições de irradiação na mesa, cujas taxas de dose foram certificadas pela IAEA com utilização de dosímetros de referência, através do programa de garantia de dose. Foram realizadas as medidas de corrente, nas posições: 10; 20; 30 e 40 cm, com o intuito de verificar o espalhamento da radiação em relação a distancia e assegurar uma taxa de dose única para cada posição.

4.1.2 DESENVOLVIMENTO DA GEOMETRIA DE IRRADIAÇÃO E DOSIMETRIA PARA IRRADIAÇÃO DO CAMUNDONGO *Nude* (Nu/Nu)

4.1.2.1 DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO DO SUPORTE DE CAMUNDONGO *Nude* (NU/NU) PARA IRRADIAÇÃO

Para prender e garantir a imobilidade do camundongo *Nude* (Nu/Nu) durante a irradiação foi idealizado um suporte, que pudesse ser esterilizável, onde o animal fosse acondicionado sem que houvesse ablação de qualquer parte de seu corpo, e ainda, que não fosse hermeticamente fechado, impedindo sua respiração.

Para isso foi idealizado um protótipo³ (**patente em processo de análise do INPI**), conforme a **FIGURA 7** e **8**.

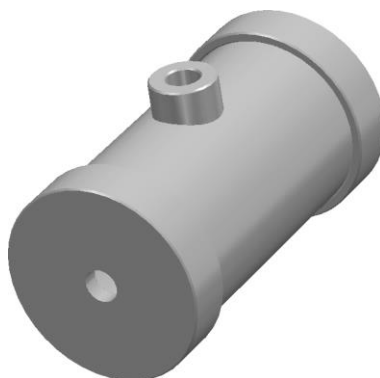


FIGURA 7 – Desenho esquemático do protótipo do suporte para camundongo.

³ Desenho do protótipo executado pelo Departamento de Desenvolvimento do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (DD/IPEN-CNEN/SP) com o software Solid Edge ST[®] - Siemens PLM Software

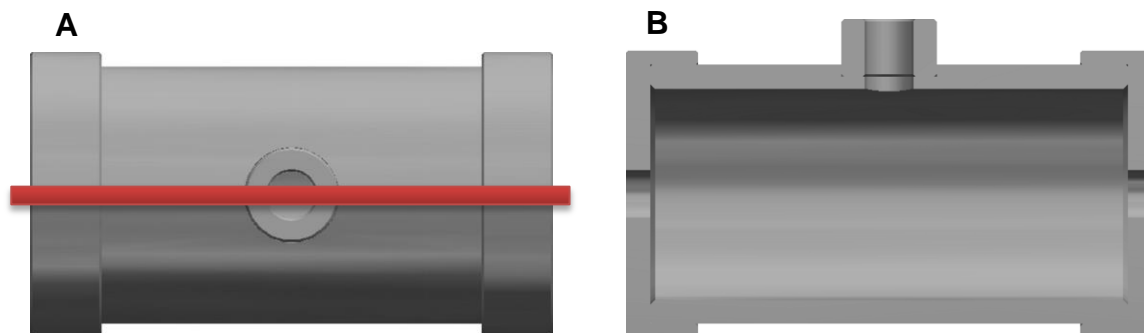


FIGURA 8 – Desenho esquemático do protótipo do suporte para o camundongo (**patente em processo de análise do INPI**) onde em (A) a linha **vermelha** representa o corte seccional para visualização da parte interna do protótipo (B).

4.1.2.2 DESENVOLVIMENTO DO ARRANJO PARA IRRADIAÇÃO DO CAMUNDONGO *Nude* (NU/NU)

Após a definição da curva de sensibilidade e do protótipo do suporte para camundongos (**patente em processo de análise do INPI**), um arranjo foi desenvolvido para propiciar uma blindagem capaz de proteger o corpo do camundongo *Nude* (Nu/Nu) da radiação gama da fonte de Cobalto-60, deixando apenas parte da pele do dorso de seu corpo, sem proteção.

Um arranjo foi idealizado com uma blindagem de quatro blocos de chumbo com dimensões de 10 x 10 x 5 cm posicionados a 10 cm do longo eixo (fonte de Cobalto-60) e o protótipo de suporte do camundongo *Nude* foi fixado perpendicularmente na intersecção dos blocos de chumbo conforme a **FIGURA 9**.

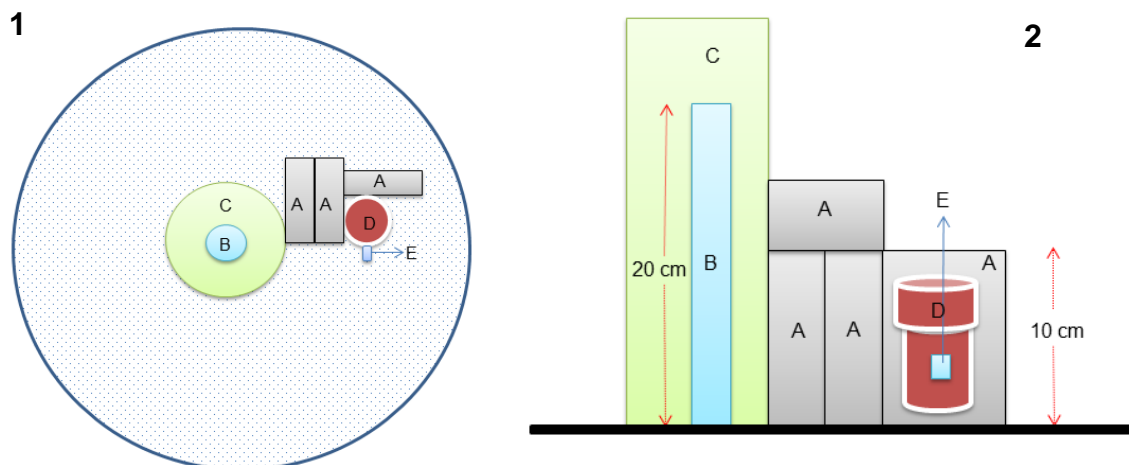


FIGURA 9 – Desenho esquemático com a vista superior (1) e lateral (2) da mesa do irradiador panorâmico contendo o arranjo idealizado para blindagem do camundongo *Nude* (Nu/Nu) onde **A** – são os blocos de chumbo, **B** – fonte de Cobalto-60, **C** – eixo de metal, **D** – protótipo do suporte de camundongo animal (**patente em processo de análise do INPI**) e **E** – cilindro anexo por onde a pele do dorso do animal será distendida e fixada.

4.1.2.3 MEDIDAS DE TAXA DE DOSE NO ARRANJO PARA IRRADIAÇÃO DO CAMUNDONGO *Nude* (NU/NU)

Com o protótipo de suporte do camundongo e o arranjo para a irradiação definidos, a sonda dosimétrica foi inserida em 4 pontos diferentes do suporte (**patente em processo de análise do INPI**), a fim de se medir as taxas de dose que o camundongo *Nude* (Nu/Nu) receberá no momento da irradiação (**FIGURA 10 – A**) Estes 4 pontos representam como um todo, o corpo do animal (ponto 1), a intersecção da pele protegida pela blindagem de chumbo (ponto 2), a parte média da pele exposta diretamente a radiação gama da fonte de Cobalto-60 (ponto 3) e o ápice da pele exposta diretamente a radiação (ponto 4) (**FIGURA 10 – B**).

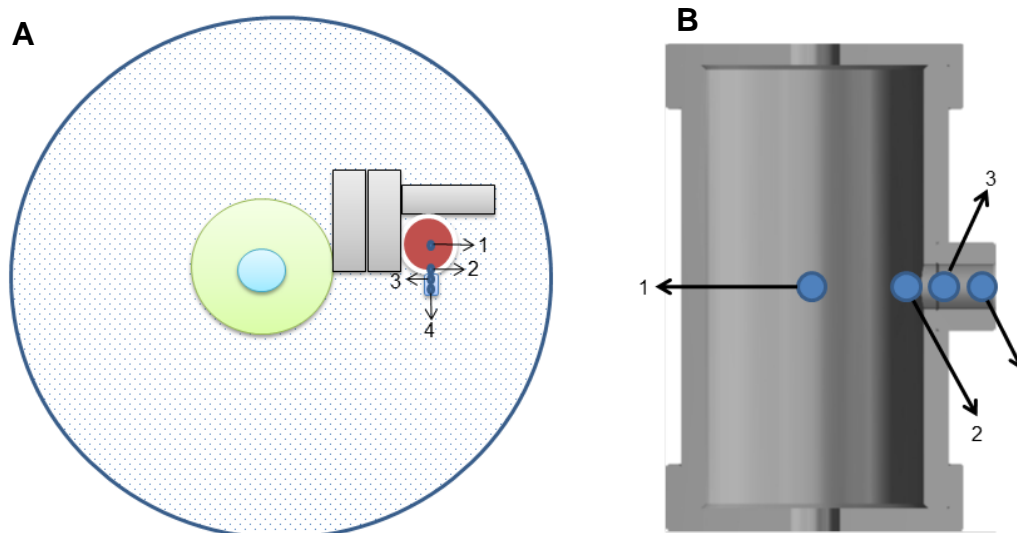


FIGURA 10 – Desenho Esquemático da vista superior do arranjo na mesa do irradiador panorâmico (A) com o protótipo do suporte de camundongo animal em posição com os pontos dosimétricos definidos e em (B), (patente em processo de análise do INPI).

4.2 MODELO ANIMAL

Foram selecionados 33 camundongos da espécie *Nude* (Nu/Nu), fêmeas, com media de idade de 8 semanas, pesando em torno de 20 ± 5 g, provenientes do biotério do Centro de Biotecnologia (IPEN/CNEN – SP), mantidos em gaiolas estéreis e estantes climatizadas. A alimentação consistiu em água autoclavada e em ração peletizada irradiada (Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN/CNEN – SP) granulada com 15 a 16 mm de diâmetro e 30 a 40 mm de comprimento, constituída basicamente de milho integral moído, farelo de trigo e de soja e premix mineral vitamínico.

O uso destes animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais em Pesquisa (IPEN/CNEN – SP) sob o número 052/10 de 26 de janeiro de 2010 (ANEXO 1).

Antes de quaisquer procedimentos com os animais, estes foram anestesiados com injeção intramuscular e complementação intraperitoneal de 0,3 mL de uma solução de cetamina e xilazina diluídas em soro fisiológico (1,0 mL cetamina + 0,5 mL xilazina + 8,5 mL de soro fisiológico).

Para definir os parâmetros de sedação em função do tempo, após a injeção anestésica, o camundongo *Nude* (Nu/Nu) foi observado e testes de estímulos nervosos e visuais foram aplicados para determinação da resposta máxima anestésica.

Baseado no tempo de sedação do camundongo *Nude* (Nu/Nu) e com os parâmetros da geometria e dosimetria realizada, os animais foram anestesiados e inseridos no protótipo do suporte para camundongo (**patente em processo de análise do INPI**), no qual a pele de seu dorso foi pinçada por dentro do cilindro de quartzo, distendida e fixada com um fio de sutura de nylon 4.0. Três diferentes doses foram testadas em três animais diferentes dos 33 disponíveis: 30 minutos – 43,4 Gy; 60 minutos – 86,8 Gy; 75 minutos – 108 Gy, a fim de se reproduzir a radionecrose na pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu). Estes animais foram assistidos diariamente, onde se definiu a dose ideal (86,8 Gy) como capaz de reproduzir a radionecrose na pele de seu dorso, após 14 dias. Esta dose ideal foi determinada baseada na qualidade de vida do animal apresentada após a irradiação e no aspecto clínico da úlcera formada.

O desenho do experimento é baseado conforme a **TABELA 6** a seguir:

TABELA 6 – Divisão dos 24 camundongos *Nude* (Nu/Nu) em grupos controle e intervencionista

	Grupos	Quantidade de Animais por Grupo
1	CONTROLE 1 - Radionecriose	4
2	CONTROLE 2 - Radiodermite	5
3	INTERVENÇÃO 1 - Desbridamento e Acompanhamento	5
4	INTERVENÇÃO 2 - Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada	5
5	INTERVENÇÃO 3 - Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico	5

Os 30 animais inicialmente disponíveis, foram numerados de 1 a 30 e divididos em 5 grupos baseados pela estatística experimental aleatorizado. Como durante o experimento houve a perda de seis animais, que não foram repostos, o “n” foi reduzido a 24 animais e o Grupo 1 (CONTROLE 1 – Radionecriose) foi estudado com quatro animais.

Para a eutanásia dos camundongos, inicialmente uma solução de cetamina e xilazina diluídas em soro fisiológico (2,0 mL cetamina + 1 mL xilazina + 7 mL de soro fisiológico) foi injetada em seu peritônio e aguardado cerca de 3 minutos antes de inseri-los em uma câmara de CO₂ previamente abastecida por 30 segundos. Após sua inserção, o CO₂ foi reaberto e agora de forma constante por cerca de 3 minutos e esperou-se cerca de 5 minutos até a retirada do animal da câmara de CO₂ onde foram verificados seus sinais vitais, para assim proceder à remoção do tecido e proceder-se a para análise histológica.

4.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL

A etapa de padronização *in vitro*, referente à construção do substituto dermo-epidérmico contendo queratinócitos e ADSC, foi realizada sob supervisão do Dr. Cesar Isaac no Laboratório de Microcirurgia (LIM 4) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo FMUSP e em nossas instalações no Laboratório de Cultura Celular do Centro de Biotecnologia do IPEN.

4.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO PARA ISOLAMENTO CELULAR

Os tecidos biológicos obtidos a partir de excedentes de pele e gordura lipoaspirada foram oriundos de pacientes do sexo feminino, faixa etária entre 20 e 35 anos, cor branca ou parda, doados para fins de pesquisa, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ocasião de mastoplastias redutoras e cirurgia estética de lipoaspiração, sendo cedido pelo Banco de Tecidos do ICHC para a realização deste estudo. Estes tecidos foram coletados em frascos estéreis, contendo meio de cultura e transportados para o laboratório, com finalidade de pesquisa com aprovação do comitê de ética em pesquisa COEP-SP da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob o número de protocolo 2055, aprovado em 6 de julho de 2010 (**ANEXO 2**).

4.3.2 ASSEPSIA E MANUSEIO DO EXCEDENTE CIRÚRGICO

O tecido biológico foi armazenado em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), acrescido de penicilina (200 U/mL), estreptomicina (200 µg/mL), anfotericina B (50 µg/mL), à temperatura de 4°C, por no máximo 24 horas.

Todo o processo foi realizado sob condições assépticas e em ambiente controlado, utilizando um fluxo laminar do tipo vertical e materiais esterilizados. O tecido coletado foi submetido primeiramente a uma lavagem em solução fisiológica durante alguns segundos, para a remoção de possíveis resíduos de sangue e em seguida uma prévia desinfecção com solução alcoólica a 70%, durante aproximadamente 15 segundos, para então proceder ao enxágue, que foi repetido por duas vezes em solução fisiológica, e uma terceira vez, agora com a mesma solução fisiológica acrescida de: penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (40 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL) [80].

4.3.3 OBTENÇÃO DE QUERATINÓCITOS PELA TÉCNICA DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

A cultura primária de queratinócitos a ser realizada com pele mamária, foi baseada na metodologia proposta por Rheinwald e Green [81,82,83], onde descreve-se o uso de fibroblastos de camundongo modificados (3T3 Swiss albino), previamente irradiados, formando uma camada de sustentação (*Feeder Layer*). Ainda, outros fibroblastos também podem ser utilizados, como exemplo: fibroblastos humanos. Estes fibroblastos são mitoticamente inativados por γ -irradiação ou mitomicina C. Essa camada de sustentação além de fornecer suporte físico permitindo o desenvolvimento dos queratinócitos em formato de colônias, é capaz de sintetizar substâncias essenciais para o desenvolvimento das células epiteliais [81].

Fragmentos desta pele mamária foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 mm², imersos em tripsina 0,05% / EDTA 0,02% (GIBCO®:

25.300-054), transferidos para um frasco contendo uma barra magnética estéril e incubados a 37°C, sob agitação branda no intervalo de 30 minutos.

Após esse tempo, a tripsina que nesse momento terá células em suspensão, foi transferida para um tubo de fundo cônico, neutralizada com meio de cultura contendo 10% de SFB (Hyclone: Fetal Clone III SH 30.109-03). A mistura foi submetida à centrifugação (centrífuga Marathon 8K – FISHER SCIENTIFIC®) de 1500 RPM durante 5 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e, o botão de células assim formado, ressuspenso em meio de cultura próprio para queratinócitos, por nós denominado K-, que é constituído de: DMEM (GIBCO®:11.965-092) e meio de Ham F12 (GIBCO®: 11065-047 – na proporção de 2:1), contendo 10% de SFB (Hyclone: Fetal Clone III SH 30.109-03), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2.5 µg/mL), glutamina (4 mM) (GIBCO® BRL: 21.051-040), adenina (0,18 mM) (SIGMA®: A 9795), insulina (5 µg/mL – SIGMA®: I 1882), hidrocortisona (0,4 µg/mL – SIGMA®: H 0396), toxina do cólera (0,1 nM –SIGMA®: C 3012), triiodotironina (20 pM – SIGMA®: T 5516). Então, o número de células por mililitro de diluente (cél/s/mL) foi estabelecido pela contagem em câmara hemocitométrica em microscópio de luz invertida. Esta rotina de procedimento foi repetida por cerca de 5 vezes em intervalos de 30 minutos até que houvesse o decréscimo de células obtidas no intervalo. O total de células obtido foi ressuspenso em meio de cultura na concentração desejada. O sistema de cultivo foi o de alta densidade e, para tanto 5x10⁶ células ressuspenso em 5 mL de meio de cultura foram semeadas em garrafas plásticas para esta finalidade, com 25 cm² de superfície de cultivo.

A cada 48h, o meio de cultura foi trocado, agora com a adição de EGF (fator de crescimento epitelial) denominado K⁺. Amplificações similares foram realizadas

sempre que os queratinócitos atingissem o número necessário de células para a realização dos experimentos propostos (**FIGURA 11**). A cada amplificação, o número de células foi contado em hemocitômetro em microscópio de luz invertida. Os experimentos foram realizados entre a segunda e quarta amplificação

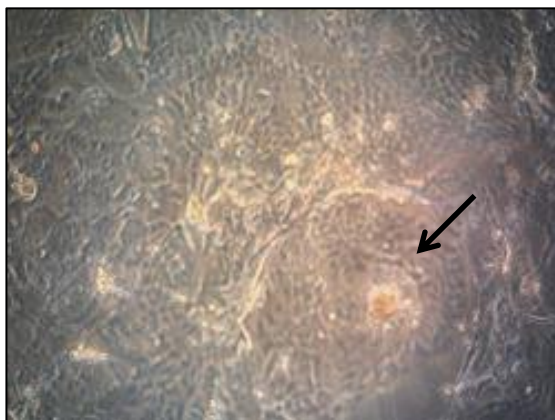


FIGURA 11 – Observação, por meio da microscopia óptica de luz invertida com filtro azul (40x), da colônia de queratinócitos (→ **SETA**)

4.3.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DA GORDURA (ADSC)

A cultura das ADSC foi baseada no protocolo do Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul [39]. Cerca de 30 mL de tecido adiposo lipoaspirado foram obtidos de pacientes submetidos à lipoaspiração e transportado até o laboratório sobre refrigeração (2°C a 8°C), sendo processado em até 24h após a coleta.

Todo o processo foi realizado sob condições assépticas e em ambiente controlado, utilizando um fluxo laminar do tipo vertical e materiais esterilizados. Os 30 mL de tecido adiposo lipoaspirado coletado foi acondicionado em um Becker de

100 mL e um mesmo volume de solução fisiológica foi acrescentada para iniciar-se a lavagem por decantação, para a remoção de resíduos de sangue. Este processo dura cerca de 30 minutos, a solução fisiológica então é aspirada e o processo é repetido até que a decantação da solução fisiológica esteja cristalina. O tecido adiposo lipoaspirado é separado em iguais proporções e acondicionado em dois tubos Falcons de 50 mL, submetidos a tratamento enzimático com colagenase Tipo D (Roche® 11088858001) a 0,05% e incubados a 37°C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Após estes 30 minutos, a colagenase foi neutralizada com o meio DMEM (GIBCO® 11.965-092) suplementado com 10% de SBF (Hyclone: Fetal Clone III SH 30.109-03). A suspensão obtida foi centrifugada a 1900 r.p.m. por 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas em solução salina por 10 minutos a 1000 r.p.m. O *pellet* celular foi ressuspensionado em meio DMEM (GIBCO® 11.965-092) suplementado com 10% de SBF (Hyclone: Fetal Clone III SH 30.109-03) e 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de gentamicina, o número de células por mililitro de diluente (células/mL) foi estabelecido pela contagem em câmara hemocitométrica em microscópio de luz invertida. Posteriormente estas células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após, atingida a confluência de aproximadamente 90%, as culturas foram dissociadas utilizando tripsina 0,05% / EDTA 0,02% (GIBCO®: 25.300-054). As células foram expandidas até a quinta passagem (P5) quando foram realizados os ensaios biológicos (**FIGURA 12**).

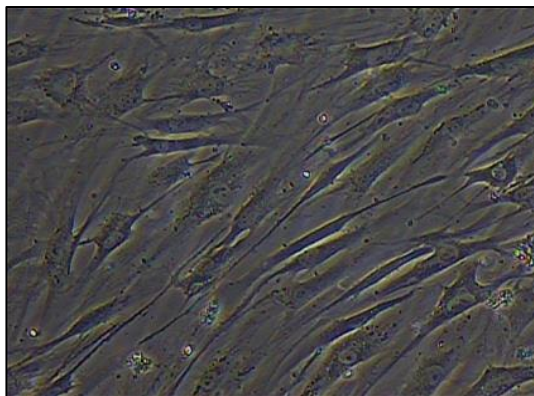


FIGURA 12 – Observação, por meio da microscopia óptica de luz invertida com filtro azul (40x), das ADSC.

4.3.5 SEPARAÇÃO DERMO-EPIDÉRMICA

As amostras utilizadas foram de pele humana de doador multiorgãos, conservadas em glicerol concentrado (mínimo de 85%) com espessura variando em torno de 0,8 a 1,2 cm. As amostras foram cedidas pelo Banco de Tecidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Foram utilizados: solução salina a 0,9%, solução de dispase a 2,5% (Protease Neutra – grau II, Boehringer-Mannheim[®], Alemanha) em DMEM (GIBCOTM, Invitrogen Corporation[®], n° 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 - GIBCOTM, Invitrogen Corporation[®], n° de catálogo 15240-062, EUA), tripsina 0,05% / EDTA 0,02% (GIBCO[®]: 25.300-054) e fluxo laminar vertical (TROX[®] Brasil Ltda, 219780-1-1, série FLV classe II 1-KE, Brasil).

Os fragmentos de pele humana foram cortados em quadrados de 2 cm x 2 cm e divididos em 3 grupos: **controle** (pele glicerolada e não irradiada),

pele irradiada a 25 kGy e pele irradiada a 50 kGy. Os fragmentos foram retirados da solução de glicerol e lavados por 15 minutos em solução salina a 0,9% por 3 vezes (**FIGURA 13 – A**), para remoção do glicerol e então colocados em solução de dispase a 2,5% em DMEM, a temperatura de aproximadamente 35°C por 90 minutos (**FIGURA 13 – B**). Os fragmentos dérmicos foram removidos da solução de dispase, a remoção epidérmica foi realizada com auxílio de uma pinça clínica e estes, inseridos em placas de cultura de 6 poços (**FIGURA 13 – C**). Após a inserção, foi adicionada solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02% por aproximadamente 15 minutos (**FIGURA 13 – D**). Decorrido o tempo, a derme foi lavada com solução salina a 0,9% e colocadas em nova placa de cultura de 6 poços com seu lado papilar para cima, onde se aderiram individualmente por desidratação e, em seguida, foi adicionado glicerol estéril que se manteve por 21 dias (**FIGURA 13 – E**). Todo o trabalho foi realizado em capela de fluxo laminar, mantendo as condições de biossegurança. Após os 21 dias estas dermes foram acondicionadas em embalagem dupla de polietileno seladas termicamente (**FIGURA 13 – F1 – F2 – F3**). Nos grupos de 25 kGy e 50 kGy as dermes foram irradiadas no irradiador de Cobalto-60 (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.

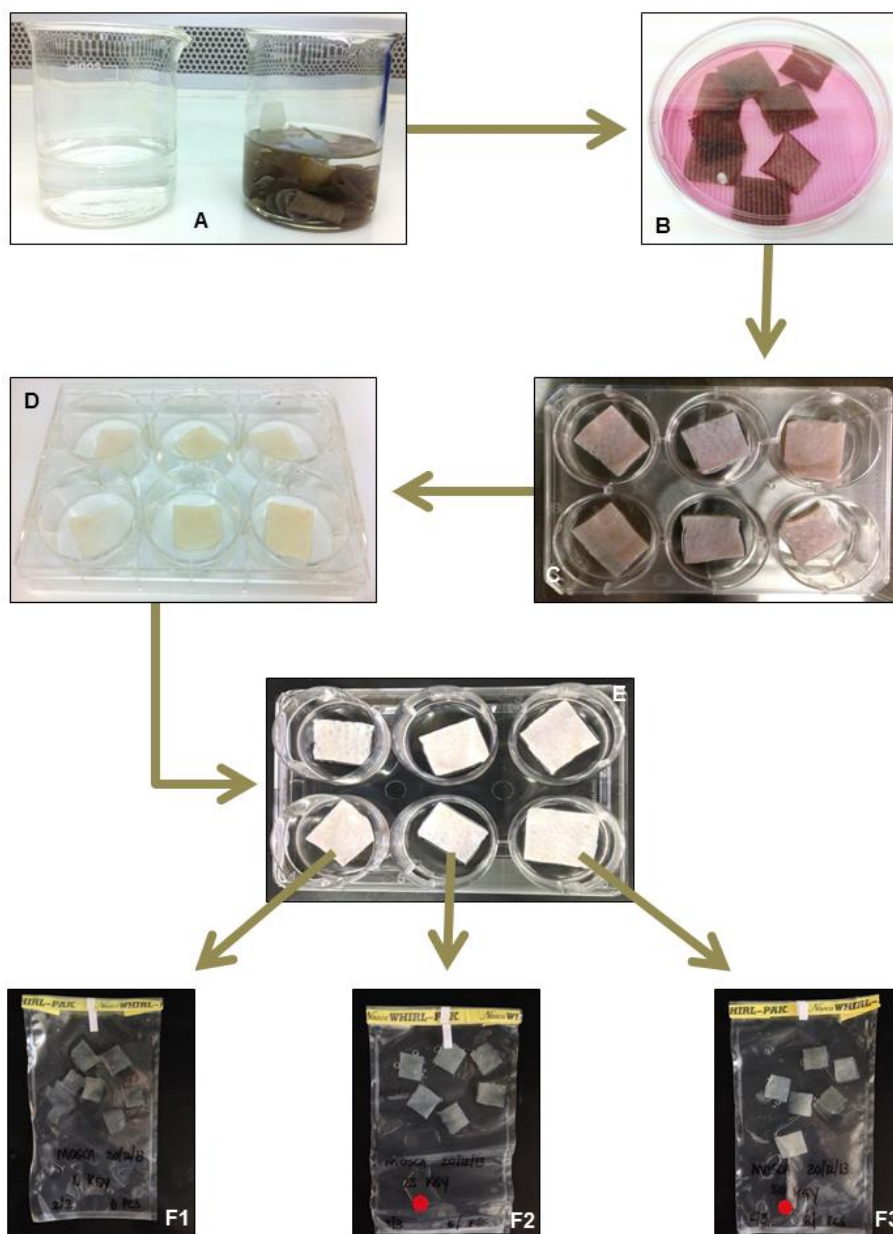


FIGURA 13 – Sequencia realizada para a desepidermização da pele (A, B, C e D) para posterior glicerolação (E) e acondicionamento das matrizes em embalagem dupla de polietileno (F1 – Controle) para posterior irradiação conforme o grupo (F2 – 25 kGy e F3 – 50 kGy).

4.3.6 CONSTRUÇÃO DO SUBSTITUTO DERMO-EPIDÉRMICO POVOADO POR QUERATINÓCITOS E ADSC NO SISTEMA AR-LÍQUIDO

Foram feitos métodos comparativos e subjetivos, baseados na histologia pela técnica HE, para a escolha da derme a ser utilizada (25 kGy ou 50 kGy) em relação

ao controle (derme glicerolada) e a padronização do número de células para construção do substituto dermo-epidérmico. A construção do substituto dermo-epidérmico, de uma forma geral, é iniciada com um número pré-definido de células, diluídas em K^+ e inseridas em um anel de aço inoxidável com dimensões características de 1 cm^2 de diâmetro por 2 cm de altura, na derme acelularizada, sem meio de cultura. As culturas foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C e após 24 horas, retira-se o anel de aço inoxidável, são acrescentados 4 mL de meio de cultura K^+ e a cada dois dias, este meio de cultura é trocado durante duas semanas subsequentes. A partir do sétimo dia de cultura, estas dermes, contendo as células, são elevadas em grade de metal. Neste momento a adição de meio de cultura é menor, mas o suficiente para manter a porção mais inferior da derme em contato com o meio e sua parte superior, onde estão contidas as células, expostas ao ar caracterizando o sistema ar-líquido por mais 14 dias, totalizando o cultivo em 21 dias.

Na construção do substituto dermo-epidérmico, para a escolha da dose adequada para o cultivo celular de queratinócitos e ADSC, foi seguida à descrição supramencionada, utilizando 350.000 céls/cm^2 de cada linhagem seguindo trabalhos [17,84] que utilizaram fibroblastos e queratinócitos, e a conjunção de fibroblastos, queratinócitos e ADSC. Análises histológicas pela técnica HE com 7 dias (sistema imerso) e 21 dias (sistema ar-líquido) foram realizadas.

Definido qual o substituto dermo-epidérmico apresentou melhor resultado em relação à dose de irradiação, foi testado à variação do número de células de cada linhagem a fim de se padronizar a construção do substituto dermo-epidérmico. Foram utilizadas 300.000 céls/cm^2 , 400.000 céls/cm^2 e 600.000 céls/cm^2 de queratinócitos e ADSC seguindo o protocolo anteriormente descrito. Foram feitas

análises histológicas pela técnica HE destes substitutos e de imunohistoquímica com anticorpos AE1/AE3 para marcação de citoqueratinas para a certificação da padronização e utilização nos modelos animais.

A sequência de eventos é visualizada no fluxograma da **FIGURA 14** a seguir:

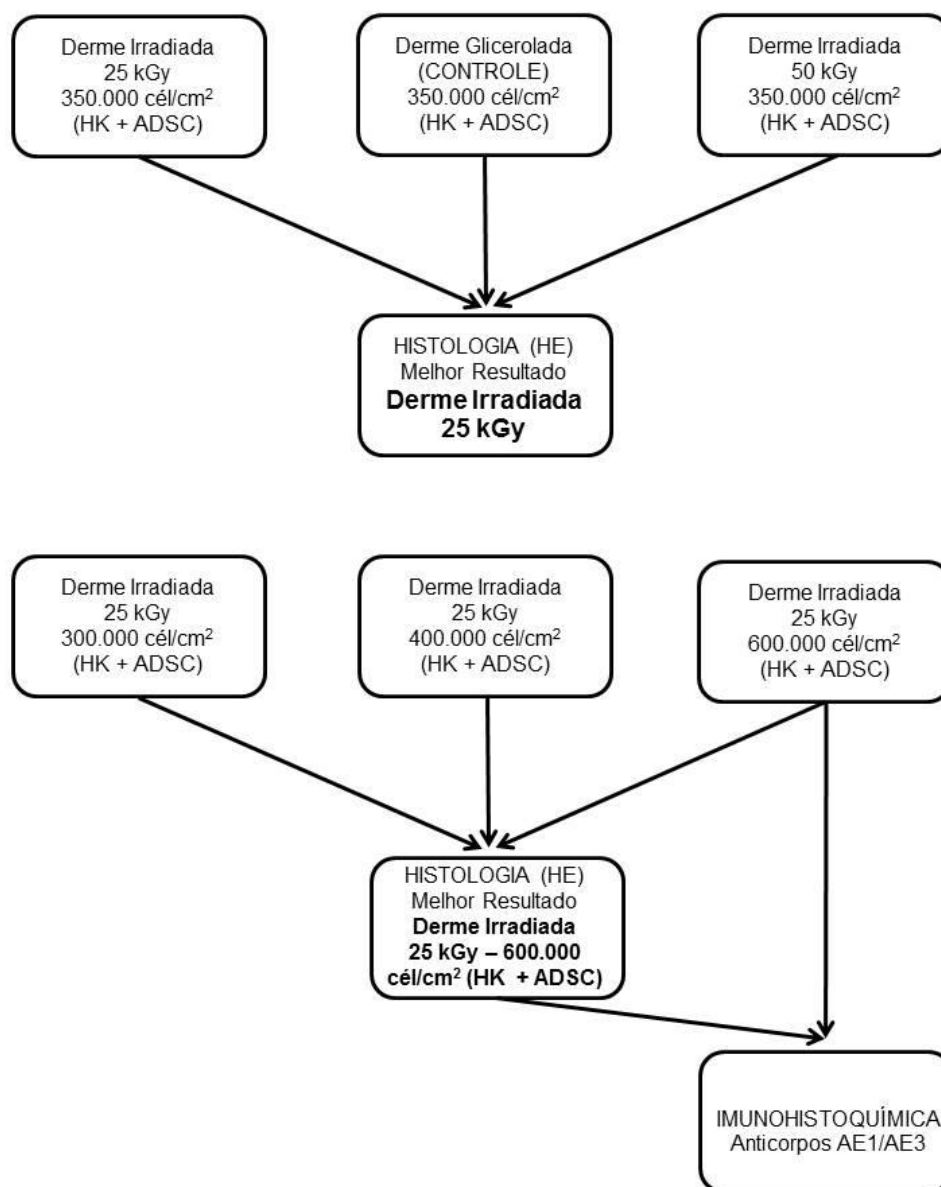


FIGURA 14 – Fluxograma do protocolo do comparativo *in vitro* entre a irradiação das dermes em relação ao controle não irradiado e com a variável do número de células

4.4 HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA

A histologia foi realizada no Laboratório de Patologia Oral, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO – USP) sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Andrea Mantesso.

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 para bloqueio da peça anatômica. Os cortes foram realizados em micrótomo, na espessura final de 5 µm, 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 por 24 horas. Realizou-se a desparafinização com xilol e hidratação com banhos subsequentes de álcool absoluto até a solução diluída de 70%.

Para a coloração pela técnica HE, as lâminas foram mergulhadas em cubetas com corantes hematoxilina e eosina e ao final, em água para remoção do excesso dos corantes.

A preparação imunohistoquímica foi realizada utilizando a técnica da ABP, onde parte do substituto dermo-epidérmico com a derme irradiada a 25 kGy com 600.000 céls/cm² de queratinócitos e ADSC, foi incubada com os anticorpos primários anticitoqueratina AE1/AE3 (Dako[®] Corporation – Dinamarca). As seções do substituto foram, então, lavadas em PBS, incubadas com reagente secundário por 30 minutos e lavados novamente em PBS. As lâminas foram expostas ao reagente de ligação e submetidas à lavagem final com PBS. A reação da peroxidase foi realizada por meio da incubação das lâminas por dois a cinco minutos com 3,3

tetraidrocloroeto-diaminobenzidina (DAB) (Sigma[®] Corporation, EUA) e posteriormente contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas.

4.5 ESTUDO *IN VIVO* ENTRE DIFERENTES FORMAS DE INTERVENÇÃO PARA RESOLUÇÃO DA RADIONECROSE

Com a dose ideal definida para o modelo animal, 24 camundongos *Nude* (Nu/Nu) foram anestesiados, preparados (**FIGURA 15**) e inseridos no protótipo de suporte para camundongo (**patente em processo de análise do INPI**).

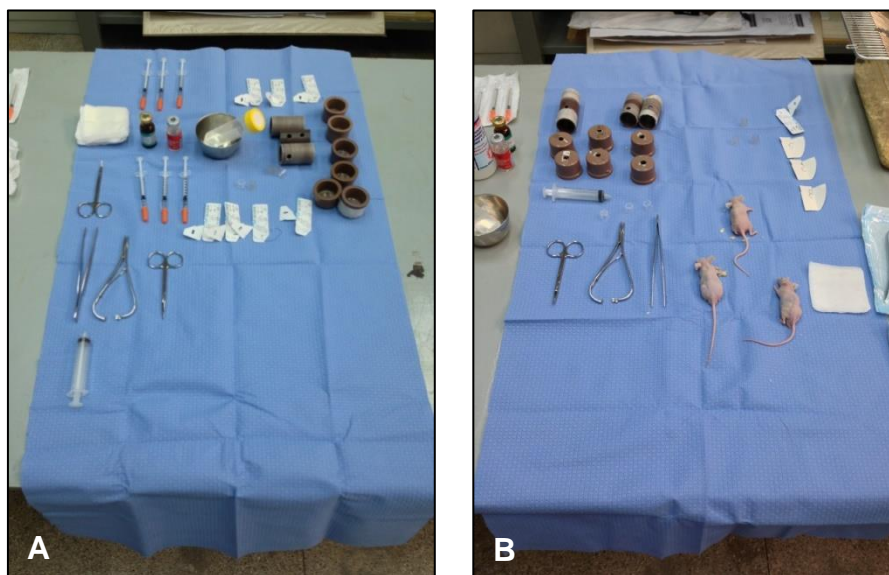


FIGURA 15 – Mesa cirúrgica auxiliar montada (**A**) onde se encontram as seringas hipodérmicas preparadas com solução diluída em solução salina a 0,9% de Xilazina e Cetamina; os fios de sutura de nylon 4.0; instrumentais cirúrgicos e gazes bem como os suportes para camundongos (**patente em processo de análise do INPI**) e seus respectivos cilindros de quartzo que foram previamente irradiados no acelerador de elétrons do IPEN e em (**B**) com os três camundongos anestesiados.

Com os animais já inseridos no protótipo do suporte para camundongo (**patente em processo de análise do INPI**), estes foram fixados no arranjo para

irradiação (**item 4.1.2.2**), que foram montados no irradiador panorâmico. Foram montados 3 arranjos para irradiação equidistantes entre si, (angulação de 90° e a 10 cm) e os animais irradiados por 60 minutos (86,8 Gy).

Os camundongos *Nude* (Nu/Nu) foram acondicionados em suas respectivas gaiolas, e assistidos diariamente. Após 14 dias da irradiação, estes animais foram divididos em grupos de acordo com o padrão de radionecrose apresentada conforme a **TABELA 7**.

TABELA 7 – Padrão de radionecroses encontrados após 14 dias da irradiação dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) a 86,8 Gy

Padrão de Radionecrose	Análise Clínica	n° de Animais	Numeração dos Animais
A	Radionecrose com área definida, circular e com aproximadamente 2 cm x 2 cm	7	2, 10, 14, 18, 3, 24, 13
B	Radionecrose sem área definida e irregular	12	12, 5, 8, 17, 1, 11, 21, 26, 27, 29, 19, 23
C	Radiodermite (lesão ulcerada úmida)	5	6, 7, 15, 20, 28

Definido os padrões de radionecrose e a divisão dos grupos, uma nova subdivisão baseada na estatística experimental aleatorizada foi realizada, para determinar os procedimentos intervencionistas conforme a **TABELA 8**. Como após os 14 dias 5 animais

TABELA 8 – Descrição dos grupos criados a partir do padrão de radionecroses formada

	Grupos	Padrão de Radionecrose e Numeração dos Animais		
		A	B	C
1	CONTROLE 1 – Radionecrose	2	5, 8, 12	
2	CONTROLE 2 – Radiodermite			6, 7, 15, 20, 28
3	INTERVENÇÃO 1 – Desbridamento e Acompanhamento	1, 10, 18	10, 17	
4	INTERVENÇÃO 2 – Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada		11, 21, 26, 27, 29	
5	INTERVENÇÃO 3 – Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico	3, 13, 24	19, 23	

Ainda nestes grupos, uma subdivisão randômica foi realizada (**TABELA 9**) onde parte dos animais tiveram sua pele dissecada e analisada histologicamente pela técnica HE, após 48 horas e a outra parte após 7 dias.

TABELA 9 – Divisão dos grupos para análises histológicas após 48 horas e 7 dias

	Grupos	Eutanásia 48 hs	Eutanásia 7 dias
1	CONTROLE 1 – Radionecrose	12, 5**	2, 8**
2	CONTROLE 2 – Radiodermite	7, 20	6, 15, 28
3	INTERVENÇÃO 1 – Desbridamento e Acompanhamento	1, 18	10, 14, 17*
4	INTERVENÇÃO 2 – Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada	11, 29 e 27*	21 e 26
5	INTERVENÇÃO 3 – Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico	23 e 13*	3, 19 e 24

* - animais que morreram antes de completar o período para o desbridamento da radionecrose

** - animais que morreram antes do aparecimento da radionecrose.

4.6 DESENVOLVIMENTO DO IRRADIADOR COM FONTES DE COBALTO-60

Todo o desenvolvimento do projeto do irradiador com fontes de Cobalto-60 (incluindo o carrinho de transporte e o suporte para o animal) foi executado no Departamento de Desenvolvimento do IPEN (DD/IPEN-CNEN/SP0 e desenhado utilizando o software Solid Edge ST® (Siemens PLM Software).

Inicialmente, para a etapa de desenvolvimento do irradiador foi proposta a utilização de um tarugo de chumbo com 40 cm de espessura. A espessura do tarugo deve-se aos cálculos preliminares que assegurariam a blindagem necessária para que não houvesse exposição à radiação, tanto do operador quanto do ambiente.

O projeto foi desenhado com 11 fontes de Cobalto-60 alinhadas entre si, formando uma espécie de cruz (**FIGURA 16**) e colimadas de forma que a radiação

gama convergisse a um único ponto focal (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 026**).

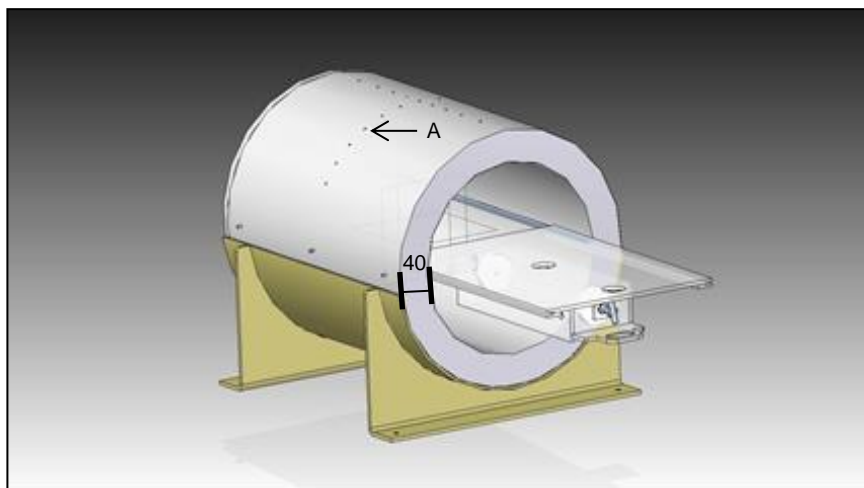


FIGURA 16 – Projeto inicial do irradiador utilizando-se do tarugo de chumbo com 40 cm de espessura e com os locais delineados para as fontes de Cobalto-60 (**A → SETA**) (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 026**).

Para acomodação das fontes de Cobalto-60 em seus locais específicos no irradiador (**FIGURA 17 – A**), foi projetado um sistema porta-fontes produzidos em aço inox (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 027**) de tal maneira que estas fontes ficassem encapsuladas para prevenir acidentes radioativos (**FIGURA 17 – B**).

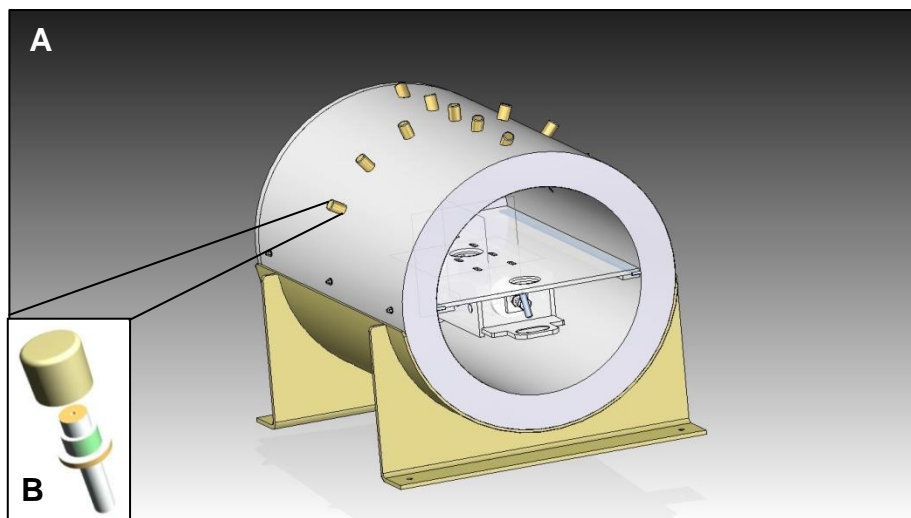


FIGURA 17 – Projeto do irradiador com o sistema porta-fontes (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 027**) em posição (A) e ampliação do sistema porta-fontes (B).

Visando uma proteção adicional tanto ao operador quanto ao ambiente de trabalho, sobre estes sistemas porta-fontes foi desenhada uma proteção articulada em forma de cruz, feita de chumbo, com 40 cm de espessura, para assegurar a blindagem específica e evitar o contato direto e acidentes com as fontes de Cobalto-60 (**FIGURA 18 – A**). Ainda, foram desenhados dois tampos, em chumbo (**FIGURA 18 – B**), nas extremidades do irradiador, também com 40 cm de espessura, sendo que em uma das extremidades, há um recorte para inserção de um suporte de animais (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 028**) pudesse ser inserido sem que o operador, acidentalmente, introduza a mão no interior do irradiador (**FIGURA 18 – C**).

Para maior segurança de operação do equipamento, um sistema de duplo cadeado foi desenhado (**FIGURA 18 – D**), sendo que para ter acesso as fontes de Cobalto-60 são necessárias à supervisão da proteção radiológica e também do operador.

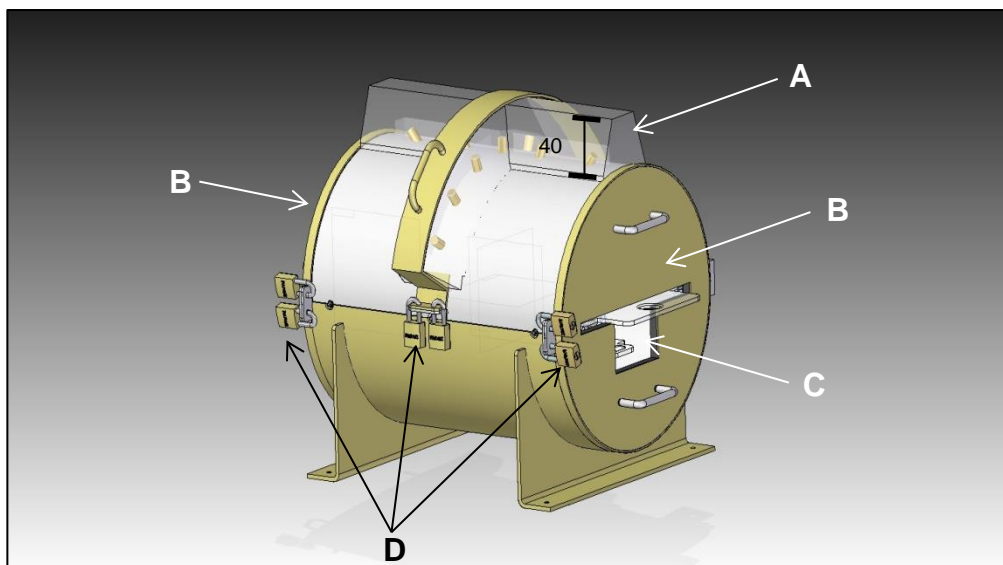


FIGURA 18 – Proteção adicional articulada em forma de cruz, de 40 cm de chumbo, para o sistema porta-fontes (A); tampos nas extremidades (B). Em um dos tampos, pode-se notar o corte (C) para a inserção do suporte de animais (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 028**) e três sistemas de duplo cadeado (D).

Para a inserção do animal no interior do irradiador, foi desenhado um sistema de suporte de animal, confeccionado sob uma placa de acrílico (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 028**), tendo em seu centro um orifício com 5 cm de diâmetro (**FIGURA 19 – A**), local este de convergência da radiação gama. A placa ainda contém 8 orifícios ao longo de seu comprimento (**FIGURA 19 – B**). A esta placa foi adicionada uma caixa retangular, também confeccionada em acrílico, contendo 7 orifícios de cada lado (**FIGURA 19 – C**) e em suas extremidades um sistema de prensa rosqueável (**FIGURA 19 – D**). Esse suporte para animais possui, em suas laterais, trilhos para que haja o encaixe no irradiador (**FIGURA 19 – E**).

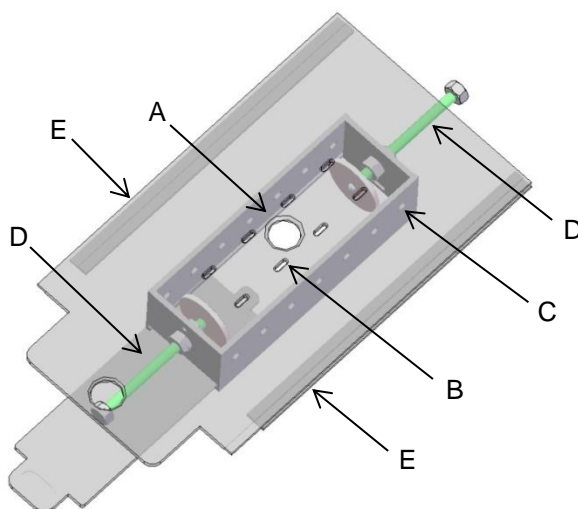


FIGURA 19 – Desenho do sistema de suporte do animal (**patente pendente sob o numero - BR 10 2012 028**) com o orifício central na placa (**A**), e os orifícios ao longo de seu comprimento (**B**). Na caixa de suporte do animal notam-se os orifícios laterais (**C**), as prensas rosqueáveis (**D**) e os trilhos laterais (**E**).

Com o irradiador finalizado, foi desenhado um carrinho de transporte em aço inox, com cantos arredondados e uma alça de suporte, contendo quatro (**FIGURA 20**).

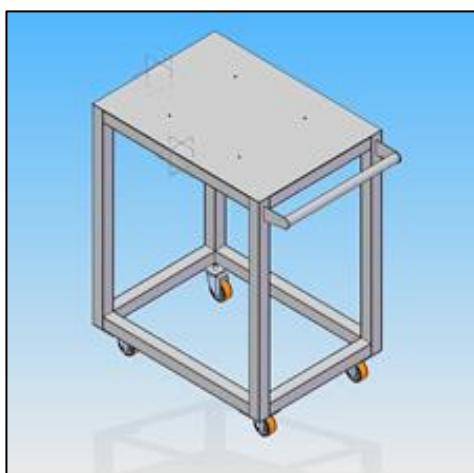


FIGURA 20 – Carrinho de transporte do irradiador com fontes de Cobalto-60.

5 RESULTADOS

5.1 DOSIMETRIA DO IRRADIADOR PANORÂMICO PARA DESENVOLVIMENTO DA RADIONECROSE EM CAMUNDONGOS *Nude* (Nu/Nu)

Para o desenvolvimento da radionecrose no modelo animal, foram realizados testes dosimétricos para determinação do período de resposta estável da sonda dosimétrica, bem como a curva de sensibilidade do diodo de silício.

5.1.1 DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE RESPOSTA ESTÁVEL DA SONDA DOSIMÉTRICA E EXATIDÃO

As correntes geradas no volume sensível do diodo em função do tempo de exposição à radiação gama proveniente do irradiador Panorâmico, com taxa de dose de 2,18 Gy/min., estão representadas nas **FIGURAS 21 e 22**. Os resultados obtidos mostram que os sinais de corrente observados são estáveis durante todo tempo de irradiação, com exatidão de 98%, baseado na média aritmética obtida entre a variação da corrente (nA) do diodo de silício a irradiação de Cobalto-60 em relação ao tempo (s).

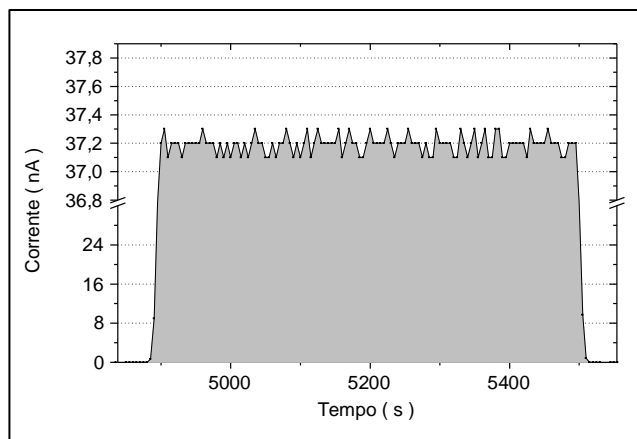


FIGURA 21 – Variação da resposta do diodo de silício a irradiação de Cobalto-60 no irradiador panorâmico. A pré-dose é necessária para estabilização da resposta do diodo de silício, onde é evidenciado a homogeneidade da radiação da fonte de Cobalto-60 na distância de 10 cm a taxa de 2,18 Gy/min.

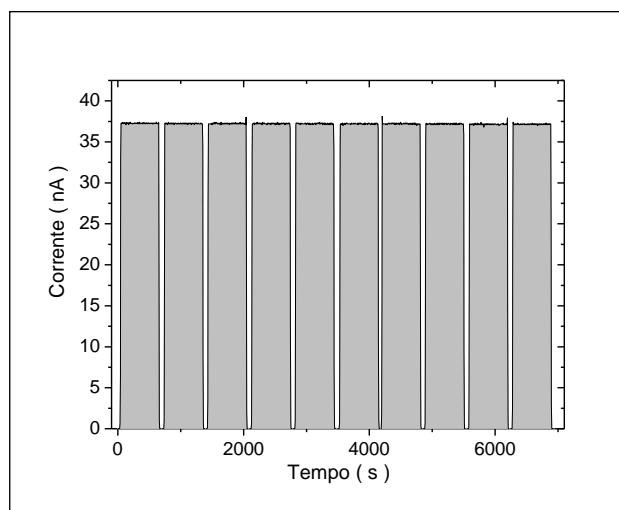


FIGURA 22 – Teste de reprodutibilidade de resposta para a mesma taxa de dose de 2,18 Gy. Corrente gerada no diodo em função do tempo a 10 cm da fonte.

5.1.2 CURVA DE SENSIBILIDADE

Para quantificar as diferentes taxas de doses no arranjo, foi montada uma curva de calibração do diodo, com medidas de corrente nas posições certificadas do Irradiador Panorâmico. Foram realizadas as medidas de corrente, nas posições: 10, 20, 30 e 40 cm, com taxas de doses de 2,18; 0,87; 0,50 e 0,30 Gy/min.

respectivamente (**FIGURA 23**). A corrente registrada pelo diodo em função das taxas de dose apresenta comportamento linear, como podemos observar no gráfico da **FIGURA 24**. Com a curva de resposta do gráfico, foram medidas as taxas de dose no arranjo do camundongo.

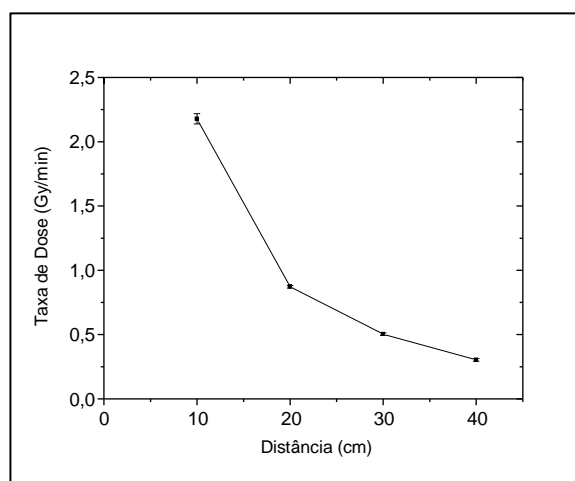


FIGURA 23 – Variação da taxa de dose (Gy/min) com a distância (cm).

Como o irradiador panorâmico não possui feixe colimado, a radiação não obedece a lei do inverso do quadrado da distância devido ao espalhamento da radiação. Incerteza da calibração IAEA – de 1,7%

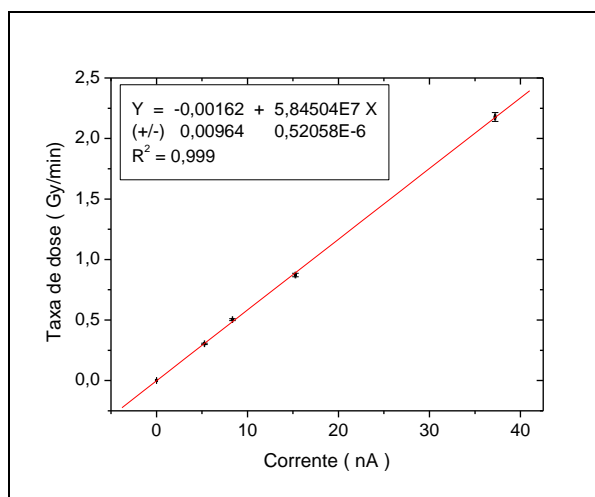


FIGURA 24 – Curva de sensibilidade do diodo nas posições 10, 20, 30 e 40 cm no irradiador panorâmico.

5.1.3 MAPEAMENTO DA TAXA DE DOSE DA FONTE DE COBALTO-60 PARA DESENVOLVIMENTO DA RADIONECROSE EM CAMUNDONGOS *Nude* (Nu/Nu)

Com as calibrações necessárias realizadas, um mapa de dose do irradiador panorâmico pode ser criado (**FIGURA 25**), a distância de 10 cm, que corresponde a distância do arranjo a fonte de Cobalto-60.

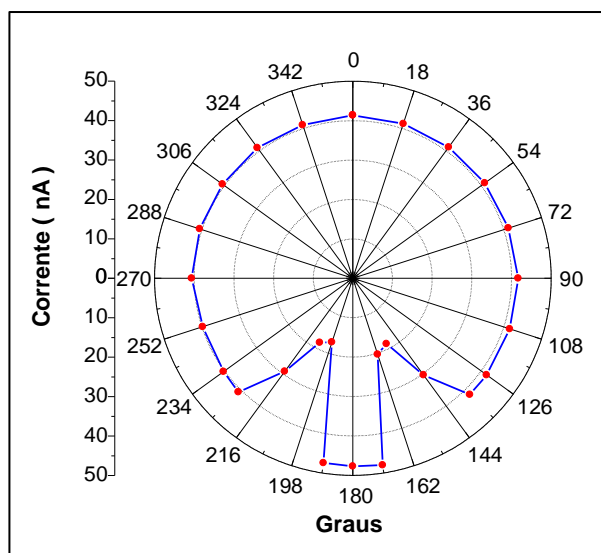


FIGURA 25 – Mapa de dose do irradiador panorâmico a distância de 10 cm da fonte de Cobalto-60

5.1.4 CONSTRUÇÃO DO PROTÓTIPO DO SUPORTE DE CAMUNDONGO PARA MEDIDA DA TAXA DE DOSE NO ARRANJO

Um protótipo foi concebido (**patente em processo de análise do INPI**) para servir de suporte para camundongos, capaz de imobiliza-los sem que houvesse ablação de seu corpo, além de ser possível distender e fixar a pele do animal para exposição direta à radiação proveniente da fonte de Cobalto-60 (**FIGURA 26**) do irradiador panorâmico, conforme a descrição do **item 4.1.2.1**



FIGURA 26 – Protótipo do suporte de camundongo (patente em processo de análise do INPI).

5.1.5 MEDIDAS DE TAXA DE DOSE NO ARRANJO PARA IRRADIAÇÃO DO DORSO DO CAMUNDONGO

Conforme o arranjo idealizado (item 4.1.2.2 FIGURA 9 – 1 e 2), o protótipo do suporte de camundongo (patente em processo de análise do INPI) utilizado foi fixado perpendicularmente na blindagem de chumbo e a sonda inserida nos quatro pontos pré-definidos. Na FIGURA 27 pode-se observar a montagem do arranjo e a sonda em posição para o mapeamento dosimétrico e determinação das doses, nos pontos pré-definidos (item 4.1.2.3 FIGURA 10 A e B).

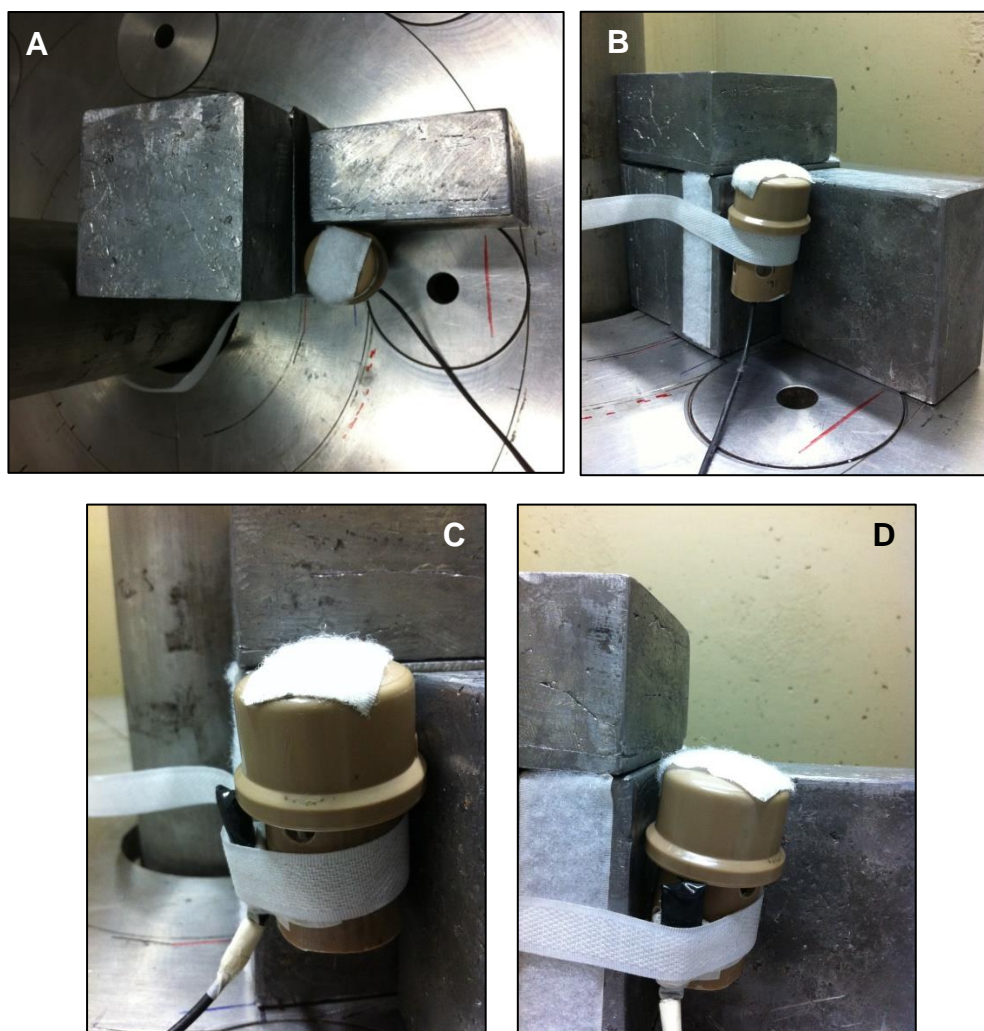


FIGURA 27 – Diferentes visualizações (A, B, C e D) do protótipo do suporte do animal em posição para determinação da taxa de dose (**patente em processo de análise do INPI**).

Na **TABELA 9** observamos um resumo dos valores de taxas de dose obtidos nas posições 1, 2, 3 e 4, utilizando-se o diodo de silício, sendo a maior dose no ponto 4 (ápice da pele) e a menor dose, no interior do suporte (representando menos que 1% da dose total).

TABELA 10 – Taxa de dose e dose em uma hora de irradiação no arranjo para dosimetria de irradiação do camundongo, obtidas com diodo de silício

Posição	1	2	3	4
Taxa de dose (Gy/min)	0,015	0,021	0,55	1,45
Dose após 60 minutos de irradiação (Gy)	0,9	1,3	32,9	86,8

5.2 MODELO ANIMAL

Após acompanhamento anestésico preliminar com os camundongos *Nude* (Nu/Nu), determinou-se que o efeito máximo sedativo foi de 75 minutos, portanto as doses foram baseadas em função deste tempo. Seguindo o protocolo descrito (item 4.2), o suporte para camundongo (**patente em processo de análise do INPI**) foi anexado à blindagem de chumbo no irradiador panorâmico (**FIGURA 28**).

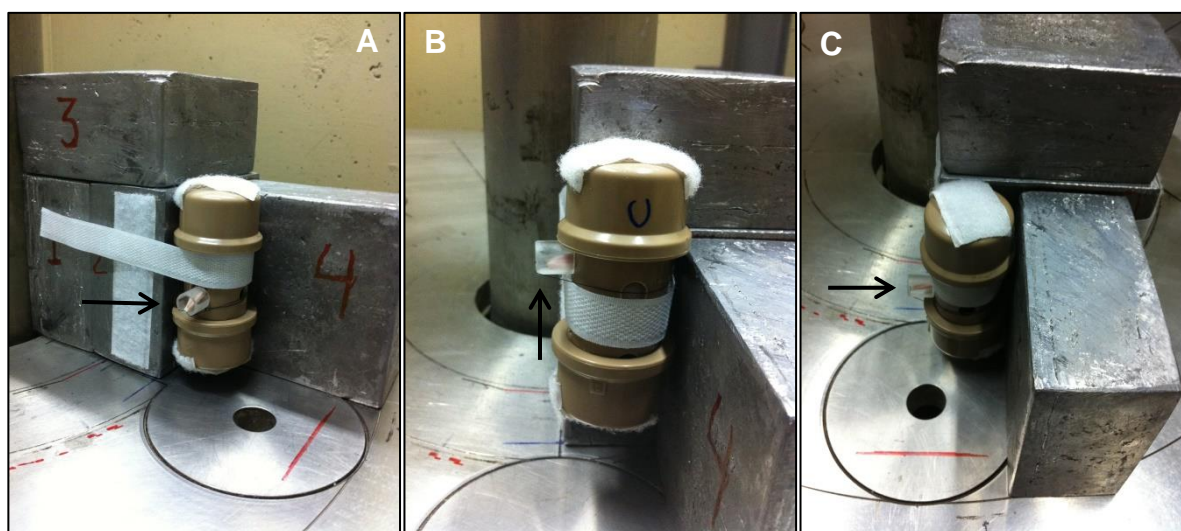


FIGURA 28 – Vista oblíqua (A), vista perpendicular a fonte de Cobalto-60 (B) e vista superior (C) do camundongo inserido no suporte com sua pele distendida e fixada, (→ **SETA**) fixado no na blindagem de chumbo.

Por meio da dosimetria realizada e o mapa de dose definido foram utilizadas três diferentes doses (30 minutos – 43,4 Gy; 60 minutos – 86,8 Gy e 75 minutos – 108 Gy), para determinar a dose ideal capaz de causar radioneecrose no dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu). Os resultados podem ser observados nas **FIGURAS 29 a 31**.



FIGURA 29 – Acompanhamento fotográfico por 20 dias após a irradiação no dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) com 43,4 Gy em dose única, utilizando-se do irradiador panorâmico.

Nos 3 camundongos *Nude* (Nu/Nu) que foram irradiados com 43,4 Gy em dose única e observado por 20 dias, não apresentaram nenhum sinal de radiodermite e/ou radioneecrose.

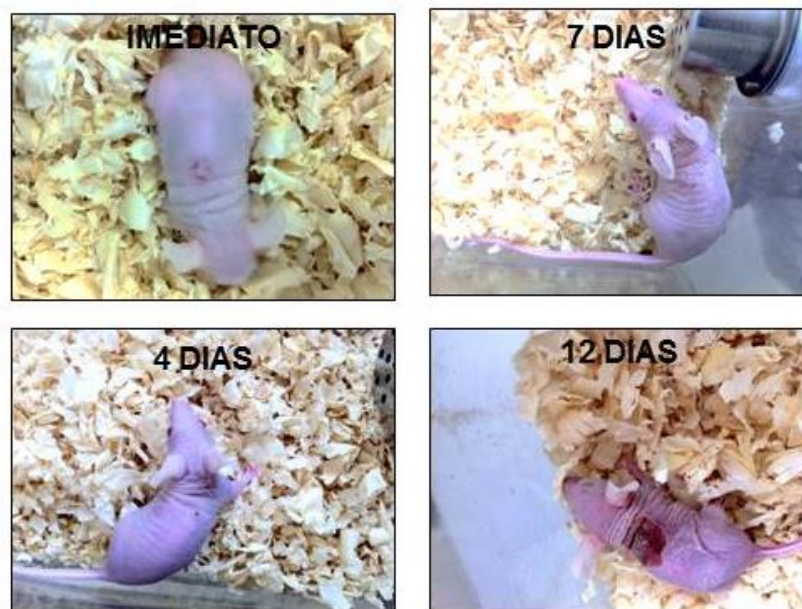


FIGURA 30 – Acompanhamento fotográfico por 12 dias após a irradiação no dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) com 108 Gy em dose única, utilizando-se do irradiador panorâmico.

Já os camundongos *Nude* (Nu/Nu) que foram irradiados com 108 Gy em dose única, o aparecimento da radionecrose ocorreu após 7 dias e as condições de sobrevivência do camundongo chegaram ao seu extremo no 12º dia, onde decidiu-se pela sua eutanásia.

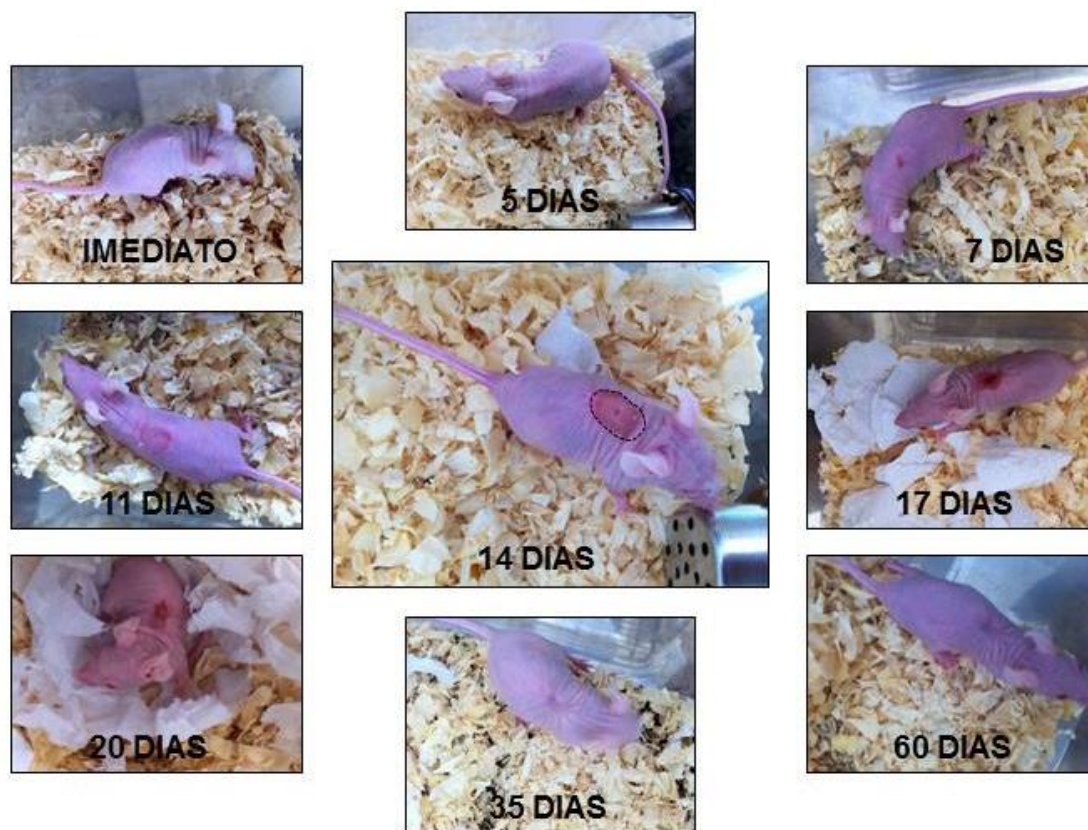


FIGURA 31 - Acompanhamento fotográfico por 60 dias após a irradiação no dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) com 86,8 Gy em dose única, utilizando-se do irradiador panorâmico.

Durante este acompanhamento fotográfico dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) pode-se observar que houve aparecimento de radiodermite a partir do 7º dia, sendo que a radionecrose ficou evidente a partir do 14º dia, com 17 dias observou-se o início da resolução fisiológica da úlcera e houve total oclusão da radionecrose no 35º dia.

A partir deste momento, definiu-se que a dose ideal capaz de produzir a radionecrose na pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) foi de 86,8 Gy e o ápice ocorre em aproximadamente 14 dias.

5.3 CONSTRUÇÃO DO SUBSTITUTO DERMO-EPIDÉRMICO POVOADO POR QUERATINÓCITOS E ADSC

A construção do substituto dermo-epidérmico começou com a cultura primária de queratinócitos (item 4.3.3 FIGURA 11) e a cultura de ADSC (item 4.3.4 FIGURA 12). Com os protocolos de cultivo de queratinócitos e ADSC testados e estabelecidos e em concordância com o protocolo de desepidermização da matriz dermo-epidérmica (item 4.3.5 FIGURA 13), foram realizados estudos comparativos entre a derme glicerolada (controle) e irradiada a 25 kGy e 50 kGy por meio de análises histológicas pela técnica HE no sistema imerso (após 7 dias de cultivo), observado na FIGURAS 32 e após mais 14 dias (sistema ar-liquido) observado na FIGURA 33.

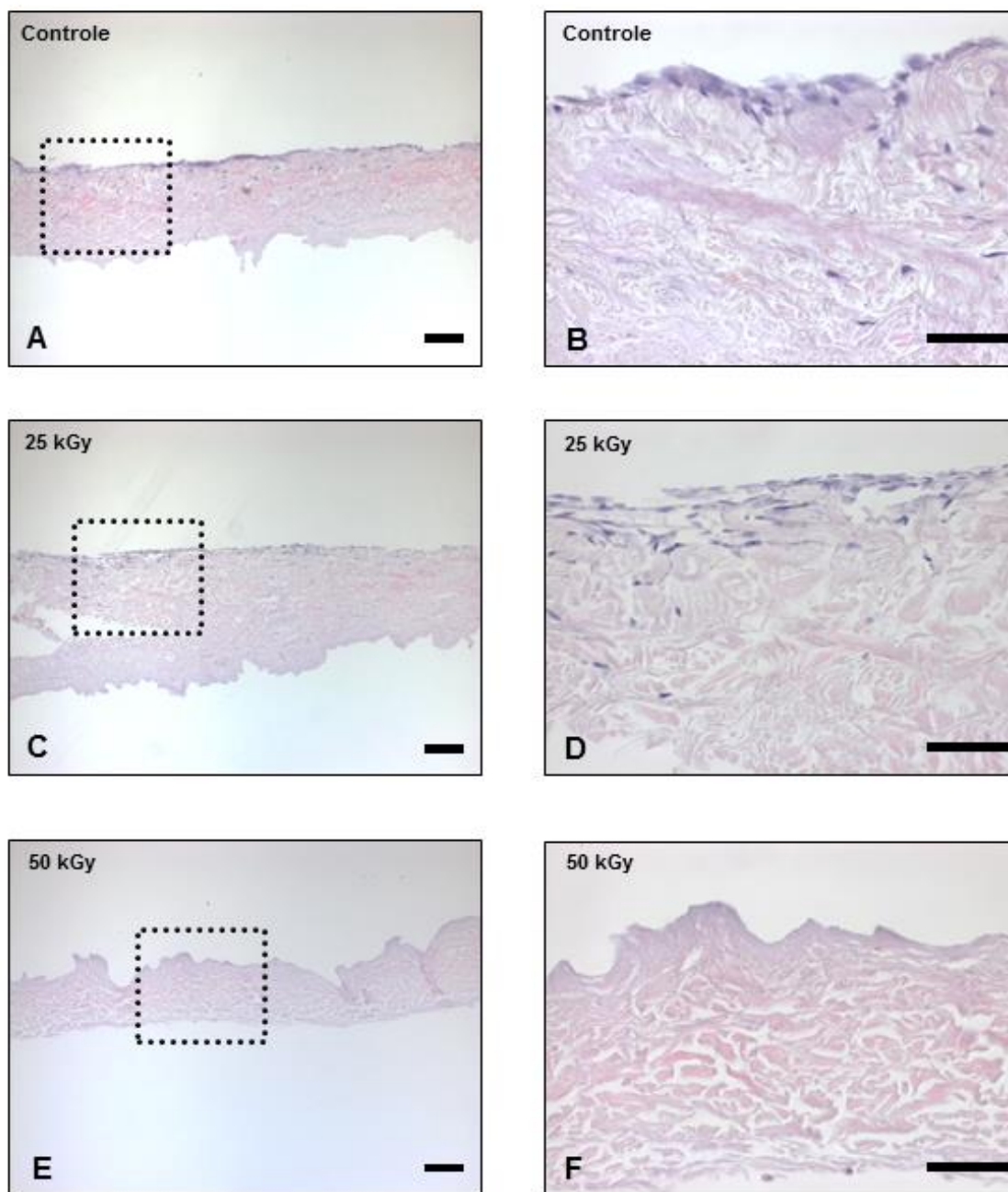


FIGURA 32 – Análise histológica do substituto dermo-epidérmico (350.000 céls/cm² de HK + ADSC) após 7 dias – sistema imerso. As imagens **A** (10x) e **B** (40x) representam o controle – derme glicerolada; **C** (10x) e **D** (40x) representam a derme irradiada a 25 kGy; **E** (10x) e **F** (40x) representam a derme irradiada a 50 kGy. Barra de escala 5 µm.

No substituo dermo-epidérmico usado como controle (derme gliceroladas e não irradiada) (**FIGURAS 32 A e B**) observa-se uma camada epitelial em sua superfície com a presença de algumas células infiltradas na trama de colágeno. Na derme previamente irradiada com 25 kGy usada para a construção do substituo dermo-epidérmico (**FIGURAS 32 C e D**) nota-se a presença de uma camada epitelial em sua superfície, com infiltrado celular em sua trama colágena e esta, apresenta uma degeneração basofílica em relação ao controle. A derme previamente irradiada com 50 kGy usada para a construção do substituo dermo-epidérmico (**FIGURAS 32 E e F**) não foi possível visualizar a formação de uma camada epitelial bem como a presença de células na trama colágena e esta, apresenta intensa degeneração basofílica.

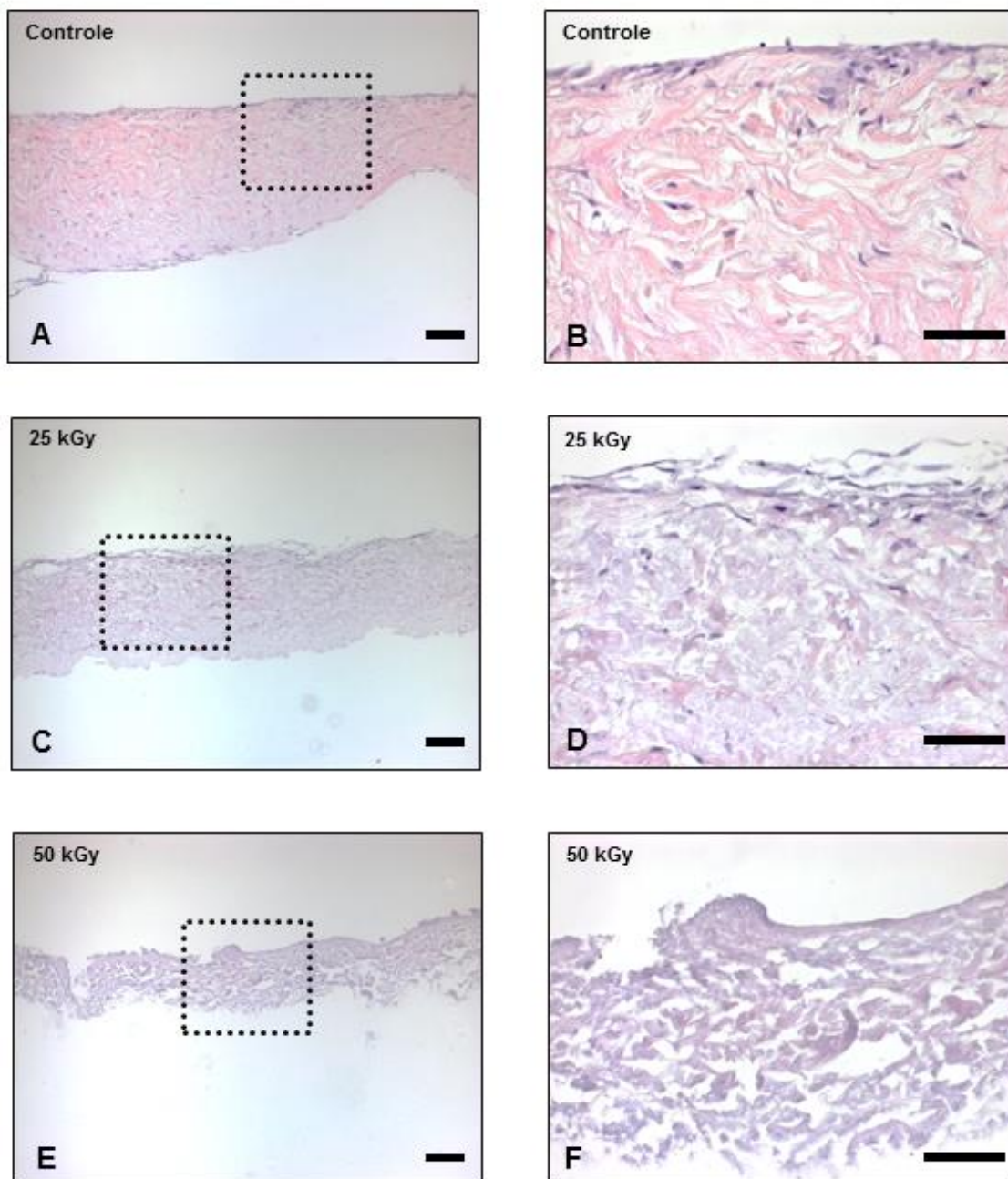


FIGURA 33 – Análise histológica do substituto dermo-epidérmico ($350.000 \text{ céls/cm}^2$ de HK + ADSC) após 21 dias – sistema ar-líquido. As imagens **A** (10x) e **B** (40x) representam o controle – derme glicerolada; **C** (10x) e **D** (40x) representam a derme irradiada a 25 kGy; **E** (10x) e **F** (40x) representam a derme irradiada a 50 kGy. Barra de escala 5 μm .

No substituo dermo-epidérmico usado como controle (derme gliceroladas e não irradiada) (**FIGURAS 33 A e B**) observa-se uma camada epitelial em sua superfície com a presença de algumas células infiltradas na trama de colágeno. Na derme previamente irradiada com 25 kGy usada para a construção do substituo dermo-epidérmico (**FIGURAS 33 C e D**) nota-se a presença de uma camada epitelial em sua superfície, com infiltrado celular em sua trama colágena e esta, apresenta uma degeneração basofílica em relação ao controle. A derme previamente irradiada com 50 kGy usada para a construção do substituo dermo-epidérmico (**FIGURAS 33 E e F**) não foi possível visualizar a formação de uma camada epitelial bem como a presença de células na trama colágena e esta, apresenta intensa degeneração basofílica.

Como a derme irradiada a 50 kGy apresentou uma intensa degeneração basofílica, e não foi possível identificar a presença de células de queratinócitos e/ou ADSC, selecionou-se as dermes irradiadas a 25 kGy como padrão. E com o intuito padronizar a quantidade de células para a construção do substituo dermo-epidérmico foram utilizadas de forma comparativa, 300.000, 400.000, 600.000 céls/cm² de queratinócitos e ADSC, cultivadas no sistema ar-líquido conforme a descrição do **item 4.3.6** e análises histológicas foram realizadas após 21 dias como mostra a **FIGURA 34**.

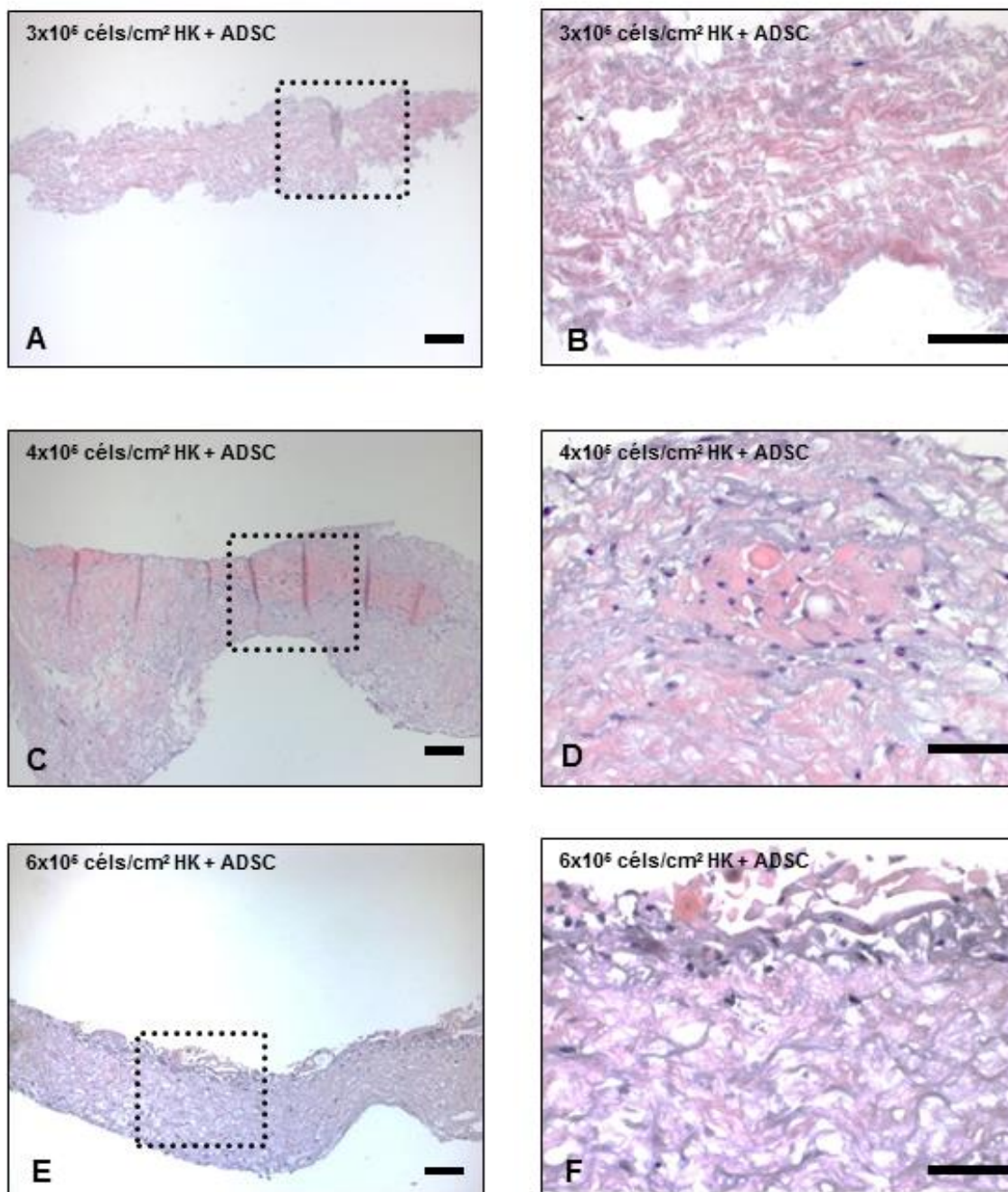


FIGURA 34 – Análise histológica do substituto dermo-epidérmico após 21 dias no sistema ar-líquido. As imagens **A** (10x) e **B** (40x) representam o substituto dermo-epidérmico com 300.000 céls/cm² de HK e ADSC; as imagens **C** (10x) e **D** (40x) representam o substituto dermo-epidérmico com 400.000 céls/cm² de HK e ADSC; as imagens **E** (10x) e **F** (40x) representam o substituto dermo-epidérmico com 600.000 céls/cm² de HK e ADSC. Barra de escala 5 μ m.

Utilizando 300.000 céls/cm² de queratinócitos e ADSC para a construção do substituto dermo-epidérmico, não foi possível observar uma camada epitelial na superfície da derme irradiada a 25 kGy e nem a presença de células na trama de colágeno desta derme. Enquanto que com 400.000 e 600.00 céls/cm² de queratinócitos e ADSC é possível notar uma camada epitelial na superfície da derme irradiada a 25 kGy bem como a presença de células na trama de colágeno.

Como o substituto dermo-epidérmico com 600.000 céls/cm² de queratinócitos e ADSC apresentou melhor organização da camada epitelial na sua superfície da derme irradiada a 25 kGy em relação ao substituto dermo-epidérmico com 400.000 céls/cm² de queratinócitos e ADSC, por esta razão, escolheu-se a quantidade de 600.000 céls/cm² como padrão para a construção do substituto dermo-epidérmico.

Para identificação dos tipos celulares em relação a sua localização na derme irradiada a 25 kGy do substituto dermo-epidérmico, procedeu-se a análise imunohistoquímica com anticorpos AE1/AE3 para marcação específica de citoqueratinas conforme a **FIGURA 35**.

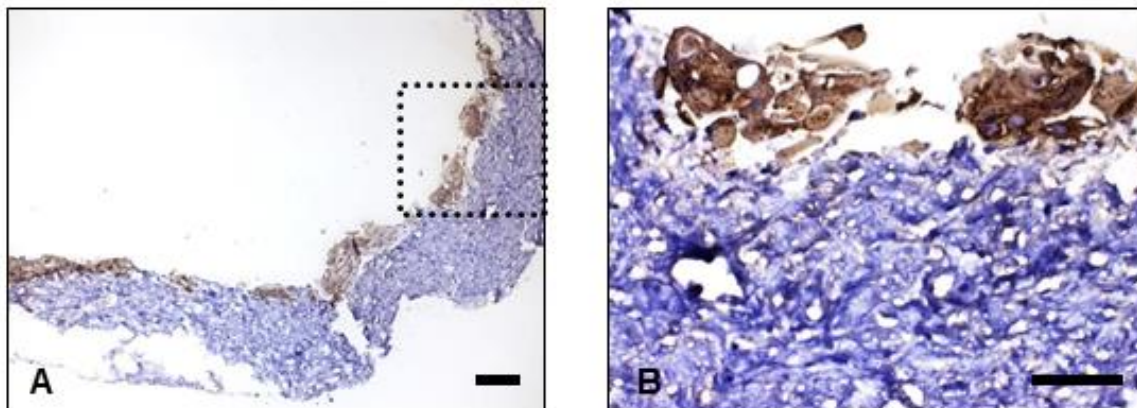





FIGURA 35 – Análise imunohistoquímica com anticorpos AE1/AE3 para marcação de citoqueratina (em marrom), em **A** (10x) e **B** (40x). Barra de escala 5 µm

Por meio da análise imunohistoquímica com os anticorpos AE1/AE3 foi possível identificar que os queratinócitos encontram-se por toda a superfície do substituto dermo-epidérmico, evidenciando a integração com a trama colágena da derme irradiada a 25 kGy.

5.4 ESTUDO *IN VIVO* ENTRE DIFERENTES FORMAS DE INTERVENÇÃO PARA RESOLUÇÃO DA RADIONECROSE

Com a dose definida de 86,8 Gy os animais foram irradiados e após 14 dias, de acordo com o padrão de radionecrose encontrado (**TABELA 11**) foi dada sequência ao experimento *in vivo* (**FIGURA 36**) onde estes animais foram posteriormente divididos segundo o desenho do experimento (**item 4.5 TABELA 8**).

TABELA 11 – Aspecto clínico do padrão de radionecroses após 14 dias da irradiação dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) a 86,8 Gy

Padrão de Radionecrose	Análise Clínica	Aspecto Clínico da Radionecrose
A	Radionecrose com área definida, circular e com aproximadamente 2 cm x 2 cm	 A photograph showing a circular, well-defined area of radionecrosis on the skin of a mouse. The area is yellowish and appears to be a necrotic ulcer.
B	Radionecrose sem área definida e irregular	 A photograph showing an irregular, non-circular area of radionecrosis on the skin of a mouse. The area is dark brown and appears to be a necrotic ulcer.
C	Radiodermite (lesão ulcerada úmida)	 A photograph showing a radiodermatitis lesion on the skin of a mouse. The lesion is circular and appears to be a wet, ulcerated area with a yellowish center and a reddish border.

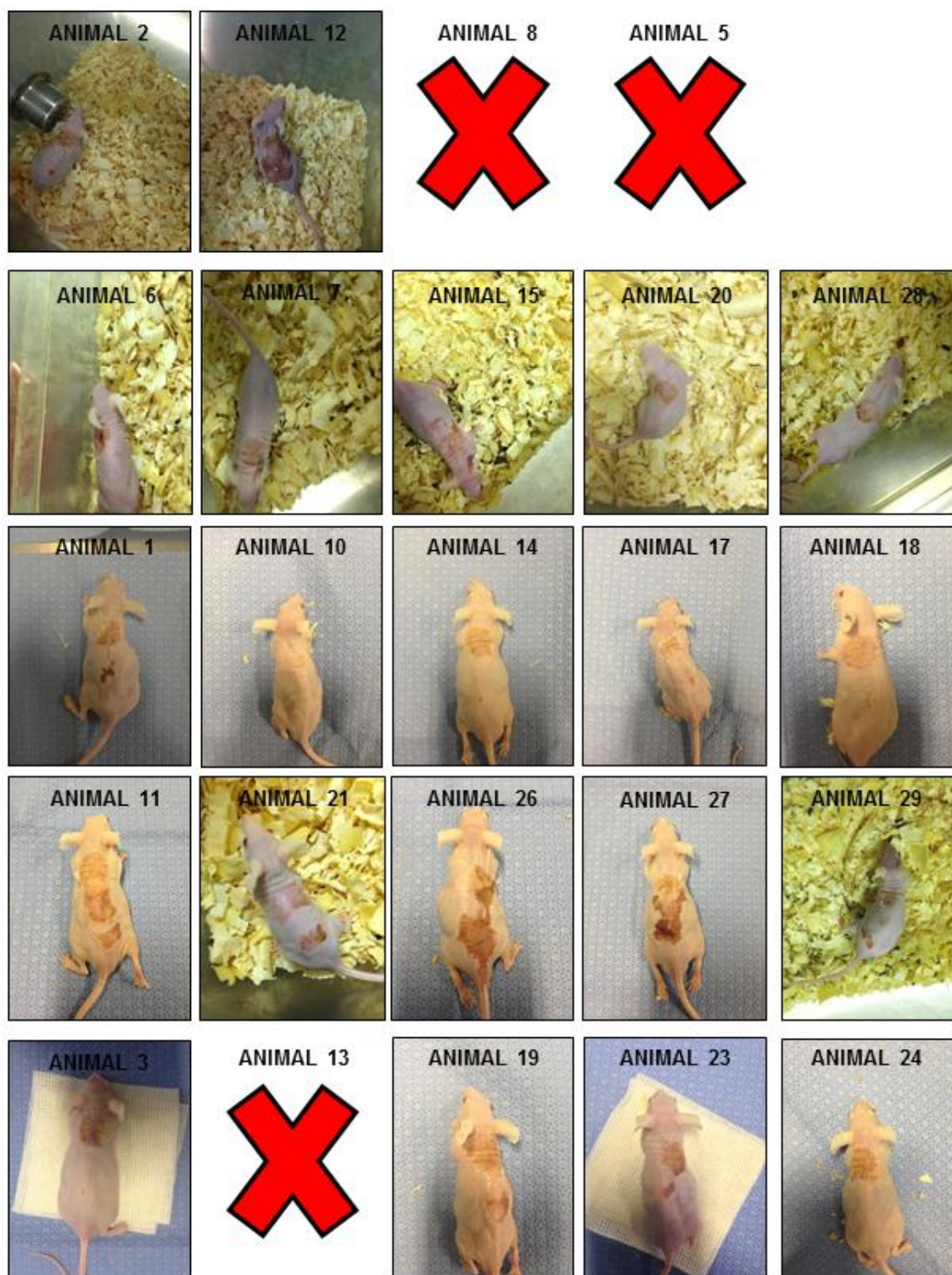


FIGURA 36 – Acompanhamento fotográfico dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) no 14º dia, onde caracterizou-se a radioneecrose, conforme a divisão dos grupos citados na **TABELA 8** (item 4.5). Os animais 13, 8 e 5 morreram antes de completar os 14 dias após irradiação.

No grupo 4 foi enxertado a derme acelularizada e os animais do grupo 5 foram enxertados com o substituto dermo-epidérmico segundo a padronização do **item 4.3.6**.

Conforme a divisão descrita na **TABELA 8 (item 4.5)** foram feitas as dissecações das peles dos animais, 48 horas após o surgimento da radionecrose (**FIGURA 37**), para análise histológica (**FIGURA 38**) assim como nos animais após 7 dias do surgimento da radionecrose (**FIGURA 39 e 40**).

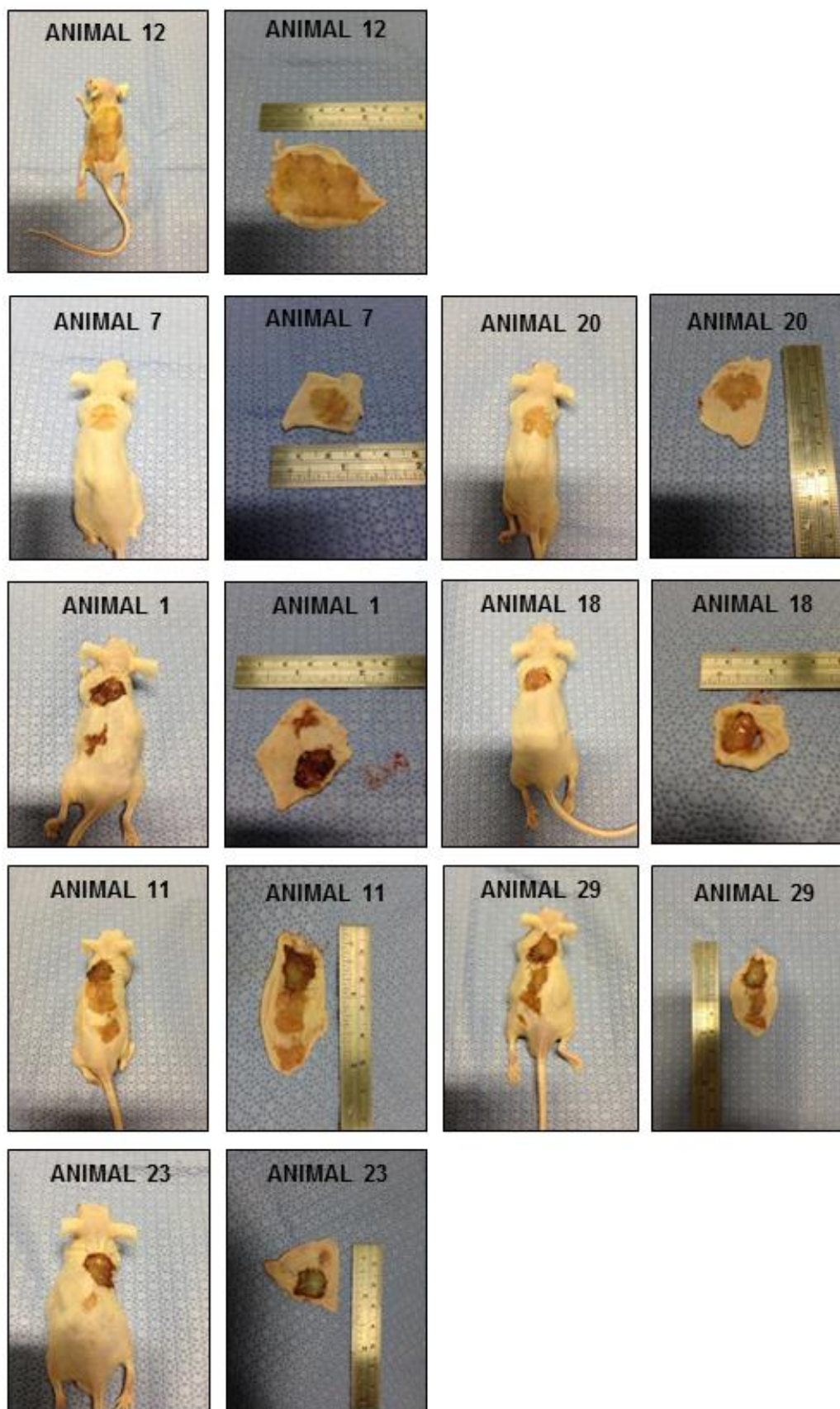


FIGURA 37 – Acompanhamento fotográfico da dissecação da pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) após 48 horas da caracterização da radionecrose nos grupos de 1 a 5.

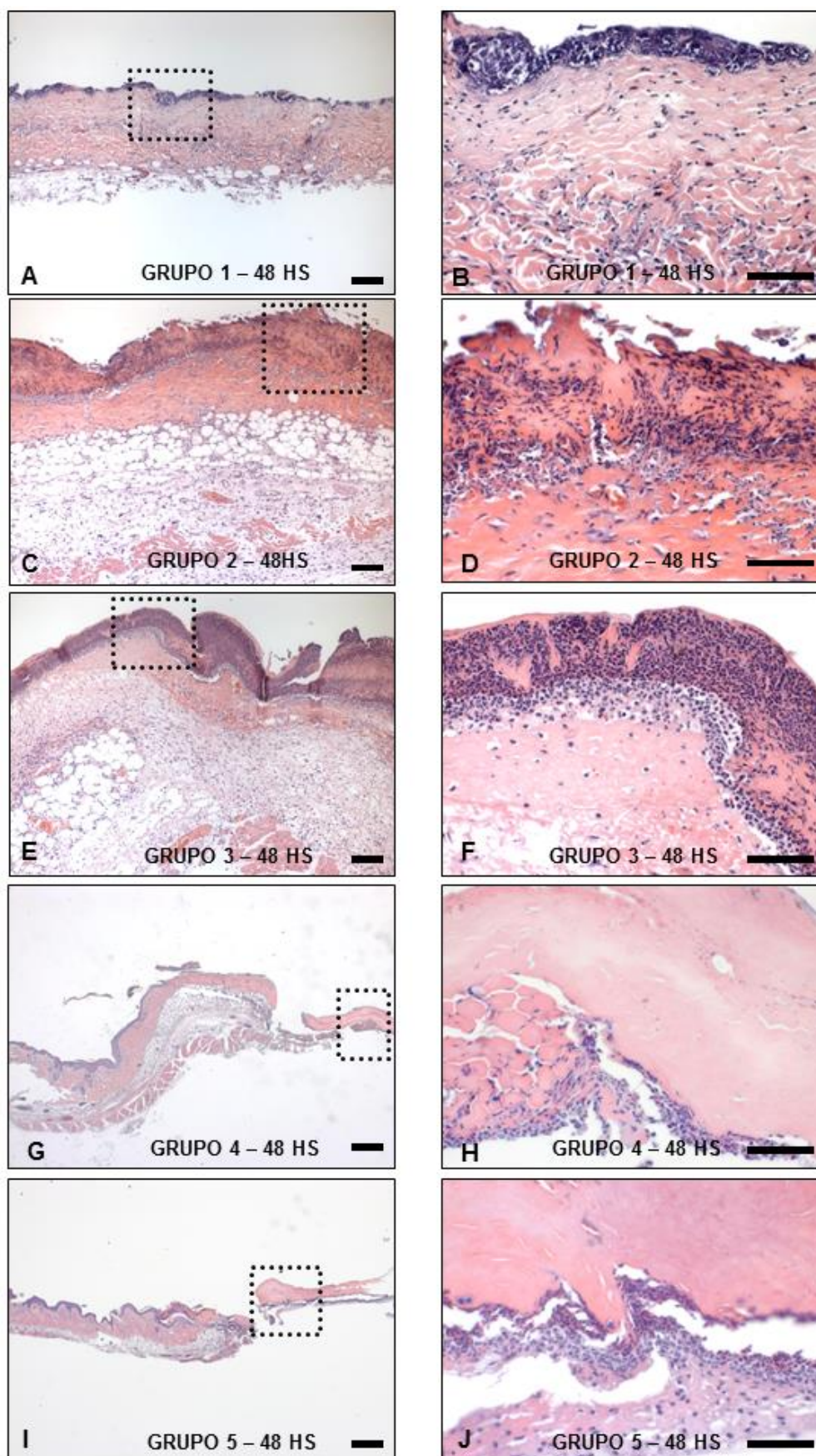


FIGURA 38 – Análises histológicas dos grupos 1 a 5, 48 horas após a intervenção cirúrgica da radionecrose. (A, C, E, G, I – 10x); (B, D, F, H, J – 40x). Barra de escala 5 μ m.

Nas análises histológicas pela técnica HE no **grupo 1** (CONTROLE 1 – Radionecrose), observa-se no corte de menor aumento (**FIGURA 38 – A**) um padrão ulcerado, com epitélio em sua periferia, além de uma pseudomembrana fibrinosa recobrimdo esta ulcera. No corte de maior aumento (**FIGURA 38 – B**), é possível observar na superfície da ulcera, células inflamatórias mononucleares, principalmente neutrófilos, assim como na profundidade do tecido conjuntivo, que apresenta além dos neutrófilos, plasmócitos. Esta mesma situação é observada no **grupo 2** (CONTROLE 2 – Radiodermite), tanto nos cortes de menor como de maior aumento (**FIGURAS 38 – C e D**).

No **grupo 3** (INTERVENÇÃO 1 – Desbridamento e Acompanhamento) há semelhanças nas análises histológicas pela técnica HE com o grupo 1 e 2 (**FIGURA 38 – E**), entretanto é possível observar áreas hemorrágicas recobrimdo a ulcera além do infiltrado inflamatório mononuclear (**FIGURA 38 – F**).

Nos processos intervencionistas no **grupo 4** (INTERVENÇÃO 2 – Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada) por meio das análises histológicas pela técnica HE, observa-se em menor aumento (**FIGURA 38 – G**) a intersecção do tecido normal com o a derme acelularizada e em maior aumento (**FIGURA 40 – H**), as células inflamatórias mononucleares do hospedeiro intimamente ligadas ao colágeno da derme acelularizada, entretanto não se observa células na trama de colágeno da derme, utilizada como tratamento oclusivo.

No **grupo 5** (INTERVENÇÃO 3 - Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico) é possível observar semelhança nas análises histológicas pela técnica HE em menor aumento (**FIGURA 38 – I**) com o grupo 4, porem em maior

aumento (**FIGURA 38 – J**), nota-se que algumas células do hospedeiro estão presentes na trama de colágeno do substituto dermo-epidérmico

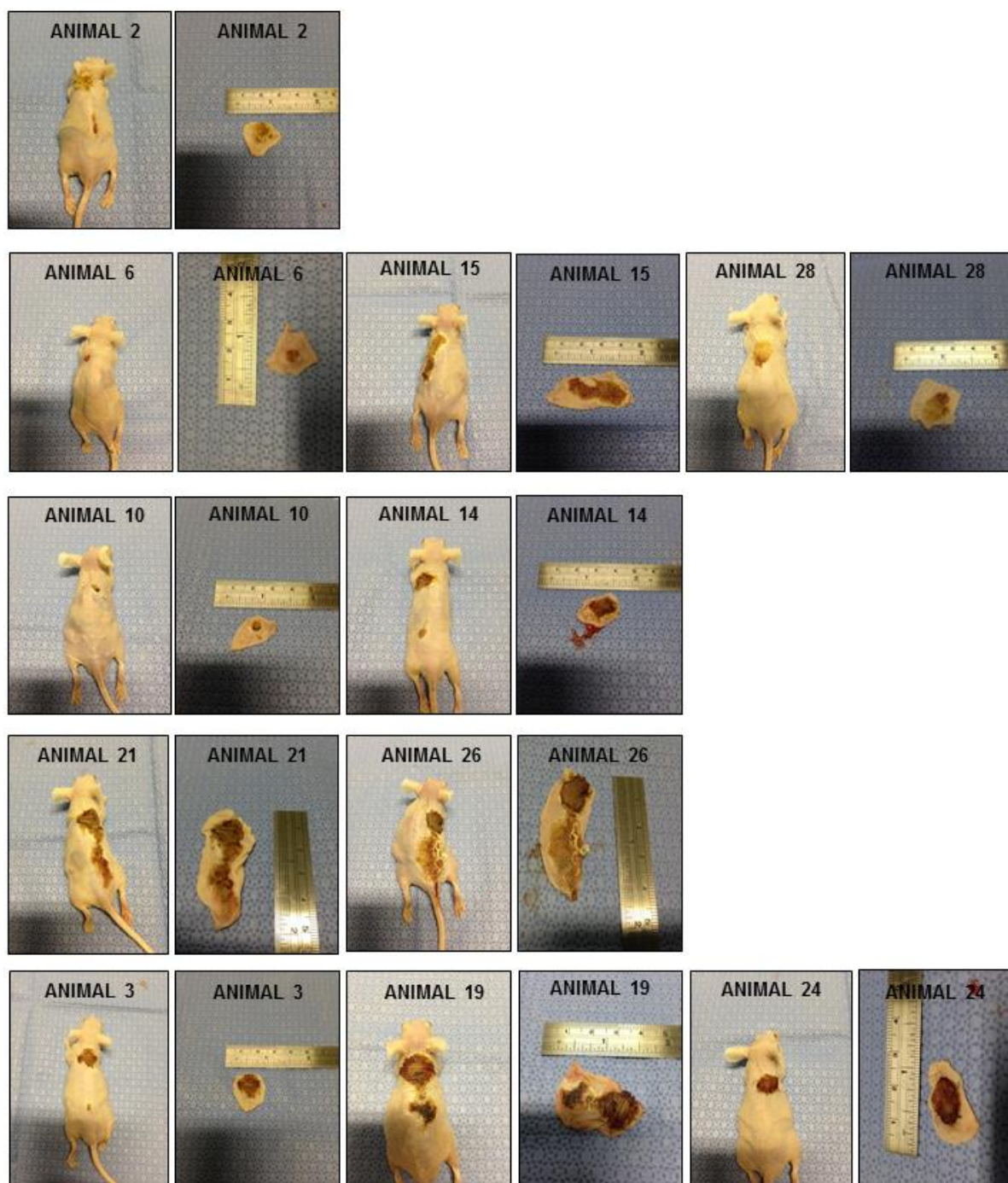


FIGURA 39 – Acompanhamento fotográfico da dissecação da pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu) após 7 dias da caracterização da radionecrose nos grupos de 1 a 5.

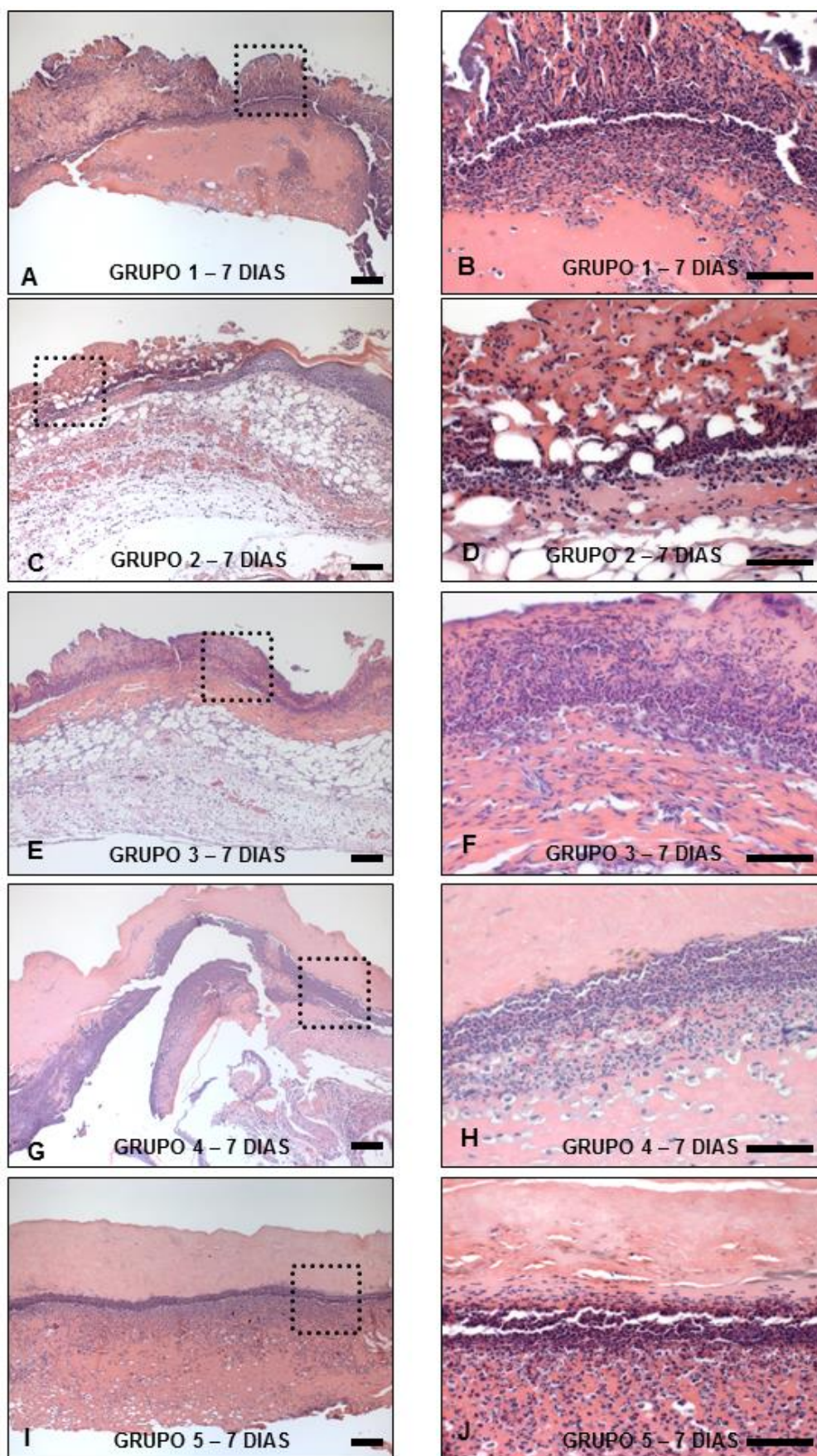


FIGURA 40 – Análises histológicas dos grupos 1 a 5, 7 dias após a intervenção cirúrgica da radionecrose. (A, C, E, G, I – 10x); (B, D, F, H, J – 40x). Barra de escala 5 μ m.

Nas análises histológicas pela técnica HE no **grupo 1** (CONTROLE 1 – Radionecrose), observa-se no corte de menor aumento (**FIGURA 40 – A**) um padrão ulcerado, com epitélio em sua periferia, além de uma pseudomembrana fibrinosa recobrimdo esta ulcera. No corte de maior aumento (**FIGURA 40 – B**), é possível observar na superfície da ulcera, células inflamatórias mononucleares, principalmente neutrófilos, assim como na profundidade do tecido conjuntivo, que apresenta além dos neutrófilos, plasmócitos. Esta mesma situação é observada no **grupo 2** (CONTROLE 2 – Radiodermite), tanto nos cortes de menor como de maior aumento (**FIGURAS 40 – C e D**).

No **grupo 3** (INTERVENÇÃO 1 – Desbridamento e Acompanhamento) há semelhanças nas análises histológicas pela técnica HE com o grupo 1 e 2 (**FIGURA 40 – E**), entretanto é possível observar áreas hemorrágicas recobrimdo a ulcera além do infiltrado inflamatório mononuclear (**FIGURA 40 – F**).

Nos processos intervencionistas no **grupo 4** (INTERVENÇÃO 2 – Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada) por meio das análises histológicas pela técnica HE, observa-se em menor aumento (**FIGURA 40 – G**) a intersecção do tecido normal com o a derme acelularizada e em maior aumento (**FIGURA 40 – H**), as células inflamatórias mononucleares do hospedeiro intimamente ligadas ao colágeno da derme acelularizada, entretanto não se observa células na trama de colágeno da derme, utilizada como tratamento oclusivo.

No **grupo 5** (INTERVENÇÃO 3 - Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico) é possível observar semelhança nas análises histológicas pela técnica HE em menor aumento (**FIGURA 40 – I**) com o grupo 4, porem em maior aumento (**FIGURA 40 – J**), nota-se que algumas células do hospedeiro estão

penetrando na trama de colágeno do substituto dermo-epidérmico, inclusive com algumas células inflamatórias mononucleares logo abaixo do substituto dermo-epidérmico.

Durante a observação macroscópica dos camundongos *Nude* (Nu/Nu), alguns achados foram encontrados e estão descritos na **FIGURA 41**.

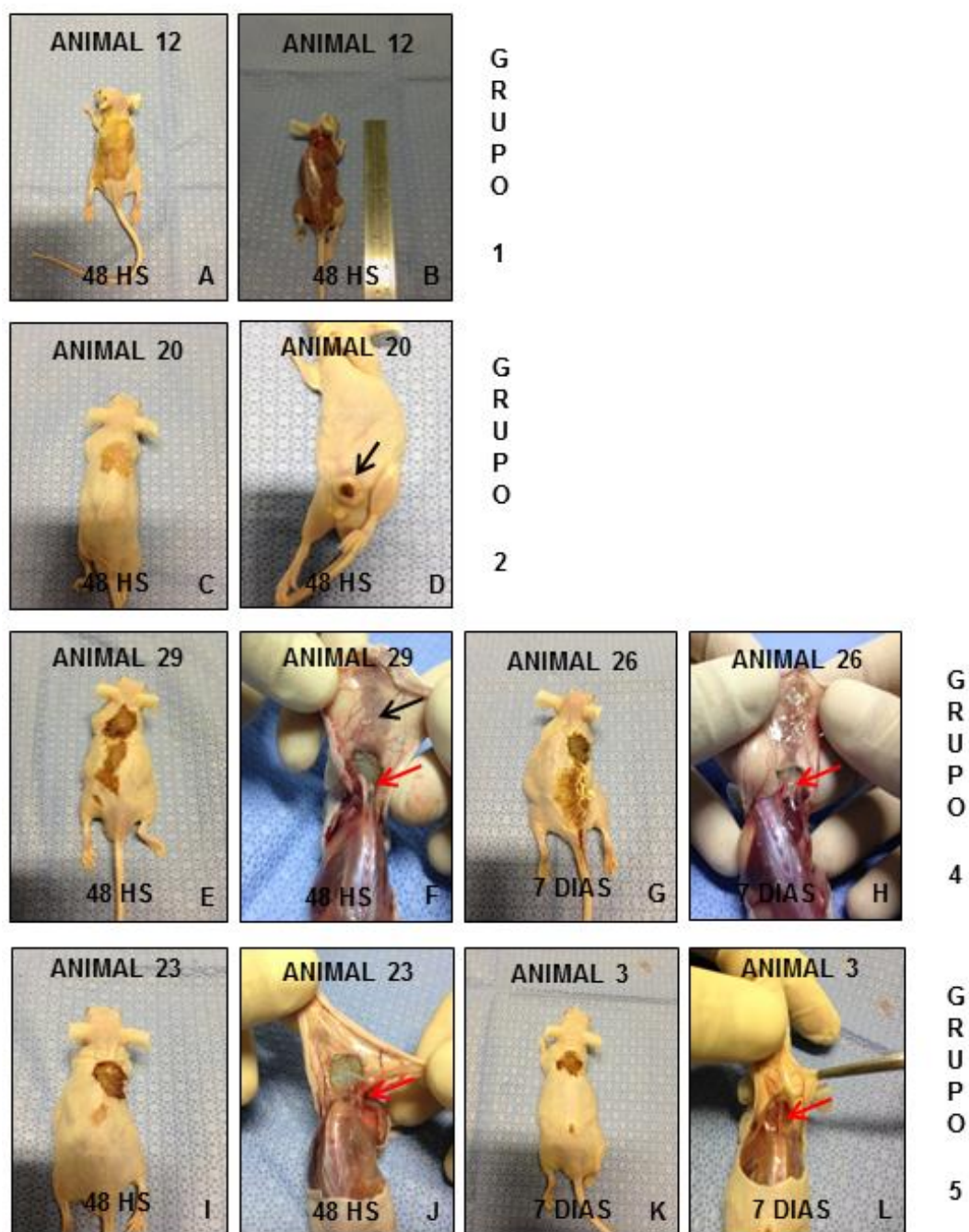


FIGURA 41 – Análises macroscópicas dos camundongos *Nude* (Nu/Nu) dos grupos 1, 2, 4 e 5.

O animal 12 (CONTROLE 1 – Radionecrose) foi eutanasiado após 48 horas do surgimento da radionecrose, onde é possível notar a extensa lesão que acometeu a totalidade de seu dorso (**FIGURA 41 – A**). Este animal, assim como os outros, recebeu a mesma dose de 86,8 Gy, sob as mesmas condições. Nota-se em (**FIGURA 41 – B**), após a dissecação, que mesmo com a totalidade da pele acometida pela radionecrose, os órgãos subjacentes não tiveram qualquer dano visível macroscopicamente.

O animal 20 (CONTROLE 2 – Radiodermite) foi eutanasiado também após 48 horas do surgimento da radionecrose e em uma análise clínica de seu corpo, em (**FIGURA 41 – D → seta preta**) é evidenciado uma lesão ulcerada, de formato circular com bordos definidos, com recobrimento por um tecido necrótico, e edemaciado, localizada na porção ventral, próximo a vagina.

O animal 29 (INTERVENÇÃO 2 – Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada) foi eutanasiado 48 horas após a intervenção requerida de seu grupo e onde em (**FIGURA 41 – F**) observa-se que, após a dissecação parcial da pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu), a radionecrose não parece atingir os órgãos subjacentes ficando restrita a pele (→ seta **preta**), e onde foi enxertada a derme acelularizada, há uma espécie de tecido conectivo unindo-o ao dorso do animal (→ seta **vermelha**). Este tecido conectivo fica mais evidente no animal 26, que foi eutanasiado após 7 dias após a intervenção requerida de seu grupo (**FIGURA 41 – H → seta vermelha**).

O mesmo ocorre com os animais do Grupo 5 (INTERVENÇÃO 3 - Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico) onde o camundongo *Nude* (Nu/Nu) número 23 foi eutanasiado 48 horas após a intervenção requerida de

seu grupo, porem observa-se uma maior adesão do substituto dermo-epidérmico por meio deste tecido conectivo (**FIGURA 41 – J → seta vermelha**) em relação aos animais do grupo 4. E após 7 dias da intervenção requerida de seu grupo, no animal 3 (**FIGURA 41 – L → seta vermelha**) observa-se de forma mais intensa esta conectividade entre o substituto dermo-epidérmico ao dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu).

5.5 CONSTRUÇÃO DO IRRADIADOR COM FONTES DE COBALTO-60

A construção do irradiador apresenta propriedade intelectual depositada no INPI sob os números **BR 10 2012 026**, **BR 10 2012 027**, **BR 10 2012 028** e ainda outras 2 em processo de deposito.

Nas **FIGURAS 42 a 45** pode-se observar o irradiador construído, acondicionado sobre o carrinho de transporte e o sistema de suporte do animal.

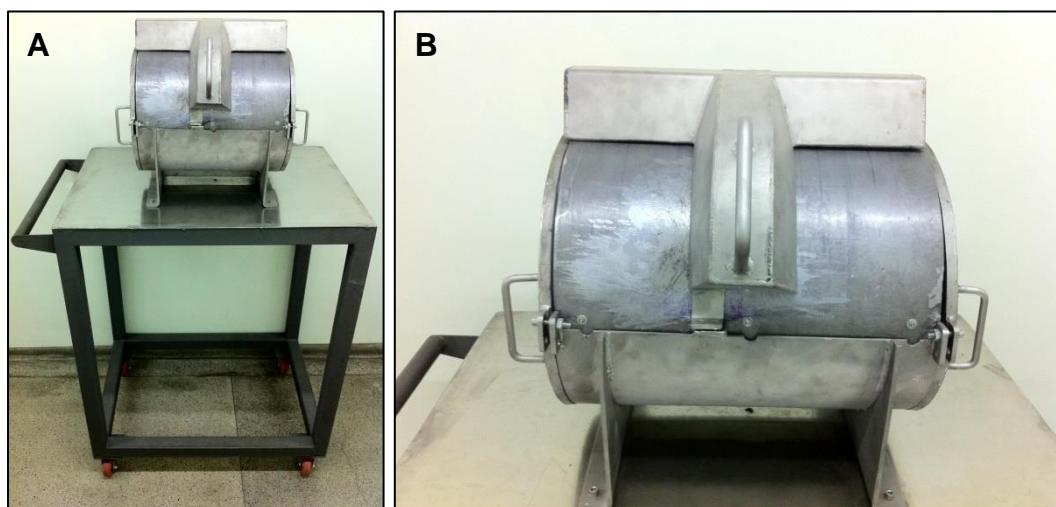


FIGURA 42 – Vista frontal do irradiador com fontes de Cobalto-60 (patente pendente sob o numero - BR 10 2012 026), apoiado sobre o carrinho de transporte (**A**) e em uma vista mais aproximada evidenciando a proteção adicional (**B**) sobre o sistema porta-fontes (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 027)

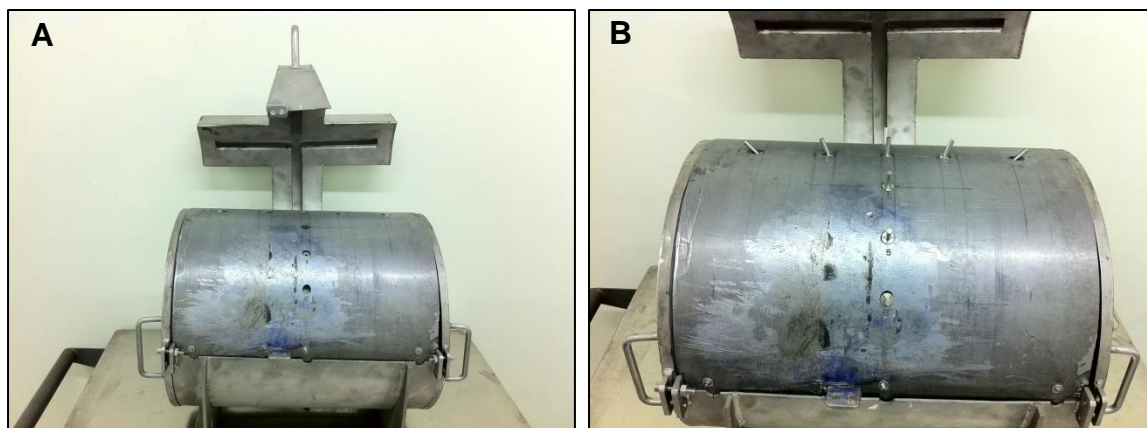


FIGURA 43 – Vista frontal do irradiador com fontes de cobalto-60 (patente pendente sob o numero - BR 10 2012 026) com a proteção de chumbo adicional erguida (A) e em uma vista mais aproximada com o sistema porta-fontes (B) em posição (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 027)

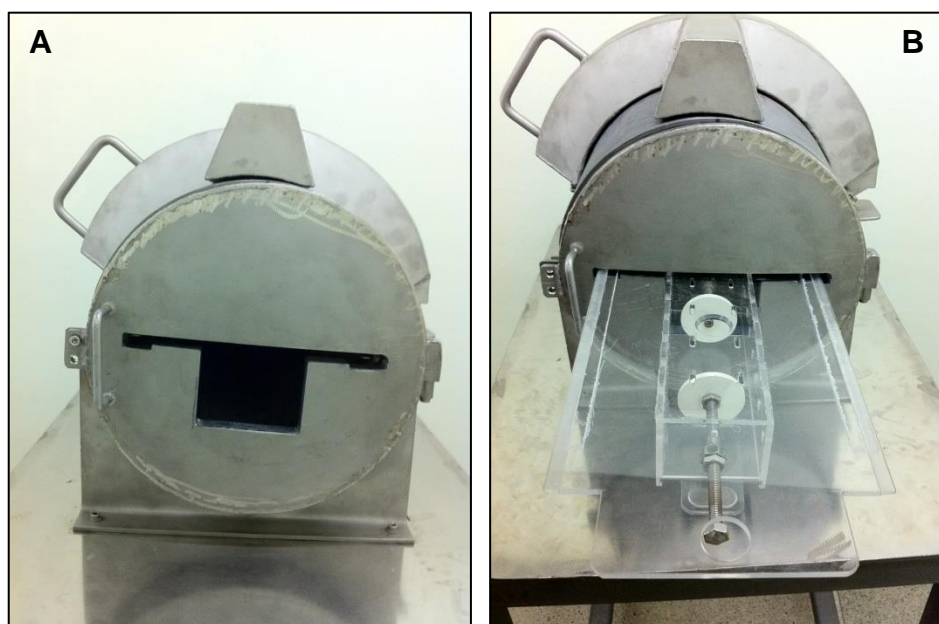


FIGURA 44 – Uma visão do recorte (A) em um dos tampos do irradiador de Cobalto-60 (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 026) e neste recorte o sistema de suporte do animal (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 028) inserido (B).

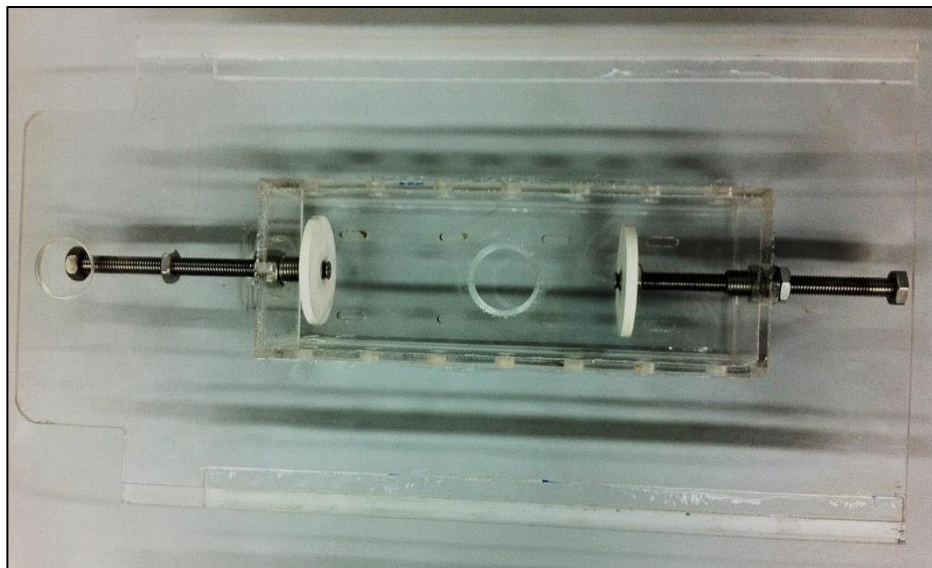


FIGURA 45 – Sistema de suporte do animal (patente pendente sob o numero – BR 10 2012 028).

5.6 MANIPULAÇÃO DO COBALTO-60

Um fio de 2 mm por 1,016 mm de diâmetro de Cobalto-59, com grau de pureza de 99,95 % foi cortado em discos de 1 mm de espessura e foram ativados a Cobalto-60, por 18 horas a um fluxo de $2,7 \times 10^{13}$ n/cm³.s no Reator IEA-R1 do IPEN. As fontes foram acondicionadas nos locais pré-determinados do irradiador, nas instalações do Laboratório de Produção de Fontes para Radioterapia (LPFP). Esta etapa foi coordenada e executada pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Zeituni (CTR-IPEN), devidamente autorizado e com acompanhamento do serviço de Proteção Radiológica (IPEN/CNEN-SP).

O posicionamento do Cobalto-60, no sistema porta-fontes (**patente pendente sob o numero – BR 10 2012 027**), foi preparado por de trás de biombo de vidro plumbífero para proteção do mediastino e com luvas de chumbo para proteção das mãos do operador. Na necessidade de que o procedimento fosse rápido e eficaz,

evitando assim o menor tempo possível de contato com a fonte de Cobalto-60, foi desenvolvido um bloco de suporte (**patente pendente sob revisão do INPI**) onde o sistema porta-fontes foi acondicionado. Por cima do sistema, um dispositivo auxiliar para armazenamento de fontes emitementes de radiação (**patente pendente sob revisão do INPI**) foi acoplado para o deslizamento da fonte de Cobalto-60 para o interior do sistema porta-fontes.

6 DISCUSSÃO

Os tratamentos das neoplasias consistem em uso isolado ou em conjunto da cirurgia, quimioterapia e radioterapia [47]. Os procedimentos radioterápicos devem ser planejados de maneira a se maximizar os danos às células neoplásicas e se minimizar os efeitos indesejáveis que a radiação pode causar às células normais [50]. Os protocolos de irradiação de tumores são direcionados de acordo com sua radiosensibilidade. O fracionamento da dose busca danificar o máximo de células malignas em sua fase sensível do ciclo celular em relação à área sadia [85]. Na radioterapia de cabeça e pescoço, por exemplo, as doses de radiação variam de 40 Gy a 70 Gy, sendo, habitualmente, fracionada em doses diárias de aproximadamente 2 Gy, em um período de quatro a sete semanas. Entretanto, quando se necessita usar uma alta dose de radiação em grandes áreas, como a cavidade bucal, como exemplo, efeitos secundários indesejáveis inerentes ao tratamento como a radiodermite e a radionecrose podem ser observados [56]. Ainda, a combinação de quimioterapia com radioterapia aumenta o efeito colateral agudo do perfil de tratamento [86] e 90% dos pacientes submetidos à radioterapia apresentam lesões de pele [42]. Sendo assim, mesmo com o benefício oferecido com o tratamento antineoplásico, os efeitos colaterais ainda são um grande desafio a ser vencido [87].

Dentre estes efeitos colaterais destacam-se as radionecroses. Elas se assemelham com queimaduras térmicas, porém a conduta clínica difere-se principalmente em relação à fisiopatologia da lesão. A radiação induz à lesão dos queratinócitos e danos ao DNA das células e a reparação da lesão se dá pela via de

ativação do p53 e a liberação simultânea de citocinas inflamatórias e como consequência a geração de radicais livres [62]

Modelos de estudos da radionecrose ainda são escassos, principalmente no que tange a mimetização dos efeitos agudos e crônicos [88]. Os limites de dose de radiação mostram uma grande variação. Em média, os limites de dose indicados a partir da bibliografia são: 2 Gy para eritema transitório, 6 Gy para eritema principal, 10 Gy para descamação seca, 15 Gy para descamação úmida e eritema crônico e 18 Gy para necrose da pele e ulceração [89], sendo assim um mapa da taxa de dose do equipamento a ser utilizado, se faz necessário para estabelecimento da dose absorvida pelo animal. Neste sentido, inicialmente uma curva de sensibilidade foi realizada (**FIGURAS 24**) no irradiador panorâmico com o intuito de caracterizar as diferentes doses em relação a distancia e ao tempo, o que nos possibilitou mapear este equipamento (**FIGURA 25**).

Em conjunto ao mapa de dose, foi criado um suporte para camundongo (**patente em processo de análise do INPI – FIGURA 26**) e estabelecida a geometria de posicionamento do mesmo (**FIGURA 27**). Com base em nossa dosimetria (**TABELA 9**) foram testadas três diferentes doses, em exposição única, nos camundongos *Nude* (Nu/Nu) (43,4 Gy – **FIGURA 29**; 86,8 Gy – **FIGURA 31**; 108 Gy – **FIGURA 30**). Verificou-se que a dose de 43,4 Gy não foi suficiente para reproduzir a radionecrose mesmo após 20 dias (**FIGURA 29**) e quando a dose aplicada foi de 108 Gy infelizmente produziram proporções inviáveis de radiodermite e radionecrose reduzindo severamente a qualidade de vida do animal onde a decisão foi a eutanásia (**FIGURA 30**). A partir de 86,8 Gy foi possível reproduzir a radionecrose (**FIGURA 31**).

O efeito da radiação e a cicatrização de feridas já foi avaliado em muitas ocasiões, incluindo vários aspectos do mecanismo reparador em relação à cura tardia, tais como a dose da irradiação e o grau de reparação tecidual. No entanto existem poucas investigações em relação à dose de irradiação e retardamento da cicatrização da ferida produzida, e também o tempo para este reparo [90]. Apesar de se utilizar um modelo animal, e diferentes condições, em comparação com um tratamento de radioterapia, observou-se que com uma única dose de 86,8 Gy, houve o surgimento da radionecrose a partir do sétimo dia, com grau máximo após o decimo quarto dia e remissão total da ferida após o trigésimo quinto dia (**FIGURA 31**).

Em paralelo ao estabelecimento do modelo animal de radionecrose, foi padronizada a construção do substituto dermo-epidérmico povoado por queratinócitos humanos e ADSC. Para se obter o substituto dermo-epidérmico com capacidade de uso *in vivo* iniciamos sua construção, com a reidratação das peles gliceroladas, desepidermização e preservadas novamente em glicerol 98% por 21 dias, e posteriormente parte destas, foram irradiadas a 25 ou 50 kGy enquanto que a outra parte mantiveram-se gliceroladas (controle). Este procedimento foi realizado, baseado na dificuldade encontrada em trabalhos anteriores [67] em fazer a desepidermização quando a pele já havia sido irradiada e assim comprometendo a matriz de colágeno, pela raspagem para separação dermo-epidérmica.

Com um numero fixo de células (175.000 de HK + 175.000 de ADSC) sobre estas dermes humanas gliceroladas e irradiadas a 25 kGy e 50 kGy, cultivadas no sistema ar-liquido, foram feitas análises histológicas (**FIGURAS 32 e 33**) onde foi possível observar que em termos histológicos, houve uma degeneração basofílica da derme quando estas, foram irradiadas tanto a 25 quanto 50 kGy em relação ao

controle, porém esta degeneração foi maior nas dermes irradiadas a 50 kGy. E ainda, foi possível notar que quanto maior a dose, menos células se aderiram ao colágeno da derme. Dermis acelularizada para tratamento oclusivo de feridas cirúrgicas de camundongos *Nude* (Nu/Nu) já foi demonstrado [67] e a inferência possível em nossos resultados, baseada na literatura [91], é de que a degeneração basofílica mais acentuada da matriz de colágeno irradiada a 50 kGy, afrouxa em demasia sua estrutura terciária não servindo assim de arcabouço para adesão celular.

Com a dose de 25 kGy definida, foram testadas quantidades diferentes de células (300.000, 400.000 e 600.000 de HK + ADSC) para padronização *in vitro* do substituto dermo-epidérmico por meio de análises histológicas pela técnica de HE (**FIGURA 34**). Foi observado que com o número de células abaixo de 350.000 de HK + ADSC não foi possível notar a presença de células na derme, já com 400.000 células esta situação é contornada e com 600.000 células temos a situação mais adequada. Com auxílio da imunohistoquímica com anticorpos AE1/AE3 para marcação de citoqueratinas (**FIGURA 35**), aplicado no substituto dermo-epidérmico com 600.000 células de HK + ADSC, notou-se que os queratinócitos formam uma camada mais superficial, enquanto algumas células não marcadas encontram-se na matriz de colágeno, que supostamente devem ser as ADSC.

Matrizes dermo-epidérmicas povoadas por queratinócitos e ADSC já foram estudadas *in vitro* [17], porém ainda não foram descritas na literatura para o tratamento de radionecroses, apesar de estudos indicarem que as ADSC em injeções, podem se diferenciar em queratinócitos [28] e a mistura de fibroblastos com ADSC em uma estrutura tridimensional *in vitro* pode formar uma camada epidermal com marcadores de queratina 10 [18].

Com a dose necessária para o surgimento da radionecrose estabelecida e o substituto dermo-epidérmico *in vitro* padronizado, iniciou-se os estudos das diferentes formas de intervenção para resolução da radionecrose. Interessante que mesmo com a dose de 86,8 Gy definida (**FIGURA 31**) e o padrão de radiodermite e radionecrose alcançado, enfrentamos situações adversas em relação aos camundongos. Ulceras de tamanhos e proporções variadas no comparativo intragrupos e intergrupos (**FIGURA 36**).

No **grupo 1** (CONTROLE 1 – Radionecrose) dos quatro animais indicados, dois morreram antes dos 14 dias até o surgimento da radionecrose, e os dois sobreviventes apresentaram padrões de radionecroses bastante distinto, enquanto que o animal 2 apresentou a radionecrose preconizada, além de um ponto focal de pequena proporção, próximo a calda, o animal 12 apresentou extensa lesão por todo o seu dorso.

No **grupo 2** (CONTROLE 2 – Radiodermite) tivemos apenas 1 único animal que apresentou um padrão diferente do preconizado (animal 15) enquanto que os animais restantes foi possível observar a lesão ulcerada após 14 dias, mas as lesões macroscopicamente não evoluíram para uma radionecrose característica, sendo assim os animais foram classificados apenas como radiodermite, pois as lesões se apresentavam úmidas, e sem o tecido necrótico recobrimo a ulcera.

No **grupo 3** (INTERVENÇÃO 1 – Desbridamento e Acompanhamento) os animais 1 e 17 além de apresentarem o padrão de radionecrose preconizado, uma outra pequena área de radionecrose surgiu no dorso do animal perto de sua calda. Enquanto que o animal 10 apresentou uma radionecrose de menor proporção

No **grupo 4** (INTERVENÇÃO 2 – Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada) obtive-se as respostas mais variadas em relação a radionecrose. Todos os animais apresentaram lesões extensas no dorso, únicas em tamanho e proporção, ou segmentadas, mas com um tamanho exagerado em relação ao preconizado. Nos animais que apresentaram lesões únicas extensas como o 11 e 29, o desbridamento foi realizado somente do tamanho do substituto dermo-epidérmico (2 cm x 2 cm), enquanto que o restante da lesão serviu de controle, ou seja, estes animais tiveram a intervenção realizada e ao mesmo tempo, houve o acompanhamento da evolução da radionecrose.

Já no **grupo 5** (INTERVENÇÃO 3 – Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico) apenas os animais 3 e 24 apresentaram o padrão de radionecrose preconizado, enquanto que o animal 13 morreu antes mesmo do desbridamento e os animais 19 e 23 apresentaram além da radionecrose preconizada, uma outra área de radionecrose sendo que no animal 19, esta área com grande proporção.

A comparação intergrupos se faz necessária, pois os animais foram divididos em grupos randomicamente conforme o padrão apresentado de radionecrose. Outros estudos utilizando irradiador estereotáxico (radiação guiada por Raios-X) [89] demonstraram que doses de 30,4 Gy causaram radiodermatites leves, que tiveram a capacidade de se resolver em menos de 20 dias pós-irradiação, sem intervenção. Nossos resultados, mesmo utilizando outra forma de radiação, mostraram que com doses inferiores a 86,8 Gy nenhuma alteração após 20 dias foi notada, o que exclui a dose como uma variante no surgimento das radionecroses nos camundongos. E também como o experimento foi realizado em um único dia, sob as mesmas

condições de temperatura e pressão, a taxa de decaimento do Cobalto-60 é matematicamente próxima de zero.

A dosimetria realizada no irradiador panorâmico antes do início do experimento (**item 5.1.5**), assegurou que o posicionamento dos arranjos onde os camundongos foram irradiados recebesse uma isodose, com um retroespalhamento desprezível. Este fato nos leva a inferir que a variação do padrão de radionecrose está relacionada diretamente com o metabolismo e fisiologia de cada animal, pois todos possuíam tamanhos e peso similares, mesma idade e receberam a mesma alimentação e acondicionamento em gaiolas estéreis. Este fato pode ser também observado em seres humanos, pois para tratar tumores semelhantes, utilizando-se a mesma dose em uma mesma região, algumas pessoas desenvolvem radiodermite e/ou radionecrose durante ou anos após a aplicação [6,92].

Do ponto de vista histológico a comparação intragrupos entre 48 horas e 7 dias, revelou que no período de 48 horas (**FIGURA 38**) é possível observar o início da reparação fisiológica da ulcera e a partir do 7º dia (**FIGURA 40**) esta lesão começa a ter sua resolução acentuada, porém ainda incompleta. Este fato foi bem visível no **grupo 3** (INTERVENÇÃO 1 – Desbridamento e Acompanhamento) onde foram visualizadas áreas hemorrágicas recobrando o desbridamento da radionecrose com uma pseudomembrana fibrinosa após 48 horas da eutanásia do camundongo, enquanto que a pseudomembrana fibrinosa já não está presente após 7 dias. Isto é esperado e já descrito na literatura [93] para o processo de reparação fisiológica de úlceras causada pela radiação.

A comparação histológica intergrupos nos trouxe dados relevantes. A começar, a radionecrose é caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear superficial além de uma pseudomembrana fibrinosa.

No **grupo 2** (CONTROLE 2 – Radiodermite) macroscopicamente a diferença entre radiodermite e a radionecrose do **grupo 1** (CONTROLE 1 – Radionecrose) foi evidente, pois os animais do **grupo 2** apresentaram uma lesão de menor intensidade necrótica, tanto em 48 horas e 7 dias, principalmente pela falta do tecido de recobrimento sobre a lesão, tendo a aparência úmida com leve descamação. Entretanto histologicamente não se notou diferença, sendo assim a radionecrose não precisa apresentar um tecido necrótico recobrindo a ulcera para ser caracterizada, e que a radiodermite e a radionecrose podem ser consideradas uma única lesão, diferentemente da classificação da **TABELA 5** [62] (**item 3.2.1.2**) o que nos leva a propor uma classificação para o modelo animal de radionecrose, pois nenhum camundongo apresentou sangramento espontâneo e até mesmo no momento do desbridamento da lesão (**TABELA 12**):

TABELA 12 – Classificação da proposta para modelo animal de radionecrose

Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
Eritema ou descamação seca	Eritema úmido e com bordas irregulares	Descamação úmida com bordas irregulares e sem padrão definido	Necrose da pele com ulceração da derme de espessura total

Ainda no **grupo 2**, o animal 20 (**FIGURA 41 A e B**) apresentou uma lesão ulcerada, de formato circular com bordos definidos, com recobrimento por um tecido necrótico, e edemaciado, localizada na porção ventral, próximo a vagina. Resultado

este proveniente da irradiação recebida. Este achado, apesar de ser um fato isolado e não presente nos outros 23 animais, deve se tornar objeto de estudos futuros.

O uso de matrizes dermo-epidérmicas (aloenxertos) para o tratamento de queimaduras já foi reportado [94], com resultados importantes, porém ainda com algumas ressalvas como a imunocompatibilidade entre o doador e receptor e a probabilidade de infecção bacteriana [95]. Estes problemas foram resolvidos com a adição de glicerol em altas concentrações que atua como descontaminante de tecidos biológicos em longo prazo, pois em concentrações acima 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 [87].

O intuito de se usar estas matrizes corrobora com a premissa de que queimaduras devem ser desbridadas e ocluídas o mais brevemente possível e a diferença entre enxerto de derme humana, com ou sem células, pode estar relacionada à sobrevivência destas células e ao fato destas secretarem sua própria matriz. [67]. Além disso, a presença de queratinócitos pode, por meio de fatores indutores, facilitar a migração de células do hospedeiro [96] além de que, o uso de ADSC pode promover uma neovascularização local [97,98], e se lembrarmos, a radionecrose é caracterizada principalmente pela hipóxia.

Os **grupos 5** (INTERVENÇÃO 3 – Desbridamento e Enxerto com o Substituto Dermo-Epidérmico) e no **grupo 4** (INTERVENÇÃO 2 – Desbridamento e Enxerto com Derme Acelularizada), a comparação intragrupos nos tempos de 48 horas e 7 dias, não apresentou diferenças significantes, e o resultado muito próximo dos outros grupos já citados. Porém algo que merece destaque foi que o enxerto da

derme acelularizada tanto quanto o enxerto do substituto dermo-epidérmico após 7 dias tinham uma adesão notória ao dorso do camundongo (**FIGURA 41 F, H, J e L**) com maior uniformidade ao enxerto com o substituto, o que faz todo o sentido, pois histologicamente podemos notar a maior penetração das células do hospedeiro no colágeno da derme do substituto. Este fato em si, nos mostra que a presença de células humanas, em dermes também humanas, quando enxertadas em camundongos *Nude* (Nu/Nu), não gera uma rejeição do hospedeiro, alias, pelo contrario, a presença de HK e ADSC favorece a integração deste tecido quando comparado com a enxertia da derme acelularizada. O uso da derme acelularizada como tratamento oclusivo de feridas já foi demonstrado anteriormente [67], contudo nunca antes testado para tratamento de radionecroses. Nossos resultados foram expressivos ao mostrar que o uso de dermes gliceroladas e acelularizada, irradiadas a 25 kGy possuem papel importante na resolução da lesão e, que a adição de HK e ADSC favorece uma resposta mais intensa do hospedeiro.

Terapias com ADSC para o tratamento de radionecroses já foi descrito anteriormente em um relato de caso onde uma paciente, após 40 anos do tratamento radioterápico fracionado de 50 Gy, para um carcinoma uterino, desenvolveu uma ulcera crônica. O tratamento consistiu em recobrimento da ulcera, após o desbridamento da área necrótica e fibrosa, com uma derme artificial (Terudermis[®]) povoada por ADSC, além de injeção nas margens da radionecrose. Após uma semana da retirada da derme artificial, foi borrifada uma solução contendo fator de crescimento angiogênico e fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF) e posteriormente recoberta com um adesivo não aderente oclusivo. Os resultados após 18 meses mostraram um tecido regenerado e durável [6]. A vantagem de se usar as ADSC em relação a outras formas de células-tronco é

sua fácil obtenção e principalmente seu potencial de síntese de fatores de crescimento e citocinas além do aumento da síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos [93].

A injeção de ADSC alógenas em comparação com células-tronco derivadas da medula óssea (CTMO) alógenas em camundongos que receberam aloenxertos mostrou que nos animais que receberam as ADSC, os aloenxertos tiveram uma significativa melhora em seu tempo de vida útil, o que não significa que houve integração do aloenxerto [99], e este dado em si, difere dos nossos resultados que evidenciaram a integração do aloenxerto tanto acelularizado como com a presença de HK e ADSC.

Para o desenvolvimento do modelo animal de radionecrose, enfrentamos algumas dificuldades durante sua execução, como a inserção do animal no suporte para camundongo e sua posição perpendicular à blindagem de chumbo, uma vez que, na posição horizontal não conseguimos assegurar a proteção do animal frente à radiação. Isto, de certa maneira, causa um desconforto ao mesmo, pois não é sua posição natural, o que nos fez aumentar a dose anestésica para diminuir este desconforto. Pensando nisso, com base em nossos resultados e baseado na literatura existente [89,90], foi proposta a criação de um irradiador com fontes colimadas de Cobalto-60 (**patente pendente sob o numero – BR 10 2012 026**) (**FIGURA 42 a 44**). O intuito da criação deste irradiador é a de ter um aparelho portátil, capaz de causar um ponto focal de radionecroses em animais de pequeno porte, sem que haja prejuízo nas funções vitais deste animal, podendo assim mimetizar os efeitos colaterais da radioterapia, e também, uma forma de tratamento a diferentes problemas encontrados em seres vivos, com inúmeras aplicações ainda não exploradas. O interessante deste equipamento é a combinação possível entre a

radiação emitida pelas fontes de Cobalto-60 e a relação com o tempo. Podemos por exemplo, diminuir o número de fontes expositoras de radiação, aumentar a atenuação das fontes com anteparos de chumbo e por fim o tempo de exposição do animal a radiação. Também é possível mudar a fonte expositora de radiação (Iridio, Iodo, etc), pois o sistema porta- fontes (**patente pendente sob o número – BR 10 2012 027**) suporta outros tipos de isótopos radioativos.

Ainda, por se tratar de um equipamento portátil e apoiado em carrinho de transporte adequado, ele pode ser movimentado em segurança, devido ao seu sistema de duplo cadeado em sua proteção adicional de chumbo sobre as fontes de Cobalto-60 e em seus tampos, evitando assim contaminação pelo operador. O sistema de duplo cadeado é idealizado para que uma das chaves fique sempre com o serviço de proteção radiológica, enquanto que a outra chave fique de posse do operador do equipamento. Assim, caso ocorra algum problema com o experimento envolvendo o equipamento, este só será resolvido com a presença do serviço de proteção radiológica.

Outro ponto interessante é o sistema de suporte do animal (**patente pendente sob o número – BR 10 2012 028**) (**FIGURA 45**). Este suporte possui uma espécie de trilho que se encaixa perfeitamente no recorte feito em um dos tampos, evitando a entrada acidental do animal e também uma forma de garantir que o ponto focal colimado da radiação seja exatamente no local pré-determinado assim como seus dois sistemas independentes de regulagens distintas, localizados em cada extremidade do equipamento, que funcionam como uma prensa, que tem a função de imobilizar o animal no local desejado.

7 CONCLUSÃO

Foi possível obter um modelo animal de radionecrose cutânea em camundongos *Nude* (Nu/Nu) onde foram testadas diferentes formas de intervenção para sua resolução, com as etapas abaixo descritas:

- O protótipo de suporte para camundongo foi criado com sucesso, sendo possível a imobilização do animal sem ablação de parte de seu organismo, com a possibilidade da pele de seu dorso ser distendida, fixada e exposta diretamente à radiação;
- Por meio da dosimetria realizada no irradiador panorâmico, foi possível criar um arranjo com blocos de chumbo, que foi capaz de limitar a dose absorvida pelo camundongo *Nude* (Nu/Nu), expondo somente a pele distendida e fixada de seu dorso à radiação gama;
- A dose de 86,8 Gy foi definida como a capaz de produzir uma radionecrose na pele do dorso do camundongo *Nude* (Nu/Nu), sem que houvesse prejuízos significativos ao metabolismo do animal e seu ápice ocorreu após aproximadamente 14 dias;
- A radionecrose tecidual tem sua máxima atividade no 14º dia e sua remissão por completo após 35 dias, sem intervenção;
- Para este modelo animal criado, histologicamente não há diferenças entre a radiodermite e a radionecrose, sendo que ambas ocorrem concomitantemente;

- A derme acelularizada irradiada a 25 kGy mostrou melhores resultados, em análises histológicas, quando comparada a derme acelularizada irradiada a 50 kGy;
- A padronização na quantidade de células, por meio de análises histológicas e de imunohistoquímica, evidenciou que com o uso de 600.000 células de HK + ADSC na derme irradiada a 25 kGy houve uma melhor organização celular em relação a outras quantidades testadas;
- Por meio de análises histológicas, o desbridamento concomitante com o tratamento oclusivo apresentou melhores condições de reparação tecidual;
- Por meio de análises histológicas do substituto dermo-epidérmico, utilizado como tratamento oclusivo, evidenciou-se uma maior integração das células inflamatórias do hospedeiro em sua trama de colágeno, em relação a derme acelularizada, o que nos permite inferir que a presença de células no substituto, media a integração do enxerto no animal.

8 REFERENCIAS

- 1 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- 2 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2013.
- 3 SCAFF, L.A.M. Física da Radioterapia, Ed Sarvier, 1º Ed. São Paulo, Brasil, 1997
- 4 PELISSER, A.; VIER-PELISSER, F.B., FONTANELLA, V.R.C., DE FIGUEIREDO, M.A.Z. Análise Microscópica do Efeito da Radioterapia Fracionada por Cobalto-60 em Mandíbula de Rato. Radiol Bras Vol. 40, n. 2, p. 113-118, 2007.
- 5 BARROS, P.B.; LEAL, P.R.A. Ulceras Complexas por Radioneclrose - Fisiopatologia, Diagnóstico e Tratamento. Rev. Soe. Bras. Cir. Plást. Vol. 18, n. 3, p. 17-26 set/dez. 2003.
- 6 AKITA S., AKINO K, HIRANO A, OHTSURU A, YAMASHITA S: Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. Stem Cells Int, Vol. 2010, p. 532704, 2010.
- 7 ASHAMALLA, H.L.; THOM, S.R.; GOLDWEIN, J.W. Hyperbaric oxygen therapy for the treatment of radiation-induced sequelae in children. Cancer. Jun Vol. 77, n. 11, p. 2407-12, Jun., 1996.
- 8 GIERINGER, M.; GOSEPATH, J.; NAIM, R. Radiotherapy and wound healing: Principles, management and prospects (Review). Oncology Reports Vol. 26: p. 299-307, 2011
- 9 KÖSTLER, W.J.; HEJNA, M.; WENZEL, C.; ZIELINSKI, C.C. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: Options for prevention and treatment. CA Cancer J Clin. Vol. 51, p. 290–315, 2001.
- 10 BENSADOUN, R.J.; MAGNÉ, N.; MARCY, P.Y.; DEMARD, F. Chemotherapy and radiotherapy induced mucositis in head and neck cancer patients: New trends in pathophysiology, prevention and treatment. Eur Arch Otorhinolaryngol. Vol. 258, p. 481-487, 2001.
- 11 EPSTEIN, J.; VAN DER MEIJ, E.; MCKENZIE, M.; WONG, F.; LEPAWSKY, M.; STEVENSON-MOORE, P. Postradiation osteonecrosis of the mandible. A long-term follow-up study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Vol. 83, p. 657-62, 1997.
- 12 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.

-
- 13 LEE, K.H. Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application. *Yonsei Med. J.*, Vol. 41, p. 774-779, 2000.
- 14 ANDREW, B.; LAM, P.K.; LAU, H. Allogenic skin: transplant or dressing? *Burns*, Vol. 28, p. 358-366, 2002.
- 15 LAROCCA, R.A.; MORAES-VIEIRA, P.M.; BASSI, E.J.; SEMEDO, P.; DE ALMEIDA, D.C.; DA SILVA, M.B.; THORNLEY, T.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N.O. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response. *PLoS One*. Vol. 4, N. 8 Out (10), e76396, 2013.
- 16 SHRIDHARANI, S.M.; WANG, H.D.; SINGH, N.K. Liposuction. *Eplasty*. Vol. 13:ic4, 2013. Epub Jan 15, 2013.
- 17 MOSCA, R.C.; ISAAC, C.; MATHOR, M.B. The Mesenchymal Stem Cells Bioengineered Tissue Using Cobalt-60 Radiation. *Anais 2012 Stem Cells, Cell Culture and Circulating Tumor Cells Conferences*, 2012.
- 18 LU, W.; YU, J.; ZHANG, Y.; JI, K.; ZHOU, Y.; LI, Y.; DENG, Z.; JIN, Y. Mixture of fibroblasts and adipose tissue-derived stem cells can improve epidermal morphogenesis of tissue-engineered skin. *Cells Tissues Organs*. Vol. 195, n. 3, p. 197-206, 2012 Epub Abr 15, 2011.
- 19 KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, Vol. 12, n. 4, p. 390-401, Jul/Aug., 2002.
- 20 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 528p., 2008.
- 21 QUERLEUX, B.; BALDEWECK, T.; DIRIDOLLOU, S.; DE RIGAL, J.; HUGUET, E.; LEROY, F.; HOLLOWAY BARBOSA, V. Skin from various ethnic origins and aging: an in vivo cross-sectional multimodality imaging study. *Skin Res Technol*. Vol. 15, n. 3, p. 306-13, Aug., 2009.
- 22 QUERLEUX, B.; RICHARD, S.; BITTOUN, J.; JOLIVET, O.; IDY-PERETTI, I.; BAZIN, R.; LÉVÊQUE, J.L. In vivo hydration profile in skin layers by high-resolution magnetic resonance imaging. *Skin Pharmacol*. Vol. 7, n. 4, p. 210-6, 1994.
- 23 GUNIN, A. Atlas of histological images. <http://www.histol.chuvashia.com/tab-en/000-en.htm>. acessado em maio de 2010.
- 24 BURTON, J.L. *Essentials of Dermatology*. 3rd Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone p.57- 63, 1990.
- 25 RABE, J.H.; MAMELAK, A.J.; MCELGUNN, P.J.S.; MORISON, W.L.; SAUDER, D.N. Photoaging: mechanisms and repair. *JAAD* Vol. 55, n. 1, p. 1-19, July, 2006.
- 26 GARDERET, L.; CAO, H.; SALAMERO, J.; VERGE, V.; TISSERAND, E.; SCHOLL, S.; GORIN, N.C.; LOPEZ, M. In vitro production of dendritic cells from human blood monocytes for therapeutic use. *J Hematother Stem Cell Res* Vol. 10, p. 553-567, 2001.

-
- 27 STEINMAN, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* Vol. 9, p. 271-296, 1991.
- 28 BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* Vol. 392, p.245-252, 1998.
- 29 AMADEU, T.P.; COULOMB, B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A.M. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds*. Vol. 2, n. 2, p. 60-8, Jun, 2003.
- 30 PAGNANO, L.O.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R.; SANTOS, E.; OLIVEIRA, D.; LUI, J.F. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. *Ciência Rural* Vol. 38, n. 6, p. 1662-1666, Set, 2008.
- 31 HARRIS, M.I.N.C. *Pele – Estrutura, propriedades e envelhecimento*. 2ª Ed., São Paulo: Editora SENAC, p. 220, 2003.
- 32 USHIKI, T. Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint. *Arch. Histol. Cytol.* Vol. 65, n. 2, p. 109-126, 2002.
- 33 KUHN, K. Structure and biochemistry of collagen. *Aesth Plast Surg*. Vol. .13, n. 9, p. 141, 1988.
- 34 WEBER, L.; MEIGEL, W.N.; SPIER, W. Collagen polymorphism in pathologic human scars. *Arch Dermatol Res*. Vol. 15, n. 16(1) Fev., p.:63-71, 1978.
- 35 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.
- 36 PINTO FILHO, S.T.L.; EILERS TREICHEL, T.L.E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J.S.; MAURICIO BORGES DA ROSA, M.B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M.V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N.L. Células-Tronco mesenquimais adultas: Características e aplicações experimentais em animais. *Vet. e Zootec*. Vol. 20 (Edição Comemorativa), p. 49-59, 2013.
- 37 AHRARI, I.; ZARANDI, N.P.; MAHARLOOEI, M.K.; MONABATI, A.; ATTARI, A.; AHRARI, S. Adipose Tissue Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Can Be Isolated Using Serum-free Media. *Iran Red Crescent Med J*. Vol. 15, n. 4 Abr., p. 324-9, 2013. Epub 5 Abr., 2013.
- 38 MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; CARLO, R.J.D. Células-tronco mesenquimais, *Cienc. Rural* Vol.40, n. 1, Santa Maria Jan./Fev., 2010.
- 39 ROSA, R.A. *Electrospinning de emulsão para a produção de matrizes de nanofibras como uma estratégia para o cultivo de células-tronco e incorporação de fatores de crescimento*. Tese apresentada para obtenção do título de mestre em ciências dos materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, 2012.
- 40 American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures*, 2007.

-
- 41 SALVAJOLI, J.V.; SOUHAMI, L.; FARIA, S.L. Radioterapia em oncologia. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica Ltda., 1999.
- 42 FRIGATO, S.; HOGA, L.A.K. Assistência à mulher com câncer de colo uterino: o papel da enfermagem. Revista Brasileira de Cancerologia, Vol. 49, n. 4, p. 209-214, 2003.
- 43 BARBOSA, M.B.A. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. Instituto Nacional de Câncer. – 3ª Ed., Rio de Janeiro: INCA, 2008.
- 44 PODGORSK, E.B. Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students. IAEA Library Cataloguing in Publication Data, Austria, 2005.
- 45 CASTRO, R.C. Cálculo de Dose Equivalente em órgãos de pacientes devido a fotonêutrons gerados em Aceleradores Lineares Clínicos. Dissertação de Mestrado na área de Engenharia Nuclear - UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.
- 46 International Commission on Radiological Protection, Target Volumes in Radiation Oncology, 1993.
- 47 THWAITES, D.; SCALLIET, P.; LEER, JW.; Overgaard, J. Quality assurance in radiotherapy. European Society for Therapeutic Radiology and Oncology Advisory Report to the Commission of the European Union for the 'Europe Against Cancer Programme. Radiother Oncol. Vol. 35, n. 1, p. 61-73, Abr., 1995.
- 48 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TEC DOC - 1151: aspectos físicos da garantia da qualidade em radioterapia. Rio de Janeiro: INCA, 2000.
- 49 Commissioning and Quality Assurance of Computerized Planning Systems for Radiation Treatment of Cancer – Vienna: International Atomic Energy Agency, 2004.
- 50 SIMÃO, E.M. Implantação de uma metodologia para controle de qualidade em sistemas de planejamento computadorizados usados em radioterapia. Dissertação de Mestrado na área de Física - UFS, Sergipe, 2008.
- 51 TAUHATA, L.; SALATI, IPA.; DI PRINZIO, R.; DI PRINZIO, A. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. Instituto de Radioproteção e Dosimetria / Comissão Nacional de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 5ª Ed. Agosto, 2003.
- 52 NOUAILHETAS, Y.; ALMEIDA, C.E.B.; PESTANA, S. Radiações ionizantes e a vida. Apostila Educativa, Rio de Janeiro, CNEN, www.cnen.gov.br.
- 53 KNOLL, G.F. Radiation Detection and Measurement. 3rd Ed. John Wiley & Sons Inc., New York, 2000.
- 54 International Commission on Radiological Protection. Basis for Dosimetric Quantities Used in Radiological Protection, 2005

-
- 55 NOVAES, P.E.R.S. RADIOTERAPIA. In: BRENTANI, M.M.; COELHO, F.R.G.; IYEYASU, H.; KOWALSKI, L.P. Bases da oncologia. 1a Ed. São Paulo: Ed. Marina, 1998.
- 56 JHAM, B.C.; FREIRE, A.R.S. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. Rev Bras Otorrinolaringol. Vol.72, n. 5, p. 704-8, 2006.
- 57 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.
- 58 COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th Ed. W. B. Saunders Company, 1999.
- 59 DENMAN, P.K.; MCELWAIN, D.L.; HARKIN, D.G.; UPTON, Z. Mathematical modelling of aerosolised skin grafts incorporating keratinocyte clonal subtypes. Bull Math Biol. Vol. 69, n. 1, p. 157-79, 2007, Epub 20 Oct 2006.
- 60 WAGHMARE, C.M. Radiation burn-from mechanism to management. Burns. Vol. 29, n. 2, p. 212-9, Mar, 2013, Epub 23 Oct 2012.
- 61 KOENIG, T.R.; WOLFF, D.; METTLER, F.A.; WAGNER, L.K. Skin injuries from fluoroscopically guided procedures: part 1, characteristics of radiation injury. AJR Am J Roentgenol. Vol. 177, n. 1, p. 3-11, 2001.
- 62 BERNIER, J.; BONNER, J.; VERMORKEN, J.B.; BENSADOUN, R.J.; DUMMER, R.; GIRALT, J.; KORNEK, G.; HARTLEY, A.; MESIA, R.; ROBERT, C.; SEGAERT, S.; ANG, K.K. Consensus guidelines for the management of radiation dermatitis and coexisting acne-like rash in patients receiving radiotherapy plus EGFR inhibitors for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. Ann Oncol. Vol. 19, n. 1, p. 142-9, Jan. 2008,. Epub 4 Sep 2007.
- 63 SCIUBBA, J.J.; GOLDENBERG, D. Oral complications of radiotherapy. Lancet Oncol. Vol. 7, p. 175–83, 2006.
- 64 ROSEN, L.S.; ABDI, E.; DAVIS, I.D.; GUTHEIL, J.; SCHNELL, F.M.; ZALCBERG, J.; CESANO, A.; GAYKO, U.; CHEN, M.G.; CLARKE, S. Palifermin reduces the incidence of oral mucositis in patients with metastatic colorectal cancer treated with fluorouracil-based chemotherapy. J Clin Oncol. Vol. 25, n. 9, e24-5, Jul., 2007.
- 65 HERDON, D.N. Perspectives in the use of allograft. Burn Care & Rehabilitation, Vol. 18,. Suplemento 6, 1997.
- 66 Centro Cochrane do Brasil. Materiais Substitutivos de pele para o tratamento de queimaduras, 2005.
- 67 BRINGEL, F.A. Avaliação morfofuncional de pele humana conservada em glicerol e submetida à radiação gama: estudo em camundongos *Nude* (Nu/Nu). Tese apresentada para obtenção de título de doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações IPEN/CNEN – USP, 2011.

68 SCHECHTMAN, L.M. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. *ILAR Journal*, Vol. 43, suppl., p.S85-S94, 2002.

69 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*, Vol. 15, n. 2, p. 149, 1987.

70 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.*, Vol. 26, p. 23-26, 1991.

71 MIZOGUCHI, A.; MIZOGUCHI, E.; SMITH, R.N.; PREFFER, F.I.; BHAN, A.K. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med* Vol. 186, n. 10, p. 1749-56, 1997.

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

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

74 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.*, Vol. 291, p. 591–599, 1999.

75 PAINTER, J.T.; CLAYTON, N.P.; HERBERT, R.A. Useful Immunohistochemical Markers of Tumor Differentiation. *Toxicol Pathol* January 2010 Vol. 38, n. 1, p. 131-141.

76 TSENG, S.C.G.; JARVINEN, M.J.; NELSON, W.G.; HUANG, J.W.; WOODCOCK-MITCHELL, J.; SUN, T.T.L. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: Monoclonal antibody studies. *Cell* Vol. 30, n. 2, p. 361-72, 1982.

77 WOODCOCK-MITCHELL, J.; EICHNER, R.; NELSON, W.G.; SUN, T.T. Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* Vol. 95, n. 2 Pt 1, p. 580-8, 1982.

78 BACARELLI, J.C. Imuno-Histoquímica: aplicações em patologia oral. *Revista de Ciências Médicas - PUCCAMP*, Vol. 4, n. 2, p. 66-70, maio/agosto, 1995.

79 FERREIRA, D.C. Dosimetria de processos de irradiação gama com diodos comerciais de silício. Dissertação de Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Aplicações, IPEN-CNEN / USP, 2009.

80 KLINGBEIL, M.F.G. Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primaria de queratinócitos bucais humanos. Dissertação de Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Aplicações, IPEN-CNEN / USP, 2006.

81 RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. Vol. 6, n. 3, p. 331-43, nov., 1975.

82 RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Serial cultivation of human epidermal keratinizing colonies from single cells. *Cell*, Vol. 6, p. 331-344, 1975b.

83 RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* Vol. 265, n. 3, p.421-424, Fev. 1977.

84 HERSON, M.R.; MATHOR, M.B.; ALTRAN, S.; CAPELOZZI, V.L.; FERREIRA, M.C. *In vitro* construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. *Artif Organs*. Vol. 25, n. 11, p. 901-6, Nov. 2001.

85 SUNTHARALINGAM, M. Principles and complications of radiation therapy. In. *Oral Cancer: the dentist's role in diagnosis, management, rehabilitation and prevention*. Ord, R.A; Blanchaert R.H. p.111-122. Chicago, IL. Quintessence, 2000.

86 KEROB, D.; KOLB, F.; MARGULIS, A.; MAMELLE, G.; SPATZ, A.; IBRAHIM, M.; AVRIL, M.F. Delayed cerebral radionecrosis following radiation therapy of cutaneous squamous cell carcinomas of the head. *Ann Dermatol Venereol*. Vol. 129, n. 1 (Parte 1), p. 41-5, Jan. 2002.

87 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.

88 MOSCA, R.C.; FERREIRA, C.D.; NAPOLITANO, C.M.; MATHOR, M.B. An Athymic Mouse Model to Mimic Cobalt-60 Cutaneous Radiation Injury. *Anais VIII Congresso Internacional da Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares - SBBN 2012*

89 RIFKIN, L.H.; STOJADINOVIC, S.; STEWART, C.H.; SONG, K.H.; MAXTED, M.C.; BELL, M.H.; KASHEFI, N.S.; SPEISER, M.P.; SAINT-CYR, M.; STORY, M.D.; ROHRICH, R.J.; BROWN, S.A.; SOLBERG, T.D. An athymic rat model of cutaneous radiation injury designed to study human tissue-based wound therapy. *Radiat Oncol*. Vol. 8., N. 7 Maio, p. 68, 2012.

90 RAN, X.; CHENG, T.; LIN, Y.; QU, J.; LIU, D.; AI, G.; YAN, G.; WANG, W.; XU, R. Dose-effect relationships in total body irradiation on the healing of cutaneous wounds. *Chin Med J (Engl)*. Vol. 116, n. 6, p. 878-882, 2003.

91 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.

92 REUTHER, T.; SCHUSTER, T.; MENDE, U.; KÜBLER, A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients--a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. Vol. 32, n. 3 Jun., p. 289-95, 2003.

93 HAUBNER, F.; OHMANN, E.; POHL, F.; STRUTZ, J.; GASSNER, H.G. Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Radiat Oncol*. Vol. 24, n. 7 Set., p. 162, 2012.

94 BUSHMANOV, A.I.U.; EREMIN, I.I.; MOROZ, B.B.; GALSTIAN, I.A.; NADEZHINA, N.M.; SLOBODINA, T.S.; GRINAKOVSKAIA, O.S. Experience of contemporary treatment of radiation burns in individuals subjected to ionizing radiation. *Med Tr Prom Ekol*. Vol. 10, p. 20-7, 2012.

95 LEON-VILLAPALOS, J.; ELDARDIRI, M.; DZIEWULSKI, P. The use of human deceased donor skin allograft in burn care. *Cell Tissue Bank*. Vol. 11, n. 1 Fev., p. 99-104, 2010. Epub 15 Jan 2010.

96 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.*, Vol. 291, p. 591–599, 1999.

97 MIRANVILLE, A.; HEESCHEN, C.; SENGÈS, C.; CURAT, C.A.; BUSSE, R.; BOULOUMIÉ, A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* Vol. 110, p. 349–355, 2004.

98 HEBERT, T.L.; WU, X.; YU, G.; GOH, B.C.; HALVORSEN, Y.D.; WANG, Z.; MORO, C.; GIMBLE, J.M. Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adipose-derived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. *J Tissue Eng Regen Med* Vol. 3: p. 553–561, 2009.

99 LATAILLADE, J.J.; BEY, E.; THEPENIER, C.; PRAT, M.; LECLERC, T.; BARGUES, L. Skin engineering for burns treatment. *Bull Acad Natl Med*. Vol. 194, n. 7 Out., p. 1339-51, 2010.

ANEXO 1**Parecer - Projeto N° 052/10 - CEPA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"CONSTRUÇÃO DE EQUIVALENTE MUCOSO ORAL"** 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 deve ser encaminhada a este CEPA .

São Paulo, 26 de janeiro de 2010

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

ANEXO 2**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/008/11

11 de janeiro de 2011.

Prezado pesquisador e orientadora,

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, em seu Ofício CONEP/CNS/MS n.º 3647, de 29/11/2010, em anexo, devolveu o protocolo de pesquisa n.º 2055, intitulado "CONSTRUÇÃO DE EQUIVALENTE MUCOSO ORAL", sob responsabilidade do pesquisador **Rodrigo Crespo Mosca** e orientação da Dra. **Monica Beatriz Mathor**, considerando, de acordo com o entendimento do item VIII.4 da Resolução CNS 196/96, que o protocolo de pesquisa dispensaria a apreciação da CONEP devido ao seu não enquadramento a áreas temáticas especiais (conforme registrado em sua folha de rosto), pertencendo assim, ao **grupo III**, cuja aprovação ética é delegada a este Comitê de Ética em Pesquisa.

Portanto, em aditamento ao Ofício n.º 263/10, informo que o protocolo de pesquisa supramencionado foi **analisado e aprovado na 7ª/10 Sessão Ordinária do COEP**, realizada em 3/9/2010, não sendo necessária sua avaliação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Cabe lembrar que, em consonância com a Resolução CNS 196/96, são deveres do pesquisador: 1. Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; 2. Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; 3. Comunicar formalmente a este Comitê quando houver o encerramento da pesquisa; 4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; 5. Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Claudio Leone

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilma. Sra.

Dra. **Monica Beatriz Mathor**

Centro de Tecnologia das Radiações - CTR

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